

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Renato de Almeida Martins

**BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO EM
INDIVÍDUOS EXPOSTOS A DERIVADOS DO
PETRÓLEO: APLICAÇÃO DO TESTE DO
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA
BUCAL**

SANTOS

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Renato de Almeida Martins

**BIOMONITORAMENTO CITOGENÉTICO EM
INDIVÍDUOS EXPOSTOS A DERIVADOS DO
PETRÓLEO: APLICAÇÃO DO TESTE DO
MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA
BUCAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Educação Física – modalidade saúde.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Colaboradores

Prof. Dr. Odair Aguiar Júnior - Colaborador

Guilherme Augusto da Silva Gomes – Colaborador - Graduando em Educação Física

SANTOS

2009

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO -----	1
MATERIAIS E MÉTODOS -----	6
Casuística -----	6
Teste do micronúcleo -----	6
Análise Estatística -----	7
RESULTADOS -----	8
DISCUSSÃO -----	10
CONCLUSÃO -----	11
PESPECTIVAS FUTURAS -----	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	13
ANEXOS -----	17
Questionário -----	17
Termo de Consentimento -----	18

RESUMO

Devido à influência da geno-e citotoxicidade sobre a carcinogênese química, estudos têm demonstrado que derivados de petróleo são capazes de induzir danos genéticos e morte celular com resultados conflitantes até agora. O objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente danos ao DNA (micronúcleo) e morte celular (picnose, cariorréxis e cariólise) em células esfoliadas da mucosa oral de atendentes de postos de combustível usando dois diferentes sítios anatômicos da mucosa bucal: mucosa jugal e borda lateral da língua. Um total de 23 voluntários atendentes de postos de combustível e 23 voluntários saudáveis como controles (indivíduos não expostos) foram incluídos nesta definição. Os indivíduos tinham células do epiteliais da mucosa jugal e borda lateral da língua esfoliadas mecanicamente, colocadas em solução fixadora e, posteriormente, em lâminas limpas para a verificação ao microscópio dos fenótipos nucleares acima. Os resultados apontaram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) de células micronucleadas da mucosa oral de atendentes de postos de combustível para ambos os sítios avaliados. Da mesma forma, a exposição aos derivados de petróleo foi capaz de aumentar as outras alterações nucleares estreitamente relacionadas, tais como a citotoxicidade picnose, cariorréxis e cariólise, sendo o mais pronunciado efeitos aqueles encontrados para borda lateral da língua. Não houve interação entre tabagismo e exposição ao derivado de petróleo. Em resumo, estes dados indicam que os atendentes de postos de combustível compreendem um grupo de alto risco para danos ao DNA e morte celular. Parece que a borda lateral da língua é um sítio mais sensível ao geno-e citotóxica induzida por derivados petróleo.

Palavras chave: células da mucosa jugal; células da língua; derivados de petróleo; raio-X; teste do micronúcleo

ABSTRACT

Owing to the influence of geno- and cytotoxicity on chemical carcinogenesis, studies have demonstrated that petroleum derivatives are able to induce genetic damage and cellular death with conflicting results so far. The aim of the present study was to comparatively evaluate DNA damage (micronucleus) and cellular death (pyknosis, karyolysis and karyorrhexis) in exfoliated oral mucosa cells from gas petrol attendants using two different anatomic buccal sites: cheek mucosa and lateral border of the tongue. A total of 23 gas petrol attendants and 23 health controls (non-exposed individuals) were included in this setting. Individuals had epithelial cells from cheek and lateral border of the tongue mechanically exfoliated, placed in fixative and dropped in clean slides which were checked for the above nuclear phenotypes. The results pointed out significant statistical differences ($p < 0.05$) of micronucleated oral mucosa cells from gas petrol attendants for both oral sites evaluated. In the same way, petroleum derivate exposure was able to increase other nuclear alterations closely related to cytotoxicity such as karyorrhexis, pyknosis and karyolysis, being the most pronounced effects as those found in the lateral border of the tongue. No interaction was observed between smoking and petroleum exposure. In summary, these data indicate that gas petrol attendants comprise a high risk group for DNA damage and cellular death. It seems that the lateral border of the tongue is a more sensitive site to geno- and cytotoxic insult induced by petroleum derivatives.

Keywords: Buccal mucosa cells; Tongue cells; Petroleum derivatives; Miconucleus test

INTRODUÇÃO

A preocupação com a possibilidade de uma catástrofe global causada pela introdução de agentes químicos manufacturados pelo homem no meio ambiente tem fomentado atenção a compostos que são nocivos à saúde humana, principalmente no que diz respeito àqueles capazes de induzir danos genéticos e, conseqüentemente, desencadear doenças degenerativas, como o câncer (CEBULSKA-WASILEWSKA et al. 2007; LICHTMAN 2007; SABBIONI et al. 2007). Essa informação é apoiada pela noção de que os chamados agentes mutagênicos são indutores de alterações na seqüência das bases do DNA, podendo acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas às neoplasias. Nesse sentido, os mecanismos envolvendo lesões genéticas, mutagênese e carcinogênese parecem estar intimamente relacionados (RIBEIRO et al. 2004).

