



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Fábio Santiago Figueredo

Avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis

Rio de Janeiro

2018

Fábio Santiago Figueredo

Avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Helena Faria de Souza Ornellas

Coorientadora: Prof.^a Dra. Gilda Alves Brown

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F475 Figueiredo, Fábio Santiago.

Avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis / Fábio Santiago Figueiredo – 2018.

119 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Helena Faria de Souza Ornellas

Coorientadora: Prof.^a Dra. Gilda Alves Brown

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Doenças profissionais - Teses. 2. Polimorfismo. 3. Posto de combustível. 4. Benzeno. 5. Xilenos. 6. Tolueno. 7. Saúde do trabalhador. 8. Fatores de risco. I. Ornellas, Maria Helena Faria de Souza. II. Brown, Gilda Alves. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-057

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 - 5302

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fábio Santiago Figueredo

Avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de setembro de 2018.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Gilda Alves Brown
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Maria Helena Faria de Souza Ornellas (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Sandra Regina Boiça da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ubirani Barros Otero
Instituto Nacional de Câncer

Prof. Dra. Thaís Porto Amadeu
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Juan Clinton Llerena Junior
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eduardo e Marilene, pelo amor, carinho, apoio e confiança.

À toda a minha família e amigos, que são os mais especiais de todos.

À UERJ, minha segunda casa há 10 anos.

À minha orientadora e segunda mãe Prof.^a Dra. Maria Helena Ornellas, pela oportunidade, apoio e confiança.

À minha co-orientadora Dra. Gilda Alves pelas valiosas correções e direcionamento desse estudo.

A todos os amigos do Departamento de Patologia e Laboratórios-UERJ, pela ajuda e pela amizade.

À Friedrich Schiller University (Alemanha, Jena), pela estrutura cedida.

Ao amigo Prof. Dr. Thomas Liehr pela participação no estudo e pela orientação na Friedrich Schiller University.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e pelas sugestões, comentários e críticas que com toda certeza em muito contribuirão para o enriquecimento desse trabalho.

Aos trabalhadores dos postos de gasolina e que aceitaram fazer parte desse estudo.

A vida é aquilo que acontece enquanto fazemos planos para o futuro.

John Lennon

RESUMO

Figueredo, Fábio Santiago. **Avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis.** 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são compostos aromáticos usados como solventes de combustíveis, que são reconhecidamente tóxicos e carcinogênicos. Trabalhadores dos postos de combustíveis são expostos cronicamente a essas substâncias químicas. A susceptibilidade individual desses trabalhadores, assim como os efeitos precoces dessa exposição são discutidos em três artigos, como a seguir: Artigo 1- A frequência das alterações nos cromossomos (ACs) dos linfócitos do sangue periférico é considerado um biomarcador de efeito precoce, sendo importante na prevenção de doenças oncológicas ocupacionais. Foram avaliados 60 trabalhadores pela técnica de FISH, aplicando-a nos cromossomos 1, 2 e 4, além de exames laboratoriais, avaliação médica e sociodemográfica. Encontramos uma população jovem (mediana: 36 anos), contudo com um longo período de exposição (mediana 16 anos) e uma alta frequência populacional de ACs (9.3/1000 metafases). Dos trabalhadores, 16,6% (10/60) apresentaram mais de 10 alterações por 1000 metafases, sendo as translocações, a mais frequente (43,6%). A análise estatística revelou uma diferença significativa na cor da pele ($P = 0,002$). Portanto, é altamente provável que a frequência elevada de ACs esteja correlacionada com a exposição ocupacional aos BTEX. Artigo 2- Relatamos os casos de duas mulheres, trabalhadoras de posto de combustíveis, com sintomas de intoxicação por BTEX e relatos de abortos. Em ambos os casos foram identificados rearranjos complexos nos cromossomos pela técnica de FISH (caso 1: 46,XX,der(1)t(1;4),der(4)t(1;4;?),ace(1),ace(1); caso 2- der(4)ins(2;4)). Foi encontrado ainda um tipo raro de células NK (NK^{bright}) no sangue periférico destas trabalhadoras. Assim, este foi o primeiro estudo a sugerir uma possível relação causal entre a depleção do efeito de citotoxicidade das células NK, aborto no primeiro trimestre e rearranjos complexos nos cromossomos. Artigo 3 - Artigo caso-controle em que foram avaliados 114 trabalhadores e 115 controles, utilizando-se dois tipos de biomarcadores: um de efeito precoce (ACs pela técnica de FISH) e outros de susceptibilidade (genotipagem dos polimorfismos *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R* e *CHEK2/T470C*). Encontramos uma frequência elevada de ACs (9,8 ACs/1.000). Dos trabalhadores, 19,1% apresentaram um número elevado de ACs. Foi observado, também, nos trabalhadores com frequências elevadas de ACs (grupo 2) uma maior proporção de mulheres ($P = 0,035$), baixos níveis de monócitos ($P = 0,024$), assim como a não confiança no fornecimento automático de combustível ($P = 0,027$). A presença do polimorfismo *RAD51 / G135C* ($P = 0,011$) foi associada aos trabalhadores quando comparado aos controles, e também ao número de ACs por trabalhador ($P = 0,008$). A especificidade *RAD51 / G135C* para detectar trabalhadores com ACs foi de 87%, enquanto 79% para *ATM/P1054R*. Nenhuma variante de alelos foi encontrada para *CHEK2/T470C*. Desta forma o polimorfismo *RAD51/G135C* é um promissor marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer.

Palavras-chave: Benzeno, Tolueno. Xilenos. Metilbenzeno. Postos de combustíveis.
Alterações nos cromossomos. Polimorfismo.

ABSTRACT

Figueredo, Fabio Santiago. **Assessment of the effects of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) exposure on the genome of gas station workers.** 2018. 119 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) are aromatic compounds used as fuel solvents, which are known to be toxic and carcinogenic. Gas station workers (GSWs) are chronically exposed to these chemicals, which are volatiles and solubles. The individual susceptibility of GSWs and the early effects of this exposure are discussed in three papers, summarized as follows: Article 1. The frequency of chromosome alterations (CAs) of peripheral blood lymphocytes is considered a biomarker of early effect, being important in the prevention of occupational oncologic diseases. We evaluated 60 GSWs through the FISH technique, applying it to chromosomes 1, 2, and 4; in addition, blood exams and medical and socio-demographic evaluation were performed. We found a young population (median: 36 years) but with a long period of exposure time (median 16 years) and a high population frequency of CAs (9.3 / 1000 metaphases). Of the workers 16.6% (10/60) had a high number of CAs (> 10 CAs per 1000 metaphases), and translocations were the most common CAs (43.6%). Statistical analysis revealed a significant difference in skin color ($P = 0.002$). Therefore, more studies are needed to better characterize the damage associated with the genome of these workers. Article 2. We report the cases of two women with symptoms of BTEX intoxication and abortions reports. In both cases, complex chromosome rearrangements (CCRs) were identified applying the FISH technique (case 1- 46,XX, der(1) t(1;4), der(4)t(1;4;?), ace(1), ace(1); case 2 -der(4)ins(2;4)). A rare type of NK cells (NK^{bright}) was also found in the peripheral blood of these workers. Thus, this was the first study to suggest a possible causal relationship between depletion of the NK cell cytotoxicity function, first trimester miscarriage, and CCRs. Article 3. Case-control study in which 114 workers and 115 controls were evaluated, using two types of biomarkers: one with an early effect (CAs through FISH technique) and the other with susceptibility (genotyping of *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R*, and *CHEK2/T470C* polymorphisms). Medical and sociodemographic evaluation was also applied. A high frequency of ACs (9.8 CAs / 1,000) was observed. Of the workers 19.1% had a high number of CAs. Also, a high number of women ($p = 0.035$) and lower monocyte levels in blood exams ($P = 0.024$), as well as “untrust in automatic fuel supply” ($P = 0.027$) were observed in the group with the highest number of CAs (group 2). The presence of *RAD51 / G135C* polymorphism was associated with GSWs when compared to the controls ($P = 0.011$), and to the number of CAs per worker ($P = 0.008$). The specificity of *RAD51/G135C* to detect workers with CAs was 87%, while that of *ATM/ P1054R* was 79%. No allele variant was found for *CHEK2 / T470C*. Thus, the *RAD51 / G135C* polymorphism is promising marker of susceptibility to the development of cancer to apply in GSW monitoring.

Keywords: Workers. Cytogenetic. Polymorphism. Benzene. Toluene. Xylenes. Etilbenzeno.
Gas Station.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1–	Fórmulas moleculares do benzeno, xilenos, tolueno e etilbenzeno.....	15
Tabela 1 -	Especificações para o benzeno na gasolina	18
Tabela 2 -	Principais sinais e sintomas relacionados à exposição ao benzeno	20
Figura 2 –	Etapas químicas da metabolização do benzeno no organismo.....	24
Figura 3 –	Dano no DNA, mecanismos de reparo e consequências celulares.....	27
Figura 4 –	Reparo do DNA (recombinação homóloga), em destaque a função do gene RAD51 e ATM.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	<i>Altrações nos cromossomos</i>
Ace	<i>Acentric fragment</i>
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ATM	<i>Ataxia-telangiectasia Mutated Gene</i>
BTEX	Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CHEK2	<i>Cell Cycle Checkpoint Kinase 2</i>
Chrb	<i>Chromosome Break</i>
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
CRD	Capacidade de Reparo de DNA
DEAC	<i>7-Diethylaminocoumarin-3-carboxylic acid</i>
del	<i>Deletion</i>
der	<i>Chromosome derived</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSBR	Double Strand Break Repair
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FAN	Fator anti-nuclear
FECOMBUSTIVEIS	Federação Nacional do Comércio de Combustíveis e de Lubrificantes
FENEPOSPETRO	Federação Nacional dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FIT C	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
LDH	Lactato Desidrogenase
LMA	Leucemia mieloide aguda
MS	Ministério da Saúde

P	Braço curto do cromossomo
Pb	Par de bases nitrogenadas
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RAD51	Gene de recombinação homólogo à RecA da E.coli
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (meio de cultura celular)
SINPOSPETRO	Sindicatos dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
SpO	<i>Spectrum Orange</i>
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate buffer</i>
T	Translocação
TGO	Transaminase glutâmico oxalacético

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplificação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa
M	Molaridade
mg	Miligram
mL	Mililitro
μL	Microlitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	JUSTIFICATIVA	34
2	OBJETIVOS	35
2.1	Geral	35
2.2	Específico	35
3	ARTIGOS	36
3.1	Artigo 1- Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting (Artigo publicado)	36
3.2	Artigo 2- Benzene poisoning, clinical and blood abnormalities in two Brazilian female gas station attendants: two case reports. (Artigo publicado)	45
3.3	Artigo 3- Cytogenomic biomonitoring in gas station workers for their susceptibility to occupational cancer. (Manuscrito)	50
	CONCLUSÕES	83
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética	91
	ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo 3.....	95
	ANEXO C - Questionário individual.....	96
	ANEXO D - Questionário clínico.....	105
	ANEXO E - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	116

INTRODUÇÃO

No Brasil, trabalhadores de postos de gasolina, conhecidos como frentistas, são cronicamente expostos a vapores dos combustíveis, que contém conhecidos agentes tóxicos e potencialmente cancerígenos, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). Na maioria dos países desenvolvidos, ao contrário do que ocorre no Brasil, a manipulação da bomba de combustível é feita pelo próprio usuário no momento do abastecimento reduzindo a exposição ocupacional. Estima-se que a exposição ocupacional relacionada a postos de combustíveis atinga mais de 500.000 trabalhadores, em 40.000 postos revendedores de combustíveis em todo o país (FENEPOSPETRO, 2018; FECOMBUSTIVEIS, 2018). O setor de comercialização de combustíveis apresenta um faturamento anual de quase R\$ 200 bilhões, o que corresponde à 6,3% do produto interno bruto do Brasil. Trata-se de um dos segmentos da economia que mais arrecada tributos estaduais e federal, chegando à ordem de R\$ 60 bilhões por ano (FECOMBUSTIVEIS, 2018).

Desde 2016, o Ministério do Trabalho com a portaria nº 1.109, popularmente conhecida como “Portaria do Benzeno”, prevê a implementação de novas normas para segurança e saúde do trabalhador nos postos de combustíveis, com a finalidade de reduzir a exposição ocupacional destes aos efeitos do benzeno (DOU, portaria 1109/2016). Dentre os avanços, destacam-se: i) obrigatoriedade de informar ao trabalhador sobre os riscos relacionados à exposição ao benzeno; ii) proibição de flanelas e tecidos similares para contenção de respingos e extravasamentos de combustíveis; iii) implementação de bicos automáticos nas bombas de combustíveis líquidos, contendo benzeno; iv) instalação de sistema de recuperação de vapores. Apesar dos avanços conseguidos com a “Portaria do Benzeno” o mesmo estipula prazos considerados longos para implementação das normativas de segurança pelos postos de combustíveis, algumas a serem cumpridos em até 15 anos.

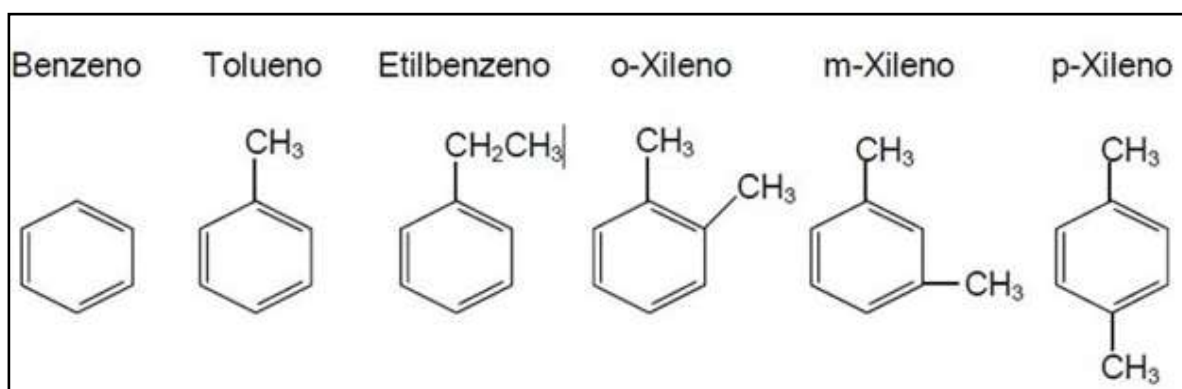
A “Portaria do Benzeno” também preconiza o hemograma completo com contagem de plaquetas e reticulócitos, a cada seis meses e organizados em série histórica, como sendo um dos principais mecanismos de monitoramento desses trabalhadores. Desta forma, destacamos ainda, que não foram consideradas as susceptibilidades individuais dos trabalhadores, de forma a realizar e promover mecanismos de proteção a subgrupos mais vulneráveis e nem a

implementação de biomarcadores considerados mais eficazes na monitorização da exposição ao trabalhador. A avaliação dos efeitos da exposição aos BTEX no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis se faz relevante, de forma a delimitar subgrupos de trabalhadores mais vulneráveis à exposição ocupacional, a estabelecer biomarcadores de susceptibilidade e de efeito precoce para a monitorização desses trabalhadores e, desta forma, permitir uma atuação mais eficaz na prevenção do câncer de origem ocupacional.

Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX)

O benzeno é um hidrocarboneto aromático, encontrado principalmente no petróleo, muito utilizado em diversos processos industriais, desde o incremento da indústria química durante a Primeira Guerra Mundial. O termo “benzol”, comercialmente utilizado, se aplica às misturas de hidrocarbonetos aromáticos, que em geral consistem de uma mistura de benzeno e seus homólogos (tolueno, etilbenzeno e xilenos) (Amaral *et al.*, 2011). Na Figura 1, observam-se as fórmulas químicas dos BTEX.

Figura 1 - Fórmulas moleculares do benzeno, xilenos, tolueno e etilbenzeno



Nota: Fórmulas moleculares do benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos (meta, orto e para), respectivamente da direita para esquerda.

Fonte adaptada: Graham Solomons e Craig Fryhle (2000). Química Orgânica. LTC.Ed. 70.(1)57-65

O benzeno apresenta-se em estado líquido e incolor, à temperatura ambiente e à pressão atmosférica normal, possui odor característico dos compostos aromáticos e, por ser lipossolúvel, mistura-se bem com a maioria dos solventes orgânicos (álcool, gasolina,

clorofórmio, éter e acetona), além de ser extremamente volátil, sendo perceptível ao olfato em concentrações superiores a 12 ppm (Amaral *et al.*, 2017). É considerado hidrocarboneto aromático mais nocivo ao homem, sendo classificado como agente carcinogênico do Grupo I pela *International Agency of Research on Cancer – IARC* (Cogliano *et al.*, 2011). Este agente químico tem lenta degradação no ambiente e a meia vida varia conforme o compartimento ambiental, sendo 13,4 dias no ar; 5 a 16 dias em águas superficiais; 10 dias a 24 meses em águas profundas; 7,2 dias em solo com espessura de 1 cm e 38,4 dias com espessura de 10 cm (Barata-Silva *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018).

Por sua vez, o tolueno ou metilbenzeno, é um solvente líquido, incolor, com a fórmula estrutural $C_6H_5CH_3$. Ele é muito utilizado na preparação de tintas, revestimentos, borrachas, resinas, adesivos e nos combustíveis. É popularmente conhecido no Brasil como “cola de sapateiro”. A inalação voluntária do toluol causa danos ao organismo e pode levar à dependência química. Os xilenos ou dimetilbenzeno, com fórmula estrutural $C_6H_4(CH_3)_2$, hidrocarbonetos aromáticos constituídos por um anel benzeno e dois radicais metil. O dimetilbenzeno pode ser encontrado em três de seus isômeros que em conjunto é conhecido como xilol: o meta (m), o orto (o) e o para (p)-xileno, ilustrados na Figura 1. Já o etilbenzeno, de fórmula estrutural $C_6H_5CH_2CH_3$, é um hidrocarboneto aromático monocíclico, incolor, altamente volátil e inflamável. Está presente no petróleo bruto, em solventes e na produção de estireno (Otero *et al.*, 2015).

BTEX na gasolina

A gasolina automotiva consiste na mistura de hidrocarbonetos voláteis e inflamáveis derivados do petróleo, predominantemente com 4 a 12 átomos de carbono. Sua composição depende da sua utilização, origem e dos processos de refino do petróleo. Hidrocarbonetos aromáticos como os BTEX estão presentes na gasolina, sendo o benzeno reconhecidamente o mais tóxico de todos (DEMEC, 2018).

O benzeno encontrado na gasolina automotiva é devido a impurezas no processo de produção. Ele pode aumentar a octanagem (índice de resistência à detonação de combustíveis) e reduz o “bater de bielas” de motores, ou seja, a autoignição. Diante destes vários fatores, a gasolina automotiva fabricada no Brasil deve atender especificações técnicas indicadas pela Agência

Nacional de Petróleo (ANP). A ANP, em 27 de dezembro de 2001, publicou a Portaria no 309 que estabelece as especificações para a comercialização das gasolinas automotivas em todo o território nacional e definiu obrigações dos agentes econômicos sobre o controle da qualidade do produto. A Tabela 1 registra, com base na Portaria da ANP, os valores especificados para o benzeno e demais componentes na gasolina comum e *premium* (ANP, 2001).

Nos Estados Unidos, a preocupação com efeitos tóxicos do benzeno na saúde e a possibilidade de contaminação do mesmo em águas subterrâneas, tem conduzido a regulação estrita do teor de benzeno na gasolina, com limites em torno de 1%. As especificações européias de gasolina já contém o mesmo limite de 1% para a presença de benzeno (Costa, 2009; Silva *et al.*, 2009). Cabe destacar, que mesmo no diesel-biodiesel e no álcool combustível foram identificados níveis aumentados de BTEX nos vapores emitidos na combustão (Ferreira *et al.*, 2008). Destacamos ainda as possíveis fraudes por adulteração dos combustíveis no Brasil, com à adição de solventes. Já foram descritos níveis que chegam a 8% de benzeno em gasolina fraudadas (Costa, 2009). Atualmente, a utilização de benzeno na destilação azeotrópica para produção de álcool anidro é proibida no Brasil.

Tabela 1 - Especificações para o benzeno na gasolina

Características	Especificações			
	Gasolina comum		Gasolina <i>premium</i>	
	Tipo A	Tipo C	Tipo A	Tipo C
Benzeno, max. %vol	1,2	1,0	1,9	1,5
Hidrocarbonetos: Aromáticos, max. %vol	57,0	45,0	57,0	45,0
Hidrocarbonetos: Olefínicos, max. %vol	38,0	30,0	38,0	30,0

Nota: Os teores máximos de benzeno, hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos olefínicos permitidos para a gasolina A referem-se à qualquer transformar-se á em gasolina C através da adição de 22% à 1% de álcool.
Fonte: (Portaria No 309, ANP/2001).

BTEX e a saúde do trabalhador

Os BTEX são absorvidos principalmente pela via pulmonar e, em menor escala, pela via cutânea. A absorção cutânea contribui pouco para o total da absorção de um trabalhador, pois é influenciada pela temperatura corpórea, integridade e hidratação da pele. Já pela via pulmonar os BTEX são absorvidos rapidamente, chegam à corrente sanguínea em poucos minutos e são distribuídos para os tecidos, que devido à sua lipossolubilidade, possui alta afinidade pelo tecido adiposo. (Amaral *et al.*, 2017).

O benzenismo é um conjunto de sinais, sintomas e complicações decorrentes da exposição aguda ou crônica ao benzeno. As complicações podem ser agudas quando ocorre exposição a altas concentrações com predominância clínica de sinais e sintomas neurológicos, ou crônicos, com sinais e sintomas clínicos diversos, expostos na Tabela 2. Cabe destacar, que o diagnóstico de benzenismo de natureza ocupacional é eminentemente clínico e epidemiológico. Sendo o diagnóstico fundamentado na história de exposição ocupacional e na observação de sintomas e sinais clínicos, auxiliados com exames laboratoriais. Entende-se

como exposição ocupacional a exposição ao benzeno, decorrente de atividades nos ambientes de trabalho. Segundo o Ministério do Trabalho do Brasil em trabalhadores potencialmente expostos ao benzeno, todas as alterações hematológicas devem ser valorizadas, investigadas e justificadas (MT, 2006).

Cabe ressaltar, que o benzeno possui conhecido efeito mielotóxico regular, decorrente de três mecanismos básicos: a depressão das células hematopoéticas progenitoras primitivas e indiferenciadas (*Stem cells*); a lesão do tecido de medula óssea; a formação clonal de células primitivas afetadas com danos nos cromossomos (Ji *et al.*, 2012; Mc Hale *et al.*, 2011). Estes mecanismos podem gerar na medula óssea hipoplasia, displasia ou aplasia celular. A hipoplasia medular tem repercussão no sangue periférico com citopenia(s), principalmente leucopenia com neutropenia, plaquetopenia isolada ou associada à neutropenia (Mc Hale *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Tabela 2- Principais sinais e sintomas relacionados à exposição ao benzeno

Sistema	Principais efeitos da exposição
Cardiovascular	Fibrilação ventricular e hipertensão arterial
Respiratório	Dispneia, dor torácica, depressão respiratória, hemorragia alveolar, edema pulmonar e alterações apoptóticas no parênquima pulmonar
Neurológico/ Psiquiátrico	Convulsões, delírio, perda da consciência, tonturas, excitação, depressão, dor de cabeça, alucinações, atrofia das extremidades inferiores e neuropatia das extremidades superiores, doença de Alzheimer e alterações de comportamento
Gastrointestinal	Náuseas e vômitos
Imunológico	Supressão das imunoglobulinas séricas, linfopenia e diminuição de células T, CD4, NK e B
Reprodutivo ♂	Diminuição da contagem de espermatozóides
Reprodutivo ♀	Distúrbios menstruais, abortos espontâneos e alterações congênitas
Hematológicos	Trombocitopenia, leucopenia, anemia, macrocitose, hipocromia, linfopenia, hipoplasia, anemia aplástica, displasia, leucemia, linfoma, linfoma não-Hodgkin e mieloma múltiplo

Fonte adaptada: Otero UB, Ornellas MH. Health risk related to the exposition to benzene and other chemicals present in gasoline. In: Alves G, editor. The health and environmental threats related to gas stations. Germany: Lambert; 2015. pp. 9–25. ISBN-13: 978-3-659-81445-7.

A aplasia da medula, por sua vez, corresponde à depressão de todas as linhagens hematológicas (leucopenia, plaquetopenia e anemia) (Mitri *et al.*; 2015; Silvestre *et al.* 2017). A exposição aos BTEX pode, também, cursar com falhas no processo de aquisição do conhecimento. Desta forma, o trabalhador exposto ao BTEX pode vir a apresentar comprometimento da atenção, percepção, memória, habilidade motora, função executiva e/ou raciocínio lógico. A exposição ocupacional também é relacionada à astenia, cefaleia,

depressão, insônia, agitação, alterações de comportamento, perdas auditivas neurosensoriais, zumbidos e vertigens (MS, 2006; Hiraoka *et al*, 2017). Há estudos que relacionam a exposição ao BTEX a abortos espontâneos e problemas menstruais (MS, 2006).

O tolueno, em níveis baixos ou moderados, pode causar cansaço, confusão, fraqueza, náuseas e/ou perda de memória, apetite, visão e audição. No entanto, estes sintomas geralmente desaparecem quando a exposição termina. Já a exposição aos xilenos também provoca irritação nos olhos e nas vias respiratórias após inalação. A exposição dérmica em humanos provoca irritação da pele, secura, vasodilatação e urticária (MS, 2006; Otero *et al.*; 2015). A exposição gestacional aos xilenos em animais, resultaram em defeitos deletérios no desenvolvimento neurológico e a exposição em doses elevadas também em animais, resultou em alterações na morfologia, peso e funções enzimáticas no fígado (Cruz *et al.*, 2014). Poucos relatórios estão disponíveis sobre a exposição ao etilbenzeno em seres humanos (Bolden *et al.*, 2015). Entre eles, foram observadas irritações oculares e ototoxicidade (perda auditiva) e alterações hematológicas (aumento da contagem de linfócitos e diminuição da concentração de hemoglobina e contagem de leucócitos). Em estudos com animais, a exposição crônica está associada a efeitos adversos no fígado, nos rins (nefropatia e hiperplasia) e no sistema endócrino (hiperplasia tireoidea e pituitária) (Bolden *et al.*, 2015).

