

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**RELAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E POLIMORFISMOS DA MTHFR C677T  
COM A INSTABILIDADE GENÔMICA EM FUMICULTORES GAÚCHOS**

Simone Pereira Fernandes

Orientador: Profa. Dra. Kátia Kvitko

Colaborador: Profa Dra. Eliane Bandineli

**Porto Alegre (RS)  
2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

RELAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR E POLIMORFISMOS DA MTHFR C677T  
COM A INSTABILIDADE GENÔMICA EM FUMICULTORES GAÚCHOS

**Simone Pereira Fernandes**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular  
da UFRGS como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Mestre em Genética e  
Biologia Molecular.

**Orientador: Profa. Dra. Kátia Kvitko**  
**Colaborador: Profa. Dra. Eliane Bandineli**

**Porto Alegre (RS), 2012.**

## **INSTITUÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **Instituição de origem:**

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em colaboração com o Laboratório de Hemostasia do mesmo departamento.

### **Instituições Financiadoras:**

CNPq

CAPES

FAPERGS

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, a Prof<sup>a</sup>. Dra. Kátia Kvitko por todo o apoio, pelo acompanhamento contínuo, pela experiência, amizade e sabedoria.

Outro agradecimento em especial à Prof<sup>a</sup> Dra. Eliane Bandinelli, pela atenção e pela ajuda, principalmente no início do processo. Agradeço a disponibilidade de seu laboratório no Departamento de Genética, sempre de portas abertas para mim.

Agradeço à UFRGS pelo suporte financeiro oferecido como apoio para o desenvolvimento desta dissertação.

Queria agradecer a minhas amigas Roberta Petry Gorziza e Mariana Botton do laboratório de hemostasia, pela grande ajuda nas horas de sufoco e pela paciência!

Não poderia me esquecer das colegas de laboratório da Imunogenética: Fernanda Rabaioli da Silva e Paula Rohr pela atenção e pela força dada através do companheirismo, sempre que precisei.

Aos professores do PPGM pelos ensinamentos e ao Elmo pelo respeito, carinho e disponibilidade incondicional a mim e a todos os alunos do departamento.

Aos agricultores, por nos colocarem dentro de suas casas e nos permitirem realizar esse trabalho: meu carinho e meu respeito.

Também gostaria de agradecer a meus pais, Sonia Fernandes, Celso Fernandes e Lucy Jacquet por tudo aquilo que me ensinaram e pelos muitos momentos de dificuldades que enfrentamos, mas que não impediram que me dessem todo o apoio necessário. Ao meu namorado e amigo Romero agradeço pelo apoio e companheirismo. A todas as pessoas, cujos nomes não são citados, mas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Por último, agradeço a Deus por todas as alegrias, pela saúde e pela força que me concedeu, para que conseguisse chegar até aqui e, sobretudo, por ter me dado esta oportunidade maravilhosa de crescimento na minha vida.

À todos, o meu profundo agradecimento: Muito obrigada!

## LISTA DE ABREVIATURAS

5 –MTHF	5 metilertahidrofolato ( <i>5-metyltetrahydrofolate</i> )
5,10- MTHF	5,10 metilertahidrofolato ( <i>5,10-metyltetrahydrofolate</i> )
CBA	Nutrientes e compostos bioativos dos alimentos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CV	Coeficiente de variação do nutriente
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DP	Desvio Padrão
DRIs	Dietary Reference Intakes
DTN	Defeitos no tubo Neural
dUMP	Deoxiuridilato monofosfato
EAR	Necessidade Média Estimada (Estimated Average Requirement).
EPI	Equipamento de proteção Individual
FD	Fator de Dano
ID	Índice de Dano
IMC	Índice de Massa Corporal
IOM	Institute of Medicine
MN	Micronúcleo
MTHFR	Metilnotetrahidrofolato redutase
NHANES	US National Health and Nutrition Examination Survey
QFA	Questionário de frequência alimentar
R24h	Recordatório de 24 horas
RDA	Quota Dietética Recomendada (Recommended Dietary Allowance)
SAM	S-adenosilmetionina

SNC	Sistema Nervoso central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
USDA	United States Department of Agriculture
WHO	World Health Organization