Para que inicie a formação de um tumor, a célula deve ser atacada por carcinógenos genotóxicos, ou seja, um pré-carcinógeno. Pré-carcinógenos são compostos estáveis no PH fisiológico, incapazes de reagir com o DNA. Entretanto, esses são biotransformados por enzimas, tais como o citocromo P450 e glutathione s-transferases, em compostos mais hidrossolúveis para que possam ser excretados. Seus produtos são eletrofilicos, e reagirão com regiões do DNA, levando a formação de adutos. Esses, caso não forem reparados por enzimas de reparo antes da divisão celular, podem levar ao aparecimento de uma alteração permanente no DNA, podendo ser discreta ou aberrante dependendo da quantidade e tipo do cancerígeno. Caso estas alterações ocorram em determinadas regiões de genes que estimulam e/ou inibam a proliferação celular, ocorre o surgimento de um tumor.

Câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas que caracterizam-se pela perda de controle da proliferação celular e ganho de capacidade de invadir tecidos adjacentes ou de sofrer metástase para tecidos distantes (RIBEIRO, et al. 2003). A mutação é uma conseqüência do dano no DNA, haja visto pode ser o estágio inicial no processo pelo qual a maioria do cancerígenos químicos inicia a formação do tumor. Há alguns anos, a literatura tem demonstrado que mutações em alguns genes considerados críticos, especialmente relacionados à proliferação celular e apoptose são importantes

para o desenvolvimento das neoplasias (HONG et al. 2007; ZHANG et al. 2007; RIBEIRO et al. 2005;2007; SILVA et al. 2007).

Os primeiros eventos no processo de carcinogênese química incluem a exposição ao agente cancerígeno, seu transporte à célula-alvo, sua ativação a metabólitos ativos (caso o agente seja um pró-carcinógeno) e o dano no DNA, levando a mudanças que resultem em uma célula iniciada. As fases da carcinogênese segundo RIBEIRO et al. (2003) são: a Exposição, onde a célula normal é atacada pelo agente químico, físico ou vírus; a Iniciação, onde ocorrem alterações genéticas; a Promoção, onde ocorre expansão clonal seletiva caracterizada por defeitos na diferenciação terminal, no controle de crescimento e a resistência a citotoxicidade; a Progressão, onde há a ativação de proto-oncogenes e inativação do gene supressores de tumor, nesta fase o tumor maligno já está instalado, e finalmente a Manifestação onde há o câncer clínico diagnosticado.

A maioria dos casos de câncer está associado a fatores ambientais (RIBEIRO, et al. 2003). Atualmente, o homem está exposto repetidamente a misturas químicas variadas e complexas, geralmente em baixas concentrações (DONMEZ-ALTUNTAS et al. 2007). Essas misturas ambientais contêm agentes tanto iniciadores como promotores, ambos capazes de deflagrar o processo de carcinogênese. No Brasil, verifica-se que a mortalidade por câncer tem sido maior nas áreas metropolitanas, localizadas nas regiões Sudeste e Sul do País, o que pode indicar a importância do processo urbano industrial. No Estado de São Paulo, em 1996, o câncer foi o responsável por cerca de 13% das mortes no sexo masculino, e em 1993, na Baixada Santista com seus oito municípios os quais incluem o complexo industrial de Cubatão, apresentou a mais elevada taxa de mortalidade por câncer tanto para o sexo masculino quanto para o feminino, embora seja mais elevada para o masculino. Como agentes etiológicos, as substâncias químicas ocupam posição de destaque na história natural do câncer ocupacional. Isso explica a variabilidade nos percentuais estimados, de 4 a 38%, para a contribuição da exposição ocupacional na determinação do câncer (FARIA et al. 1999).