BTEX e o câncer

De acordo com a *American Cancer Society*, de uma maneira geral, somente 5% dos cânceres estão diretamente ligados a questões hereditárias e nestes as alterações genéticas herdadas conferem ao seu portador um alto risco de desenvolver um ou mais tipos de câncer (Smith *et al.*, 2012). Contudo, a maioria dos cânceres não resulta da genética herdada, mas de danos acumulados ao longo da vida no conteúdo genético. Fatores externos ao organismo, como: o consumo de tabaco, uso de agentes químicos tóxicos e exposição à radioatividade. Juntamente com aspectos intrínsecos, como: mutações herdadas, ciclo hormonal e condições imunológicas estão listados entre os agentes que, juntos ou em sequência, podem iniciar ou promover o desenvolvimento de um processo neoplásico (Smith *et al.*, 2012).

Destaca-se que o benzeno possui elevado potencial de genotoxicidade, e possui conhecido efeito leucemogênico, mesmo em baixas concentrações (MS, 2006). A leucemia mieloide

aguda (LMA) é a doença hematológica mais associada à exposição ocupacional ao BTEX. Considerando o processo de patobiogênese das leucemias, este se realiza em múltiplas etapas por acúmulo de mutações sinérgicas, iniciando-se quando uma célula-tronco multipotente ou um progenitor hematopoético comprometido com uma linhagem sofre alterações genéticas que lhe conferem vantagens proliferativas e/ou de sobrevivência sobre as demais, sendo os clones resultantes, positivamente selecionados no microambiente hematopoético (Rohrbacher *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2018). Descendentes de tais células, apresentando proliferação acelerada, podem sofrer mutações genéticas adicionais e cooperativas que lhes conferem, por exemplo, capacidade de auto-renovação (surgimento de células leucêmicas-tronco quando se tratar de um precursor celular já comprometido) e bloqueio do processo de diferenciação (Rohrbacher *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2018). O que se verifica, por último, é a formação de uma produção hierarquizada de clones autônomos quanto ao aspecto proliferativo e descompromissados com alguma função, sendo isto determinante para o processo de falência da medula óssea (que corresponde ao órgão de relevância hematopoiética na vida adulta) significando, portanto, desenvolvimento de anemia, trombocitopenia e susceptibilidade a infecções (Rohrbacher *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2018). Cabe destacar, também, que a exposição ao benzeno é associada a linfoma de Hodgkin linfomas não-Hodgkin (MS, 2006; Otero *et al.*, 2015), câncer de pulmão e de bexiga (urotelial). Há estudos que o relacionam também a câncer de mama em mulheres e ao aumento da incidência de câncer de mama em homens expostos de forma ocupacional aos BTEX (Silvestre *et al.*, 2017). Cabe ressaltar ainda, que a exposição ao tolueno e/ou aos xilenos estão relacionadas ao surgimento de tumores cerebrais (MS, 2006).

O câncer vem se tornando cada vez mais comum em todo mundo, fato este mais marcante nos países desenvolvidos decorrente principalmente do envelhecimento da população. Na tentativa de salvar vidas em relação a medidas de saúde pública, merecem destaque e as que demonstram serem mais eficazes contra o câncer em geral, a prevenção e diagnóstico precoce. Sendo estes fundamentais na prevenção do câncer de origem ocupacional.

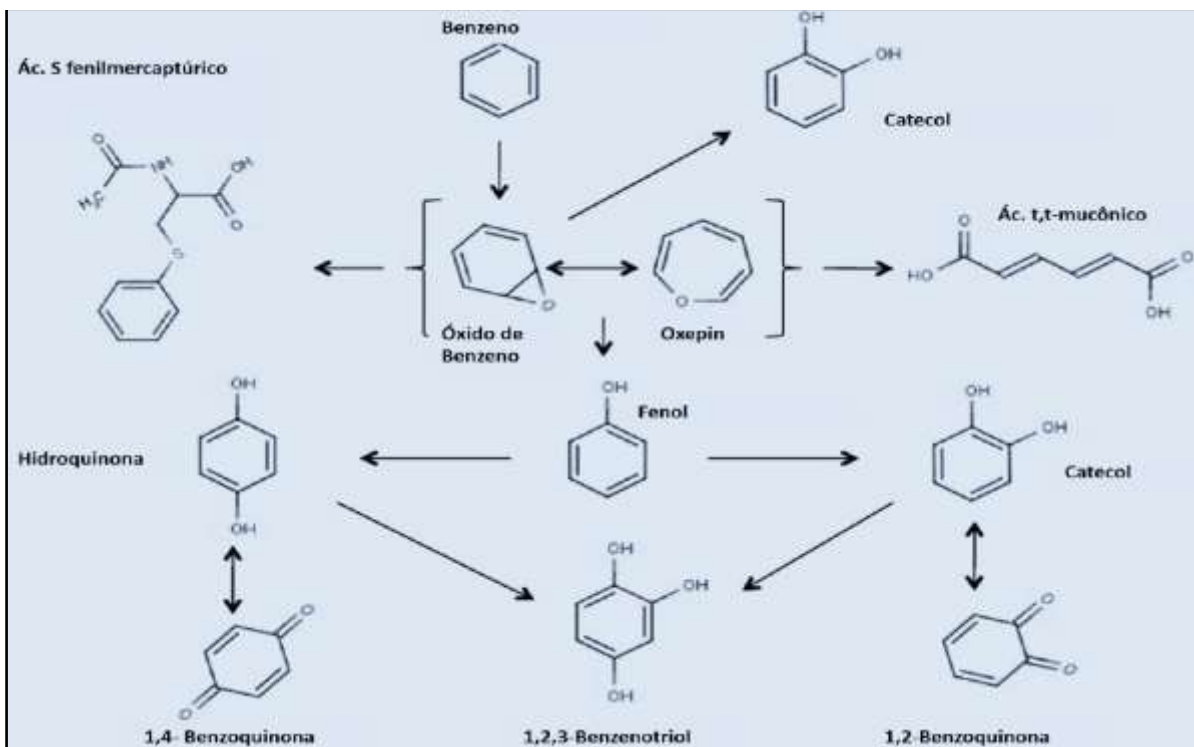
BTEX e instabilidade do genoma humano

Os mecanismos pelos quais os BTEX causam os efeitos genotóxicos não estão totalmente esclarecidos. Contudo acredita-se que a função de uma ampla gama de alvos celulares é atingida por metabólitos específicos e por espécies reativas de oxigênio. Os alvos genotóxicos incluem: (i) inibição da topoisomerase II (TOP2A); (ii) formação de aduto de metabólitos reativos; (iii) dano oxidativo ao DNA; (iv) mutação no mecanismo de reparo do DNA; (v) alterações epigenéticas (Mc Hale *et al.*, 2011).

O benzeno é metabolizado no fígado pelo citocromo P4502E1 (CYP2E1) em fenol, seu primeiro metabólito e, subseqüentemente metabolizado pelo CYP2E1 em hidroquinona, Figura 2. A hidroquinona é transportada à medula óssea onde é oxidada em benzoquinonas, que por sua vez liberam espécies reativas de oxigênio responsáveis por induzir danos no genoma de células hematopoiéticas (Kim *et al.*, 2004; Amaral *et al.*, 2017).

Um mecanismo que também é amplamente aceito para a genotoxicidade dos metabólicos do benzeno nas células da medula óssea é a inibição da TOP2A (Mondrala e Eastmond, 2010; Pandey *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2011). A TOP2A é a responsável por catalisar a quebra e a reunião de filamentos de DNA, sendo portanto uma enzima crítica para a replicação de DNA, recombinação, separação de cromossomos, condensação e transcrição gênica (Nitiss, 2009). Cabe destacar também que a expressão de TOP2A tem sido utilizada como marcador prognóstico em neoplasias, mostrando que altos níveis de expressão protéica indicam um melhor prognóstico e sobrevida ao câncer de próstata, e boa resposta ao tratamento em câncer de mama (Brase *et al.*, 2010). Além disso, a inibição da TOP2A correlaciona-se com as aneuploidias, como no caso da aneuploidia induzida pelo benzeno na LMA (Feng *et al.*, 2014)

Figura 2 - Etapas químicas da metabolização do benzeno no organismo



Fonte adaptada: Otero UB, Ornellas MH. Health risk related to the exposition to benzene and other chemicals present in gasoline. In: Alves G, editor. The health and environmental threats related to gas stations. Germany: Lambert; 2015. pp. 9–25. ISBN-13: 978-3-659-81445-7.

As alterações nos cromossomos (ACs) de indivíduos expostos aos BTEX são descritos em inúmeros trabalhos (Zhang *et al.*, 2002, 2005, 2011; Holecková *et al.*, 2004 e 2008; Ji *et al.*, 2012, Fang *et al.*, 2017) como um biomarcador de efeito precoce e instabilidade genômica. Zhang e col. (2002) revisaram seis estudos de monitoramento citogenético em trabalhadores de postos de gasolina e concluíram que a taxa de ACs estruturais foram elevadas nos trabalhadores expostos. A principal AC estrutural detectada foi a quebra nos cromossomos. Foram também observadas taxas elevadas de quebras específicas para os cromossomos 2, 4, 7 e 9, enquanto que as alterações numéricas dos cromossomos foram raramente observadas (Zhang *et al.*, 2002). Verdorfer e col. (2001) analisaram ACs nos cromossomos 1, 2 e 4, ao invés da análise dos 24 pares humanos, em trabalhadores expostos a agentes ocupacionais externos. Juntos esses três cromossomos representam 21,87% do genoma humano, sendo

utilizados na avaliação de ACs como forma de estimar o dano global ao genoma (Verdorfer *et al.* 2001).

Os números elevados de ACs são correlacionadas ao aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias, principalmente leucemias (Holeková *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2014). Estudo realizado na República Checa reforça a associação entre o aumento dos níveis de alterações nos cromossomos, em linfócitos, e a incidência de câncer e mortalidade no futuro (Smerhovskyyet *et al.*, 2001). Zhang e col. (2002) referiram a frequência de alterações nos cromossomos como um promissor biomarcador de efeito precoce, sendo este um possível preditor de risco de desenvolvimento de neoplasias, em especial, leucemias (Zhang *et al.* 2002). Desta forma, com a exposição aos BTEX, o DNA sofre danos na sua estrutura. Danos estes que podem vir a resultar na perda de informação genética vital ao indivíduo. Na tentativa de responder aos efeitos potencialmente devastadores ao material genético, os organismos desenvolveram uma série de diferentes processos de reparo, através dos quais as agressões ao DNA podem ser revertidas (Fang *et al.*, 2017).

Uma preocupação em relação à exposição crônica dos trabalhadores de postos de combustíveis está na possibilidade de comprometimento das células germinativas das frentistas (Ji *et al.*, 2012; Moro *et al.*, 2017). Vários estudos epidemiológicos apoiam a ideia de que eventos genotóxicos e não genotóxicos relacionados à exposição aos BTEX podem contribuir com o desenvolvimento da leucemia infantil no útero (Zhang *et al.*, 2002; Holeková *et al.*, 2004; Greaves *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 2012). Assim, a exposição da mãe ao benzeno pode ser tão importante quanto à exposição infantil direta, como causadoras de leucemia mieloide aguda. Quanto à etiogênese das LLAs, acredita-se que tenham início com a exposição a agentes carcinogênicos uma vez que células leucêmicas normalmente apresentam aberrações cromossômicas, possivelmente derivadas do acúmulo de danos não-reparados no DNA. Em relação ao surgimento e o acúmulo destas mutações, estas podem ocorrer (a) num período pré-concepção (que abrange a ontogênese da célula germinativa na geração parental do indivíduo) e (b) no período pós-concepção que compreende o desenvolvimento intra-uterino do indivíduo (Silva, 2011; Lightfoot e Roman, 2004; Belson *et al.*, 2007).

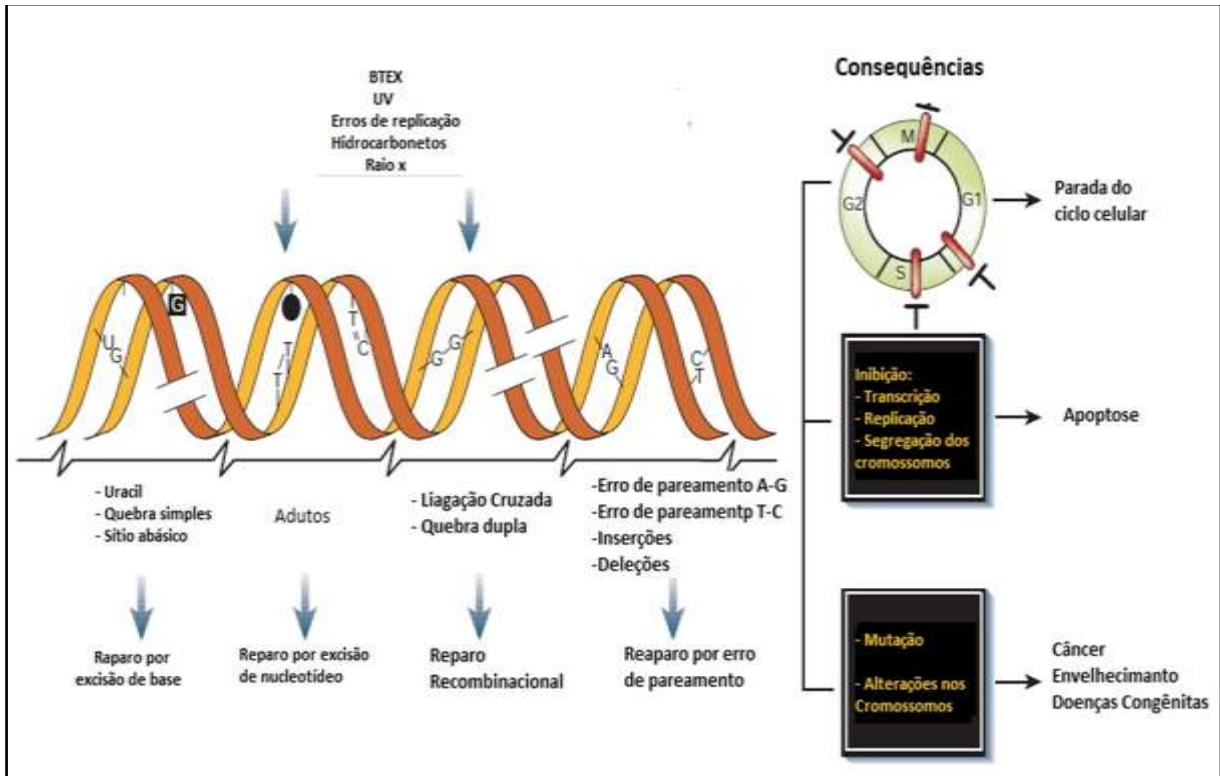
Mecanismos de reparo do DNA

A molécula de DNA está constantemente exposta a modificações por agentes endógenos e exógenos que podem desencadear vários distúrbios na funcionalidade da célula com efeitos nocivos para o organismo. Sendo assim, a estabilidade do genoma é constantemente monitorada por mecanismos de controle interno para garantir a fidelidade da informação genética. As lesões presentes no DNA ativam uma cascata de sinalização intracelular que regulam mecanismos específicos de resposta ao dano no DNA (DDR, do inglês *DNA-Damage Response*) em diferentes fases do ciclo celular (Justino, 2015).

Cabe destacar, que as células em mitose não são capazes de ativar a DDR de forma eficiente, sendo o ponto de checagem em G2 o último ponto de checagem do ciclo celular, que impede a entrada do DNA lesado da célula na mitose. Existem dois pontos de checagem moleculares distintos, G2 e G2/M. Em G2 o ciclo celular é interrompido quando o material genético é danificado em G1 ou em S. Já em G2/M quando o DNA é danificado em G2. Destaca-se que a proteína ATM é dispensável nas interrupções em G2, porém é necessário no ponto de checagem G2/M (Silva, 2011; Hoeijmakers *et al.*, 2001).

As principais vias de reparo de DNA em humanos, ilustradas na figura 3, incluem: reparo por excisão de bases (BER, *Base Excision Repair*), reparo por excisão de nucleotídeos (NER, *Nucleotide Excision Repair*), reparo de erros de pareamento (MMR, *Mismatch Repair*), reparo por recombinação homóloga (HR, *Homologous Recombination*) e reparo de ligação de extremidades não homólogas (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*).

Figura 3 - Dano no DNA, mecanismos de reparo e consequências celulares



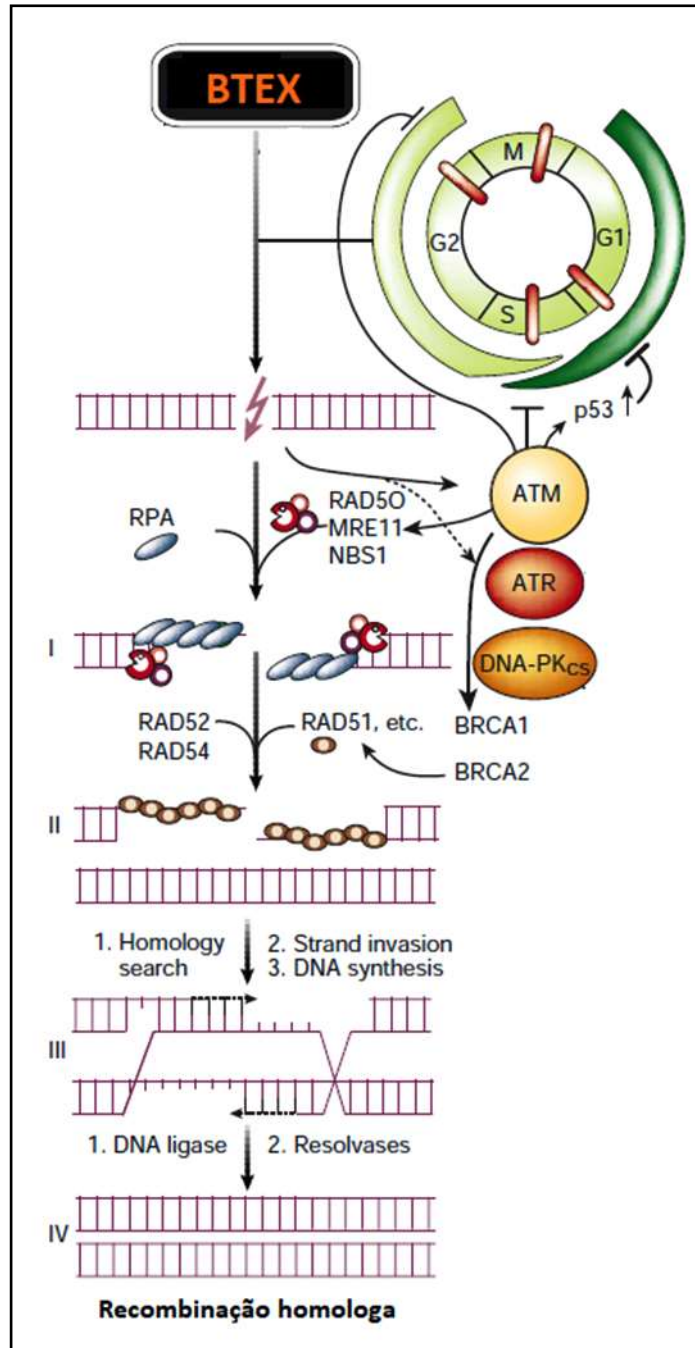
Nota: Esquema indicando as vias de dano à molécula de DNA e instabilidade genômica e possíveis consequências na viabilidade celular.

Fonte adaptada: Hoeijmakers HJ. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* 411.6835 (2001): 366.

O Reparo de Quebra de Fita Dupla (DSBR), intermediado por um complexo enzimático que reúne inúmeras proteínas e constitui-se num dos mecanismos de reparo cuja falha mais influencia no processo de leucomogênese. Devendo-se ao fato de que as quebras de dupla fita correspondem ao tipo de lesão mais perigosa para o DNA, podendo levar ao surgimento de aberrações cromossômicas (Stingele *et al.*, 2017; Hoeijmakers *et al.*, 2001). Destacamos o mecanismo molecular de reparo da DSB pela Recombinação Homóloga, que se inicia quando o complexo MRN (Mre11/RAD50/NBS1) interage com as extremidades geradas pela dupla quebra e recruta a proteína ATM na forma dimerizada, inativa. Ao interagir com o complexo MRN, monômeros da proteína ATM ativados são gerados e estes fosforilam proteínas-chaves do ciclo celular como a p53 o que causa a interrupção do ciclo celular (Friedberg *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Stingele *et al.*, 2017; Chatterjee *et al.*, 2017).

O complexo MRN também processa a extremidade da DSB digerindo a fita dupla quebrada no sentido 5'→3' gerando uma extremidade 3' simples (uma cauda de DNA unifilamentar 3') que é protegida pela proteína RPA. Posteriormente, esta cauda unifilamentar 3' é reconhecida por uma proteína recombinase chamada Rad51, sendo este processo de reconhecimento, interação e estabilização intermediado ou auxiliado pelas proteínas RPA, RAD52 e RAD54. Devido a ligação em sequência de várias unidades de Rad51 à cauda 3', verifica-se a formação de um filamento nucleoprotéico que, por sua vez, interage com uma fita de DNA homóloga não desenrolada. (Silva, 2011; Brase *et al.*, 2010) A formação deste nucleofilamento envolve além da participação da proteína RAD51, as proteínas RAD51B, C e D, XRCC2 e XRCC3. Encontrando a região de complementaridade, Rad51 cataliza os eventos de troca de filamentos no qual a molécula danificada invade o DNA duplex íntegro, deslocando uma das fitas para posterior formação de um híbrido constituído de um dos filamentos intactos hibridizado com o filamento da molécula de DNA danificada, que lhe é complementar. A extremidade 3' terminal da molécula danificada é então estendida por uma DNA polimerase que copia informação do modelo não lesado (Silva, 2011). Posterior à síntese, verifica-se a resolução do DNA cruzado (junção Holliday) por meio da clivagem e ligação para gerar duas moléculas de DNA intactas. As proteínas BRCA1 e BRCA2 interagem com RAD51 aumentando sua eficiência no processo de interação com a molécula de DNA intacta (Silvestre *et al.*, 2017; Chatterjee *et al.*, 2017). BRCA2 interage com a extremidade 3' gerada pelo complexo MRN deslocando as proteínas RPA e, em seguida, posicionando os monômeros de RAD51 nesta para a formação do nucleofilamento. Adicionalmente, BRCA1 e BRCA2 remodelam a cromatina para facilitar o reconhecimento da molécula de DNA doadora intacta (Friedberg *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Stingele *et al.*, 2017).

Figura 4 - Reparo do DNA (recombinação homóloga), em destaque a função do gene RAD51 e ATM



Nota: Esquema indicando o reparo do DNA pela via de recombinação homóloga, destacando função da proteína codificada pelo gene ATM e RAD51.

Fonte adaptada: Hoeijmakers, Jan HJ. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411.6835 (2001): 366.

Fatores que afetam a capacidade de reparo de DNA modulando o risco de carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo e multifásico que se inicia por meio da interação entre agentes genotóxicos ambientais (como os BTEX) com o DNA, subsequentes a acúmulos de danos promutagênicos no genoma em genes que regulam programas de crescimento, sobrevivência, diferenciação e apoptose (Justino *et al.*, 2015; Chatterjee *et al.*, 2017).

Com o mecanismo de prevenção e supressão ao surgimento de mutações lesão-dependentes, as células interrompem a progressão do ciclo celular e ativam sistemas bioquímicos de reparo do DNA específicos a cada categoria de danos, os quais identificam e removem lesões introduzidas no material genético (Silva, 2011; de Resende *et al.*, 2013).

A Capacidade de Reparo de DNA (CRD), por sua vez, pode ser afetada por dois fatores de caráter hereditário, a saber: i) mutações nas sequências gênicas dos genes de reparo de DNA; ii) variações polimórficas nas sequências transcritas ou regulatórias destes genes.

Em termos de definição, a principal distinção entre mutações e polimorfismos refere-se ao fato destes ocorrerem numa frequência maior que 1% na população e por terem efeitos menos deletérios ou benéficos, o que permite sua distribuição entre indivíduos numa dada espécie contribuindo para o aumento da variabilidade genética (Silva, 2011; Ya-zhou *et al.*, 2014). Já as mutações podem causar inviabilidade em termos de sobrevivência ou são fatores causais do desenvolvimento de patologias graves e os indivíduos que as apresentam são eliminados, excetuando-se casos relacionados com uma vantagem seletiva e/ou sob certas condições ambientais.

Polimorfismos nos genes de Reparo de DNA e carcinogênese

Tendo em vista as dificuldades que circundam as questões ainda não respondidas sobre a etiologia e prevenção dos cânceres de origem ocupacional, busca-se entender como características individuais podem colaborar para o surgimento dos mesmos. Nisso consiste o interesse de se investigar, cada vez mais, a presença dos marcadores genéticos e sua influência sobre cada indivíduo (Silva, 2011). Desta forma, variações polimórficas nas seqüências de genes associados ao reparo de DNA podem afetar a CRD, gerando um fenótipo de reparo subótimo que, por consequência, modula os processos de mutagênese e carcinogênese (Chatterjee *et al.*, 2017; Ya-zhou *et al.*, 2014). A grande maioria (90%) dos polimorfismos estudados no genoma humano corresponde aos assim-chamados Polimorfismos em um Único Nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs). SNPs podem ocorrer em regiões gênicas codificantes, alterando o significado de um códon (polimorfismos não-sinônimos) ou simplesmente substituindo um nucleotídeo sem alteração do aminoácido especificado pelo códon, devido ao caráter degenerado do código genético (polimorfismos sinônimos). Em adição, SNPs podem ocorrer em seqüências regulatórias dos genes, modulando a sua expressão (Justino *et al.*, 2015).