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I.....	14
Figura1 Representação esquemática das vias de metabolização da homocisteína.....	18
CAPÍTULO II.....	38
Figure1 Correlation of the Folate intake Mean with age (years); and correlation of MN frequency and Comet assay with age (Spearman'test).....	49

## LISTA DE UNIDADES

µg: micrograma

mg: miligrama

kg: quilograma

m<sup>2</sup> : metro quadrado

g: grama

l: litro

## LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	10
Tabela 1 Conceitos de referência das DRIs.....	21
Tabela 2 Conteúdo de folato ,B <sub>6</sub> e B <sub>12</sub> em alguns alimentos.....	24
Tabela 3 Valores recomendados de ingestão de ácido fólico.....	25
Tabela 4 Valores recomendados de ingestão de vitamina B <sub>12</sub> .....	26
Tabela 5 Valores recomendados de ingestão de vitamina B <sub>6</sub> .....	26
Tabela 6 Valores de referência para determinação do IMC – adultos.....	34
Tabela 7 Valores de referência para determinação do IMC – idosos.....	34
Tabela 8 Valores para razão D/Dp e a probabilidade correspondente em concluir corretamente que a ingestão habitual está adequada/inadequada.....	36
Tabela 9 Proporção de adequação dos micronutrientes ( folato, B <sub>12</sub> e B <sub>6</sub> ) .....	37
CAPÍTULO II.....	38
Tabela I Characteristics of the study population with respect to BMI, PPE utilization, smoking, alcohol and medicine intake .....	65
Tabela II Distribution of adequacy / inadequacy of folate, B <sub>6</sub> and B <sub>12</sub> according to DNA Damage .....	66
Tabela III Distribution of polymorphism MTHFR C677T the according to DNA Damage .....	67



## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT .....	12
CAPÍTULO I .....	13
I.1 INTRODUÇÃO .....	14
I.1.1 GENÔMICA NUTRICIONAL .....	15
I.2 INFORMAÇÕES DIETÉTICAS.....	16
I.2.1 ACIDO FÓLICO ( vitamina B <sub>9</sub> ) E O GENE <i>MTHFR</i> .....	16
I.2.2 RECOMENDAÇÕES PARA INGESTÃO DE NUTRIENTES.....	18
I.2.3 CONSUMO HABITUAL E VARIABILIDADE DA DIETA .....	20
I.2.4 ÁCIDO FÓLICO E DIETA.....	22
I.3 FUMICULTORES .....	26
I.4 BIOMARCADORES PARA BIOMONITORAMENTO.....	28
I.4.1 Biomarcador de exposição – Ensaio Cometa .....	28
I.4.2 Biomarcador de efeito - Teste do Micronúcleo e Aberrações Cromossômicas .....	29
I.4.3 Biomarcadores de Suscetibilidade .....	29
II OBJETIVOS .....	30
2.1 GERAL.....	30
2.2 ESPECÍFICOS .....	30
2.3 DELINEAMENTOS DO ESTUDO .....	30
III CASUÍSTICA.....	31
IV ASPECTOS ÉTICOS .....	31
V PROCEDIMENTOS .....	32
VI COLETA DE DADOS.....	32
6.1 Questionários de dados .....	32
6.2 Avaliações Antropométricas.....	32
6.3 Recordatório de 24 Horas – Método de Referência.....	33
VII ANÁLISE DOS DADOS .....	35
7.1 Análise de micronutrientes .....	35
7.2 Proporção de adequação dos micronutrientes.....	36
CAPÍTULO II .....	37
INFLUENCE OF FOLATE, VITAMIN B12, B6 and <i>MTHFR</i> C677T POLYMORPHISM ON THE LEVELS OF DNA DAMAGE IN TOBACCO FARMERS.....	38
CAPÍTULO III .....	67
III.1 DISCUSSÃO .....	68
CAPÍTULO IV.....	73
IV.1 REFERÊNCIAS.....	74
CAPÍTULO V.....	90
V ANEXOS .....	91
5.1 Anexo 1 Questionário dados gerais .....	91
5.2 Anexo 2 Recordatório de 24 horas.....	92
5.3 Anexo 3 Material de apoio.....	93