Diante do colocado, há uma crescente busca por metodologias no intuito de

se detectar e, por conseguinte, mensurar o risco pelo qual populações humanas estão expostas a diversos agentes cancerígenos. Dentre os ensaios atualmente disponíveis para essa finalidade, destaca-se o teste do micronúcleo em células epiteliais esfoliadas, pois esse tem demonstrado ser um método efetivo e válido para detecção de quebras cromossômicas causadas por agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (ÇELIK et al., 2003; HUVINEN et al., 2002; KAYAL et al., 1993; MINICUCCI et al., 2005; PASTOR et al., 2001a,b; 2003; TOLBERT et al., 1992; CAVALLO et al., 2007; SPEIT et al., 2007; ÇELIK & KANIK 2006). O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina normalmente de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo com o diâmetro entre 1/3 a 1/16 do diâmetro do núcleo principal (ANDRADE et. al. 2005; THOMAS . et. al. 2008). A sua formação resulta de quebra na molécula de DNA dias ou semanas após a ação de carcinógenos durante a divisão celular, mais precisamente durante a telófase da mitose ou meiose das células da camada basal, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São constituídos, portanto, de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram inclusos no núcleo principal, após a conclusão da duplicação (STICH et. al. 1983; RIBEIRO et al. 2003). Portanto, células micronucleadas podem refletir a incidência de eventos genotóxicos sobre a mucosa bucal, haja visto a expressão do micronúcleo pode avaliar o grau de comprometimento do tecido perante a mutagênese (ANDRADE et. al. 2005; BELIËN et al. 1995). Aliado a sua facilidade de execução e baixo custo quando comparado a outros testes designados para o mesmo propósito, o teste do micronúcleo em células esfoliadas tem sido amplamente utilizado em estudos de biomonitoramento humano (KNUDSEN & HANSEN 2007), incluindo populações expostas tais como pintores de carros (MARTINO-ROTH et. al., 2003), agricultores que utilizam pesticidas (PASTOR et. al., 2001), enfermeiras que manipulam drogas anti-neoplásicas (REKHADEVI et. al., 2007; WIESNER et. al., 2001) e a contaminantes ambientais considerados suspeitos, como o derivados do petróleo (ÇELIK et al., 2003).

Nosso grupo de pesquisa já vem utilizando o teste do micronúcleo em células esfoliadas para a avaliação de risco em pacientes acometidos por tumores epiteliais, como por exemplo, os de bexiga urinária e cavidade oral (GONTIJO et al., 2002; MINICUCCI et al., 2005). Além disso, nós temos

empregado a técnica para a avaliação de biocompatibilidade de compostos rotineiramente utilizados na prática clínica, dentre eles a clorexidina (RIBEIRO et al., 2004), assim como em estudos de quimioprevenção tanto *in vitro* como *in vivo* (AZEVEDO et al., 2007; SCOLASTICI et al., 2007). Não obstante, estamos aplicando o ensaio em estudos de biomonitoramento humano relacionados à exposição diagnóstica aos raios-X (ANGELIERI et al., 2007) e modalidades terapêuticas ligadas à ortodontia funcional (trabalho em andamento com auxílio pecuniário da FAPESP, Proc. N. 2007/00345-7).

Alguns estudos têm postulado que indivíduos expostos rotineiramente a derivados do petróleo evidenciaram um aumento na frequência de células micronucleadas, caracterizando, portanto, um evento mutagênico, pois motores de combustão interna, que utiliza derivados de petróleo como combustível, liberam uma grande quantidade de gases, partículas e substâncias, que induzem efeitos genotóxicos. (BENITES et al., 2006; ÇELIK et al., 2003; KARAHALIL et al. 1999). Além disso, derivados de petróleo são misturas químicas complexas, representadas principalmente por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos químicos com potencial cancerígeno bem estabelecido (PARENT et al. 2007; PATEL et al. 2004). Segundo a Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC), vapores de gasolina são possivelmente carcinogênicos para seres humanos devido a presença de alguns componentes como o benzeno (ÇELIK et al., 2003). O benzeno é encontrado no petróleo e em produtos petrolíferos. Níveis de benzeno na gasolina variam de 1 a 5%. Gasolina é a principal fonte de exposição do benzeno em uma grande variedade de situações, incluindo a contaminação das águas subterrâneas por meio de vazamento de tanques de armazenamento subterrâneo; a contaminação do ar através da evaporação da gasolina nos locais de trabalho e nos lares, e exposição transdérmica, quando a gasolina fica em contato com a pele. Estudos sobre toxicidade do benzeno demonstraram que essa substância é capaz de causar três tipos de alterações cromossômicas, sendo elas: aberrações cromossômicas, micronúcleo e troca de cromátides irmãs. EREXSON et al. (1984) relataram que em exposição a baixas doses de benzeno (ppm 10-28) durante 4-6 h ocorreu trocas de cromátides irmãs em linfócitos B periféricos murinos. TICE et al. (1980) demonstraram a indução de troca de cromátides irmãs em ratos após a exposição a curto prazo em altas

concentrações de benzeno (SNYDER, et al. 1993).

Contudo, até o presente momento ainda há poucos estudos que revelem com exatidão se indivíduos expostos ocupacionalmente a derivados de petróleo, tais como os trabalhadores de postos de gasolina (frentistas), compõem um possível grupo de risco ao desenvolvimento de tumores (BENITES et al., 2006). O descaso por parte dos seus empregadores intensificam os riscos enfrentados por este grupo, pois a exigência de muitas horas de trabalho e a falta de equipamento de segurança como luvas e máscaras aumentam os níveis de exposição dos trabalhadores aos derivados de petróleo (HALLARE et. al., 2008.).