RAD51 (RAD51/G135C)

A proteína RAD51 está envolvida na via de reparo por recombinação homóloga e auxilia na manutenção na estabilidade cromossômica, apresentando atividade de ATPase. Seu gene se localiza no cromossomo 15q15.1 que é uma proteína homóloga à RecA da *E. coli*, e existem descritos 737 polimorfismos (Levy-Lahad *et al.*, 2001; Ya-zhou *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). Como ilustrado na Figura 4, a proteína codificada pelo gene RAD51 está associada às proteínas dos genes BRCA1 e BRCA2, que são genes supressores tumorais, sugerindo que um defeito na recombinação possa levar ao desenvolvimento tumoral. O polimorfismo RAD51 - 98G>C (rs1801320), também chamado de *RAD51/G135C* se dá por uma substituição de guanina por uma citosina a 98 pares de bases antes do promotor no éxon 1. A substituição G135C aumenta a atividade promotora de RAD51 resultando no aumento da transcrição deste gene. Inicialmente, o excesso de RAD51 foi associado com aumento de reparo de DNA via

recombinação homóloga. Porém, estudos posteriores verificaram que aumento de RAD51 bloqueia o início desta modalidade de reparo havendo ainda a ocorrência de recombinação anômala e inespecífica, o que aumenta a mutagênese (Ya-zhou *et al.*, 2014). Zhao e col. (2014) em um estudo de metanálise, envolvendo 19.142 casos e 20.363 controles, concluíram que o *RAD51/G135C* é um polimorfismo de suscetibilidade ao câncer em geral, principalmente para o câncer de mama (Zhao *et al.*, 2014). Já em outra metanálise, conduzida por Ya-zhou e colaboradores (2014), envolvendo 2.656 pacientes e 3.725 controles, o polimorfismo *RAD51/G135C* foi associado ao aumento do risco de síndrome mielodisplásica (Ya-zhou *et al.*, 2014).

ATM (ATM/P1054R)

A ATM é uma proteína serina/treonina codificada pelo gene ATM, localizado no cromossomo 11q22-23. Abrange cerca de 150 quilobases de DNA genômico, contendo 66 éxons. Mais de 300 mutações já foram descritas, das quais cerca de 80% são por substituições, inserções ou deleções de bases, originando terminações prematuras dos códons ou anormalidades nos *splicing* (Hallajian *et al.*, 2017).

Em resposta ao dano do DNA (DDR), a proteína ATM orchestra a detecção e o reparo do DNA, garantindo a manutenção, a estabilidade genômica e a viabilidade celular. Desta forma, a ATM é uma proteína central da resposta a danos no DNA, regulando e interagindo com diferentes substratos, incluindo proteínas que ativam pontos de controle da divisão celular em G1, S ou G2-M, como ilustrado na Figura 4. Se o reparo do DNA for eficiente, este ajudará na manutenção da estabilidade da informação genética pela célula, caso contrário, esta passará a se multiplicar erroneamente, propagando o dano genético (Gutiérrez-Enríquez *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2007).

O ATM/P1054R tem efeito deletério previsto quando em homozigose. A heterozigocidade do ATM/P1054R foi associada com a diminuição da expressão de ATM nas leucemias linfocíticas agudas (LLA) (Pause *et al.*, 2003). A variante ATM/1054R foi também associada ao aumento do risco para o câncer de mama e o câncer de próstata (Hallajian *et al.*, 2017; Angèle *et al.*, 2004).

CHEK2 (CHEK2/T470C)

O gene CHEK2 codifica o ponto de verificação quinase 2 (CHK2), uma proteína que age como um supressor de tumor. O CHEK2 regula a divisão celular e tem a capacidade de impedir que as células se dividam muito rapidamente ou de maneira descontrolada. Quando o DNA sofre uma quebra de fita dupla, o CHEK2 é ativado. Especificamente, a proteína da família da fosfatidilinositol quinase ativada por dano ao DNA (PIKK) fosforila o local Thr68 e ativa o CHEK2 (Han *et al.*, 2013, Wu *et al.*, 2001). Uma vez ativada, a CHEK2 fosforila alvos à jusante, incluindo as fosfatases CDC25, responsáveis por desfosforilar e ativar as quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Falck *et al.*, 2001a e 2001b).

O polimorfismo *CHEK2/T470C* causa uma substituição do aminoácido isoleucina por uma treonina na posição 157 da proteína. A variante *CHEK2/T470C* foi associada ao risco de desenvolvimento de cânceres de mama e de próstata e como marcador de susceptibilidade de canceres em geral (Liang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2012; Kilpivaara *et al.*, 2004; Han *et al.* 2013). Estudos funcionais demonstraram que a proteína *CHEK2/T470C* é estável e torna-se normalmente ativada. Porém, a ligação de *CHEK2/T470C* aos seus substratos, como a proteína p53 a proteína BRCA1 e a proteína Cdc25A é reduzida (Liu *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2013).

1 JUSTIFICATIVA

Considerando que os trabalhadores de postos de gasolina são expostos a concentrações elevadas de BTEX durante longos períodos de trabalho, e que esses representam uma importante parcela de trabalhadores do Brasil.

Considerando que as mudanças nas legislações veem contribuindo para a diminuição dos níveis de exposição aos BTEX (especialmente ao benzeno), contudo estipulam prazos considerados longos para implementação das novas normativas de segurança pelos postos de combustíveis.

Considerando que as legislações vigentes relacionadas à segurança dos trabalhadores de postos de gasolina não levam em consideração as variações interindividuais, e isso limita as medidas de prevenção e controle do câncer.

Considerando que a capacidade de reparo de DNA pode ser alterada por variações polimórficas e que isto, por consequência, tem impacto na modulação dos processos de mutagênese e carcinogênese, determinando variabilidade interindividual no aspecto de susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer.

Considerando que o volume de estudos científicos nesta área, concernentes à exposição de populações brasileiras, ainda é incipiente frente à real situação do risco.

Desta forma, trata-se de uma pesquisa inédita e relevante, pois, além de contribuir para a elucidação da etiopatologia do câncer de origem ocupacional, poderá contribuir para gerar políticas de saúde pública para a identificação de subpopulações com maior risco para o desenvolvimento do câncer de origem ocupacional, bem como pontuar marcadores individuais de susceptibilidade ao desenvolvimento câncer. O reconhecimento precoce dos indivíduos em riscos devido à exposição ocupacional aos BTEX, associado ao conhecimento prévio de susceptibilidade genética individual poderá, no futuro, ser uma boa ferramenta para qualificar a intervenção em defesa da saúde dos trabalhadores de postos de combustíveis, possibilitando uma maior efetividade na prevenção e controle do câncer.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Entender como o genoma dos frentistas está em risco, através da análise das alterações cromossômicas e pelo estudo dos polimorfismos de genes chaves do mecanismo de reparo recombinacional ou Reparo de Quebras Duplas no DNA (DSBR, *Double Strand Break Repair*).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a exposição, individual e coletiva, de 114 trabalhadores de postos de combustíveis aos BTEX.
- b) Descrever as frequências de alterações nos cromossomos 1, 2 e 4, em linfócitos do sangue periférico, de 114 trabalhadores de postos de combustíveis;
- c) Descrever as frequências genótípicas dos polimorfismos genéticos do *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R* e *CHEK2/T470C* em um estudo do tipo caso-controle para exposição aos BTEX;
- d) Avaliar a associação dos polimorfismos genéticos do *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R* e *CHEK2/T470C*, na suscetibilidade à alterações nos cromossomos 1, 2 e 4, de linfócitos do sangue periférico, destes trabalhadores;
- e) Comparar os resultados encontrados dos 114 trabalhadores de postos de combustíveis com os resultados de 115 indivíduos controles (sendo 11 dos indivíduos controles, com dados de citogenética).

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1- Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting (Artigo publicado)

Santiago et al. *Molecular Cytogenetics* 2014, 7:15
<http://www.molecularcytogenetics.org/content/7/1/15>



RESEARCH

Open Access

Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting

Fábio Santiago^{1,2,3}, Gilda Alves^{2,3,7*}, Ubirani Barros Otero⁴, Marianne Medeiros Tabalipa⁴, Luciano Rios Scherrer⁵, Nadezda Kosyakova⁶, Maria Helena Ornellas^{1,2} and Thomas Liehr⁶

Abstract

Background: Chronic exposure of BTX (benzene, toluene, xylene) may lead to progressive degeneration of bone marrow, aplastic anemia and/or leukemia. In Brazil there is no self-service fuel in gas stations and attendants fill the fuel themselves. Due to this they are chronically exposed to high concentration of BTX. Occupational exposure to benzene has been associated with increased chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using whole chromosome painting (wcp) probes allows the rapid detection of chromosomal aberration. In the present study three-color wcp probes for chromosomes 1, 2 and 4 were used for monitoring 60 gas station attendants.

Results: Blood tests were done and interviews were conducted for each worker. For searching for possible associations between the clinical characteristics and the frequency of chromosomal aberrations the workers were divided into two groups (≤ 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases and > 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases). The studied workers had a low median age (36 year), albeit long period of BTX exposure (median was 16 years). Low prevalence of smoking and moderate consumption of alcoholic beverages were found in this population. The cytogenetic analysis showed 16.6% (10/60) of workers with a high frequency of chromosomal abnormalities (>10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases). Translocations were the most frequently observed chromosome aberration. The statistical analysis revealed highly significant differences in skin color ($p = 0.002$) and a weak significant differences in gender ($p = 0.052$) distribution between the two groups.

Conclusion: 16.6% of the studied population showed elevated frequencies of chromosomal abnormalities, which is highly likely to be correlated with their exposure to BTX during their work. Therefore, further studies are needed for better characterize the work associated damage of the genome in gas station workers. It is necessary to better understand the risks that these workers are exposed, so that we can be effective in preventing diseases and maintaining the health of these workers and possibly the offspring.

Keywords: Benzene, Toluene, Xylene, Monitoring, Cytogenetic, Painting, Chromosome

* Correspondence: gbrown@inca.gov.br

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³Laboratório de Genética Aplicada, Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Santiago et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

In contrast to many developed countries, there are no self service fuel in gas stations in Brazil. Filling in fuel depends on attendants who are chronically exposed to BTX (benzene, toluene and xylene) during the work time. It is well known that benzene induces myelotoxicity in humans; the role of xylene and toluene is still unclear, thus, here we concentrate on the best studied substance among those three, benzene. It causes a variety of hematological disorders including aplastic anemia, myelodysplastic syndrome, and acute myelogenous leukemia (AML) [1-4]. Benzene is metabolized in the liver to its primary metabolite phenol by cytochrome P4502E1 (CYP2E1) through the benzene oxide intermediate, and is subsequently metabolized by CYP2E1 to hydroquinone (HQ) [5,6]. HQ is transported to the bone marrow and oxidized to benzochinones, which eventually releases reactive oxygen species (ROS) damaging hematopoietic cells [5,7].

Many studies have been carried out to determine the hematological alterations and chromosomal aberrations (CA) in benzene exposed workers [8-11]. Reported genetic damages caused by benzene include sister chromatid exchange, DNA cross-linking, DNA adduct formation, and impairment of DNA repair mechanisms [12]. Other studies reported increased levels of chromosomal anomalies such as aneuploidies including monosomy of chromosomes 5 and 7 and trisomies of chromosomes 8 and 21, in the blood lymphocytes of apparently healthy Chinese workers exposed to high levels of benzene (median: 31 ppm, range: 1.6–328.5 ppm). It is well known that these kinds of alterations are also commonly found in leukemia and myelodysplastic syndrome [7,10,13]. Thus, chromosomal aberrations may be a precursor of future leukemia risk and other cancers. Additional studies have further strengthened the association between increased levels of CA in human lymphocytes and future cancer incidence and mortality [13,14].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) using whole chromosome painting (wcp) libraries opened new insights in studying the CA in people exposed to mutagens and in delimiting individuals at risk [15]. This approach allows the rapid detection of translocations and other cytogenetic alterations, enabling new possibilities of cytogenetic dosimetry. This kind of test can also be used to address the chromosomal rearrangements detectable in individuals exposed to benzene and delimiting their individual cancer risk [1,15].

The aim of this study was to describe the cytogenetic changes on chromosomes 1, 2 and 4 in gas station attendants from Rio de Janeiro, Brazil, that had occupational exposition to BTX. The obtained results were used as an indicator for chromosomal damage as a whole, which happened in this population due to their work exposure.

Results

Health report

The gas station attendants routinely work for 6 days a week, during 8 hours or more per day. As it can be deduced from Table 1 the median time of employment in this activity was 16 years and their median age was 36 years. A low prevalence of smoking (15%) and a moderate consumption of alcoholic beverage (65%) were reported. No illicit drugs consumption (marijuana, cocaine and ecstasy) and no high consume of alcoholic beverages were described.

In the medical history of workers vision impairment (22.6%) was the complaint most frequently reported, followed by osteoarticular^{*a} (18.5%), cardiovascular (16.0%) and respiratory tract diseases (12.6%). Hematological diseases (1.8%) were scarce, and no neoplastic diseases were reported.

Cytogenetic data

A high frequency of CA (> 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases) was found in 16.6% (10/60), whereas 83.4% (50/60) of workers showed no aberrations

Table 1 Biometrics data (clinical and demographic) of gas station attendants

Biometrics data	Results	
Gender		
Men	50 (83.3%)	
Women	10 (16.7%)	
Age (years)	36 (± 13.5)	
Duration of exposure (years)	16 (±11.8)	
Smokers	9 (15%)	
Ex-smokers	9 (15%)	
Illicit drug consumption	0 (0%)	
Drinking	39 (65%)	
Ex-drinking	3 (5%)	
Blood test	Men	Women
Erythrocytes (million/ μ L)	4.9 (±0.32)	4.5 (±0.26)
Hemoglobin	14.4 (±1.14)	12.7 (±1.07)
Hematocrit (%)	42.3 (±2.84)	37.4 (±2.91)
Mean corpuscular volume (fL)	84.9 (±4.55)	84.9 (±4.26)
Leukocytes(/ μ L)	7025 (±1677.6)	
Neutrophils(%)	57 (±9.26)	
Typical lymphocytes	33 (±8.39)	
Basophils (%)	0.4 (±0.25)	
Eosinophils (%)	2.5 (±2.52)	
Monocytes (%)	7.1 (±1.76)	
Platelets (mil/ μ L)	230 (±54.05)	
Gamma-GT (U/L)	32 (±44.2)	

Gamma GT- Gamma glutamyl transpeptidase.

or less than 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases. Table 2 shows the CAs found on molecular cytogenetic analysis and Figure 1 shows an example of an abnormal metaphase.

As compared to normal controls (see Discussion) elevated frequency of CAs (9.3 per 1,000 metaphases analyzed) was found in the gas station workers population. Among the total CAs the translocations were most frequently found (43.6%), followed by deletions (23.7%); monosomies (10.9%); chromosomal breaks (12.7%); chromosomal fragments (7.3%) and trisomies (1.8%).

Translocations of chromosome 2 were responsible for 20% of total CAs, followed by translocation involving chromosome 1 (18.2%) and gross deletions within chromosome 2 (9.1%). Chromosome 1 showed the high-est percentage of CAs (41.8%) that corresponded to: translocations (18.2%), chromosome breakage (7.2%), deletions

Table 2 Chromosomal abnormalities of gas station workers

Number	Chromosomal abnormalities
1	chr(1); del(1);del(2);chr(1);t(2;?);t(2,?)
2	chr(1);chr(4)
3	t(1;2;?);t(2;?);t(4,?)
4	t(1;?);chr(1); t(2;?)
5	ace(1)
6	-1,ace(1);del(4p);t(1;?)
7	t(2;?)
8	t(1;?); t(2;?);del(1);del(4)
9	t(1;2)
10	t(1;?)
11	der(1), t(1;2)
12	del(2);t(1;?);t(4;?);ace(4)
13	+4
14	del(2)
15	del(4)
16	del(2)
17	del(1), del(2); -4
18	-4,ace(4)
19	t(2;?)
20	-4
21	chr(4)
22	t(1;?)
23	del(4)
24	-1
25	chr(2)
26	-1
27	t(4;?)
28	t(1;?)
29	t(2;?)

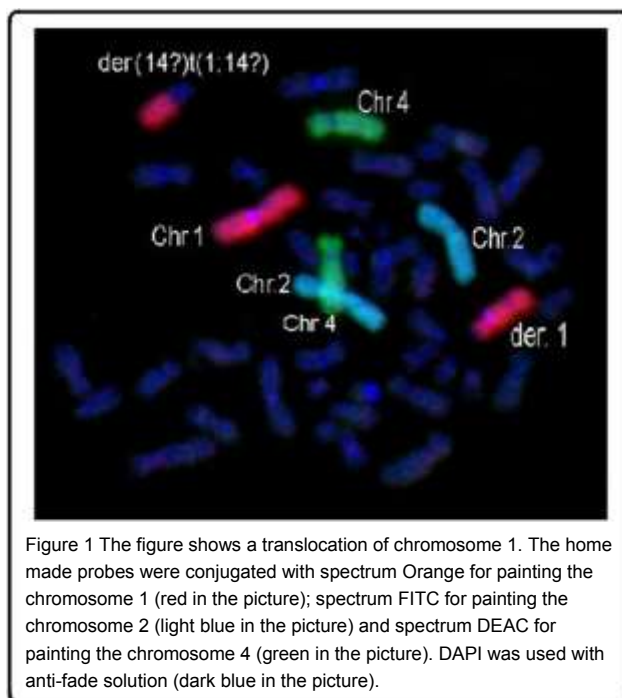


Figure 1 The figure shows a translocation of chromosome 1. The home made probes were conjugated with spectrum Orange for painting the chromosome 1 (red in the picture); spectrum FITC for painting the chromosome 2 (light blue in the picture) and spectrum DEAC for painting the chromosome 4 (green in the picture). DAPI was used with anti-fade solution (dark blue in the picture).

(7.2%), monosomies (5.4%), and formation of chromosome fragments (3.6%). Chromosome 4 had the lowest percentage of CAs observed (27.3%). Among the CAs of chromosome 4 the most common were deletions (7.2%), followed by translocations (5.4%), monosomies (5.4%), chromosome breaks (3.6%), chromosome fragments (3.6%) and trisomies (1.8%).

The number of translocations was compared to other chromosomal aberrations that were found. Table 3 shows that significant differences were present, pointing that monosomies ($p = 0.022$), trisomies ($p = 0.00$) and chromosomal fragments ($p = 0.007$) were less frequent than translocations in chromosome 1. In Table 4 the same analysis was done for chromosome 1 and 2. The translocation of chromosome 2 was the most frequent aberration seen in this chromosome. The overall-involvement of translocations in rearrangements did not show any significant differences for the number of translocations of chromosome 4 compared to the other chromosomal aberrations.

Association between the cytogenetic results and clinical and demographic data

For possible associations between the clinical characteristics and the frequency of CAs the subjects were divided into two groups (≤ 10 CAs per 1,000 metaphases = group 1, and > 10 CAs per 1,000 metaphases = group 2). The statistical analysis revealed highly significant differences in skin color distribution between the groups ($p = 0.002$). Similarly, we found, when statistical analysis were done, differences only concerning blacks and whites between the two groups ($p < 0.01$, OR = 9.02 and 95% CI [1.54 to

Table 3 Statistical analysis between translocations and others chromosomal abnormalities of chromosomes 1, 2 and 4

	Number of chromosomal aberrations	P-value
Translocation	24	Aberration compared
Chromosome breakage	7	0.000
Chromosome fragment	4	0.000
Deletion	13	0.026
Monosomy	6	0.000
Trisomy	1	0.000

97.77]). It was observed that blacks have a lower number of CA than whites. Also we observed on the gender analyze that 88% of male workers were in group 1 and 12% in group 2, while it were 60% of female workers in the group 1 and 40% in group 2. The statistical analysis revealed weak significant differences in gender distribution between the two groups ($p = 0.052$, OR = 4.71 and 95% CI [0.76 to 28.05]).

To assess whether the frequency of CAs has association on hematological and biochemical parameters Table 5 was established. No significant associations were found between frequency of chromosomal aberration and whole blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), Gamma-glutamyltransferase ($p > 0.05$) and

Table 4 Statistical analysis between translocations and others chromosomal abnormalities of chromosome 1 and 2

	Number of chromosomal aberrations	P-value
Chromosome 1		
Translocation	10	Aberration compared
Chromosome breakage	4	0.055
Chromosome fragment	2	0.007
Deletion	4	0.055
Monosomy	3	0.022
Trisomy	0	0.000
Chromosome 2		
Translocation	11	Aberration compared
Chromosome breakage	1	0.000
Chromosome fragment	0	0.000
Deletion	5	0.039
Monosomy	0	0.000
Trisomy	0	0.000

platelets count ($p = 0.059$), however for the latter p-value was borderline.

Discussion

In the present study, the frequency of CAs in peripheral blood lymphocytes of Brazilian gas station workers was used as an effect biomarker of BTX exposure. The chromosomes pairs 1, 2 and 4 represent together 21.87% of human genome. Thus they were chosen for the cytogenetic paint analysis as representatives of the entire human genome as previously described by Verdorfer and colleagues [15].

A questionnaire analysis showed a population with a low median age, albeit with long period of exposure. We did not detect inappropriate health behaviors on life style questions. The self-reported medical history showed that the main health problems were related to acute symptoms; reported sight changes appeared to be mainly associated with direct irritant action of fuel vapor in eyes (no masks are used). Osteoarticular diseases were most likely due to the long period of time in physical labor. Hematological and neoplastic diseases were rarely/not reported by workers, which was most likely due to the quiet character of the natural history of these diseases and the fact that they lead quickly to absence from work. Also they are late manifesting diseases, which might not be present in the on average young population studied.

It should be remembered that fuel volatile fraction contains chemicals other than BTX that may act as aneugens or clastogens. It is likely that the workers in this study were exposed simultaneously to several other complex chemicals. However, considering the different behaviors of environment chemicals once released, the significant relationship observed with respect to BTX concentration, indicates a specific role for BTX, mainly for the benzene, in this association [9,16].

Several studies examined cytogenetic endpoints in subjects exposed to petroleum fuels, auto exhaust, or other organic solvents [1,10,17-23]. The benzene exposure has been strongly associated with increased chromosomal abnormalities in the lymphocytes in individuals without diseases [22]. Verdorfer and colleagues analyzed with same technique different groups of individuals with different types of exposures [15]. In our study the workers had a higher frequency of chromosomal abnormalities when compared with Verdorfer groups (control group, military occupied in nuclear area and radiology workers) [15].

In the present search were found 10/60 of workers with high number of chromosome abnormalities (all workers with ≥ 20 abnormalities per 1,000 metaphase). It is worth to note that in a normal control group only 4/60 individuals with high number of chromosome abnormalities could be expected (≥ 20 abnormalities per 1,000 metaphase) [15].

Table 5 Associations between the frequency of chromosomal abnormalities and biometrics (clinical and demographic) data

Biometrics data	≤ 10 chromosomal abnormalities per 1000 metaphases	>10 chromosomal abnormalities per 1000 metaphases	p-value
Gender			0.052
Women	6	4	
Men	44	6	
Age (year)	34.00 (±13.73)	42.00 (±12.51)	0.177
Time of employment (year)	12.50 (±12.53)	18.00 (±8.41)	0.433
Skin color			0.002
Black	33	2	
White	14	8	
Native American	2	—	
Asian	1	—	
Platelets (mil/μL)	231.50 (±52.41)	195.0 (±61.82)	0.059
Gamma-GT (U/L)	32.0 (±48.47)	32.5 (±12.58)	0.944
Leukocytes (/μL)	7020 (±172)	6930 (±151)	0.835
Neutrophils (%)	56.58 (±9.66)	57.00 (±5.48)	1.000
Eosinophils (%)	2.80 (±2.65)	1.84 (±1.49)	0.312
Basophils (%)	0.35 (±0.25)	0.27 (±0.27)	0.585
Typical lymphocytes (%)	33.20 (±8.94)	31.20 (±4.89)	0.565
Monocytes (%)	7.10 (±1.84)	7.28 (±1.43)	0.866
Women			
Erythrocytes (million/μL)	4.48 (±0.22)	4.51 (±0.35)	0.521
Hemoglobin	13.15 (±0.9)	12.30 (±1.44)	0.669
Hematocrit (%)	38.80 (±3.01)	36.00 (±3.11)	0.915
Mean corpuscular volume (fL)	84.45 (±4.17)	84.90 (±4.88)	0.915
Men			
Erythrocytes (million/μL)	4.92 (±0.48)	5.00 (±0.13)	0.855
Hemoglobin	14.30 (±1.21)	14.70 (±0.71)	1.000
Hematocrit (%)	42.90 (±3.06)	41.80 (±1.37)	0.944
Mean corpuscular volume (fL)	84.90 (±4.89)	84.90 (±2.42)	0.944

Gamma-GT - Gamma-glutamyltransferase. Gender: OR (95% CI) = 4.71 (0.76 - 28.05). Skin color: Native American and Asian were excluded from statistical analysis because the sample size were below 5; OR (95%) = 9.02 (1.54 a 97.77).

CAs have a direct association with malignancy. An induced chromosomal instability could also predispose cells to further mutations and by that to an increased risk of malignant transformation [24]. Several researchers studying acute exposure of workers to fuel or organic solvents reported gaps and chromosomal breaks as the chromosomal abnormalities most often detected [16]. While chromosomal translocations were described as markers of chronic exposure that dating back up several years of benzene exposure, so the number of translocations may be a parameter for long term exposure to benzene or BTX [15,25,26]. Thus, the elevated involvement of chromosomal translocations found in this study should be most likely due to the long years of workers exposure. Also, chromosome breaks detected in conventional

cytogenetic studies cannot be detected in FISH (own unpublished data).