## RESUMO

O dano genético pode ocorrer espontaneamente sob circunstâncias metabólicas normais e pode ser potencializado em situações de deficiência dietética e exposição excessiva a mutagênicos e carcinogênicos ambientais. As deficiências de ácido fólico, vitamina B<sub>6</sub> e vitamina B<sub>12</sub> podem levar a um aumento nos níveis e alterações na metilação do DNA. MTHFR é a enzima chave na via de metabolização do folato e o polimorfismo *MTHFR C677T* conduz à redução na atividade da enzima. O objetivo deste estudo foi avaliar influências da ingestão dos micronutrientes B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> e folato (B<sub>9</sub>), do polimorfismo *MTHFR C677T* na instabilidade genômica de indivíduos expostos ocupacionalmente a pesticidas. O estudo envolveu 69 homens e 41 mulheres (n= 110) com uma idade média 42,3 ± 13,32 anos no qual 42 (38,2%) deles apresentaram peso normal, 51 (46,4%) sobrepeso e 15 (13,6%) obesidade grau I, todos os indivíduos da amostra são fumicultores de Venâncio Aires e Santa Cruz do Sul (estado do Rio Grande do Sul, Brasil). A genotipagem do polimorfismo *MTHFR C677T* foi realizada pelo método PCR-RFLP. Os dados de dano de DNA foram avaliados pelos biomarcadores de exposição ocupacional ensaio cometa e micronúcleo. O status nutricional foi avaliado com base na média de 3 recordatórios de 24 horas (coletados em 3 dias não consecutivos, incluindo um final de semana em um intervalo de 4 meses). A ingestão dos micronutrientes foi estimada usando o programa nutricional *Food Processor SQL 10.9*. Não foram encontradas diferenças significativas entre idade e tempo de exposição a pesticidas para os parâmetros analisados. Encontramos aumento na frequência de micronúcleo de linfócitos em indivíduos com ingestão inadequada de folato e vitamina B<sub>12</sub>, apresentando diferença significativa ( $p = 0,030$ ) e ( $p = 0,014$ ) respectivamente quando comparados com os indivíduos com ingestão adequada. Dano de DNA não mostrou resultados significativos quando relacionados com tabagismo, anos de exposição, IMC e polimorfismo *MTHFR C677T*. A correlação entre dano do DNA, ingestão de folato, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e o polimorfismo *MTHFR* não apresentou significância. Em conclusão, nossos resultados indicaram que a adequação de folato para valores  $\geq 320 \mu\text{g} / \text{dia}$  e vitamina B<sub>12</sub>  $\geq 2,0 \mu\text{g} / \text{dia}$ , nesta amostra exposta, estaria protegendo da ação mutagênica dos pesticidas. A dieta

adequada, tanto em folato quanto em vitamina B<sub>12</sub> poderia estar auxiliando em um reparo de DNA adequado sugerindo um fator de proteção nesses indivíduos.

Palavras - chave: metabolismo do folato, dano DNA, polimorfismo *MTHFR* C677T, fumicultores, exposição ocupacional.

## ABSTRACT

Genetic damage can occur spontaneously under normal metabolic circumstances and can also be present in situations of dietary deficiency or inadequate intake of nutrients and excessive exposure to environmental mutagens. The purpose of this study was to evaluate the influence of the intake of micronutrients B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> and folate and of polymorphism *MTHFR C677T* in the induction of DNA damage in individuals exposed to pesticides. The study involved 69 men and 41 women who were tobacco farmers in the region of Venâncio Aires (State of Rio Grande do Sul, Brasil). DNA damage was analyzed by the Comet Test and Micronucleus Test (MN); dietary intake was evaluated based on the mean of three 24-hour Diet Recall questionnaires. The nutrient intake data were computerized and estimated in the *Food Processor SQL 10.9* program. The DNA damage results showed a significant increase in MN frequency in the lymphocytes of individuals who had an inadequate intake of folate and B<sub>12</sub> ( $p = 0.030$  and  $p = 0.014$ , respectively). No significant association was found between DNA damage and polymorphism *MTHFR C677T*. Correlations between DNA damage and polymorphism *MTHFR C677T* and nutrient intake were not significant. In conclusion, our results indicated that the adequate intake of folate ( $\geq 320 \mu\text{g /day}$ ) and vitamin B<sub>12</sub> ( $\geq 2,0 \mu\text{g /day}$ ) can provide protection from the mutagenic action of pesticides. A dietary adaptation of folate and B<sub>12</sub> can ensure adequate repair, showing that diet is a protective factor in this population.