MATERIAIS E MÉTODOS

Casuística

A amostra foi composta por 23 voluntários, brasileiros, trabalhadores em postos de gasolina da cidade de Santos – SP, no exercício da função de frentista há pelo menos cinco anos durante 40 horas semanais. Os critérios de seleção dos voluntários para o presente estudo consistiram em: apresentar boas condições de saúde; não apresentar processos infecciosos e/ou de natureza neoplásica na mucosa bucal; não ter submetido a radiografias da região de cabeça e pescoço nos últimos 15 dias; não estar ingerindo drogas com finalidade terapêutica diariamente.

Um total de 23 casos de indivíduos não expostos aos derivados ao petróleo (grupo controle) foi também recrutado, sendo pareado em sexo e idade. Esse se obedeceu aos mesmos critérios de exclusão dos indivíduos expostos, para garantir reprodutibilidade ao estudo. Em todos os casos, foi realizado uma entrevista, a fim de coletar informações gerais, tais como idade, sexo, período de exercício na função, tabagismo e sua frequência, etilismo e sua frequência, e uso de enxaguatórios bucais. A coleta dessas informações fora feita por meio de formulário próprio (Anexo I). Ademais, todos os pacientes serão orientados sobre os objetivos do presente estudo, os quais assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (Protocolo n. CEP 1526/08)

Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo em células da mucosa bucal foi feito conforme a metodologia descrita por BELIEN et al., (1995). Após um bochecho com água, células da mucosa jugal e borda lateral de língua de ambos os lados foram coletadas de todos os pacientes com o auxílio de uma espátula de madeira. A seguir, o material obtido foi acondicionado em um tubo contendo soro fisiológico (NaCl à 0,9%), onde a solução foi depositada em laminais histológicas previamente lavadas (cada determinação em duplicada), e fixadas com solução de metanol:ácido acético (3:1), deixando-as secar à temperatura ambiente. Por conseguinte, as laminais foram imersas em solução de HCl à 1 M durante 90

minutos e, posteriormente coradas com o reagente de Feulgen (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 90 minutos e contra-coradas com Fast green (Merck) à 1% durante 1 minuto. Um total de 1000 células foi analisado por lamina para a determinação da frequência do micronúcleo e de cariólise, carioreexse e picnose (parâmetros de citotoxicidade).

Análise Estatística

Os dados referentes ao teste do micronúcleo foram submetidos ao teste do qui-quadrado para se avaliar as frequências de células micronucleadas e o teste não paramétrico para amostras não pareadas (Teste de Mann-Whitney) para os valores numéricos originais. $p < 0,05$ foi considerado para significância estatística.

RESULTADOS

A amostra foi composta por 23 atendentes de postos de gasolina da cidade de Santos, sendo 22 homens e 1 mulher com média de idade de 37.3 ± 11.1 anos. Para o grupo controle, consistiu-se em uma média de idade de 39.6 ± 13 anos.

Tabelas 1 e 2 mostram as freqüências de micronúcleos e outras alterações nucleares (cariorréxis, picnose e cariólise) para atendentes de postos de gasolina e indivíduos controle em ambos os sítios avaliados (mucosa jugal e borda lateral da língua). Na tabela 1 para o grupo controle, a freqüência média de micronúcleos foi de 0,04%, porém, para o grupo exposto aos derivados de petróleo, a freqüência média de micronúcleo foi de 0,42% em células da mucosa jugal. Na tabela 2, a freqüência média de micronúcleos foi de 0,70% em células da borda lateral da língua. Além disso, observou-se um aumento das outras alterações nucleares intimamente relacionadas à citotoxicidade, conforme ilustrado pela freqüência de cariorréxis, picnose e cariólise em ambos os sítios anatômicos avaliados, ou seja, mucosa jugal e borda lateral da língua.

Neste estudo, os voluntários foram considerados fumantes se tivessem fumado mais de 5 cigarros por dia durante pelo menos 5 anos. Considerou-se, um total de seis indivíduos fumantes para o grupo experimental e sete para o grupo controle. No entanto, este estudo não foi capaz de revelar uma relação entre a contagem de micronúcleos e o tabagismo entre os indivíduos não expostos e os indivíduos expostos aos derivados do petróleo para ambos os sítios avaliados, apesar de fumantes apresentarem valores mais elevados quando comparados aos não-fumantes (dados não divulgados). Provavelmente, a quantidade de indivíduos fumantes no presente estudo seja pequena para uma resposta positiva.

Tabela 1. Freqüência de células micronucleadas e outras alterações nucleares (cariorréxis, picnose e cariólise) encontradas na mucosa jugal de atendentes de postos de gasolina.