It is worth remembering that significant decreases of WBC, RBC and platelet counts already been observed in human populations exposed to high levels of benzene [11,27]. However, we did not find a relationship between the frequency of CAs and the rates of WBC or RBC counts in the studied population. The presence of isolated thrombocytopenia is a change which was previously described in literature [28]. Remarkably, the statistical positivity association of platelet decreased counting with frequency of CAs was closer. Further and longer studies are needed to associate the effects of BTX exposure between frequency of CAs and hematological changes with broad range of exposures.

In our study a weak association between gender and frequency of CAs were found. It is serious concern the possibility of women's genome be severely more affected by BTX exposure. Several epidemiological studies support the idea that genotoxic and nongenotoxic events following ben-zene exposure may be initiators of childhood leukemia in utero [1]. Another study on AML have shown that the dis-ease is usually initiated in utero because the leukemic trans-locations and other genetic changes are present in blood spots collected at birth [29-31]. Thus, mother exposure to benzene could be just as important as childhood expo-sures in producing childhood AML and acute lympho-blastic leukemia.

Conclusion

The number of workers with high amount (10/60) and the high frequency of CAs (9.2 per 1,000 metaphase) found shows how necessary it would be to expand this study nationwide, since Brazil has great ethnic and cul-tural diversity. The results obtained are valuable, but were only obtained from 5 gas stations in Rio de Janeiro city, a pilot study. It is necessary to better understand the risks that these workers are exposed, so that we can be effective in preventing diseases and maintaining the health of these workers and possibly the offspring.

Methods

This study was approved by the local ethics committee (Instituto Nacional de Câncer – INCA, Brazil). All subjects were informed for each individual about the nature of the study, the potential benefits, and the risks. Participation was voluntary and written informed consent was obtained from each subject before study participation.

Population study

The study included 50 male and 10 female workers recruited on 6 gas stations, in Rio de Janeiro city. A trained interviewer questioned the members of the study population regarding their age, sex, race, life-style (smoking habits, alcohol and illicit drugs consumption, etc.) and medical and work histories.

Peripheral blood samples were collected for complete hemogram, biochemistry tests and cytogenetics. The cytogenetic analyses were made for delimiting workers at risk and for allowing associations between the frequency of CA and clinical characteristics.

Chromosome preparation

Blood samples, 2 ml of heparinized whole blood, were collected by venipuncture. For each sample two cul-tures were performed according standard technique of lymphocyte cultures. Chromosomes were prepared according to standard procedures after 48 hours of cultivation [32].

FISH was done as previously reported [15] using home made wcp probes for chromosomes 1, 2 and 4 [33]. Per gas station worker 100 metaphases should be analyzed; this was possible in 47 cases. In the remainder 13 cases 34 to 97 metaphases were available.

Hematological and biochemistry analysis

The hematological analysis consisted of complete hemogram measuring of hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume and white blood cell counts. The biochemistry analysis consisted of measuring gamma glutamyl transpeptidase (Gamma GT), aspartate transaminase (AST), glutamic pyruvic transaminase (TGP), lactate dehydrogenase (LDH), bilirubin, creatinine and c-reactive protein.

All blood tests were analyzed in the central laboratory of INCA, according to standard haematological methods.

Statistical analysis

Subjects were divided into two groups (≤ 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases and > 10 chromosomal abnormalities per 1000 metaphases) and compared to clinical characteristics (age, time of employment, race, hemoglobin, leukocytes, etc.) by either Mann–Whitney test or chi-square test (if either quantitative or dichotomic variable). The Mann–Whitney test was performed because the variables quantitative did not have a Gaussian distribution in most of situation. For cytogenetic analyses the Chi-Square Goodness-of-Fit test was performed to evaluate statistical differences of chromosomal aberrations distribution among chromosomes 1, 2 and 4. For all statistical tests $p < 0.05$ was considered sig-nificant. All analyses were carried out using the PASW software (Version 18, Inc., Chicago, IL, USA).

Endnotes

^a*Osteoarticular is defined as disease relating to, involving, or affecting bones and joints.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

GA, UBO and MHO designed the study and applied for Research Ethics Board approval. MMT and FS recruited the workers. The cytogenetic data were analyzed by NK and FS. LRS analyzed all data. FS prepared the manuscript draft with important intellectual input from TL, GA and MH. All authors approved the final manuscript and had complete access to the study data.

Acknowledgments

We thank the subjects who volunteered in the study and the workers of the central laboratory of INCA that provided the hemogram.

Grant support

Programa de Oncobiologia, Rio de Janeiro, Brazil, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Brazil (APQ1 E-26/111.422/2013).

Author details

¹Departamento de Patologia e Laboratórios, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. ³Laboratório de Genética Aplicada, Serviço de Hematologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. ⁴Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. ⁵Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. ⁶Jena University Hospital, Institute of Human Genetics, Friedrich Schiller University, Kollegiengasse 10, D-07743 Jena, Germany. ⁷Instituto Nacional de Câncer, Serviço de Hematologia, Laboratório de Genética Aplicada, Pç. da Cruz Vermelha, 23, 6° andar, 20230-130 Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 28 January 2014 Accepted: 12 February 2014

Published: 27 February 2014

References

- Smith MT: Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Ann Rev Pub Health* 2010, 31:133–148.
- Glass DC, Gray CN, Jolley DJ, Gibbons C, Sim MR, Fritschi L, Manuell R: Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiol* 2003, 14(5):569.
- Beelte S, Haas R, Germing U, Jansing PJ: Paradigm change in the assessment of myeloid and lymphoid neoplasms associated with occupational benzene exposure. *Med Klin* 1983, 104(3):197.
- Holecková B, Piesova E, Sivikova K, Dianovský J: Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agricult Env Med* 2004, 11(2):175.
- Kim SY, Choi JK, Cho YH, Chung EJ, Paek D, Chung HW: Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2004, 14(7):453–463.
- Ross D: The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *J Toxicol Environment Health* 2000, 61(5–6):357–372.
- Smith MT: The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environment Health Perspect* 1996, 104(Suppl 6):1219.
- Swaen GM, Van Amelsvoort L, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Collins JJ, Burns CJ: Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chem Biol Interact* 2010, 184(1):94–100.
- Maffei F, Hrelia P, Angelini S, Carbone F, Barbieri A, Sanguinetti G, Violante FS: Effects of environmental benzene: micronucleus frequencies and haematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat Research* 2005, 583(1):1–11.
- Ji Z, Weldon RH, Marchetti F, Chen H, Li G, Xing C, Eskenazi B: Comparison of aneuploidies of chromosomes 21, X, and Y in the blood lymphocytes and sperm of workers exposed to benzene. *Environment Molec Mutagen* 2012, 53(3):218–226.
- Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chi Chen L, Cohen B, Li K: Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Am J Indust Med* 2002, 42(4):275–285.
- Joo WA, Kang MJ, Son WK, Lee DY, Lee E, Kim CW: Monitoring protein expression by proteomics: human plasma exposed to benzene. *Proteomics* 2003, 3(12):2402–2411.
- Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Yin S, Titenko-Holland N, Dosemeci M, Wang Y, Kolachana P, Xi L, Li G, Smith MT: Benzene increases aneu-ploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence in situ hybridization in interphase and metaphase cells. *Environ Mol Mutagen* 1999, 34(4):260–268.
- Liou SH, Lung JC, Chen YH, Yang T, Hsieh LL, Chen CJ, Wu TN: Increased chromosomotype chromosome aberration frequencies as biomarkers of cancer risk in a blackfoot endemic area. *Cancer Res* 1999, 59(1):1481–1484.
- Verdorfer I, Neubauer S, Letzel S, Angerer J, Arutyunyan R, Martus P, Gebhart E: Chromosome painting for cytogenetic monitoring of occupationally exposed and non-exposed groups of human individuals. *Mutation Res* 2001, 491(1):97–109.
- Gebhart E, Neubauer S, Schmitt G, Birkenhake S, Dunst J: Use of a three-color chromosome in situ suppression technique for the detection of past radiation exposure. *Radiation Res* 1996, 145(1):47–52.

17. Zhang L, Eastmond DA, Smith MT: The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Crit Rev Toxicol* 2002, 32(1):1–42.
18. Carere A, Antoccia A, Cimini D, Crebelli R, Degrassi F, Leopardi P, Marcon F, Sgura A, Tanzarella C, Zijno A: Genetic effects of petroleum fuels. II. Analysis of chromosome loss and hyperploidy in peripheral lymphocytes of gasoline station attendants. *Environ Mol Mutagen* 1998, 32(2):130–138.
19. Santos-Mello R, Cavalcante B: Cytogenetic studies on gas station attendants. *Mutat Res* 1992, 280(4):285–290.
20. Silva JM, Santos-Mello R: Chromosomal aberrations in lymphocytes from car painters. *Mutat Res* 1996, 368(1):21–25.
21. Bukvic N, Bavaro P, Elia G, Cassano F, Fanelli M, Guanti G: Sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat Res* 1998, 415(1):25–33.
22. Zhang L, Lan Q, Guo W, Li G, Yang W, Hubbard AE, Smith MT: Use of OctoChrome fluorescence in situ hybridization to detect specific aneuploidy among all 24 chromosomes in benzene-exposed workers. *Chem Biol Interact* 2005, 153(4):117–122.
23. Wright EG: Inherited and inducible chromosomal instability: a fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumourigenesis. *J Pathol* 1999, 187(1):19–27.
24. Zhang L, Lan Q, Guo W, Hubbard AE, Li G, Rappaport SM, Smith MT: Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to an established leukemogen, benzene. *Carcinogenesis* 2011, 32(4):605–612.
25. Smerhovsky Z, Landa K, Rössner P, Brabec M, Zudova Z, Hola N, Pokorna Z, Mareckova J, Hurychova D: Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ Health Perspect* 2001, 109(?):41–45.
26. Pressl S, Stephan G: Chromosome translocations detected by fluorescence in situ hybridisation (FISH)-a useful tool in population monitoring? *Toxicol Let* 1998, 96:189–194.
27. Aksoy M, Ozeris S, Sabuncu H, Yanardag R: Exposure to benzene in Turkey between 1983 and 1985: a hematologic study on 231 workers. *Br J Ind Med* 1987, 44(11):785–787.
28. Ruiz M, Vassalo J, Souza CAD: Alterações hematológicas em pacientes expostos cronicamente ao benzeno. *Rev Saúde Pública* 1993, 27(2):145–14130.
29. Greaves MF, Wiemels J: Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(9):639–649.
30. McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA: Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). *Blood* 2013, 101(11):4640–4641.
31. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden OB, Addison GM: Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 1999, 354(9189):1499–1503.
32. Liehr T, Claussen U: FISH on chromosome preparations of peripheral blood. In *FISH-Technology*, Springer-labmanual. Edited by Liehr T, Rautenstrauss B. Berlin: Springer; 2002:73–81.
33. Liehr T, Claussen U: Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med* 2002, 2(3):283–297.

doi:10.1186/1755-8166-7-15

Cite this article as: Santiago et al.: Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Molecular Cytogenetics* 2014 7:15.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CASE REPORT

Open Access



Benzene poisoning, clinical and blood abnormalities in two Brazilian female gas station attendants: two case reports

Fábio Santiago^{1,2,3}, Simone Lima¹, Tayná Pinheiro¹, Rafaela Tavares Silvestre^{1,2,3}, Ubirani Barros Otero⁴, Marianne Medeiros Tabalipa⁴, Nadezda Kosyakova⁵, Maria Helena Ornellas^{1,2,6*}, Thomas Liehr⁵ and Gilda Alves^{1,2,3}

Abstract

Background: Brazilian gas station workers are chronically exposed to benzene, toluene, xylene (BTX) during their working time. Describe below two cases of latin female gas station workers with benzene poisoning symptoms and miscarriage history.

Case presentation: In both cases were identified complex chromosomal rearrangements (CCR) with fluorescence in situ hybridization, applied to whole chromosome paints by chromosomes 1, 2 and 4. The lower natural killer cell (NK) cells have also been observed in cases correspondents, especially the rare type of NK (NKbright) in their peripheral blood cells.

Conclusions: It is known that acquired chromosomal aberrations are positively correlated with cancer and reproductive risk. In concordance, lower NK cytotoxicity increases the risk for cancer, as well. Thus, this is the first study providing hints on a possible causative relation of lower NK cytotoxicity and increase rates of chromosomal rearrangements including CCRs.

Keywords: Benzene, Toluene, Xylene, Cytogenetic, Painting chromosome, Natural killer

Background

Brazilian gas station workers are chronic exposed to benzene, toluene and xylene (BTX), mainly benzene, during the working time [1]. Chronic exposure to benzene may lead to progressive degeneration of bone marrow, aplastic anemia and/or leukemia. According to the U.S. Department of Labor only a detailed history and appropriate investigative procedures will enable a physician to rule out or confirm the benzene poisoning [2]. To assist the examining physician the cytogenetic tests with fluorescence in situ hybridization (FISH) shown to be a new and valuable tool to determine the workers in risk [3]. Genetic damages caused by benzene include sister chromatid

exchanges, DNA cross linking agents, DNA adduct formations, and impairment of DNA repair mechanisms [4].

Since 2010, 115 gas station attendants have been monitored in Rio de Janeiro city, Brazil applying FISH, using whole chromosome painting (wcp) probes for chromosomes 1, 2 and 4. Among the study group, the medical inquiry identified two female gas station attendants with signs and symptoms of acute benzene intoxication, associated with history of abortions. Added to the cytogenetic tests an large hematological evaluation by cytometry were made and found a down regulation of the natural killer (NK) cells association an acquired complex chromosomal rearrangements (CCRs).

Case presentation

Case 1

A 25-year-old latin woman, working 8 h per day, 6 days a week, for the last 4 years as a gas station attendant

*Correspondence: mariahelenaornellas@gmail.com

⁶ Departamento de Patologia Geral, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manuel de Abreu 444, 4º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

had one gestation with miscarriage in the first half of pregnancy. Headache, dizziness irritability, asthenia and normal menstrual cycle were reported. A physical examination showed changes in the thyroid gland, nodules in the right lobe, and a nonspecific pulmonary auscultation. The attendant also reported being a former smoker and not having a family history of cancer. Was found in 1/100 metaphases a CCR involving 8 chromosomal breakpoints described as: 46,XX,der(1)t(1;4),der(4)t(1;4;?),ace(1),ace(1), (Fig. 1). Hemogram showed mild neutropenia (1470 cells/mm³) and biochemistry tests revealed no changes compared to normal values as described in Table 1. On the other hand, the immunophenotypic analysis confirmed neutropenia (33.00%),

with a lower NK cell count (2.28%), with all NK CD56+/CD16- (Table 2; Fig. 1).

Case 2

A 40-year-old latin woman, who was not a smoker or drug addict, working 48 h a week for the last 9 years as a gas station attendant had a pathological history of one miscarriage in the first half of pregnancy. Anxiety, dizziness, cramps, asthenia and normal menstrual cycle were reported. No physical examination alteration and no family history of cancer were observed. For case 2, Fig. 1 shows one CCR, which was found in 1/100 metaphases, described as der(4)ins(2;4), which was due to a 3 breakpoint event. Complete hemogram and biochemistry tests

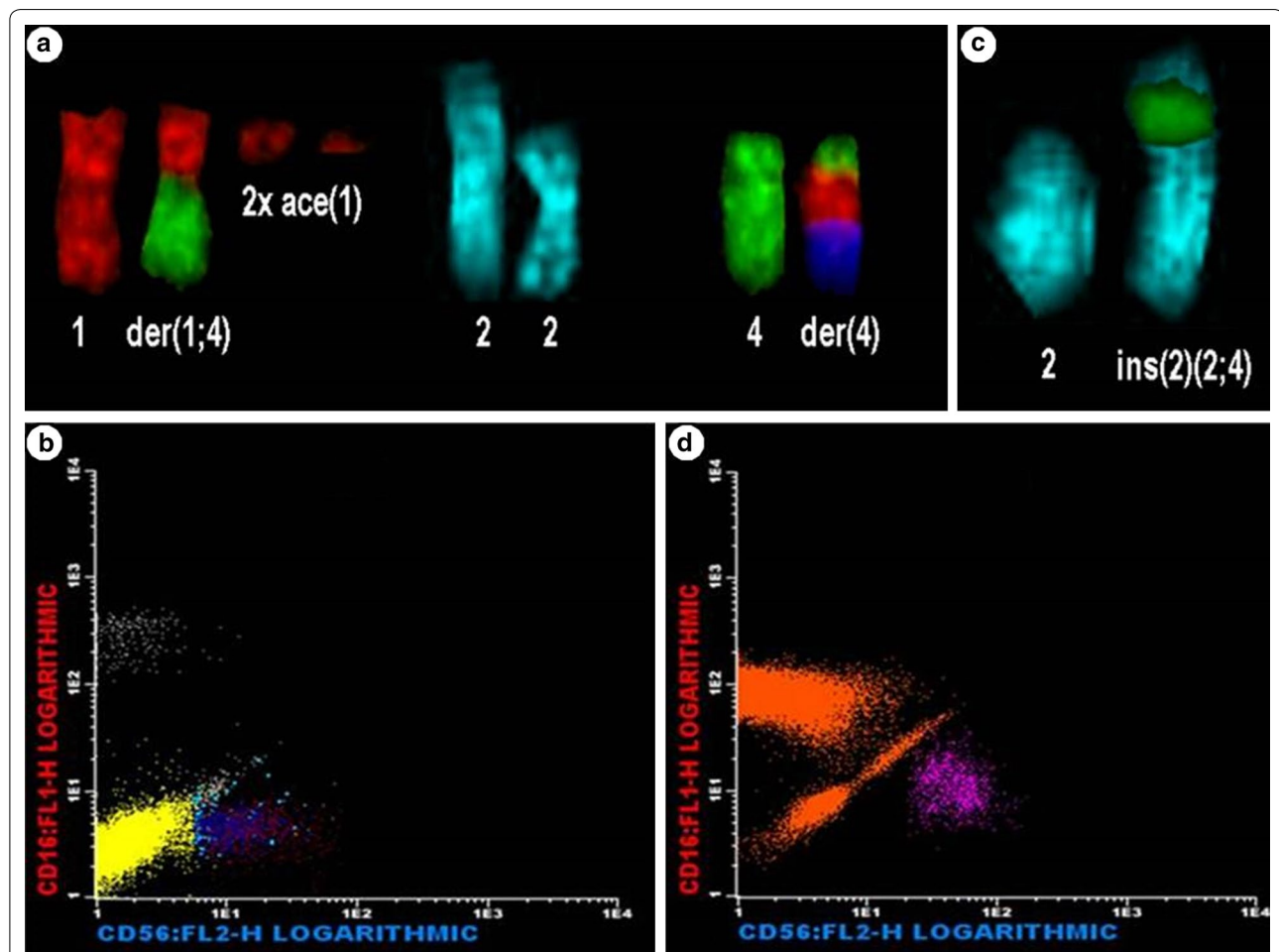


Fig. 1 CCRs found in case 1 and 2 and flow cytometric analyses of NK cell subsets. Case 1: **a** CCR—der(1)t(1;4),der(4)t(1;4;?),ace(1),ace(1). **b**, flow cytometric analyses of NK cell of case 1. Show all NK cells (CD56 positive) are CD16 negative, thus all are sub-sets of NK^{bright}. Case 2: **c** CCR- ins(2;4). Chromosome 2 was folded and thus looks shorter due to preparation. **d** flow cytometric analyses of NK cell of case 1. Show all NK cells (CD56 positive) are CD16 negative, thus all are sub-sets of NK^{bright}. **a, b** the probes were conjugated with TexasRed to label chromosome 1 (red), Diethylaminocoumarin (DEAC) for chromosome 2 (lightblue) and fluorescein isothiocyanate (FITC) for chromosome 4 (green). Other chromosomes were counterstained with DAPI (dark blue). **c, d** BD FACSCanto II cytometer was used in both cases and the data analyses were performed using the Infinicyt[®] software

Table 1 Biometrics data (clinical and demographic) of 2 female gas station attendants

Biometrics data	Case 1	Case 2
Smokers	No	No
Ex-smokers	Yes	No
Illicit drug consumption	Yes ^a	No
Alcohol abuse	Yes	No
Family history of cancer	No	No
Blood test		
Erythrocytes (10 ⁶ /μL)	4.0	4.2
Hemoglobin (g/dL)	12.0	12.5
Hematocrit (%)	36.1	38.0
Mean corpuscular volume (fl)	88.7	88.6
Leukocytes (/μL)	4620	7410
Neutrophils (%)	32.1	57.4
Typical lymphocytes (%)	56.7	34.5
Basophils (%)	0.6	0.4
Eosinophils (%)	3.7	1.5
Monocytes (%)	6.9	6.2
Platelets (10 ³ /μL)	230	312
Reticulocytes (%)	1.21	0.7
Gamma-GT (U/L)	31.0	14.0
Oxaloacetic transaminase (U/L)	0.23	17.0
Pyruvic transaminase (U/L)	15.0	11.0
Creatinine (mg/dL)	0.6	0.7
Total bilirubin (mg/dL)	0.23	0.38
Lactate dehydrogenase (mg/dL)	252	320
Rheumatoid factor (IU/mL)	9.6	9.5
C reactive protein (mg/dL)	0.11	0.12

Gamma GT Gamma glutamyl transpeptidase

^a Marijuana

showed no abnormalities in comparison with normal values, as described in Table I. Like case 1, the immunophenotypic analysis of case 2 resulted in a lower NK cell count (1.51%), with all NK CD56+/CD16– (Table 2; Fig. 1).

Conclusions

We characterized cytogenetic, hematological, and immunophenotypic status in two female gas station attendants, who working in gas station with a proved harmful environmental concentration of BTX. The following abnormalities were found: CCRs, a decrease in NK cells with abnormal CD16 expression, and early pregnancy loss.

It is well known that gas station workers are exposed to potentially harmful chemicals including BTX. However, benzene is considered the main carcinogenic agent (group 1 according to IARC) and studies associate this compound with acquired cytogenetic alterations [5–7]. Among various forms of benzene-induced

Table 2 Results of Immunophenotyping by flow cytometry

Monoclonal antibody	Lymphocyte	Monocyte	Granulocyte	Eosinophil
Case 1				
Percent of total cells	54.1	6.7	33.00	3.03
CD 4	28.56	–	–	–
CD 8	13.75	–	–	–
CD4 + CD 8	42.31	–	–	–
CD5	44.20	–	–	–
CD7	50.00	–	–	–
CD2	46.60	–	–	–
CD3	41.87	–	–	–
CD16	0.00	0.00	36.5	0.00
CD56	2.28	0.00	0.00	0.00
CD16 + CD 56 (NK)	2.28	0.00	0.00	0.00
CD19	5.77	–	–	–
CD20	6.10	–	–	–
CD10	0.07	–	28.94	–
CD27	0.00	0.00	0.00	3.52
CD22	5.88	0.00	0.00	0.00
HLA-DR	7.23	6.42	0.00	4.00
CD11c	3.08	7.06	32.4	3.52
CD25	0.00	0.00	0.00	5.70
Case 2				
Percent of total cells	31.23	5.4	63.6	0.16
CD 4	13.51	–	–	–
CD 8	9.08	–	–	–
CD4 + CD8	22.59	–	–	–
CD5	30.85	–	–	–
CD7	25.17	–	–	–
CD2	24.36	–	–	–
CD3	22.59	–	–	–
CD16	0.00	0.00	55.06	0.00
CD56	1.51	0.00	0.00	0.00
CD16 + CD 56 (NK)	1.51	0.00	0.00	0.00
CD19	5.58	–	–	–
CD20	5.59	–	–	–
CD10	0.13	–	46.09	–
CD27	0.00	0.00	0.00	0.00
CD22	4.88	0.00	0.00	0.00
HLA-DR	4.89	7.12	0.00	0.00
CD 11c	0.20	3.75	49.12	0.00
CD25	0.00	0.00	0.00	0.00

genetic alterations, aneuploidy and chromosomal breakage are the most studied [4]. Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of chronically benzene-exposed patients were previously documented [5–7].

Zhang et al. [5] reported dose-dependent chromosomal aneuploidies (mono- and trisomies) in the peripheral blood lymphocytes of workers exposed to benzene. In our study, we analyzed CAs only in three pairs of chromosomes, which make up 22.8% of the human genome. It's a cheaper and faster test to estimate the DNA damage when compared to whole genome CA screening. Chromosomal aberrations (CAs) of high complexities could be detected in 1 out of 100 metaphases per patient (i.e. 1%). The rate of CCRs in normal controls lies between 0 and 0.5%, determined in 1000 metaphases, each [8]. In the present study, only 100 metaphases could be analyzed per case. Thus, the finding of one meta- phase with a CCR among 100 cells is at least noteworthy.

Even though CCR detection in peripheral blood is not directly correlated with enhanced cancer risk, it should be kept in mind that such CAs may indicate increased radio- and/or chemosensitivity. As tumors may be induced by environmental factors in combination with a special genetic susceptibility, the two cases reported may be at risk of acquiring malignancies [8].

As is well known, meiosis is a complex process controlled by different checkpoints, but males and females respond differently to meiotic disturbances [9]. During oogenesis, meiosis is generally pursued leading to the formation of aneuploid gametes or with single gene mutations.

Thus, in gametes, acquired genetic changes can be passed on to the next generation. Several epidemiological studies support the idea that genotoxic and nongenotoxic events following benzene exposure may be initiators of childhood leukemia in utero [10]. Another study on AML has shown that disease is usually initiated in utero because the leukemic translocations and other genetic changes are present in blood spots collected at birth [10, 11]. Also interesting is the fact that the majority of the CCR cases are reported in females ascertained through repeated spontaneous abortions or the birth of a malformed child [11].