**Keywords:** folate metabolism, DNA damage, polymorphism *MTHFR C677T*, tobacco farmers, occupational exposed.

## ***CAPÍTULO I***

## I.1 INTRODUÇÃO

Diversos micronutrientes como as vitaminas e os minerais exercem proteção aos eventos de dano do DNA gerados por fatores endógenos e exógenos a célula. Eles são essenciais nas rotas de ativação e desintoxicação dos xenobióticos e nos caminhos dos substratos e cofatores para enzimas de metabolização/detoxificação que são capazes de reparo e síntese do DNA, metilação e apoptose. A deficiência de micronutrientes ou o seu excesso pode modificar a estabilidade do genoma e estes efeitos podem igualmente depender da interação do nutriente-nutriente e do nutriente-gene, assim, o grau de influência da dieta no equilíbrio entre os estados de saúde e de doença poderá depender da composição genética do indivíduo (Lindahl *et al.*, 1999; DeBusk *et al.*, 2005; Alfari e Muller, 2006; Fenech, 2010; Li e Tollefsbol, 2010).

É crescente a preocupação sobre o efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações humanas expostas ocupacionalmente. Esforços contínuos têm sido feitos para identificar os agentes com potencial genotóxico, reconhecer condições de exposição danosa e monitorar populações que podem estar sofrendo exposição excessiva, com o objetivo de prevenir consequências adversas sobre a população (Maluf e Erdtmann, 2003).

Nutrientes e compostos bioativos dos alimentos (CBAs) modulam o funcionamento do genoma e, da mesma forma, características do genoma influenciam a resposta à alimentação, as necessidades de nutrientes e risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Assim, os fatores nutricionais de uma população podem significar modificações nas variadas respostas a toxicidade ambiental e uma dieta adequada pode inibir parar ou mesmo inverter uma cadeia de acontecimentos de toxicidade (Hu *et al.*, 1995; Willet, 1995; Carpenter, 2003; Phillips, 2008; Ragib e Cravioto, 2009).

Estudos epidemiológicos provam a forte ação do consumo de frutas e verduras na proteção do desenvolvimento de câncer, sobretudo dos compostos antioxidantes dos alimentos à proteção de danos oxidativos do DNA. Contudo, em muitos casos são desconhecidos os mecanismos moleculares dos vários nutrientes na proteção às patologias. Por isso, o desenvolvimento e otimização dos biomarcadores para investigação dos efeitos moleculares dos fatores dietéticos

em experimentações humanas, estudos animais e *in vitro* são de grande importância (Cravo *et al.*, 1994; Franceschini *et al.*, 1998; Choi e Mason, 2000).

### **I.1.1 GENÔMICA NUTRICIONAL**

A nutrigenômica objetiva suas pesquisas nas diferenças entre exposições dietéticas e prováveis associações com fenótipos metabólicos de células e tecidos específicos, evidenciando a ação dos nutrientes e sua interação com o genoma e suas modificações na expressão do gene, através dos mecanismos biológicos que comandam a resposta do alimento em um determinado organismo. A nutrigenética relaciona os mecanismos da variabilidade individual a respostas dos nutrientes alimentares associando à presença ou ausência de marcadores biológicos específicos (Subbiah, 2007; Godard e Ozdemir, 2008; Fenech, 2008).

Estilo de vida, meio ambiente e dieta começam a ser evidências chave na compreensão dos fatores genéticos e ambientais de um indivíduo (Ordovas, 2004). Assim, a resposta individual ao estresse pode variar conforme absorção e taxa do metabolismo a agentes genotóxicos, reparo do DNA, morte celular (apoptoses/necrose), controle do ciclo celular e da resposta imune (Goode *et al.*, 2002; Thier *et al.*, 2003).