Grupos	MNC(%)		Outras Alterações Nucleares ¹ (%)	
	N° de Indivíduos	Média ± DP	N° de Indivíduos	Média ± DP
Grupo Controle	23	0.04 ± 0.04	23	6.52 ± 3.84
Frentistas	23	0.42 ± 0.06*	23	24.53 ± 6.87*

¹ Cariorréxis, Picnose e Cariólise

*p<0.05 quando comparado com o grupo controle

Tabela 2. Frequência de células micronucleadas e outras alterações nucleares (cariorréxis, picnose e cariólise) encontradas na borda lateral da língua de atendentes de postos de gasolina.

Grupos	MNC(%)		Outras Alterações Nucleares ¹ (%)	
	N° de Indivíduos	Média ± DP	N° de Indivíduos	Média ± DP
Grupo Controle	23	0.04 ± 0.06	23	7.45 ± 3.81
Frentistas	23	0.70 ± 0.09*	23	14.06 ± 5.87*

¹ Cariorréxis, Picnose e Cariólise

*p<0.05 quando comparado com o grupo controle

DISCUSSÃO

O ar atmosférico é composto por partículas suspensas como dióxido sulfúrico, dióxido de nitrogênio, monóxido de carbono, ozônio e chumbo. Esses poluentes são as principais causas que elevam os índices de doenças crônicas como pulmonares obstrutivas crônicas, doenças cardiovasculares, asma, câncer e mortalidade, impactando a saúde pública.(GATTÁS et al., 2001).

A gasolina, um derivado de petróleo que é utilizada como combustível de automóveis, contém benzeno em sua composição. Estudos epidemiológicos, em diversos países, relacionam o benzeno a doenças como anemia aplástica, mielóide aguda e leucemia em humanos.(AKSOY 1985; RINSKY, et. al. 1987). Além disso, a população em geral é exposta ao benzeno contido no diesel pela fumaça liberada dos escapamentos dos veículos e a de cigarros.(ZHANG et.al., 2002). Um estudo, realizado na Itália, onde ratos foram expostos por inalação aguda a uma única dose de benzeno, observou-se um aumento na frequência de micronúcleo em culturas de fibroblastos pulmonares (RANALDI et. al. 1998).

Por esse motivo, vimos a necessidade de realização desse trabalho, pois, atendentes de postos de gasolina são representantes de um grupo profissional permanentemente exposto a potenciais cancerígenos, devido a sua ocupação, tais como aos gases produzidos pela combustão de combustível e a vapores potencialmente tóxicos. Essa exposição é preocupante, uma vez que exerce efeito a longo prazo sobre a saúde humana.(BENITES et. al.2006). Ao entrarem na circulação sanguínea, esses compostos com propriedades citotóxicas e genotóxicas, passam a exercer ações mutagênicas (ÇELIKA, et. al. 2003; HALLARE, et. al. 2008).

O teste do micronúcleo representa um importante marcador biológico e não invasivo para avaliar o grau de exposição da mucosa bucal a carcinógenos (ANDRADE, et. al. 2005). Estudos demonstraram que existe uma relação clara entre o aumento da frequência de micronúcleo em indivíduos expostos ao benzeno e seus derivados (YAGER et. al., 1990; TOMPA et. al., 1994; TURKEL et. al.,1994). O presente estudo aponta diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação a frequência de micronúcleo das células da mucosa oral de atendentes de postos de gasolina, tanto para borda lateral da língua quanto mucosa jugal. Esta afirmação esta consonante com estudos de ÇELIKA et. al.

2003; BENITES et. al. 2006; GATTÁS et al., 2001; HALLARE et. al 2008.

Em vários estudos epidemiológicos há ligação entre o tabagismo e o desenvolvimento de câncer do pulmão, boca, faringe, esôfago, rim, bexiga, pâncreas e colo-retal (BURGAZ S et.al. 1995). Porém, estudos sobre os efeitos do uso constante do tabaco e freqüência de micronúcleo têm sido, até agora, contraditórios. Segundo GATTÁS et al., 2001 a freqüência de fumar não exerce qualquer influência sobre o ocorrência de micronúcleo, corroborando com resultados de ÇELIKA et. al., 2003; HALLARE et. al., 2008. Em nosso estudo verificou-se também que não há aumento na freqüência de micronúcleos nos voluntários tabagistas.

Os resultados desta investigação concluíram que a constante inalação crônica de derivados de petróleo por atendentes de postos de gasolina representa um aumento na freqüência de micronúcleo. Essa afirmação corrobora com estudos que investigaram o aumento do mesmo em pintores de carros (MARTINO-ROTH et. al., 2003), agricultores que utilizam pesticidas (PASTOR et. al., 2001) e enfermeiras que manipulam drogas anti-neoplásicas (REKHADEVI et. al., 2007; WIESNER et. al., 2001) confirmando a hipótese de que a inalação de certas substâncias provocam danos ao DNA. Portanto, atendentes de postos de gasolina, por ser um grupo de risco, está sendo recomendado biomonitoramento e “check-ups” médicos periódicos e paramentação completa como, a utilização de luvas e máscaras durante o tempo de trabalho, reduzindo, assim efeitos negativos de substâncias cancerígenas para a saúde dos trabalhadores.