Besides the detected CCRs pointing towards enhanced chemosensitivity, these two female workers had hematological and immunological abnormalities characterized by mild leukopenia (case 1) and NK abnormalities. There are some studies concerning benzene with hematological and immunological abnormalities in humans [12–16]. The effects of immunotoxicity induced by benzene are depression and alteration of both the immune system mediated by cells and the humoral system [15]. Lan et al. [13] observed that leucocytes, B and CD4+-T cell counts, were significantly decreased in workers exposed to benzene compared to the controls. In another study, the number of T lymphocytes, lymphocytes T CD4 and T CD8, and NK cells was reduced in the percentages

and absolute numbers, and an increase in the monocyte count in workers during the period of exposure was found [15]. Thus, it was suggested that the depressive effect of benzene on the T and NK cells may be a factor of the probable carcinogenic activity of benzene through the immune system.

Natural killer (NK) cells are immune effector cells that recognize both virally infected and malignant target cells. Surprisingly, the results of the immunophenotypic analysis revealed NK CD56 positive (normal fluorescence) and CD16 negative in both cases, suggesting the presence of the rare subtype NK bright in the peripheral blood, which has low cytotoxic action [15]. It is possible that the action of BTX on the immune system had blocked the transition of immature CD56 bright cells into CD56 dim cells. In agreement with this finding, an 11 year follow up study showed that low NK cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes correlates with an increased risk for cancer [16].

The identifications of chromosomal abnormalities and NK downregulation in the blood may be a new indicator for effective follow up of workers exposed to BTX, preventing diseases mainly important for females and their offspring. Further studies with a larger number of workers are necessary to confirm the results found.

Abbreviations

AML: acute myeloid leukemia; BTX: benzene, toluene and xylene; CAs: chromosomal aberrations; CCR: complex chromosomal rearrangements; FISH: fluorescence in situ hybridization; NK: natural killer.

Authors' contributions

GA, UBO and MHO designed the study and applied for Research Ethics Board approval. MMT, TP, RTS and FS recruited the workers. The cytogenetic and immunophenotypic data were analyzed by NK, SL and FS. FS prepared the manuscript draft with important intellectual input from TL and MHO. All authors approved the final manuscript and had complete access to the study data.

Author details

¹ Laboratório de Marcadores Circulantes, Departamento de Patologia e Laboratórios, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ² Pós-graduação em Ciências Médicas (PGCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ³ Coordenação de Pesquisa, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴ Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵ Jena University Hospital, Friedrich Schiller University, Institute of Human Genetics, Kollegienasse 10, D-07743 Jena, Germany. ⁶ Departamento de Patologia Geral, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Avenida Professor Manuel de Abreu 444, 4º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro 20551-030, Brazil.

Acknowledgements

We thank the subjects who volunteered in the study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

All the data supporting our findings is contained within the manuscript.

Consent for publication

Written informed consents were obtained from the patients for publication of this Case Report and any accompanying images. A copy of the written consents are available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Ethics approval

This study was approved by the local ethics committees (Instituto Nacional de Câncer—INCA (121/09) and Universidade do Estado do Rio de Janeiro—UERJ (758.647), Brazil).

Grant support

Programa de Oncobiologia, Rio de Janeiro, Brazil, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro Brazil.

Received: 18 September 2016 Accepted: 30 December 2016

Published online: 18 January 2017

References

- Otero UB, Ornellas MH. Health risk related to the exposition to benzene and other chemicals present in gasoline. In: Alves G, editor. The health and environmental threats related to gas stations. Germany: Lambert; 2015. pp. 9–25. ISBN-13: 978-3-659-81445-7.
- Occupational Safety and Health Administration, US Department of Labor. Medical surveillance guidelines for Benzene. In: Occupational Safety and Health Standards. https://www.osha.gov/pls/oshaweb/owadisp.show_document?p_table=STANDARDS&p_id=10045. Accessed 25 Oct 2016.
- Verdorfer I, Neubauer S, Letzel S, Angerer J, Arutyunyan R, Martus P, et al. Chromosome painting for cytogenetic monitoring of occupationally exposed and non-exposed groups of human individuals. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagenesis*. 2001;49:97–109.
- Smith MT. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility. *Annu Rev Public Health*. 2010;31:133–48.
- Zhang L, Lan Q, Guo W, Hubbard AE, Li G, Rappaport SM, et al. Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to an established leukemogen, benzene. *Carcinogenesis*. 2011;32:605–12.
- Santiago F, Alves G, Otero UB, Tabalipa MM, Scherrer LR, Kosyakova N, et al. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet*. 2014;7:15.
- Zhang L, Lan Q, Ji Z, Li G, Shen M, Vermeulen R, et al. Leukemia-related chromosomal loss detected in hematopoietic progenitor cells of benzene-exposed workers. *Leukemia*. 2012;26:2494–8.
- Neubauer S, Dunst J, Gebhart E. The impact of complex chromosomal rearrangements on the detection of radiosensitivity in cancer patients. *Radiother Oncol*. 1997;43:189–95.
- Madan K. Balanced complex chromosome rearrangements: reproductive aspects. A review. *Am J Med Genet*. 2012;158:947–63.
- McHale CM, Wiemels JL, Zhang L, Ma X, Buffler PA, Feusner J, et al. Prenatal origin of childhood acute myeloid leukemias harboring chromosomal rearrangements t(15;17) and inv(16). *Blood*. 2013;101:4640–1.
- Greaves MF, Wiemels J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:639–49.
- Brandao MM, Rêgo MAV, Pugliese L, Cláudio J, Bastos CM, Ferreira J, et al. Phenotype analysis of lymphocytes of workers with chronic benzene poisoning. *Immunol Lett*. 2005;101:65–70.
- Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*. 2004;306:1774–6.
- Luan FJ. A study on lymphocyte subpopulations and immunologic status of female workers exposed to benzene. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 1992;26:77–9.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9:503–10.
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow up study of a general population. *Lancet*. 2000;356:1795–9.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3.3 Artigo 3- Cytogenomic biomonitoring in gas station workers for their susceptibility to occupational cancer. (Manuscrito)

Cytogenomic biomonitoring in gas station workers for their susceptibility to occupational cancer

Journal:	<i>Genes, Chromosomes and Cancer</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Keywords:	gas station worker, benzene, toluene, xylenes, ethylbenzene

SCHOLARONE™
Manuscripts

Peer Review

Background

BTEX (benzene, toluene, ethyl benzene, and xylene) are aromatic hydrocarbons widely used as solvents in fuels, being chemical contaminants in gas station environments. Benzene is considered the main carcinogenic agent (Group 1 according to IARC), and the association with cancer is well-established¹. In Brazil, as self-service fuel filling at gas stations is illegal, gas station workers (GSWs) have to fill the fuel in the car's tank; due to this, they are chronically exposed to high concentrations of BTEX. Although the mechanisms by which BTEX causes genotoxic effects are not fully clear, there is evidence that the function of a wide range of cellular targets are perturbed by specific metabolites and reactive oxygen species (ROS). Genotoxic effects include: (i) inhibition of topoisomerase II; (ii) adduct formation of reactive metabolites; (iii) oxidative DNA damage; (iv) error-prone DNA repair; and (v) epigenetic alterations².

Chromosome alterations (CAs) are standardized biomarkers of early biological effects in human biomonitoring. In fact, CAs in peripheral blood lymphocytes reflect inter-individual sensitivity to exogenous genotoxic substances and can be used as biomarker of carcinogenic risk^{3,4}. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using whole chromosome painting (wcp) probes allows a rapid detection of CAs, enabling new possibilities of cytogenetic dosimetry^{5,6}.

It is suggested that DNA repair mechanisms do not work correctly in GSWs who have high somatic rates of CAs. In this way the mutated DNA perpetuates in the daughter cells, thus inducing the development of cancer⁷. *RAD*, *ATM*, and *CHEK* genes play a role in the DNA double-strand break repair and *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R*, and *CHEK2/T470C* polymorphisms are related to many cancers, such as prostate, breast, and head and neck cancer, and leukemias^{8,9,10}. The *ATM* gene is located on chromosome 11 and encodes a serine threonine kinase that is activated in response to

1
2
3 DNA double-strand breaks. *ATM* participates in DNA repair by phosphorylating
4 downstream proteins involved in cell cycle checkpoint control, apoptosis, and DNA
5 repair. *CHEK2* is located on chromosome 22 encoding a serine threonine kinase
6 involved in the DNA damage response¹⁰. *RAD51* is located on chromosome 15 and
7 codes for a bacterial RecA recombinase homolog, central to the Homologous
8 Recombination Repair (HRR) mechanism. The RAD51 protein is critical for
9 maintaining genomic integrity by repairing DNA double-strand breaks⁸. These
10 polymorphism prone genes involved in DNA repair were analyzed in the present study
11 to verify the presence of genetic susceptibility in GSWs. It should be noted that genetic
12 variations in DNA repair genes could alter the DNA repair capacity, leading to
13 accumulation of DNA damage, followed by programmed cell death or unregulated cell
14 growth and may account, in part, for the cancer development.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 The aims of this study were to evaluate the health of the 114 GSWs working in
29 Rio de Janeiro and 115 controls. Medical inquiries, hematological and biochemical
30 evaluations, CA-rate in lymphocytes using three-color chromosome painting (Chrs 1, 2,
31 and 4), and the assessment of the *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R* and *CHEK2/T470C*
32 polymorphisms were performed.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

MATERIALS AND METHODS

Population study

This is a workplace-based case-control study with 114 workers (60 men and 54 women) recruited at 11 gas stations in Rio de Janeiro and 115 age-matched controls (64 men and 51 women). A trained interviewer questioned the members of the study population regarding their age, sex, race, life-style (smoking habits, alcohol and illicit drug consumption, etc.), as well as medical and occupational histories. Peripheral blood samples were collected for complete hemogram, biochemistry, and cytogenetic tests. The workers were divided into two groups (group 1, ≤ 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases; and group 2, > 10 chromosomal abnormalities per 1,000 metaphases) and compared to clinical characteristics and genotyping results. This study was approved by the local ethic committees of Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ (34310014.9.0000.5259/14) and Instituto Nacional de Câncer - INCA (121/09), Brazil, and all subjects were informed about the potential benefits and risks of this study.

Hematological and Biochemistry Analyses

The hematological analysis consisted of a complete hemogram, while the biochemistry analysis consisted of measuring gamma glutamyl transpeptidase (gamma-GT), direct bilirubin, and reticulocyte levels. All blood tests were performed in the routine laboratories of UERJ/HUPE and INCA according to standard methods.

Cytogenetic Analyses

The cytogenetic analyses were performed for delimiting GSWs at risk as previously described and for allowing associations between the frequency of

1
2
3 lymphocyte CAs, genotyping results, and clinical characteristics^{3,5,6}. Blood samples, 2
4 ml of heparinized whole blood, were collected by venipuncture. Lymphocyte cultures
5 were performed and chromosomes were prepared according to standard procedures after
6
7
8 48 hours of cultivation¹¹. FISH was done as previously reported using homemade wcp
9 probes for chromosomes 1, 2, and 4^{5,6}. One hundred metaphases were analyzed per
10 GSW and 200 metaphases in 11/115 controls.
11
12
13
14
15
16
17

18 **Genotyping**

19
20 Genomic DNA from peripheral blood leukocytes was obtained by phenol-
21 chloroform extraction and analyzed by polymerase chain reaction and restriction
22 enzyme digestion (PCR-RFLP) assays for *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R*, and
23 *CHEK2/T470C* polymorphisms according to previous publications^{9,10,12}. The PCR
24 reactions were carried out in the VeritiVR Thermal Cycler (Applied Biosystems) and
25 were done using 50–200ng of genomic DNA, 0.4μM of each primer, 1×PCR buffer,
26 250μM of dNTPs, 1.5mM of MgCl₂, and 1–2.5 units of Taq polymerase in a 50μl
27 reaction volume. PCR products were digested with MvaI (*RAD51/G135C*, 60°C for 1h),
28 AlwI (*ATM/P1054R*, 37°C for 1h), and PstI (*CHEK2/T430C*, 37°C for 5 min) (New
29 England Biolabs), and then separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide, and
30 the digested/separated products were further visualized by silver staining. Positive and
31 negative controls were used in all reactions.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 **Statistical Analysis**

49
50 The Hardy–Weinberg (HW) equilibrium was tested using the Chi-Square (v2)
51 statistic for the goodness-of-fit test for each polymorphism, and the differences in the
52 allele and genotype frequencies between groups were analyzed using standard v2 or
53 Fisher's exact tests. In the distributed variables, a nonparametric Mann–Whitney test or
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Goodness-of-fit test (multinomial distribution) was used for comparison of the
4 distributed variables between groups using the IBM SPSS (Version 20). The odds ratio
5 (OR) was also calculated. For all statistical tests, P -value <0.05 was considered
6 significant. Inconclusive results concerning blood exams and molecular analysis, and
7 uncertain questionnaire information were excluded from the statistical analysis.
8
9
10
11
12

13 Results

14 Health report

15
16 The GSWs interviewed in this study routinely worked for 6 days a week, for 8
17 hours or more per day, with 6.92 years of median time of employment. Regarding age,
18 there were no significant differences between the workers (38.84 ± 12.42) and the control
19 groups (36.43 ± 12.93) ($P=0.101$). As for race, 52.6% (60/115) self-declared as Mulatto,
20 14.9% (17/115) White, 28.9% (33/115) Black, 1.8% (2/115) Native Indians, and 1.8%
21 (2/115) Asiatic. A low prevalence of smoking (7%) and moderate consumption of
22 alcohol beverage were identified. No statistical differences were found between alcohol
23 consumption, illicit drug use (marijuana, cocaine, and ecstasy), smoking, and race
24 between workers and controls ($P=1.000$; $P=1.000$; $P=0.293$; $P=1.000$, respectively;
25 Table 1). Despite no statistical difference for gender between workers and controls, a
26 higher number of women were observed in group 2 (68.2%) compared to group 1
27 (42.4%) ($P= 0.035$).
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

44 Regarding the comparative analyses of blood tests, monocytes, eosinophils,
45 basophils, hemoglobin (men), hematocrit (men), and gamma-gt were found to be
46 significantly higher in the workers group, when compared with the controls ($P=0.001$;
47 $P<0.001$; $P< 0.001$, $P=0.001$, $P= 0.003$, and $P<0.001$, respectively). On the other hand,
48 platelets, erythrocytes (women), hemoglobin (women), and neutrophil levels ($P= 0.001$,
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 $P=0.001$, $P=0.003$ and $P=0.001$, respectively) were lower. It should be noted that only
4
5 monocytes were associated with a high CA-rate ($P=0.024$, group 1 vs. group 2).
6

7
8 Table 2 shows the main somatic symptoms reported by the workers. A higher
9
10 number of workers recorded weakness (19.3% vs. 6.1%; $P=0.005$), dizziness (27.9% vs.
11
12 7.9%; $P=0.000$), drowsiness (24.1% vs. 10.5%; $P=0.008$), headache (37.7% vs. 18.6%;
13
14 $P=0.002$), and irritability/nervousness (50.0% vs. 15.8%; $P=0.000$) when compared to
15
16 the controls. Also in the medical inquiry, bruises, epistaxis, arterial hypertension,
17
18 osteoarticular, and otorhinolaryngologic diseases were the health problems frequently
19
20 reported by the workers and with statistical difference when compared with controls, as
21
22 seen in Table 3 ($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.001$; $P=0.000$ and $P=0.035$, respectively). Also
23
24 noteworthy is the high frequency (77.8%) of spontaneous abortions in the first trimester
25
26 of pregnancy of total abortions reported by the female workers in comparison with
27
28 female controls (11.1%) ($P=0.015$), Table 3.
29

30
31 Table 4 shows risk behavior adopted by GSWs during their work time and compares the
32
33 results between the groups (Group 1 vs. Group 2). Note that both groups presented
34
35 similar results for “use the cleaning flannel” ($P=0.551$), “smell the fuel cap before
36
37 refueling” ($P=1.000$), “approaches the face when fueling to the limit” ($P=0.800$) and
38
39 “aspirates fuel with the mouth” ($P=1.000$). However, statistical difference was found for
40
41 “untrust in the automatic fuel supply” (Group 2, 76.5% vs. Group 1, 50%; $P=0.027$)
42
43

44 45 46 **Early effect biomarker data**

47
48 The GSWs CA-rate was 9.8 CAs/1,000 metaphases, and a high frequency of
49
50 CAs (> 10 CAs per 1,000 metaphases) was found in 19.1% (22/114) of GSWs, whereas
51
52 80.9% (92/114) of workers showed no aberrations or less than 10 CAs per 1,000
53
54 metaphases, and no CAs were found among controls.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Chromosome 1 with 38.4% (43/112) of CAs was the most affected, followed by
4 chromosomes 4 (32.1%) and 2 (29.4%); however, no statistical difference was found
5 between the chromosomes and CA distribution ($P = 0.494$). Among the total CAs, the
6 translocations were most frequently found (38.4%), followed by monosomies (14.3%);
7 deletions (13.4%); chromosomal fragments (13.4%); chromosomal breaks (11.6%);
8 chromosome derivatives (5.3%); trisomies (1.8%), and inversion (1.8%)(see Table 5).
9
10 In Table 4 we described the types of CAs for each chromosome analyzed. Figure 1
11 shows an example of CAs found in one female worker (CAs - del(1),der(2),t(2;?),
12 der(4),t(4;?)).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 **Genotyping**

25
26 The *RAD51/G135C*, *ATM/P1054R*, and *CHEK2/T470C* polymorphisms were
27 determined for GSWs and controls. The *RAD51/G135C* and *ATM/P1054R*
28 polymorphisms did not show deviation from the HW equilibrium in the population
29 analyzed ($P=0.322$, $P= 0.632$, respectively), Table 6. However, the variant
30 *CHEK2/T430C* was not found in GSWs or controls; thus, these results were not
31 considered for statistical analysis. Neither *RAD51/G135C* nor *ATM/P1054R*
32 polymorphisms were associated with gender or ethnicity. In a comparative population
33 analysis, the frequencies of *ATM/P1054R* showed no statistical difference between total
34 workers and controls ($P= 0.930$); however, by the Chi-Square test the frequencies of
35 *RAD51/G135C* were different ($P= 0.011$) (see Table 6).
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 There was a positive association for a number of CAs per GSW and variants of
49 *RAD51/G135C* genotypes ($P=0.008$, variant/variant + wild/variant vs. wild/wild; $P=$
50 0.011 , variant/variant vs wild/wild; and $P=0.034$, wild/variant vs. wild/wild), Table 7.
51
52 Similar results were found for the distribution of the number of abnormal metaphases
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 per workers ($P=0.005$, variant/variant + wild/variant vs. wild/wild; $P= 0.004$,
4 variant/variant vs. wild/wild; and $P=0.028$, wild/variant vs. wild/wild) (see Table 7).
5
6

7 Regarding the comparative analyses for types of chromosomal alterations and
8 *RAD51/G135C* genotypes, we found a higher number of chromosome fragments
9 ($P=0.004$, wild/variant vs. wild/wild; $P=0.014$, variant/variant + wild/variant vs.
10 wild/wild) and chromosome breaks ($P=0.013$, wild/variant vs. wild/wild) between
11 variant allele genotype groups (Table 8).
12
13
14
15
16

17 The frequencies of *ATM/P1054R* genotypes were compared between the
18 workers and controls, and no significant difference was detected, indicating that the two
19 populations were equivalent (see Table 9). Only a weak positive association with
20 chromosome breaks was detected, when compared between variant/variant +
21 wild/variant vs. wild/wild genotypes ($P= 0.054$), (see Table 10). To assess the capacity
22 of variant alleles *RAD51/G135C* and *ATM/P1054R* to detect the workers with CAs, the
23 sensitivity and specificity were calculated. Note a considerable specificity for
24 *RAD51/G135C* (87%) and *ATM/P1054R* (79%); however, lower sensitivity was found
25 for both 28% and 14%, respectively. When the specificity was calculated for
26 *RAD51/G135C* and *ATM/P1054R* together, the value found was 82% (see Table 6).
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The association between three dysfunctional polymorphisms (*RAD51/G135C*, *ATM/P1054R*, and *CHEK2/T470C*) and CAs, as an early effect biomarker, was evaluated in this case-control study. In addition, comparative medical and epidemiological inquiries were applied to cases and controls. The collected data revealed a higher number of women and GSWs who reported “untrust in the automatic fuel supply” between the workers with > 10 CAs per 1,000 metaphases (group 2). However in the same group a lower rate of monocytes was found. The GSWs who reported “untrust in the automatic fuel supply” hold their face close to the fuel tank to hear or to see the gasoline rising when fueling the car, thereby increasing the BTEX exposure.

Major areas of research about GSWs' health have focused on two main points: (i) strategies for early diagnosis of benzenism, clinical and laboratory findings; (ii) prevention with socio-educational orientation; and (iii) finding accurate biomarkers for occupational cancer risk. The present study was designed to target items (ii) and (iii).

Genetic instability assessment

Numerous studies have associated exposure to BTEX with increased levels of CAs in circulating lymphocytes of exposed workers^{3,6,13,30}. Increased levels of CAs have, in turn, been correlated with an increased risk of cancer, especially for hematologic malignancies such as myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myelogenous leukemia (AML)¹⁴.

FISH using wcp probes was applied in our study to detect alterations caused by chronic exposure to BTEX in 21.87% (Chrom. 1, 2, and 4, together) of the human genome⁵. Similar results were previously described by our research group applying the

1
2
3 same technique in GSW populations (rate: 9.3 CAs per 1,000 metaphases)⁶, as well as
4
5 results described by Verdorfer et al. (2001) in populations exposed to nitroaromates
6
7 (16.0 CAs per 1,000 metaphases) and compared to controls (5.85 CAs per 1,000
8
9 metaphases)⁵. It is possible GSWs with higher rates of CAs have a higher risk of
10
11 developing cancer in future than others with low rates of CAs.
12

13
14 In the present study, the frequencies of *RAD51/G135C* variants were higher in
15
16 the GSW population when compared to controls, and the allele variant genotypes were
17
18 associated with CAs per workers. In a meta-analysis study on the relationship between
19
20 *RAD51/G135C* and cancer risk, Zao et al. (2014) investigated 42 studies involving
21
22 19,142 cases and 20,363 controls¹⁵. They found a significantly increased risk for overall
23
24 cancers and concluded that *RAD51/G135C* polymorphism is a candidate for
25
26 susceptibility to cancer in general, especially for breast cancer. In another meta-analysis
27
28 involving 10 studies with 2,656 patients and 3,725 controls, the *RAD51/G135C*
29
30 polymorphism was associated with increased MDS risk, while no association was
31
32 observed for acute leukemia¹⁶. In our study chromosome fragments and chromosome
33
34 breaks were positively associated with variant allele genotypes. There is evidence that
35
36 in Rad51 deficient cells stop in the G2/M phase and accumulate chromosomal breaks
37
38 prior to cell death or unregulated cell growth, justifying the association found¹⁷.
39
40

41
42 Regarding the *ATM* results, no differences were found in the proportion of
43
44 carriers of the *ATM/PI054R* variant between workers and controls. However, this
45
46 proportion was considerably higher among our workers (19.0%, 21 out of 110)
47
48 compared to prostate cancer patients (9.5%, 25 out of 261) and controls (4.78%, 22 out
49
50 of 460) described by Meyer *et al.* (2007)¹⁸. A weak positive association between
51
52 chromosome breaks and *ATM/PI054R* variant allele genotyping was detected in our
53
54 workers, suggesting that more studies are necessary for a final conclusion.
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In the case of the *CHEK2/T470C* polymorphism, no variant alleles were found
4
5 in our study, possibly due to the low frequency in our study population. *CHEK2/T470C*
6
7 is associated with reduced DNA repair ability and increased cancer susceptibility, such
8
9 as breast cancer and colorectal cancer³¹. In the USA, the *CHEK2/T470C* variant has
10
11 been reported in 1.2% of the population, while in Germany the frequency was 2.2% in
12
13 breast cases and 0.6% in controls; and in Belarussian populations 5.7% in cases and
14
15 1.3% in controls^{19,20}. It may be necessary to increase the number of workers to be
16
17 analyzed in order to draw conclusions about the *CHEK2/T470C* polymorphism in the
18
19 Brazilian GSWs.
20
21

22 The literature has also reported an influence of gene–gene interactions on cancer
23
24 susceptibility. Several studies have shown that combinations of *RAD51* and *ATM*
25
26 variant alleles may increase the risk for cancer development²¹. In our study no increase
27
28 in specificity or sensitivity was found for the *RAD51/G135C* and *ATM/P1054R*
29
30 polymorphism association for detecting CAs. Perhaps for an effective GSWs genomic
31
32 instability monitoring and an increase in the sensitivity and specificity in detecting CAs,
33
34 it will be necessary to evaluate not only more polymorphisms related to the DNA repair,
35
36 but also polymorphisms related to BTEX detoxification^{22,23}.
37
38
39
40

41 **Risk behavior and prevention of cancer**

42
43
44

45 Hematological changes in classic blood tests were previously described^{1,3,24}. In
46
47 the present study, a high rate of monocytes, eosinophils, basophils, and gamma-gt was
48
49 found compared to controls, as previously described^{3,25,26}. However, a lower rate of
50
51 platelets and neutrophils was associated with the workers. Despite the higher rate of
52
53 monocytes found in total of workers, a lower rate of monocytes was associated with a
54
55 high number of CAs (group 2), highlighting the importance of the simple classic blood
56
57
58
59
60

1
2
3 test in monitoring their overall health. We should also consider the high frequency of
4
5 spontaneous abortions in the first trimester of pregnancy of total abortions reported by
6
7 the female workers compared to female controls. This was also previously described by
8
9 Silvestre et al. (2017) in a study with a lower number of female GSWs²⁴. Thus, the
10
11 immediate absence of female workers to the gas station once pregnancy is confirmed is
12
13 necessary to reduce the BTEX's genotoxic and abortive effects. More maternal-
14
15 child health studies are needed, since the female gender was associated with a higher
16
17 number of CAs (Group 2). Women have shown faster benzene biotransformation than
18
19 men, metabolizing 23–26% more benzene, and it is known that benzene must be
20
21 biotransformed to exert its toxic effects. Thus, woman may be at greater risk, and
22
23 environmental/biological limit values established in studies of male subjects may be
24
25 inadequate^{27,28,29,32}.