Segundo Kaput *et al* (2004) e Trujillo (2006), a base conceitual da nutrigenômica apóia-se nos princípios químicos da dieta e na sua ação direta, ou, indireta sobre o genoma. Por isso, em determinadas situações, a dieta pode ser um fator de risco ou de proteção importante para o desenvolvimento de determinadas doenças e assim os genes regulados por ela, podem apresentam um papel no início, na incidência, na progressão e, ou na severidade de uma doença crônica.

Os componentes bioativos dos alimentos são altamente variáveis, pois, a maioria dos problemas nutricionais não resulta da interação de um único nutriente com um único gene, mas de uma mistura complexa deles com múltiplos genes. Assim, a variação genética é a base da diferença na susceptibilidade dos problemas nutricionais (Lee e Go, 2005; Afman e Muller, 2006; Sutandyo, 2010).

## I.2 INFORMAÇÕES DIETÉTICAS

### I.2.1 ACIDO FÓLICO ( vitamina B<sub>9</sub>) E O GENE *MTHFR*

O folato mantém a estabilidade genômica através da regulação da síntese de DNA, reparo e metilação. Dentro do ciclo da metionina, a 5 - metiltetrahydrofolato (5-metil THF) remetila homocisteína à metionina, a qual é novamente metabolizada à s-adenosilmetionina (SAM). SAM é a principal doadora de grupos metil nas reações celulares, controlando expressão gênica através de sua habilidade de metilar a citosina no DNA (Duthie, 2011). ( Figura 1)

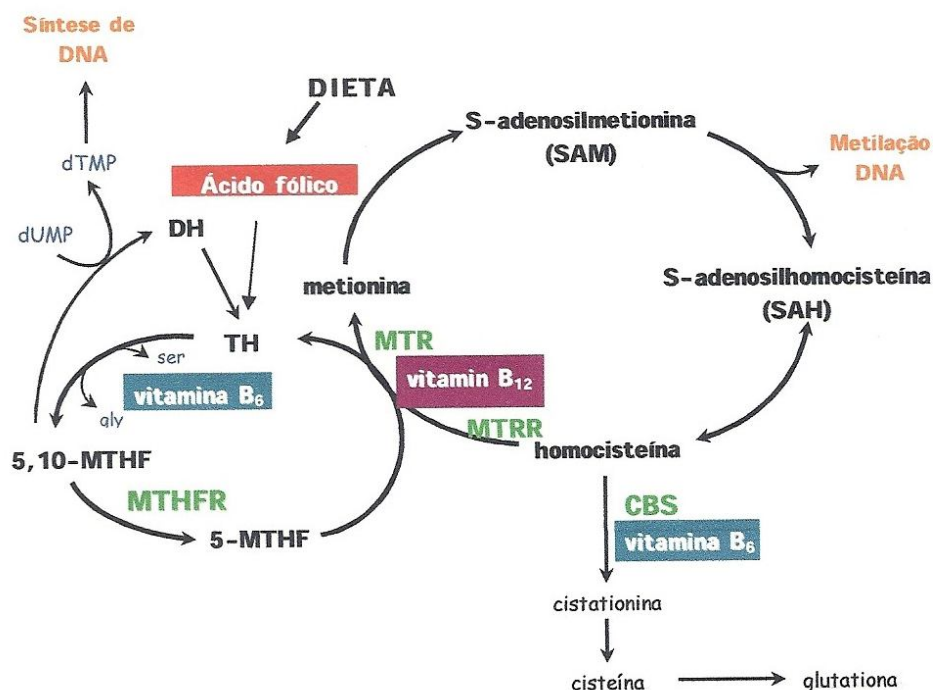
O folato também é essencial para a síntese de purinas e pirimidinas. A Desoxi-uridina monofosfato (dUMP) é convertida a timidina nonofosfato (TMP) pela enzima timidilato sintase (TS) utilizando 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-metileno THF) como doador de grupo metil. Subseqüentemente, 5,10-formiltetrahydrofolato (5,10-formil THF) é envolvida na produção de adenosina e guanina. A produção contínua destes precursores de DNA é essencial para a síntese de DNA e reparo (Duthie, 2011).

Quando ocorre a deficiência de folato, o balanço dos precursores de pirimidinas e purinas é alterado e o reparo de DNA é inibido. A uracila é incorporada ao DNA em vez da timina, levando a quebras nas fitas de DNA e danos cromossômicos. Além disso, a metilação das citosinas é alterada, levando a hipometilação do DNA e/ou mudanças na metilação gene-específica (Duthie, 2011).