CONCLUSÃO

Em resumo, estes dados indicam que os atendentes de postos de gasolina compreendem um grupo de alto risco para danos ao DNA e morte celular. Parece que a borda lateral da língua é mais sensível à mutagenicidade induzida por derivados de petróleo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A literatura relata que o exercício físico se praticado cronicamente e de maneira moderada exerce importante efeito antioxidante além do aumento na eficiência e número de células do sistema imune, prevenindo e evitando assim, o surgimento e desenvolvimento do câncer.

Os atendentes de postos de gasolina, por se tratar de um grupo de risco para danos ao DNA e mutações e, normalmente, se encontrarem em um nível socioeconômico baixo deveriam utilizar uma estratégia de periodização de exercício físico para prevenção de tais danos. O exercício físico, por ser uma prática de baixa custo, deveria ser incentivado pelos proprietários dos postos de gasolina e praticada constantemente pelos seu funcionários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSOY, M. Malignancies due to occupational exposure to benzene. **Am. J. Ind. Med.**,v.7, p.395-402,1985.
- ANDRADE, M.G.S; REIS, S.R.A; ROBINSON, W.M; BORGES-OSÓRIO, M.R;. Micronúcleo um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer no câncer bucal. **Revista Odonto Ciência.**.v.20,p.137-141,2005.
- ANGELIERI, A, SANNOMIYA EK, RIBEIRO, D.A;. DNA damage and cellular death in oral mucosa cells of children who have undergone panoramic dental radiography. **Pediatr Radiol**,v.37,n.6,p.561-5,Jun/2007.
- AZEVEDO, L; ALVES, L.P.L; GOMES, J.C; STRINGHETA, P.C; RIBEIRO, D.A; SALVADORI, D.M;. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. **Food Chem Toxicol**,v.45,n.5,p.852-8, Mai/2007.
- BELIËN, J.A; COPPER, M.P; BRAAKHUIS, B.J; SNOW, G.B; BAAK; J.P;. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, v.16,n.10,p.2395-400,Out /1995.
- BENITES, C.I; AMADO, L.L; AMADO, L.L; VIANNA, R.A; MARTINO-ROTH, M.D.A.G;. Micronucleus test on gas station attendants. **Genet Mol Res**,v.31,n.5,p.45-54, Mar/2006.
- BURGAZ, S; ISCAN, A; BÜYÜKBİNGÖL, Z.K; BOZKURT, A; et. al. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. **Mutat. Res.**,v.335,p.163-169,1995.
- CAVALLO, D; URSINI, C.L; OMODEO-SALE, E; IAVICOLI, S;. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. **Mutat Res**, v.30,n.628,p.11-8,Mar/2007.
- CEBULSKA-WASILEWSKA, A; BINKOVA, B; SRAM,R.J; KALINA, I; POPOV,T; FARMER, P.B;. Repair competence assay in studies of the influence of environmental exposure to c-PAHs on individual susceptibility to induction of DNA damage. **Mutat Res**, v.1,N.620(1-2), p.155-64,Jul/2007.
- ÇELİK, A;. et al. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. **Mutagenesis**, v.18, n.5, p.417-21, 2003.
- ÇELİK, A; KANIK, A;. Genotoxicity of occupational exposure to wood dust: Micronucleus frequency and nuclear changes in exfoliated buccal mucosa cells. **Environ Mol Mutagen**,v.47,n.9,p.693- 8,Des/2006.
- DONMEZ-ALTUNTAS, H; BARAN, M; OYMAK, F.S; HAMURCU, Z; IMAMOGLU, N; OZESMI, M; DEMIRTAS, H; Investigation of micronucleus frequencies in lymphocytes of inhabitants environmentally exposed to chrysotile asbestos. **Int J Environ Health Res**,v.17,n.1,p.45-51,Feb/2007.
- EREXSON, G.L; WILMER, J.L; KLINGERMAN, A.D;. Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei in male DBA/2 mice after inhalation of benzene. **Environ. Mutagen**.6: 408,1984.
- FARIA, M.A.M; ALMEIDA, J.W.R; ZANNETA, D.M.T;. Mortalidade por câncer na região urbano-industrial da Baixada Santista, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública**

[online],v.33,n.3,p.255-261, 1999.

GATTÁS, G.J.F; CARDOSO, L.A; MEDRADO-FARIA, M.A; SALDANHA, P.H;. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. **Occup. Med**,v.51,n.2,p.107-113,2001.

GONTIJO, A.M; et al. DNA damage in cytologically normal urothelial cells of patients with a history of urothelial cell carcinoma. **Environ Mol Mutagen**,v.40,n.3,p.190-9, 2002.