26
27
28 We recommend that an educational orientation for the GSWs regarding the non-
29
30 adoption of risk behaviors during their working time would reduce the workers'
31
32 symptoms and possibly the carcinogenic effects. Note that “untrust in the automatic fuel
33
34 supply” by the workers associated with an elevated rate of CAs (group 2). The workers
35
36 who reported “untrust in the automatic fuel supply” hold their face close to the fuel tank
37
38 to hear or to see the gasoline rising when fueling the car, thereby increasing the BTEX
39
40 exposure.
41
42
43
44

45 **Conclusion**

46
47
48 Herein we describe a health survey and the consequent genome risks related to
49
50 the chronic exposure to gasoline vapors as well as the possible ways to monitor such
51
52 risks and the protective attitudes that should be taken. CAs are standardized biomarkers
53
54 used to identify not only the worker population at a higher risk of developing cancer,
55
56
57
58
59
60

1
2
3 but also specific individuals who are susceptible to cancer development. Our results
4
5 make it clear that GSWs showed an increased frequency of CAs (9.8 per 1,000
6
7 metaphases), maybe due to the genotoxic effect of the BTEX to which they are exposed.
8

9
10 The higher frequencies of the *RAD51/G135C* variant in the GSW population and
11
12 its association with higher CA frequency is a relevant result. In this way the
13
14 *RAD51/G135C* polymorphism maybe a promising future marker of susceptibility to the
15
16 development of cancer. Increasing the knowledge of the DNA repair variations in
17
18 maintaining the genomic stability and integrity in the GSWs is crucial for cancer
19
20 prevention. As a result, a better understanding of inter-individual variations in
21
22 susceptibility, with the identification of groups-at-higher-risk, may provide a foundation
23
24 for developing better prevention programs.
25
26
27
28
29
30

31 **Acknowledgements**

32
33 We thank the subjects who volunteered to participate in the study.
34

35 **Competing interests**

36
37 The authors declare that they have no competing interests.
38

39 **Availability of data and materials**

40
41 All the data supporting our findings are contained within the manuscript.
42
43

44 **Consent for publication**

45
46 Written informed consents were obtained from all subjects for publication of this paper
47
48 and any accompanying images.
49

50 **Ethics approval**

1
2
3 This study was approved by the Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ
4 (34310014.9.0000.5259/14) and Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da
5
6
7 Silva - INCA (121/09), Brazil.
8

9 **Grant support**

10
11 Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), APQ1
12
13 E.26/010.002022/2015.
14
15

16 17 **REFERENCES**

- 18
19
20
21
22 1. IARC. International Agency for Research on Cancer: agents classified by the IARC
23 monographs. IARC: Lyon, France, updated 14 January 2014. Vol. 1–109. Available
24 from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
25
26
27
28 2. McHale, Cliona M, Zhang L, et al. Current understanding of the mechanism of
29 benzene-induced leukemia in humans: implications for risk
30 assessment. *Carcinogenesis*.2011;33:240-252
31
32
33
34 3. Zhang L, Lan Q, Ji Z, et al. Leukemia-related chromosomal loss detected in
35 hematopoietic progenitor cells of benzene-exposed workers.
36
37
38
39
40
41
42
43 4. Mateuca RA, Decordier I, Kirsch-Volders M. Cytogenetic methods in human
44 biomonitoring: principles and uses. *Methods Mol Biol*. 2012;817:305–34.
45
46
47 5. Verdorfer I, Neubauer S, Letzel S, Angerer J, Arutyunyan R, Martus P, Gebhart E:
48 Chromosome painting for cytogenetic monitoring of occupationally exposed and
49 non-exposed groups of human individuals. *Mutation Res* 2001,491(1):97–109.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 6. Santiago F, Alves G, Otero UB, Tabalipa MM, et al. Monitoring of gas station
4 attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color
5 chromosome painting. *Molecular cytogenetics*. 2014;7:15.
6
7
- 8
9
10 7. De Palma G, Manno M. Metabolic polymorphisms and biomarkers of effect in the
11 biomonitoring of occupational exposure to low-levels of benzene: state of the art.
12 *Toxicology letters*.2014;231:194-204.
13
14
- 15
16 8. Zeng X, Zhang Y, Yang L, et al. Association between RAD51 135 G/C
17 polymorphism and risk of 3 common gynecological cancers: A meta-analysis.
18 *Medicine*.2018;97:26.
19
20
- 21
22 9. Schumacher FR, Al Olama AA, Berndt SI, et al. Association analyses of more than
23 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nature*
24 *genetics*.2018;1.
25
26
- 27
28 10. Skasko E, Kluska A, Niwińska A, et al. Age at onset of bilateral breast cancer, the
29 presence of hereditary BRCA1, BRCA2, CHEK2 gene mutations and positive
30 family history of cancer. *Oncology Research and Treatment*.2009; 32:182-188.
31
32
- 33
34 11. Liehr T, Claussen U. FISH on chromosome preparations of peripheral blood. In
35 *FISH-Technology*, Ed. Springer-labmanual. Edited by: Liehr T, Rautenstrauss B.
36 Berlin: Springer; 2002:73–81.
37
38
- 39
40 12. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual: three-volume set*.
41 Cold Spring Harbor Laboratory Protocols.4rd ed. New york, NY.2012;7:456-540.
42
43
- 44
45 13. Zhang L, Eastmond DA, Smith MT. The nature of chromosomal aberrations
46 detected in humans exposed to benzene. *Critical reviews in toxicology*.2002;32:1-
47 42.
48
49
- 50
51 14. Smith MT. Advances in understanding benzene health effects and susceptibility.
52 *Annu Rev Public Health*. 2010;31:133–48
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 15. Zhao M, Chen P, Dong Y, et al. Relationship between Rad51 G135C and G172T
4 variants and the susceptibility to cancer: a meta-analysis involving 54 case-control
5 studies. *PloS one*. 2014;9:87259.
6
7
- 8
9 16. He YZ, Hu X, Chi XS, et al. Association between RAD51 gene polymorphism (-
10 135G/C) and susceptibility of myelodysplastic syndrome and acute leukemia:
11 evidence based on a meta-analysis. *Tumor Biology*. 2014;35:615-621.
12
13
- 14
15 17. Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, et al. Rad51-deficient vertebrate cells
16 accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *The EMBO*
17 *journal*.1998;17:598-608.
18
19
- 20
21 18. Meyer A, Wilhelm B, Dörk T, et al. ATM missense variant P1054R predisposes to
22 prostate cancer. *Radiotherapy and oncology*. 2007;83:283-288.
23
24
- 25
26 19. Dong X, Wang L, Taniguchi K, et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate
27 cancer risk. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72:270-280.
28
29
- 30
31 20. Bogdanova N, Enßen-Dubrowskaja N, Feshchenko S, et al. Association of two
32 mutations in the CHEK2 gene with breast cancer. *International journal of cancer*.
33 2005;116:263-266.
34
35
- 36
37 21. Hallajian Z, Mahjoubi F, Nafissi N. Simultaneous ATM/BRCA1/RAD51 expression
38 variations associated with prognostic factors in Iranian sporadic breast cancer
39 patients. *Breast Cancer*. 2017;24:624-634.
40
41
- 42
43 22. Yadav A, Kumar N, Gulati S, at al. Association of CYP2E1 and CYP1A1m2
44 (BsrD1) polymorphisms with cytogenetic biomarkers in petrol pump workers.
45 *Biomarkers and Genomic Medicine*. 2015;7:159-164.
46
47
- 48
49 23. Fang Y, Wu HT, Ye YJ, et al. Association Between Polymorphisms of Metabolic
50 Enzyme Genes and Chromosomal Damage in Benzene-Exposed Workers in China.
51 *Journal of occupational and environmental medicine*. 2017;59:215-e220.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 24. Silvestre RT, Delmonico L, Bravo M, et al. Health survey and assessment of the
4 polymorphisms BRCA1/P871L, BRCA1/Q356R, and BRCA2/N372H in female gas
5 station workers in Rio de Janeiro. *Environmental and molecular mutagenesis*.
6 2017;58:730-734.
7
8
9
10
11 25. Mitri S, Fonseca ASA, Otero UB, et al. Metabolic polymorphisms and clinical
12 findings related to benzene poisoning detected in exposed brazilian gas-station
13 workers. *International journal of environmental research and public health*.
14 2015;12:8434-8447.
15
16
17
18
19 26. Otero UB, Ornellas MH. Health risk related to the exposition to benzene and other
20 chemicals present in gasoline. In: Alves G, editor. *The health and environmental*
21 *threats related to gas stations*. Germany: Lambert; 2015:9–25.
22
23
24
25
26 27. Moro AM, Brucker N, Charão MF, et al. Biomonitoring of gasoline station
27 attendants exposed to benzene: Effect of gender. *Mutation Research/Genetic*
28 *Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2017; 813:1-9.
29
30
31
32
33 28. Angelini S, Maffei F, Bermejo JL, et al. Environmental exposure to benzene,
34 micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study.
35 *Mutat. Res*. 2012;743:99-104
36
37
38
39 29. Brown EA, Shelley ML, Fisher JW. A pharmacokinetic study of occupational and
40 environmental benzene exposure with regard to gender. *Risk Anal*. 1998;18:205-
41 213.
42
43
44
45
46 30. Gonçalves RO, de Almeida Melo N, Rêgo MAV. Association between occupational
47 exposure to benzene and chromosomal alterations in lymphocytes of Brazilian
48 petrochemical workers removed from exposure. *Environmental monitoring and*
49 *assessment*. 2016;188:334.
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 31. Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer
4 susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA and cell biology*. 2013;32:329-
5 335.
6
7
8
9
10 32. Santiago F, Lima S, Pinheiro T, Silvestre R T, et al. (2017). Benzene poisoning,
11 clinical and blood abnormalities in two Brazilian female gas station attendants: two
12 case reports. *BMC Research Notes*. 2017;10:52.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Table 1 - Biometrics data (demographics and blood tests) of gas station attendants

Biometrics data	Group 1	Group 2	Group 1 "Vs." Group 2 (<i>P</i> -value)	Total of workers	Controls	Total of workers "Vs." controls (<i>P</i> -value)
Gender			0.035			0.235
Women	39 (42.4%)	15 (68.2%)		54 (47.4%)	64 (55.7%)	
Men	53 (57.6%)	7 (31.8%)		60 (52.6%)	51 (44.3%)	
Age (year)	38.9 (±12.4)	38.8 (±12.51)	0.900	38.84 (±12.42)	36.43 (±12.93)	0.101
Time of employment (year)	5.7. (±6.0)	4.3 (±3.8)	0.574			
Skin color			0.638			0.100
Black	25 (27.2%)	8 (36.4%)		33 (28.9%)	20 (18.2%)	
White	14 (15.7%)	3 (13.6%)		17 (14.9%)	48 (43.6%)	
Mulatto	50 (54.3%)	10 (45.5%)		60 (52.6%)	41 (37.3%)	
Native Indians	2 (2.2%)	0 (0.0%)		2 (1.8%)	1 (0.9%)	
Asiatic	1 (1.1%)	1 (4.5%)		2 (1.8%)	0 (0.0%)	
Platelets (mil/μl)	254.16 (±58.83)	255.52 (±70.85)	0.969	254.43 (±60.99)	278.29 (±49.70)	0.001
Gamma-GT (U/l)	37.17 (±39.40)	28.81 (±12.61)	0.819	35.74 (±35.86)	27.00 (±37.30)	<0.001
Direct bilirubin (mg/dL)	0.39 (±0.17)	0.34 (±0.15)	0.223	0.14 (±0.05)	0.16(±0.07)	0.046
Leukocytes (/μl)	7318.1 (±2102.3)	7226.2 (±1291.2)	0.795	7300.22 (±1966.01)	7778.61 (±1980.38)	0.066
Neutrophils (%)	55.41 (±9.80)	55.78 (±8.36)	1.00	55.49(±9.51)	59.46 (±10.92)	0.001
Eosinophils (%)	3.10 (±2.76)	2.73 (±1.61)	0.951	3.03 (±2.58)	2.14 (±3.09)	<0.001
Basophils (%)	0.42 (±0.34)	0.33 (±0.23)	0.577	0.40 (±0.32)	0.27 (±0.43)	<0.001
Typical lymphocytes (%)	33.62 (±8.92)	35.05 (±7.89)	0.385	33.89 (±8.72)	32.64 (9.79)	0.152
Monocytes (%)	7.40 (±2.04)	6.24 (±1.55)	0.024	7.18 (±2.00)	5.42 (±1.95)	<0.001
Reticulocytes (%)	1.13 (0.38)	1.19 (0.30)	0.209	1.15 (±0.36)	1.27 (±0.46)	0.080

	Women					
Erythrocytes (million/μl)	4.48 (\pm 0.22)	4.31 (\pm 0.35)	0.148	4.44(\pm 0.37)	4.62 (\pm 0.48)	0.056
Hemoglobin	13.06 (\pm 1.1)	12.54 (\pm 1.09)	0.117	12.92(\pm 1.11)	13.58 (\pm 1.88)	0.021
Hematocrit (%)	38.76 (\pm 2.98)	37.42 (\pm 3.02)	0.216	38.40(\pm 3.02)	40.18 (\pm 3.56)	0.002
Mean corpuscular volume (fl)	86.66 (\pm 5.21)	86.86 (\pm 3.73)	0.845	86.72(\pm 4.82)	87.12 (\pm 5.13)	0.511
	Men					
Erythrocytes (million/μl)	4.98 (\pm 0.37)	4.95 (\pm 0.11)	0.904	4.98 (\pm 0.35)	4.72 (\pm 0.45)	0.001
Hemoglobin	14.47 (\pm 1.13)	14.49 (\pm 0.71)	0.884	14.47 (\pm 1.08)	13.82 (\pm 2.08)	0.003
Hematocrit (%)	42.37 (\pm 2.86)	42.51 (\pm 1.55)	1.000	42.38 (\pm 2.72)	42.23 (\pm 3.71)	0.370
Mean corpuscular volume (fl)	84.90 (\pm 4.89)	84.90 (\pm 2.42)	0.645	85.42 (\pm 4.35)	88.07 (\pm 5.07)	0.001

Table 2- Statistical comparison of somatic symptoms between workers and controls

Symptoms	Total of workers	Controls	P-value
Weight Loss	10 (8.8%)	14 (12.2%)	0.518
Weakness	22 (19.3%)	7 (6.1%)	0.005
Dizziness	31 (27.9%)	9 (7.9%)	0.000
Drowsiness	27 (24.1%)	12 (10.5%)	0.008
Headache	43 (37.7%)	21 (18.6%)	0.002
Irritability / Nervousness	57 (50.0%)	18 (15.8%)	0.000
Anxiety	41 (36.0%)	45 (39.5%)	0.682
Insomnia	17 (14.9%)	11 (9.7%)	0.313
Change of mood / Depression	20 (17.5%)	12 (10.6%)	0.181
Attention Alteration	17 (15.0%)	12 (11.9%)	0.552
Memory change	19 (16.7%)	11 (9.7%)	0.169
Tingling	19 (16.7%)	10 (8.8%)	0.111
Involuntary Movements	6 (5.3%)	4 (3.5%)	0.539
Tremors	8 (7.1%)	4 (3.5%)	0.249
Decreased muscle strength	9 (8.0%)	4 (3.5%)	0.166

Table 3. Statistical comparison of health problems between workers and controls

Symptoms	Total of workers	Controls	<i>P</i> -value
Bruises	22 (19.3%)	3 (2.8%)	0.000
Epistaxis	16 (14.4%)	1 (1.0%)	0.000
Arterial hypertension	15 (13.3%)	2 (1.7%)	0.001
Diabetes Mellitus	4 (3.6%)	5 (4.4%)	1.000
Infectious diseases	14 (12.4%)	16 (13.9)	0.845
Cardiovascular diseases	12 (10.6%)	9 (7.8%)	0.500
Endocrine diseases	5 (4.4%)	12 (10.4%)	0.128
Respiratory diseases	27 (23.7%)	26 (22.6%)	0.876
Gastrointestinal diseases	29 (25.4%)	18 (15.9%)	0.101
Neurological diseases	1 (0.9%)	2 (1.7%)	1.000
Liver diseases	6 (5.3%)	4 (3.5%)	0.539
Urologic/Gynecologic diseases	15 (13.3%)	14 (12.2%)	0.844
Hematologic diseases	13 (11.4%)	6 (5.2%)	0.099
Psychical diseases	4 (3.5%)	4 (3.5%)	1.000
Osteoarticular diseases	42 (36.8%)	14 (12.2%)	0.000
Otorhinolaryngologic diseases	22 (19.5%)	10 (9.1%)	0.035
Vision changes	51 (45.1%)	46 (40.0%)	0.503
Skin diseases	17 (15.0%)	8 (7.0%)	0.059
First trimester of spontaneous abortion	7 (77.8%)	1 (11.1%)	0.015

Table 4. Association between risk behavior of gas station workers between groups 1 and 2

Risk behavior at work	Group 1	Group 2	<i>P</i> -value
Uses the cleaning flannel	60 (76.9%)	17 (85.0%)	0.551
Smells the fuel cap before refueling	19 (23.5%)	5 (25.0%)	1.000
Approaches the face when fueling to the limit	32(40.0%)	7 (35.0%)	0.800
Untrust in the automatic fuel supply	10 (50.0%)	62 (76.5%)	0.027
Aspirates fuel with the mouth (hose)	27 (33.3%)	7 (35.0%)	1.000

Table 5. Statistical analysis of chromosome alterations of gas station workers

	Chromosome Alterations				<i>P</i> - value
	Chr 1	Chr 2	Chr 4	Total	
Translocation	19	16	8	43 (38.4%)	0.105
Trisomies	0	0	2	2 (1.8%)	0.135
Monosomies	5	3	8	16 (14.3%)	0.305
Deletions	4	7	4	15 (13.4%)	0.549
Chr. derivatives	2	1	3	6 (5.3%)	0.606
Inversion	0	1	1	2 (1.8%)	0.606
Chr. fragments	6	3	6	15 (13.4%)	0.549
Chr. breaks	7	2	4	13 (11.6%)	0.231
Total alterations	43 (38.4%)	33 (29.4%)	36 (32.1%)	112 (100.0%)	0.494

Table 6. Genotypic frequencies of *RAD51* and *ATM* genotypes in 114 gas station workers and 115 controls.

	<i>RAD51/G135C</i>			<i>ATM/P1054R</i>		
	Wild/Wild	Wild/variant	variant/variant	Wild/Wild	Wild/variant	variant/variant
Group 1	59 (64.1%)	29 (31.5%)	4 (4.3%)	70 (79.5%)	18 (20.5%)	0 (0.0%)
Group 2	9 (40.9%)	10 (45.5%)	3 (13.6%)	19 (86.4%)	2 (9.1%)	1 (4.5%)
Total of workers N (%)	68 (59.6%)	39 (34.2%)	7 (6.1%)	89 (80.9%)	20 (18.2%)	1(0.9%)
Controls N (%)	88 (72.2%)	24 (21.1%)	2 (1.8%)	92 (82.1%)	20 (17.9%)	0 (0.0%)
Total	156 (68.4%)	63 (27.6%)	9 (3.9%)	181 (81.5%)	40 (18.0%)	1 (0.4%)
		<i>P</i> - value			<i>P</i> - value	
Hardy-Weinberg Equilibrium		0.322			0.632	
Total workers vs. controls		0.011			0.930	
Group 1 vs. Group 2		0.074			0.092	
Polymorphisms assessment for CA detection						
		<i>RAD51/G135C</i>		<i>ATM / P1054R</i>		<i>RAD51/G135C + ATM/P1054R</i>
Specificity (%)		87 (76-94)		79 (68-87)		82 (75-88)
Sensitivity (%)		28 (16-43)		14 (16-43)		24(14-35)

Table 7. Statistical analysis of *RAD51/G135C* genotypes

		<i>RAD51/G135C</i>			<i>P</i> -value Variant/V ariant + Wild/Vari ant “Vs.” Wild/ Wild	<i>P</i> -value Variant/Vari ant “Vs.” Wild/ Wild	<i>P</i> -value Wild/Va riant “Vs.” Wild/ Wild
		Variant/ Variant	Wild/ Wild	Wild/ Variant			
Gender N (%)	Men	6 (75.0%)	35 (51.5%)	20 (52.6%)	0.702	0.275	1.000
	Women	2 (25.0%)	33 (48.5%)	18 (47.4%)			
Ethnicity N (%)	Black	3 (37.5%)	18 (26.5%)	12 (31.6%)	0.395	0.164	0.555
	Mulatto	3 (37.5%)	40 (58.8%)	18 (47.4%)			
	White	1 (12.5%)	9 (13.2%)	6 (15.8%)			
	Asiatic	1 (12.5%)	0 (0.0%)	1 (2.6%)			
	Native Indians	0 (0.0%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)			
Number of abnormal metaphases per subject		1.63 (±1.6)	0.59 (±1.4)	0.76 (±1.00)	0.005	0.004	0.028
Number of chromosomal aberrations per subject		1.63 (±1.92)	0.84 (±1.94)	1.03 (±1.33)	0.008	0.011	0.034
Group 1 N (%)	No	5 (62.5%)	59 (86.8%)	29 (76.3%)	0.091	0.107	0.187
	Yes	3 (37.5%)	9 (13.2%)	9 (23.7%)			
	No	5 (62.5%)	86.8%	28 (73.7%)			
Group 2 N (%)	Yes	3 (37.5%)	13.2%	10 (26.3%)			

Table 8. Statistical analysis of *RAD51/G135C* genotypes and chromosome alterations

		<i>RAD51/G135C</i>			<i>P</i> -value Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild	<i>P</i> -value Variant/Vari ant "Vs." Wild/ Wild	<i>P</i> -value Variant/Vari ant + Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild
		Variant/Va riant	Wild/ Wild	Wild/ Variant			
	0	6 (75.0%)	58 (85.3%)	26 (68.4%)	0.133	0.769	0.126
Translocation s	1	1 (12.5%)	6 (8.8%)	7 (18.4%)			
	2	1 (12.5%)	3 (4.4%)	4 (10.5%)			
	4	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.6%)			
	5	0 (0.0%)	1 (1.5%)	0 (0%)			
Chr. fragments	0	8 (100.0%)	64 (94.0%)	30 (78.9%)	0.004	1.000	0.014
	1	0 (0.0%)	2 (2.9%)	8 (21.1%)			
	2	0 (0.0%)	1 (1.5%)	0 (0%)			
	3	0 (0.0%)	1 (1.5%)	0 (0%)			
Chr. Breaks	0	6 (75.0%)	63 (94.0%)	35 (92.1%)	0.787	0.013	0.245
	1	0 (0.0%)	3 (4.5%)	3 (7.9%)			
	2	2 (25.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)			
	3	0 (0.0%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)			
Deletions	0	6 (75.0%)	62 (91.2%)	34 (91.9%)	0.731	0.197	0.774
	1	1 (12.5%)	4 (5.9%)	3 (8.1%)			
	2	1 (12.5%)	2(2.9%)	0 (0.0%)			
Chr. derivatives	0	8 (100.0%)	65 (95.6%)	37 (97.4%)	0.785	1.000	0.764
	1	0 (0.0%)	1 (1.5%)	1 (2.6%)			
	2	0 (0.0%)	2 (2.9%)	0 (0.0%)			
Inversions	0	8 (100.0%)	68 (100.0%)	36 (97.3%)	0.352	1.000	0.398
	1	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.7%)			

Monosomies	0	6 (75.0%)	62 (91.2%)	36 (94.7%)	1.000	0.248	1.000
	1	1 (12.5%)	4 (5.9%)	2 (5.3%)			
	2	1 (12.5%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)			
	5	0 (0.0%)	1 (1.5%)	0 (0.0%)			
Trisomies	0	8 (100.0%)	67 (98.5%)	37 (97.4%)	1.000	1.000	1.000
	1	0 (0.0%)	1 (1.5%)	1 (2.6%)			

For Peer Review

Table 9. Statistical analysis of *ATM/P1054R* genotypes

		<i>ATM/P1054R</i>			P-value Variant/Variant + Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild	P-value Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild
		Variant /Variant	Wild/ Wild	Wild/ Variant		
Gender N (%)	Men	1 (100.0%)	42 (47.2%)	14 (66.7%)	0.097	0.146
	Women	0 (0.0%)	47 (52.8%)	7 (33.3%)		
Ethnicity N (%)	Black	0 (0.0%)	25 (27.8%)	7 (33.3%)	1.000	0.976
	Brown	1 (100.0%)	47 (52.2%)	11 (52.4%)		
	White	0 (0.0%)	14 (15.6%)	3 (14.3%)		
	Asian	0 (0.0%)	2 (2.2%)	0 (0.0%)		
	Native American	0 (0.0%)	2 (2.2%)	0 (0.0%)		
Number of abnormal metaphases per subject		1 (N)	0.74 (± 1.36)	0.62 (± 1.12)	0.924	0.913
Number of chromosomal aberrations per subject		2 (N)	1.01 (± 1.85)	0.71 (± 1.35)	0.517	0.965
No changes	No	1 (100.0%)	33 (36.7%)	9 (42.9%)	0.472	0.624
	Yes	0 (0.0%)	57 (63.3%)	12 (57.1%)		
Group 1	No	0 (0.0%)	76 (84.4%)	14 (66.7%)	0.123	0.071
	Yes	0 (0.0%)	14 (15.6%)	7 (33.3%)		
Group 2	No	0 (0.0%)	19 (78.9%)	19 (90.5%)	0.557	0.354
	Yes	1(100.0%)	19 (21.1%)	2 (9.5%)		

Table 10. Statistical analysis of *ATM/P1054R* genotypes and chromosome alterations

	<i>ATM/P1054R</i>			<i>P</i> -value Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild	<i>P</i> -value Variant/Variant + Wild/Variant "Vs." Wild/ Wild	
	Variant/ Variant	Wild/ Wild	Wild/ Variant			
	0	0 (0.0%)	71 (78.9%)	16 (76.2%)	0.771	0.781
Translocations	1	0 (0.0%)	10 (11.1%)	4 (19.0%)		
	2	0 (0.0%)	7 (7.8%)	1 (4.8%)		
	4	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0.0%)		
	5	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0.0%)		
Chr. fragments	0	0 (0.0%)	78 (87.6%)	20 (95.2%)	0.793	0.662
	1	0 (0.0%)	9 (10.1%)	1 (4.8%)		
	2	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0%)		
	3	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0%)		
Chr. breaks	0	0 (0.0%)	84 (93.3%)	19 (90.5%)	0.352	0.054
	1	0 (0.0%)	5 (5.6%)	1 (4.8%)		
	2	2 (100.0%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)		
	3	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0.0%)		
Deletions	0	0 (0.0%)	79 (87.8%)	20 (95.2%)	0.275	0.279
	1	0 (0.0%)	9 (10.0%)	0 (0.0%)		
	2	0 (0.0%)	2 (2.2%)	1 (4.8%)		
Chr. derivatives	0	0 (0.0%)	87 (96.7%)	20 (95.2%)	0.573	0.589
	1	0 (0.0%)	1 (1.1%)	1 (4.8%)		
	2	0 (0.0%)	2 (2.2%)	0 (0.0%)		
Inversions	0	0 (0.0%)	89 (98.9%)	21 (100.0%)	1.000	1.000
	1	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (2.7%)		
Monosomies	0	0 (0.0%)	82 (91.1%)	19 (90.5%)	0.799	0.808
	1	0 (0.0%)	5 (5.6%)	2 (9.5%)		
	2	0 (0.0%)	2 (2.2%)	0 (0.0%)		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	5	0 (0.0%)	1 (1.1%)	0 (0.0%)		
Trisomies	0	0 (0.0%)	88 (97.8%)	21 (100.0%)	1.000	1.000
	1	0 (0.0%)	2 (2.2%)	0 (0.0%)		

For Peer Review

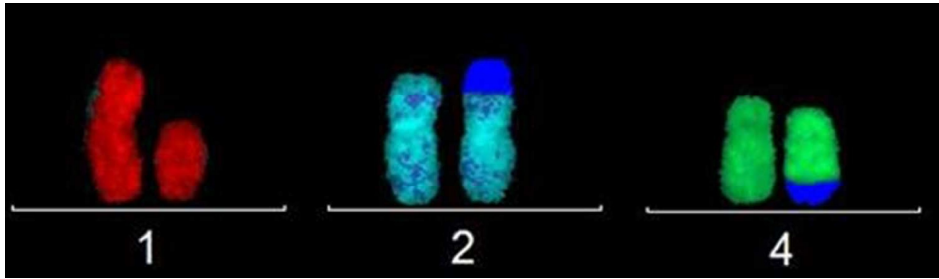


Figure 1. CAs found in analyses of one female worker, CAs - del(1),der(2),t(2;?), der(4),t(4;?). The homemade probes were conjugated with TexasRed to label chromosome 1 (red), Diethylamino-coumarin (DEAC) for chromosome 2 (lightblue), and fluorescein isothiocyanate (FITC) for chromosome 4 (green). Other chromosomes were counterstained with DAPI (dark blue, visible at chromosome 2).

128x37mm (96 x 96 DPI)

CONCLUSÕES

No artigo 1, encontramos uma população jovem (mediana: 36 anos), contudo com um longo período de exposição (mediana 16 anos), e uma alta frequência populacional de ACs (9.3/1000 metafases). Dos 60 trabalhadores avaliados encontramos 16,6% com mais de dez alterações por 1000 metafases analisadas, sendo as translocações a mais frequente (43.6%). A análise estatística revelou uma diferença significativa na cor da pele ($P=0,002$). Desta forma consideramos as ACs como um importante biomarcador de efeito precoce na possível identificação de indivíduos com risco de desenvolvimento de câncer ocupacional.

Já no artigo 2, exemplificamos dois relatos de casos com resultados de FISH de forma individual, como um biomarcador de efeito precoce ao dano no material genético. As frentistas foram identificadas pelo exame médico com sinais e sintomas de intoxicação por BTEX e com relatos de abortos espontâneos no primeiro trimestre da gestação. Em ambos os casos foram identificados rearranjos complexos nos cromossomos (caso 1: 46,XX,der(1)t(1;4),der(4)t(1;4;?),ace(1),ace(1); caso 2- der(4)ins(2;4)). Foi encontrado ainda um tipo raro de células NK (NK^{bright}) no sangue periférico destas trabalhadoras. Assim, este foi o primeiro estudo a sugerir uma possível relação causal entre a depleção do efeito de citotoxicidade das células NK, aborto no primeiro trimestre e rearranjos complexos nos cromossomos. Desta forma, evidenciamos a técnica de citogenética aplicada de forma individual, e não populacional, como sendo uma ferramenta útil na estimativa do dano ao material genético.

No Artigo 3, encontramos uma frequência elevada de ACs (9,8 ACs/1.000) em 114 trabalhadores. Dos trabalhadores 19,1% apresentaram um número elevado de ACs. Foi observado, também, nos trabalhadores com frequências elevadas de ACs (grupo 2) uma maior proporção de mulheres ($P = 0,035$), baixos níveis de monócitos ($P = 0,024$), assim como a não confiança no fornecimento automático de combustível ($P = 0,027$). Destacamos ainda que o *RAD51/G135C* ($P = 0,011$) foi associado aos trabalhadores quando comparado aos controles, assim como ao número de ACs por trabalhador ($P = 0,008$). A especificidade *RAD51/G135C* para detectar trabalhadores com ACs foi de 87%, enquanto 79% para *ATM/P1054R*. Nenhuma variante de alelos foi encontrada para *CHEK2/T470C*.

Desta forma, as frequências mais altas da variante *RAD51/G135C* na população de trabalhadores e sua associação com uma maior frequência de ACs são resultados muito relevantes. Desta forma, o polimorfismo *RAD51/G135C* é um promissor biomarcador de susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer.

Destacamos também a grande quantidade de mulheres com o genoma sensivelmente mais afetados em comparação aos homens, evidenciando a importância de políticas públicas e de novas pesquisas voltadas para a saúde materno-fetal dessas trabalhadoras. Aumentar o conhecimento das variações do reparo do DNA na manutenção da estabilidade e integridade do genoma nos trabalhadores de postos de combustíveis é crucial para a prevenção do câncer. Como resultado, apresentamos um melhor entendimento das variações interindividuais da suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer, assim como na identificação de subpopulações em maior risco, podendo fornecer uma base para o desenvolvimento de programas de prevenção ao câncer.

É de relevância dar continuidade ao estudo dos genes de reparo, assim como aumentar o número de trabalhadores de postos de combustíveis a serem analisados para compreendermos melhor de que forma o genoma desses trabalhadores se encontram em risco, para adotarmos medidas futuras de prevenção e de controle à exposição ocupacional desses trabalhadores.

REFERÊNCIAS

- Amaral ICC, Carvalho LVBD, Pimentel JNDS, et al. (2017) Environmental assessment of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes) and biomarkers of genotoxicity in gas stations workers. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*.42.
- Angèle S, Falconer A, Edwards SM, et al. (2004) ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer* 91(4):783-7
- Barata-Silva C, Mitri S, Pavesi T, et al. (2014) Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. *Cadernos Saúde Coletiva*. 22(4).
- Belson M, Kingsley B, Holmes A. (2007) Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental health perspectives*.115(1):138.
- Bolden AL, Kwiatkowski CF, Colborn T. (2015) New Look at BTEX: Are Ambient Levels a Problem? *Environ Sci Technol*. 49(9):5261-76.
- Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, et al. (2010) ERBB2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA Levels, and protein expression and their influence on prognosis and prediction. *Clin. Cancer Res*.16(8):2391–2401
- Chatterjee N, Walker GC (2017) Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 58(5):235-263.
- Cogliano VJ, Baan R, Straif et al. (2011) Updating IARC's carcinogenicity assessment of benzene. *American journal of industrial medicine* 54(2):165-167.
- Costa DF. *Prevenção da Exposição ao Benzeno no Brasil*. 2009. 179 f. Tese (Doutorado em Medicina), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. DISPONÍVEL:<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5144/tde-25092009-135349/pt-br.php>
- Cruz SL, Rivera-García MT, Woodward JJ. (2014) Review of toluene action: clinical evidence, animal studies and molecular targets. *J Drug Alcohol Res*.3:235840.
- de Resende MF, Vieira S, Chinen LT, et al. (2013) Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *J. Transl. Med*.11: 36.
- DEMEC (Departamento de Engenharia Mecânica – UFMG). Disponível em <http://www.demec.ufmg.br/disciplinas/ema003/liquidos/gasolina/gasolina.htm#II> Acesso em: 26 maio 2018.

- DOU, Portaria 1.109. 22 de setembro, o Diário Oficial da União publicou a Portaria 1.109/2016, <http://www.fecombustiveis.org.br/wp-content/uploads/2016/09/PORTARIA-N.º-1.109-DE-21-DE-SETEMBRO-DE-2016.pdf>]
- Falck J, Lukas C, Protopopova M, et al. (2001a) Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway. *Oncogene* 20(39):5503-10.
- Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, et al. (2001b) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410(6830):842-7.
- Fang Y, Wu HT, Ye YJ, et al. (2017) Association Between Polymorphisms of Metabolic Enzyme Genes and Chromosomal Damage in Benzene-Exposed Workers in China. *Journal of occupational and environmental medicine*. 59(11):e215-e220.
- FECOMBUSTIVEIS , 2018. <http://www.fecombustiveis.org.br/revendedor/portarias-ministerio-do-trabalho/>
- FENEPOSPETRO, 2018 <http://www.fenepospetro.org.br/site/index.php/quem-somos/quem-somos>. Acessado em 19.08.2018
- Feng Y, Zhang H, Gao W, et al. (2014) Expression of DNA topoisomerase II- α : clinical significance in laryngeal carcinoma. *Oncol. Lett.*8(4):1575-1580.
- Ferreira SL, SANTOS AMD, SOUZA GRD, et al. (2008) Análise por cromatografia gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). *Química Nova*. 31(3):539-545.
- Filho AP, Silveira MA, do Nascimento CB, et al. (2018) Integrative study of cell damage and cancer risk in gas station attendants. *International journal of environmental health research*. 28(1):1-7.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, et al. (2006) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington DC.
- Graham Solomons e Craig Fryhle (2000). *Química Orgânica*. LTC.Ed. 70. (1)57-65
- Greaves MF, Wiemels J. (2003) Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*.9:639–649.
- Gutiérrez-Enríquez S, Fernet M, Dörk T, et al. (2004) Functional consequences of ATM sequence variants for chromosomal radiosensitivity. *Genes Chromosomes Cancer* 40(2):109-1.
- Hallajian Z, Mahjoubi F, Nafissi N. (2017) Simultaneous ATM/BRCA1/RAD51 expression variations associated with prognostic factors in Iranian sporadic breast cancer patients. *Breast Cancer*. 24:624-634
- Han FF, Guo CL, Liu LH. (2013) The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA and cell biology*. 32:329-335.

Hiraoka IN, Ramos V, Graça L, et al. (2017). Prevenção da exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis: a experiência do estado do Espírito Santo. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*.42(1).

Hoeijmakers, Jan HJ. "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *nature* 411.6835 (2001): 366.

Holecková B, Piesová E, Sivikova K, et al. (2004) Chromosomal aberrations in humans induced by benzene. *Ann Agric Environ Med*. 11(2):175-9.

Holecková B, Piesová E, Sivikova K, et al. (2008) FISH detection of chromosome 1 aberration in human interphase and metaphase lymphocytes after exposure to benzene. *Ann Agric Environ Med*. 15(1):99-103.

Ji Z, Weldon RH, Marchetti F, et al. (2012) Comparison of aneuploidies of chromosomes 21, X, and Y in the blood lymphocytes and sperm of workers exposed to benzene. *Environ Mol Mutagen*. 53(3):218-26.

Justino MC. Influência dos polimorfismos genéticos na exposição ao benzeno In: Alves G, editor. *The health and environmental threats related to gas stations*. Germany: Lambert; 2015. pp. 65–86. ISBN-13: 978-3-659-81445-7.

Kilpivaara O, Vahteristo P, Falck J, et al. (2004) CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer*. 111(4):543-7.

Kim Jk, Shin HS, Lee JH, et al. (2003) Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. *Mutation Research*.541:55-61.

Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, et al. (2001) A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(6):3232-3236.

Li J, Williams BL, Haire LF, et al. (2002) Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol Cell*. 9(5):1045-

Li Z, Liu G, Cui X, et al. (2018) Effects of the variation in diesel fuel components on the particulate matter and unregulated gaseous emissions from a common rail diesel engine. *Fuel*.232:279-289.

Liang M, Zhang Y, Sun C, et al. (2018) Association Between CHEK2* 1100delC and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecular diagnosis & therapy*.1-11.

Lightfoot TJ, Roman E. (2004) Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicology and applied pharmacology*. 199(2):104-117.

Liu C, Wang QS, Wang YJ (2012) The CHEK2 I157T Variant and Colorectal Cancer Susceptibility: A Systematic Review and Meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 13(5):2051-

McHale, Cliona M., Luoping Zhang, et al. "Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment." *Carcinogenesis* 33.2 (2011): 240-252.

Meyer A, Wilhelm B, Dörk T, et al. (2007) ATM missense variant P1054R predisposes to prostate cancer. *Radiotherapy and oncology*. 83:283-288.

Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Risco químico: atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 48 p.(Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Saúde do Trabalhador; 7. Protocolos de Complexidade Diferenciada).

Mitri S, Fonseca ASA, Otero UB, et al. (2015) Metabolic polymorphisms and clinical findings related to benzene poisoning detected in exposed brazilian gas-station workers. *International journal of environmental research and public health*.12(7):8434-8447.

Mondrala, S, Eastmond, DA. (2010) Topoisomerase II inhibition by the bioactivated benzene metabolite hydroquinone involves multiple mechanisms. *Chem. Biol.Interact*. 184 (1–2):259–268.

Moro AM, Brucker N, Charão MF, et al. (2017) Biomonitoring of gasoline station attendants exposed to benzene: Effect of gender. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 813:1-9.

Nitiss, JL, (2009) DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat. Rev. Cancer*.9:327–337.

Otero UB, Ornellas MH. Health risk related to the exposition to benzene and other chemicals present in gasoline. In: Alves G, editor. *The health and environmental threats related to gas stations*. Germany: Lambert; 2015. pp. 9–25. ISBN-13: 978-3-659-81445-7.

Pandey AK, Gurbani D, Bajpayee M, et al. (2009). In silico studies with human DNA topoisomerase-II alpha to unravel the mechanism of in vitro genotoxicity of benzene and its metabolites. *Mutat. Res*. 661(1–2):57–70.

Pause FG, Wacker P, Maillet P, et al. (2003) ATM gene alterations in childhood acute lymphoblastic leukemias. *Human mutation*. 21(5):554-554.

Portaria No 309, ANP/2001. <http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/portarias-anp/tecnicas/2001/dezembro&item=panp-317-2001>

Rohrbacher M, Hasford J. (2018) *Epidemiology and Etiology of Chronic Myeloid Leukemia*. In *Neoplastic Diseases of the Blood*. Springer, Cham. 9-17

Silva, Flamys Lena do N., Santos Jr., José Ribeiro dos, Moita Neto, José Machado, et al. "Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in commercial gasoline from Piauí State." *Química Nova* 32.1 (2009): 56-60.

SILVA, Roberto Irineu da. Marcadores de Reparo de DNA em Pacientes Infantis Portadores de Leucemia Linfóide Aguda do Estado do Rio de Janeiro e Correlações com Aspectos Clínicos Pós-Quimioterapia. 2011.

Silvestre RT, Delmonico L, Bravo M, et al. (2017) Health survey and assessment of the polymorphisms BRCA1/P871L, BRCA1/Q356R, and BRCA2/N372H in female gas station workers in Rio de Janeiro. *Environmental and molecular mutagenesis*.58(9):730-734.

Smerhovsky Z, Landa K, Rössner P, et al. (2001) Risk of cancer in an occupationally exposed cohort with increased level of chromosomal aberrations. *Environ Health Perspect*. 109:41–45.

Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW. (2012) Cancer screening in the United States, 2012: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *CA: a cancer journal for clinicians*. 62(2):129-142.

Stingele J, Bellelli R, Simon JB. (2017) Mechanisms of DNA–protein crosslink repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18(9): 563.

Verdorfer I, Neubauer S, Letzel S, et al. (2001) Chromosome painting for cytogenetic monitoring of occupationally exposed and non-exposed groups of human individuals. *Mutat Res*. 491(1-2):97-109.

Wu X, Webster SR, Chen J (2001) Characterization of tumor-associated Chk2 mutations. *J Biol Chem*. 276(4):2971-4.

Ya-zhou He, Xin Hu, Xiao-sa Chi, et al. (2014) Association between RAD51 gene polymorphism (-135G/C) and susceptibility of myelodysplastic syndrome and acute leukemia: evidence based on a meta-analysis. *Tumor Biology*. 35(1): 615-621.

Yoon JH, Kwak WS, Ahn YS. (2018) A brief review of relationship between occupational benzene exposure and hematopoietic cancer. *Annals of occupational and environmental medicine*. 30(1):33.

Yu K, Shi YF, Yang KY, et al. 2011. Decreased topoisomerase II α expression and altered histone and regulatory factors of topoisomerase II α promoter in patients with chronic benzene poisoning. *Toxicol. Lett*. 203(2):111–117.

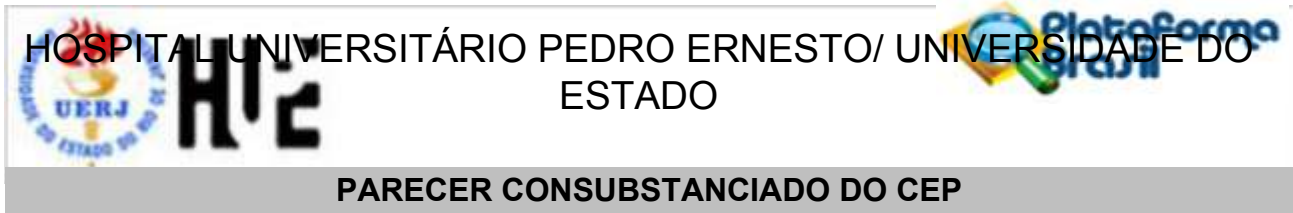
Zhang L, Eastmond DA, Smith MT (2002) The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. *Crit Rev Toxicol*. 32(1):1-42.

Zhang L, Lan Q, Guo W, et al. (2005) Use of OctoChrome fluorescence in situ hybridization to detect specific aneuploidy among all 24 chromosomes in benzene-exposed workers. *Chem Biol Interact*. 153-154:117-22.

Zhang L, Lan Q, Guo W, et al. (2011) Chromosome-wide aneuploidy study (CWAS) in workers exposed to an established leukemogen, benzene. *Carcinogenesis*. 32(4):605-12.

Zhao M, Chen P, Dong Y, et al. (2014) Relationship between Rad51 G135C and G172T variants and the susceptibility to cancer: a meta-analysis involving 54 case-control studies." *PloS one*. 9(1):e87259.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação dos efeitos da exposição aos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no genoma dos trabalhadores de postos de combustíveis

Pesquisador: Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 34310014.9.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 758.647

Data da Relatoria: 20/08/2014

Apresentação do Projeto:

A gasolina é uma mistura complexa de diversos hidrocarbonetos, dentre os quais, encontram-se os BTX (benzeno, tolueno e xileno). Frentistas são expostos aos vapores dos combustíveis cuja principal forma de absorção é através da via respiratória. A maior parte do benzeno inalado é eliminada pela expiração e a parte absorvida se acumula em tecidos ricos em lipídios, como a medula óssea. O diagnóstico de benzenismo, de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico. O benzeno possui elevado potencial de genotoxicidade e efeito leucemogênico. Na tentativa de salvar vidas em relação às medidas de saúde pública, merecem destaque as que demonstram serem mais eficazes contra o câncer em geral, a prevenção e ao diagnóstico precoce, fundamentais na prevenção do câncer de origem ocupacional. O reconhecimento precoce dos indivíduos em risco devido à exposição ocupacional aos BTX, associado ao conhecimento prévio da susceptibilidade genética individual poderá, no futuro, ser uma boa ferramenta para qualificar a intervenção em defesa da saúde dos trabalhadores de postos de combustíveis, possibilitando uma maior efetividade

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

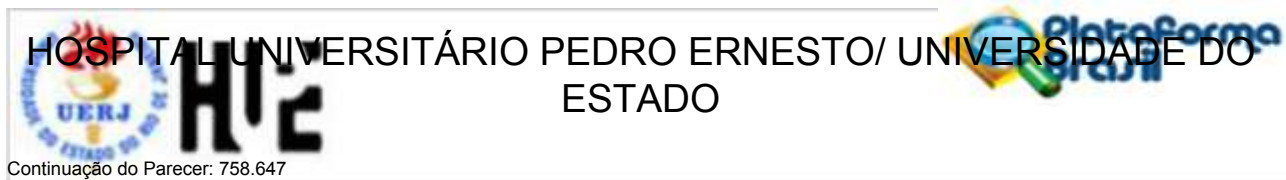
UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



na prevenção e controle do câncer. Objetivos: entender como o genoma dos frentistas está em risco, através da análise das alterações cromossômicas que podem ser causadas pela exposição ao benzeno e pelo estudo dos polimorfismos de genes chaves do mecanismo de reparo recombinacional ou Reparo de Quebras Duplas no DNA (DSBR, Double Strand Break Repair) e de variantes do gene de desintoxicação GSTP1;

Avaliar a exposição em trabalhadores de postos de combustíveis aos BTX, através de questionários socioeconômicos, exame clínico, testes hematológicos, citogenéticos e de imunofenotipagem; Metodologia: Será um estudo epidemiológico observacional do tipo caso-controle a ser realizado em trabalhadores de postos de combustíveis, localizados na cidade do Rio de Janeiro e indivíduos saudáveis. Como controles serão utilizadas amostras de DNA de doadores saudáveis. As amostras serão selecionadas aleatoriamente sendo estas pareadas em relação à idade e gênero entre os grupos. Exames laboratoriais Amostragem de sangue periférico serão coletadas para realização de testes hematológicos, bioquímicos, imunofenotípicos, citogenéticos, análise de micronúcleo e análise de polimorfismos genéticos. Análise estatística: Os trabalhadores serão divididos em dois grupos de acordo com o resultado da análise molecular de citogenética (10 alterações cromossômicas por 1000 metáfases e > 10 alterações por 1000 metáfases) para comparação de características clínicas (idade, tempo de exposição, cor da pele) e dados laboratoriais através do teste Mann-Whitney ou teste de Qui quadrado

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a exposição, individual e coletiva, de 400 trabalhadores de postos de combustíveis aos BTX, através de questionários socioeconômicos, exame clínico e testes hematológicos e de imunofenotipagem;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Poderá ocorrer constrangimento na realização do questionário. No exame físico poderá ocorrer constrangimento ao analisar o voluntário e na punção venosa poderá haver hematoma.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

**Benefícios:**

Esse estudo possui como proposta avaliar as condições de saúde dos funcionários de postos de combustíveis. O acompanhamento será individual e caso necessário você será encaminhado para o serviço de saúde de referência. Os resultados desse estudo serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente e relevante

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Em conformidade

Recomendações:

Aprovado

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br



Continuação do Parecer: 758.647

RIO DE JANEIRO, 20 de Agosto de 2014

Assinado por:
ANTONIO FELIPE SANJULIANI
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

Fax: (21)2264-0853

E-mail: cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Comprovante de submissão do artigo 3



Genes, Chromosomes and Cancer



Print

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to

Genes, Chromosomes and Cancer

Manuscript ID

GCC-18-0188

Title

Cytogenomic biomonitoring in gas station workers for their susceptibility to occupational cancer

Authors

Santiago, Fabio
 Liehr, Thomas
 Silvestre, Rafele
 Otero, Ubirani
 Tabalipa, Marianne
 Scherrer, Luciano
 Al-Rikabi, Ahmed
 Alves, Gilda
 Ornellas, Maria

Date Submitted

29-Aug-201848

[Author Dashboard](#)

© Clarivate Analytics | © ScholarOne, Inc., 2018. All Rights Reserved.

ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,655.

@ScholarOneNews | System Requirements | Privacy Statement | Terms of Use

MÓDULO 2: INFORMAÇÕES SOBRE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

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

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

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

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

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

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

ONDE ? (CNAE)	O QUE FAZIA? (CBO)	POR QUANTO TEMPO?	
		No.	Meses/Ano

(24) Qual sua ocupação atual?

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

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

(26) Qual seu horário de trabalho predominante?

1- |__|__| às |__|__| 9-NS/NR

(26.1) Turno:

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

(27) O sr (a) tem folga?

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

17. Quantos dias na semana o sr (a) tem de folga? n° de

dias da semana | _ | _ |

 9-NS/NR**18. Suas folga (s) são em dias fixos ou alternados?**

- 1-Fixo
- 2-Alternado
- 9-NS/NR

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

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

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

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

34. O sr(a) realiza (ou) coleta de amostras do caminhão tanque? 1-Sim

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

• **Caso o sr(a) tenha realizado amostras no caminhão tanque, por quanto tempo fez isto?** Tempo: |__||__|
| meses / anos

Quantas vezes na semana |__||__|

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

1-Sim Quais: _____

0-Não

9-NS/NR

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

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

0-Não 9-NS/NR

(36) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?