HALLARE, A.V; GERVASIO, M.K.R; GERVASIO, P.L.G; ACACIO-CLARO, P.J.B;. Monitoring genotoxicity among gasoline station attendants and traffic enforcers in the City of Manila using the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells. **Environ Monit Assess.**,v.156,p.331–341,2009

HONG, H.H; HOULE, C.D; TON, T.V; SILLS, R.C;. K-ras mutations in lung tumors and tumors from other organs are consistent with a common mechanism of ethylene oxide tumorigenesis in the B6C3F1 mouse. **Toxicol Pathol**.v.35,n.1,p.81-5, 2007

HUVINEN, M;. et al. Nasal cell micronuclei, cytology and clinical symptoms in stainless steel production workers exposed to chromium. **Mutagenesis**, v.17, p.425-9, 2002.

IARC. (1989) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 45. Occupational Exposures in Petroleum Refining: Crude Oil and Major Petroleum Fuels. IARC, Lyon, France.

KARAHALIL, B; KARAKAYA, A.E; BURGAZ, S;. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat Res**,v.7,n.442,p.29-35, Jun/1999.

KAYAL, J;. et al. Incidence of micronuclei in oral mucosa of users of tobacco products singly or in various combinations. **Mutagenesis**, v.5, p.31-3, 1993.

KNUDSEN, L.E; HANSEN, A.M;. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health Int J Hyg **Environ Health**,v.210,p.461-70, May/2007.

LICHTMAN, M.A;. Cigarette smoking, cytogenetic abnormalities, and acute myelogenous leukemia. **Leukemia**,v.21,p.1137-40.Jun/2007.

MARTINO-ROTH, M.G; VIÉGAS, J; ROTH, D.M;. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. **Genetics and Molecular Research**.v. 2,n. 4,p.410-417, 2003.

MINICUCCI, E;. et al. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. **J. Radiat. Res.**, v.46, n.2, p.135-42, 2005.

PARENT, M.E; ROUSSEAU, M.C; BOFFETTA, P; COHEN, A; SIEMIATYCKI, J;. Exposure to diesel and gasoline engine emissions and the risk of lung cancer. **Am J Epidemiol**,v.1p.:53-62,Jan/2007.

PASTOR, S;. et al. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v.18, n.3, p.249-58, 2003.

PASTOR, S;. et al. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v.16, p.539-45, 2001.

PASTOR, S.; et al. Micronuclei in peripheral lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. **Mutat. Res.**, v.495, p.147-56, 2001.

PATEL, A.S; TALBOTT, E.O; ZBOROWSKI, J.V; RYCHECK, J.A; DELL, D; XU, X; SCHWERHA, J;. Risk of cancer as a result of community exposure to gasoline vapors. **Arch Environ Health**.v.59,p.497-503,Out/2004.

RANALDI, R; BASSANI, B; VILLANI, P; LOMBARDI, C.C; TANZARELLA, C; PACCHIEROTTI, F; Measurement and characterization of micronuclei in cultured primary lung cells of mice following inhalation exposure to benzene. **Mutagenesis**.,v.13,n.5,p.453-460,1998.

REKHADEVI, P.V; SAILAJA, N; CHANDRASEKHAR, M; MAHBOOB, M; RAHMAN, M.F; GROVER, P;. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. **Mutagenesis**.,v.22,n.6,p.395-401, 2007.

RIBEIRO, D.A; BAZO, A.P.D.A; SILVA FRANCHI, C.A; MARQUES, M.E; SALVADORI, D.M;. Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. **J Periodontal Res**,v.39,p.358-61,Out/2004.

RIBEIRO, D.A; FAVERO SALVADORI, D.M.DA; SILVA, R.N; RIBEIRO DARROS, B; ALENCAR MARQUES, M.E;. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis Oral. **Oncol**,v.40,p.910-5,Out/2004.

RIBEIRO, D.A; KITAKAWA, D; DOMINGUES, M.A; CABRAL, L.A; MARQUES, M.E; SALVADORI, D.M;. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. **Exp Mol Pathol**,v.83,p.131-7,Ago/2007.

RIBEIRO, D.A; SALVADORI, D.M; MARQUES, M.E;. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Int J Exp Pathol**,v.86,p.375-81, Dec/2005.

RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K;. Mutagênese Ambiental. 1ª edição. Canoas/RS:Ed. **Ulbra**, 2003. 356p.

RINSKY, R.A; SMITH, A.B; HOMUNG, R; FILLON, T.G; YOUNG, R.J; OKUN, A.H; LANDNGAN, P.J;. Benzene and leukemia an epidemiologic risk assessment.**N. Engl. J Med**.,v.316,p.1044-1050,1987.

SABBIONI, G; SEPAI, O; NORPPA, H; YAN, H; HIRVONEN, A; ZHENG, Y; JARVENTAUS, H; BACK, B; BROOKS, L.R; WARREN, S.H; DEMARINI, D.M; LIU, Y.Y;. Comparison of biomarkers in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. **Biomarkers**,v.12,p.21-37, Jan-Fev/2007.