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

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

G- Outros:Quais: _____

9-NS/NR

(41) O sr(a) realiza ou já realizou medição manual (com régua) dos níveis dos tanques do subsolo? 1-Sim

Como: _____

0-Não (Passe para a **questão 40**)

9- NS/NR

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

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

9-NS/NR

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

1-Sim Quais: _____

0-Não 9-NS/NR

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

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

Quantas vezes na semana |__||__|

0-Não 9-NS/NR

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

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

Quantas vezes na semana |__||__|

0-Não 9-NS/NR

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

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

Quantas vezes na semana |__||__|

0-Não 9-NS/NR

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

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

Quantas vezes na semana |__||__|

0-Não 9-NS/NR

(44) Algumas desses eventos foram sofridos pelo sr (a) nesta função?	Quantas vezes?			
A- Assaltos	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
B- Atropelamentos	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
C- Incêndio / explosão	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
D- Vazamento de combustível no posto	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
E- Exposição ao combustível (banho/intoxicação)	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
F- Vazamento de gás (GNV)	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
G- Queimadura	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
H- Vazamento de combustível no carro do cliente	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
I- Discussão com cliente	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
J- Outro: <input type="checkbox"/> 1-Sim Quais: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 0-Não		

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

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS QUÍMICOS

45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?	46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <i>Entrevistador:</i> _____ <u>Leia as alternativas</u>
A. Gasolina <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
B. Etanol (Álcool) <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
C. Diesel <input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> vezes da semana
	<input type="checkbox"/> vezes da semana

<p>45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?</p>	<p>46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? Entrevistador: _____ <u>Leia as alternativas</u></p>
<p>[Redacted]</p>	<p><input type="checkbox"/> 1-Diariamente</p> <p><input type="checkbox"/> vezes da semana</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> vezes da semana</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> vezes da semana</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> vezes da semana</p> <hr/> <p><input type="checkbox"/> vezes da semana</p>

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

- Confio totalmente
- Confio Parcialmente
- Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO D - Questionário clínico

MINISTÉRIO DA SAÚDE
 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA COORDENAÇÃO DE
 PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA - CONPREV
 ÁREA DE VIGILÂNCIA DO CÂNCER RELACIONADO AO TRABALHO E AO
 AMBIENTE



PROJETO PILOTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A BTX NA SAÚDE DE TRABALHADORES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEIS

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nome do Posto: _____

Nome Completo: _____

Nº do Posto: |_|_| _____

Nº Questionário |_|_|_|_|

Data da Entrevista: ____/____/____

Entrevistador: _____

Supervisor: _____

|_|_|

Codificador: _____

|_|_|

Digitador: _____

|_|_|

MÓDULO 1: ANAMNESE CLÍNICA

HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA

(1) Doenças Cardiovasculares: Sim Não NS/NR

(1.1) Qual(is): _____

(1.2) Quando? Ano: _____

(2) Doenças Infecciosas: Sim Não NS/NR

(2.1) Qual(is): _____

(2.2) Quando? Ano: _____

(3) Doenças Neurológicas: Sim Não NS/NR

(3.1) Qual(is): _____

(3.2) Quando? Ano: _____

(4) Doenças Respiratórias: Sim Não NS/NR

(4.1) Qual(is): _____

(4.2) Quando? Ano: _____

(5) Doenças Gastrointestinais:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(5.1)	Qual(is): _____			
(5.2)	Quando? Ano: _____			
(6) Doenças Hepáticas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(6.1)	Qual(is): _____			
(6.2)	Quando? Ano: _____			
(7) Doenças Renais:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(7.1)	Qual(is): _____			
(7.2)	Quando? Ano: _____			
(8) Doenças Hematológicas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(8.1)	Qual(is): _____			
(8.2)	Quando? Ano: _____			
(9) Doenças Endócrinas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(9.1)	Qual(is): _____			
(9.2)	Quando? Ano: _____			
(10) Doenças Psíquicas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(10.1)	Qual(is): _____			
(10.2)	Quando? Ano: _____			
(11) Doenças Osteoarticulares:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(11.1)	Qual(is): _____			
(11.2)	Quando? Ano: _____			
(12) Doenças Uro/ginecológicas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(12.1)	Qual(is): _____			
(12.2)	Quando? Ano: _____			
(13) Doenças Otorrinolaringológicas:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(13.1)	Qual(is): _____			
(13.2)	Quando? Ano: _____			
(14) Doenças da Visão:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(14.1)	Qual(is): _____			
(14.2)	Quando? Ano: _____			
(15) Doenças da Pele:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(15.1)	Qual(is): _____			
(15.2)	Quando? Ano: _____			

(16) Neoplasias:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(16.1) Qual(is):	_____		
(16.2) Quando? Ano:	_____		
(17) Internações:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
(17.1) Motivo(s):	_____		
(17.2) Quando? Ano:	_____		
(18) Cirurgias:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
(18.1) Motivo(s):	_____		
(18.2) Quando? Ano:	_____		
(19) Transfusão de sangue ou derivados:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
(19.1) Motivo(s):	_____		
(19.2) Ano da transfusão:	_____		

HISTÓRIA PATOLÓGICA ATUAL			
(20) Diagnóstico de Hipertensão Arterial:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(20.1) Faz uso de remédios para controle da pressão arterial?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(20.2) Caso afirmativo, faz uso de forma regular?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(20.3) Quais os remédios que usa para controle da pressão arterial?	_____		
(20.4) Há quanto tempo utiliza esses remédios : __ __	<input type="checkbox"/>	D-Dia; M-Mês; A-Ano; I-Ignorado	
(21) Diagnóstico de Diabete Mellitus:	<input type="checkbox"/> Sim Tipo: 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> NS/NR
(21.1) Faz uso regular de qual(is) medicações: _____			
(21.2) Há quanto tempo : _____			
(22) Tem outro(s) problema(s) de saúde diagnosticado(s) por médico?	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(22.1) Qual: _____ (22.1.1) Início: __/__/__			
(22.2) Usa alguma medicação regularmente:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(22.3) Qual(is) medicamento(s): _____			
(22.3.1) Início: __/__/__			

HISTÓRIA REPRODUTIVA	
MULHERES	
(23) Possui filhos:	<input type="checkbox"/> Sim
	<input type="checkbox"/> Não. Motivo: _____

(24) Número de Gestações: _ _ Gestações	
(NO CASO DE NENHUMA GESTAÇÃO, MARCAR "00" E PASSAR PARA A QUESTÃO 25)	
(24.1) Número de Partos:	_ _
(24.1.1) Número de Natimortos:	_ _
(24.1.2.1) Nascidos Vivos Sadios:	_ _
(24.1.2.2) Nascidos Vivos Não Sadios:	_ _
Qual doença (inclusive má formação)? _____	
(24.2) Número de Abortos:	_ _ <input type="checkbox"/> Provocados _ _ <input type="checkbox"/> Espontâneos
(24.2.1) Período em que ocorreu (ram) a(s) perda(s) gestacional (is):	<input type="checkbox"/> Não houve perda gestacional
<input type="checkbox"/> 1.º Trimestre	Quantos: _____
<input type="checkbox"/> 2.º Trimestre	Quantos: _____
<input type="checkbox"/> 3.º Trimestre	Quantos: _____
(25) Idade em que ocorreu a primeira menstruação: _ _ Anos	
(26) Idade em que parou de menstruar:	_ _ Anos <input type="checkbox"/> Ainda menstrua (PASSE PARA QUESTÃO 28)
(26.1) Há quanto tempo parou de menstruar?	_____
(26.2) Por que sr(a) não menstrua mais?	<input type="checkbox"/> 1:Menopausa natural; <input type="checkbox"/> 2 :Cirurgia para retirada de útero ou ovários; <input type="checkbox"/> 3: Outros tratamentos (hormônios, quimioterapia ou radiação);
<input type="checkbox"/> 4: Outra razão – especificar:	_____
HOMENS	
(27) Possui filhos:	<input type="checkbox"/> Sim
	<input type="checkbox"/> Não. Motivo: _____
(27.1) Caso afirmativo, quantos?	_____
(27.2) Todos são saudáveis?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> NS/NR
(27.3) Caso negativo, qual ou quais doenças?	_____
MÓDULO 2: ESTILOS DE VIDA	
TABAGISMO	
(28) Sr(a) é:	
<input type="checkbox"/> Tabagista <input type="checkbox"/> Ex-tabagista (Passe para a questão 30) <input type="checkbox"/> Nunca fumou (PASSE PARA A QUESTÃO 33)	
(29) Quantos cigarros sr(a) fuma por dia?	
<input type="checkbox"/> menos de 10 <input type="checkbox"/> de 11 a 20 <input type="checkbox"/> 21 a 30 <input type="checkbox"/> mais de 30	
(PASSE QUESTÃO 33)	
(30) Há quanto tempo sr(a) parou de fumar:	(31) Durante quanto tempo sr(a) fumou:
_____	_____

(32) Quando sr(a) fumava, quantos cigarros sr(a) fumava, em média, por dia:			
<input type="checkbox"/> menos de 10	<input type="checkbox"/> de 11 a 20	<input type="checkbox"/> 21 a 30	<input type="checkbox"/> mais de 30
CONSUMO DE ALCOOL			
(33) Sr(a) costuma ingerir bebidas alcoólicas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não (PASSE PARA 40)			
<input type="checkbox"/> Parei de beber (PASSE PARA QUESTÃO 37)		<input type="checkbox"/> Nunca bebi (PASSE PARA QUESTÃO 40)	
(34) Que tipo de bebida alcoólica o sr (a) bebe com maior frequência?			
<input type="checkbox"/> cerveja	<input type="checkbox"/> cachaça	<input type="checkbox"/> vodka	<input type="checkbox"/> vinho <input type="checkbox"/> outras _____
(35) Qual frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?			
<input type="checkbox"/> Diariamente	<input type="checkbox"/> 1 a 2 x semana	<input type="checkbox"/> 3 a 4x semana	<input type="checkbox"/> 5 a 6 x por semana
<input type="checkbox"/> 5 a 6 x por semana	<input type="checkbox"/> Outra: _____		
(36) Em média, quantas doses o sr (a) consome?			
<input type="checkbox"/> 1 dose por dia	<input type="checkbox"/> 2 - 3 doses por dia	<input type="checkbox"/> 4 - 5 doses por dia	<input type="checkbox"/> Mais de 6 doses por dia
<input type="checkbox"/> Outra: especifique: _____	<input type="checkbox"/> NS/NR _____		
<input type="checkbox"/>	(PASSE PARA QUESTÃO 40) _____		
(37) Há quanto tempo o sr(a) parou de beber:		(38) Durante quanto tempo sr(a) bebeu:	
_____		_____	
(39) Quando sr(a) bebia, quantos doses o sr(a) bebia, em média, por dia:			
Dose/ Bebida: _____			
CONSUMO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS PSICOATIVAS			
• O sr(a) já usou ou usa algum tipo de droga: <input type="checkbox"/> Sim (PASSE 40.1)			
<input type="checkbox"/> Não (PASSE PARA A QUESTÃO 46)			
(40.1) Continua usando?	Sim (PASSE PARA 41)	Não (PASSE PARA 45)	NS/NR
(42) Quais? _____			
(43) Frequência do uso de drogas:			
<input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana	<input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana	<input type="checkbox"/>	
<input type="checkbox"/> 5 a 6 vezes por semana	<input type="checkbox"/> Diariamente	<input type="checkbox"/> Outra: _____	
(PASSE PARA QUESTÃO 45)			
(44) Por quanto tempo usou drogas: _____			
(45) Há quanto tempo deixou de usar drogas: _____			
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	MÓDULO 3: HISTÓRIA FAMILIAR	
(45) Alguém da sua família já teve câncer: <input type="checkbox"/> Sim			
Não (PASSE PARA A QUESTÃO 46)			

(45.1) Quem da sua família ou do seu convívio teve câncer:

- Pai. Qual(is) tipo(s)? _____
- Mãe. Qual(is) tipo(s)? _____
- Avô. Qual(is) tipo(s)? _____
- Avó. Qual(is) tipo(s)? _____
- Irmão(ã). Qual(is) tipo(s)? _____
- Filho(a). Qual(is) tipo(s)? _____
- Esposo(a). Qual(is) tipo(s)? _____
- Outro: _____. Qual(is) tipo(s)? _____

(45.2) Outras doenças familiares : _____

MODULO 4: SINAIS E SINTOMAS

(46) **Emagrecimento** Sim Quantos kg: _____ Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

(47) **Fraqueza** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

(48) **Tontura** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

(49) **Sonolência** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO

(50) **Dificuldade para enxergar** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

(51) **Cefaléia / dor de cabeça** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

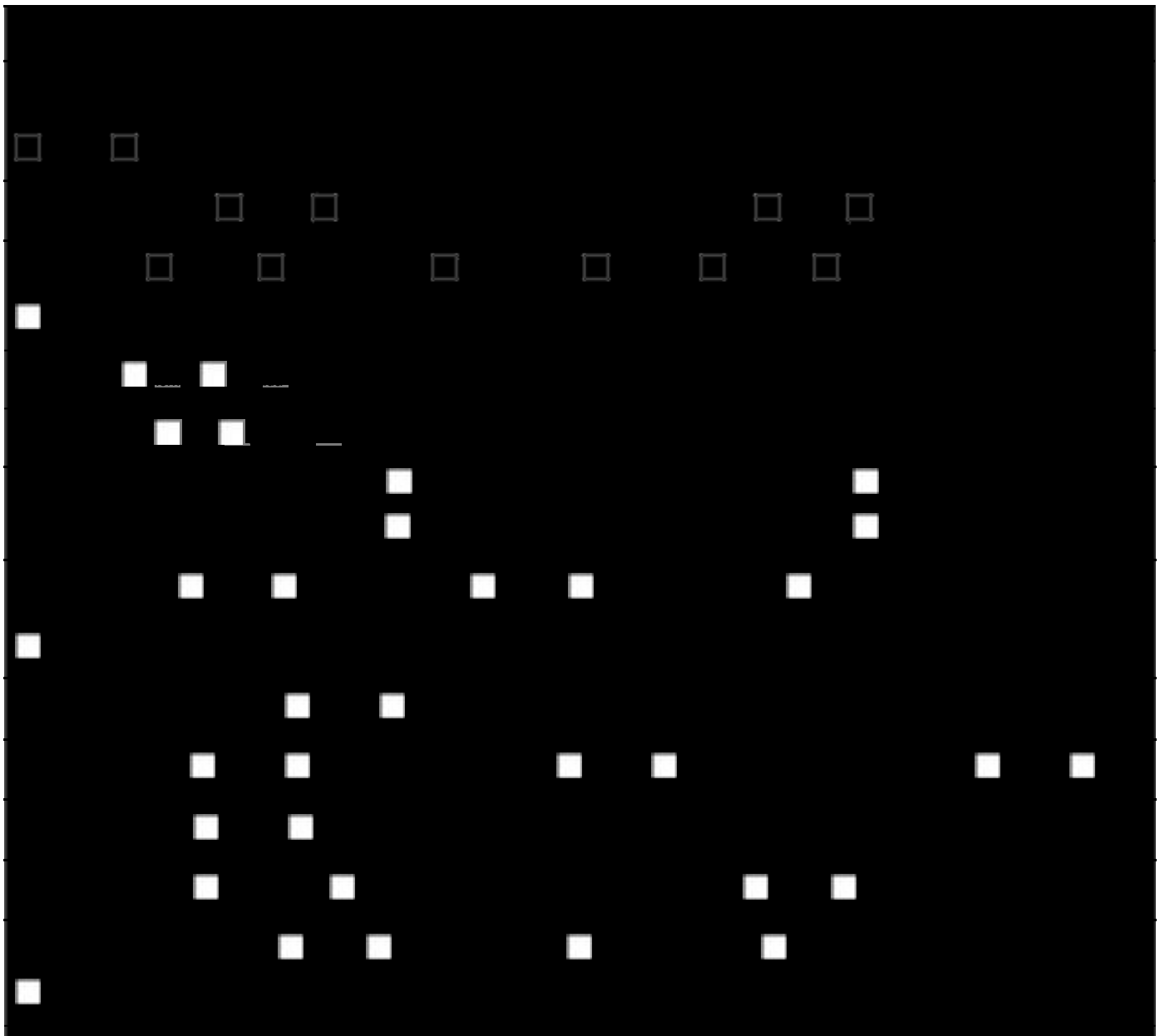
(52) **Irritabilidade / Nervosismo** Sim Por quanto tempo: _____

Qual motivo: _____

- De forma inexplicada Não NS/NR

(53) Ansiedade	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	<input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> excessiva
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(54) Insônia	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(55) Alteração da Humor / Depressão	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(56) Alteração da atenção	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(57) Alteração da memória	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(58) Sudorese Noturno	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(59) Formigamentos	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	<input type="checkbox"/> MMSS <input type="checkbox"/> MMII
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(60) Movimentos Involuntários	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(61) Tremores	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	<input type="checkbox"/> MMSS <input type="checkbox"/> MMII
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(62) Cãibras	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	<input type="checkbox"/> MMSS <input type="checkbox"/> MMII
Qual motivo: _____		
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(63) Diminuição da força muscular	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____	
<input type="checkbox"/> MMSS <input type="checkbox"/> MMII	Qual motivo: _____	
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR

(64) Convulsões	<input type="checkbox"/> Sim Por quanto tempo: _____ Tipo: _____
<input type="checkbox"/> MMSS	<input type="checkbox"/> MMII Qual motivo: _____
<input type="checkbox"/> De forma inexplicada	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> NS/NR
SISTEMA HEMATOLÓGICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO	
(65) Petéquias:	<input type="checkbox"/> Sim Há quanto tempo: _____
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(66) Hematomas	<input type="checkbox"/> Sim Há quanto tempo: _____
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR
(67) Epistaxe	<input type="checkbox"/> Sim Há quanto tempo: _____
<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> NS/NR



3) Lesões de pele: irritativa eritema Sim Não → Quais: manchas furúnculos pruridos dermatite
 outra(s): _____

(83.1) Localização: _____

(83.2) Descrição: _____

(84) Acne: Sim Não

(84.1) Localização: _____ (89.2) Extensão: _____

(85) Edemas Sim → Onde: _____
 Não

(86) Fâneros: Normal Alterado → Qual: _____

(87) Tireóide: Normal Alterado → Qual: _____

APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)

(88) Pressão Arterial: | _ | _ | _ | x | _ | _ | _ | mmHg

(89) Frequência Cardíaca: | _ | _ | _ | bpm

(90) Ritmo cardíaco Normal Alterado: _____

(91) Bulhas normofonéticas Sim Não

(92) Pulso Radial Esquerdo: Normal Alterado

APARELHO RESPIRATÓRIO (AR)

(93) Deformidade torácica: Sim Não → Qual: _____

(94) Eupnéico Taquipnéico ipm _____

(95) Murmúrio Vesicular bem distribuído: Sim
 Não → Por que? _____

ASSISTÊNCIA MÉDICA

(96) Outros locais onde busca atendimento médico:

PSF. Qual? _____

Outra unidade de saúde do SUS (que não seja PSF). Qual? _____

Hospital privado. Qual? _____

Clínicas particulares. Qual? _____

<p>(83) Lesões de pele: <input type="checkbox"/> Sim Não → Quais: manchas furúnculos pruridos dermatite</p> <p>irritativa eritema <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> outra(s): _____ <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>(83.1) Localização: _____ <input type="checkbox"/></p> <p>(83.2) Descrição: _____</p>	
<p>(84) Acne: <input type="checkbox"/> Sim Não <input type="checkbox"/></p> <p>(84.1) Localização: _____ <input type="checkbox"/> (89.2) Extensão: _____</p>	
<p>(85) Edemas <input type="checkbox"/> Sim → Onde: _____</p> <p>Não <input type="checkbox"/></p>	
<p>(86) Fâneros: <input type="checkbox"/> Normal Alterado → Qual: _____ <input type="checkbox"/></p>	
<p>(87) Tireóide: <input type="checkbox"/> Normal Alterado → Qual: _____ <input type="checkbox"/></p>	
APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)	
<p>(88) Pressão Arterial: _ _ _ x _ _ _ mmHg</p>	
<p>(89) Frequência Cardíaca: _ _ _ bpm</p>	
<p>(90) Ritmo cardíaco <input type="checkbox"/> Normal Alterado: _____ <input type="checkbox"/></p>	
<p>(91) Bulhas normofonéticas</p> <p><input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não</p>	<p>(92) Pulso Radial Esquerdo: Normal <input type="checkbox"/> Alterado <input type="checkbox"/></p>
APARELHO RESPIRATÓRIO (AR)	
<p>(93) Deformidade torácica: <input type="checkbox"/> Sim Não <input type="checkbox"/> → Qual: _____</p>	
<p>(94) <input type="checkbox"/> Eupnéico <input type="checkbox"/> Taquipnéico ipm _____</p>	
<p>(95) Murmúrio Vesicular bem distribuído: Sim <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Não → Por que? _____</p>	

ASSISTÊNCIA MÉDICA	
<p>(96) Outros locais onde busca atendimento médico:</p> <p><input type="checkbox"/> PSF. Qual? _____</p> <p>—</p> <p>—</p> <p>—</p>	

Outra unidade de saúde do SUS (que não seja PSF). Qual?

Hospital privado. Qual?

Clínicas particulares. Qual?

ANEXO E - Termo de consentimento livre e esclarecido

MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA -
CONPREV
ÁREA DE VIGILÂNCIA DO CÂNCER RELACIONADO AO TRABALHO E AO AMBIENTE



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"PROJETO PILOTO PARA O DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A BTX NA SAÚDE DE TRABALHADORES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEIS".

Nome do Voluntário:

Você está sendo convidado a participar de um projeto que busca identificar os efeitos da exposição a benzeno, tolueno e xileno em trabalhadores de postos de combustíveis. O Projeto visa à implementação de medidas de prevenção de doenças. No entanto, para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVOS DO ESTUDO

Traçar o perfil de trabalho e adoecimento dos trabalhadores dos postos de combustíveis que participarão do estudo. Será avaliada a exposição individual ao benzeno, bem como os níveis de compostos tóxicos presentes nos combustíveis, entre eles o benzeno no ar (em torno das bombas). Serão avaliadas também as condições do posto de combustível com relação às instalações físicas e obediência às normas de segurança.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se você concordar em participar deste estudo, responderá a algumas perguntas; fará exame clínico e concordará em doar 22ml de sangue para realização das seguintes análises que visam à detecção de alterações no sangue em casos de intoxicação por benzeno:

- Hemograma completo.
- Avaliação da função hepática (fígado) através da avaliados os níveis de transaminases, gama glutaril transferase, bilirrubinas totais e frações e LDH;
- Provas de atividade reumática ou inflamatórias: VHS, proteína C reativa e FAN;
- **Esses exames serão realizados somente se houver alteração nos exames anteriores:** marcadores de hepatite B e C (anti-HBS Ag, anti-HBc-IgM e anti-HCV);

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

Nome do projeto: "Projeto Piloto para o desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição a BTX na saúde de trabalhadores de 1 postos de combustíveis"

Na coleta de sangue, uma parte será destinada a análise citogenética e de mutagenicidade. Essas análises são importantes, pois permitirão a investigação do nível tóxico das substâncias presentes nos combustíveis às suas células, conseqüentemente à sua saúde.

Concordo com a coleta ()
Não concordo com a coleta do material ()

TODOS OS RESULTADOS SERÃO MANTIDOS EM SIGILO E DEVOLVIDOS APENAS A VOCÊ.

O exame clínico será realizado por um médico capacitado que aplicará um questionário com perguntas sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar.

Concordo em participar do Questionário Clínico () Não concordo ()

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não haverá outros métodos alternativos de coleta de informações.

RISCOS

Você não estará correndo nenhum risco por participar deste estudo. O responsável pelo posto de combustível também assinou um termo de consentimento que autoriza esse Projeto e vai facilitar sua participação no horário de trabalho. Cabe destacar que apenas você vai receber os resultados dos exames clínicos e laboratoriais.

BENEFÍCIOS

Esse estudo está sendo realizado em todo país e sua proposta será avaliar as condições de saúde dos funcionários de postos de combustíveis. O acompanhamento será individual e caso necessário você será encaminhado para o serviço de saúde de referência.

Os resultados desse estudo serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis em todo país.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Estão previstos dois encontros.

No primeiro, questionários serão aplicados por entrevistadores e no segundo haverá exame clínico com médico e será coletada uma amostra de sangue.

Caso seja identificado algum problema, você será encaminhado (a) para atendimento em um serviço de saúde para melhor avaliação.

Os profissionais que atuam nesse projeto pertencem as Intituições: Conprev-Inca (Coordenação e Prevenção e Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho e ao Ambiente); Cesteh-Fiocruz (Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana), Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro- GFRNB (Gerencia de Fatores de Risco Não Biológicos) Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro- SMAC (Secretaria Municipal do Meio Ambiente); UFF- Centro de Estudos Gerais (Instituto de Química); Cerest do Município do Rio de Janeiro (Centro de

Nome do projeto: "Projeto Piloto para o desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição a BTX na saúde de trabalhadores de 2 postos de combustíveis"

Referencia em Saúde do Trabalhador) e SINPOSPETRO (Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro).

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe da pesquisa, seus dados poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I –INCA. No entanto, os seus dados individuais serão mantidos em sigilo e os resultados serão divulgados em forma de relatórios estatísticos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Sua participação neste estudo não implica em danos à sua saúde. No caso de detecção de problema de saúde, você será encaminhado (a) para atendimento no Sistema Único de Saúde no Município do Rio de Janeiro.

CUSTOS

A participação neste estudo será voluntária e não haverá qualquer forma de pagamento ao voluntário pela sua participação.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que pode recusar-se a participar deste estudo sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos que você faça perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para Dra. **Ubirani Barros Otero** da Área de Vigilância do Câncer Ocupacional e Ambiental – Conprev/INCA, no telefone (21) **3207-5967**. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, a Coordenadora do Comitê de Ética do Instituto Nacional do Câncer Dra. Adriana Scheliga - Rua André Cavalcanti 37, telefone (21) 3207-6551.

Nome do projeto: "Projeto Piloto para o desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição a BTX na saúde de trabalhadores de 3 postos de combustíveis"