SCOLASTICI, C; ALVES, L.R.O; BARBISAN, L.F; FERREIRA, A.L; RIBEIRO, D.A; SALVADORI, D.M;. Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Toxicol In Vitro**,v.21,n.5,p.840-5,Ago/2007.

SILVA, R.N; RIBEIRO, D.A; SALVADORI, D.M; MARQUES, M.E;. Placental glutathione Stransferase correlates with cellular proliferation during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Exp Toxicol Pathol**,v.59,p.61-8,set/2007.

SNYDER, R; WITZ, G; GOLDSTEIN, B.D;. The Toxicology of Benzene.

Environmental Health Perspectives.v.100,p.293-306,1993.

SPEIT, G; SCHMID, O; FROHLER-KELLER, M; LANG, I; TRIEBIG, G;. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. **Mutat Res**, v.5,n.627,p.129-35, Mar/2007.

THOMAS, P; HARVEY, S; GRUNER, T; FENECH M;. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. **Mutation Research**,v.638,p.37-47, 2008.

STICH, H.F; ROSIN, M;. Quatitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **Int J Cancer**.,v.31,n.3,p.305-8, 1983.

TICE, R.R; COSTA, D.L; DREW, R.T;. Cytogenetic effects of inhaled benzene in murine bone marrow: Induction of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and cellular proliferation inhibition in DBA/2 mice. **Proc. Natl. Sci. U.S.A.**,v.77,p.2148-2152,1980.

TOLBERT, P;. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat. Res.**, v.271, p.69-77, 1992.

TOMPA, A; MAJOR, J; JAKAB, M.G;. Monitoring of benzene-exposed workers for genotoxic effects of benzene: improved working-conditionrelated decrease in the frequencies of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes. **Mutat. Res.**,v.304,p.164-165,1994.

TURKEL, B; EGELI, U;. Analysis of chromosomal aberrations in shoe workers exposed long term to benzene. **Occup. Environ. Med.**,v.51,p.50-53,1994.

WIESNER, G; HOERAUF, K; SCHROEGENDORFER, K; SOBCZYNSKI, P; HARTH, M; RUEDIGER, H.W;. High-Level, but Not Low-Level, Occupational Exposure to Inhaled Anesthetics Is Associated with Genotoxicity in the Micronucleus Assay. **Anesth Analg**.v.92,p.118-122, 2001.

YAGER, J.W; EASTMOND, D.A; ROBERTSON, M.L; PARADISIN, W.M; SMITH, M.T;. Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. **Cancer Res**.v.50,p.393-399,1990.

ZHANG, A.H; BIN, H.H; PAN, X.L; XI, X.G;. Analysis of p16 gene mutation, deletion and methylation in patients with arseniasis produced by indoor unventilated-stove coal usage in Guizhou, China. **J Toxicol Environ Health A**,v.70,p.970-5,Jun/2007.

ZHANG, L; EASTMOND, D.A; SMITH, M.T;. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene. **CRC Crit. Rev.Toxicol.**,v.32,p.1-42, 2002.

Anexo I**Questionário**

Assinale com um X a frente da alternativa escolhida e escreva nas questões dissertativas.

Sua identidade será preservada.

Idade: ____ anos Sexo: | Feminino. | Masculino.

1) Durante quanto tempo trabalha em posto de gasolina?

2) Quantas horas, em média, por semana você Trabalha no posto?

3) Quanto ao uso de bebidas alcoólicas:

a) Bebia, mas parei.

b) Bebo.

c) Nunca bebi.

d) Bebo eventualmente.

4) Há quanto tempo bebe ou parou de beber?

5) Quanto, em média, ingere de bebida alcoólica?

a) Bebo diariamente

b) Bebo 1 a 3 vezes por semana

c) bebo 4 a 6 vezes por semana

d) Bebo 1 a 3 vezes por mês

e) Bebo 1 vez por mês

f) Bebo menos de 1 vez por mês.

6) Quanto ao tabagismo (uso de cigarro):

a) Fumava, mas parei.

b) Fumo.

c) Nunca fumei.

d) Fumo eventualmente.

7) Há quanto tempo fuma ou parou de fumar?

8) Quantos cigarros por dia fuma ou fumava?

9) Já fez uso algum tipo de drogas ilegais? Se sim Quais?

10) Faz uso de algum enxaguatórios bucais? Se sim, qual e quantas vezes por dia?

Comentários :

Anexo II**Termo de Consentimento**

Eu _____ portador do RG _____ autorizo o uso do material recolhido por _____ para análise no laboratório da Universidade Federal de São Paulo – Campos Baixada Santista, localizado na Avenida Ana Costa número 95, para fins de pesquisa científica.

Após a utilização do material, ele será inutilizado e descartado.

Assinatura do voluntário

Dia _____ de _____ de 20__