A enzima metilenotetrahydrofolato redutase, codificada pelo gene *MTHFR*, converte o 5,10-metileno -THF a 5-metil-THF, gerando os grupos metil que serão utilizados na metilação do DNA, e síntese de nucleotídeos, como já mencionado.

O polimorfismo C677T no gene *MTHFR* consiste em uma substituição da citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 677, no éxon 4 ; acarretando na troca do aminoácido alanina pelo aminoácido valina. Os indivíduos homocigotos para o alelo T e os heterocigotos apresentam, respectivamente, uma redução de 70% e 35% da atividade da enzima *MTHFR*, quando comparados com os homocigotos CC (Chango A *et al.*, 2000).





**Figura 1:** Fonte: Adaptado de Sharp e Little, 2004 e cedido da tese de Doutorado de Ana Paula Carneiro Brandalize.

Em resposta ao metabolismo do folato, a vitamina B<sub>12</sub>, riboflavina, vitamina B<sub>6</sub> e outros cofatores podem modificar a atividade de reação catalizada pela *MTHFR*. O nível desses micronutrientes e sua deficiência podem influenciar na formação de micronúcleos (MN) e no reparo do DNA podendo induzir uma excessiva incorporação de uracila no DNA resultando em alguma alteração genética como mutação de ponto e quebra cromossômica (Beestra *et al*, 2005, Fenech, 2001); A deficiência de ácido fólico prejudica a divisão celular e a síntese de DNA resultando em malformação do Sistema Nervoso Central (SNC) e defeitos no tubo Neural (DTN) (Lima *et al*, 2002). O polimorfismo *C677T* do gene *MTHFR* é considerado fator de risco para doença cardiovascular, alguns tipos de câncer e situações neurológicas (Bailey *et al*, 1999; Duthie, 2010). Segundo Grillo e cols. (2002) existe uma associação entre o polimorfismo *C677T* no gene *MTHFR*, o metabolismo de ácido fólico, a metilação do DNA e a Síndrome de Down.

Uma dieta com baixas concentrações em folato juntamente com diminuição de vitaminas B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> está associadas com um maior risco de câncer entre

aqueles com o genótipo *MTHFR* 677TT (Fenech *et al.*, 1998; Andreassi *et al.*, 2003; Duthie, 2010).

O ácido fólico e a vitamina B<sub>12</sub> são micronutrientes vindos da dieta que possuem ação protetora para o dano de DNA, inclusive quando são suplementados (Fenech *et al.*, 1997).

Estudos sugerem que os genes de reparo de DNA (*XRCC1* e *XRCC3*) e genes do metabolismo do folato (*MTHFR*) também influenciam a formação de Micronúcleos (MN) (Tuimala *et al.*, 2004).

Com relação ao polimorfismo C677T do gene *MTHFR*, alguns estudos encontraram elevada frequência de MN em indivíduos com o genótipo do TT em comparação aos genótipos CC ou CT (Andreassi *et al.*, 2003; Botto *et al.*, 2003). Outros mostraram que *MTHFR* 677C>T não influenciou a frequência de MN (Crott *et al.*, 2001; Smolkova *et al.*, 2004).

## **I.2.2 RECOMENDAÇÕES PARA INGESTÃO DE NUTRIENTES**

A partir de 1997, o *Food and Nutrition Board /Institute of Medicine* (IOM) deu início ao desenvolvimento de um conjunto de valores de referência para a ingestão de nutrientes (*Dietary Reference Intakes – DRIs*) a serem utilizados no planejamento e na avaliação de populações saudáveis.

As DRIs são valores numéricos estimados de consumo de nutrientes para uso no planejamento e avaliação de dietas para pessoas aparentemente saudáveis. As DRIs são formadas pelas RDA (Recomendações dietéticas adequadas) e pelas AI (ingestão adequada) (tabela 1).

Outro valor de DRI utilizado é o EAR (Estimativa do Requerimento Médio). Quando este valor estiver disponível para um determinado nutriente, este valor é o que deve ser utilizado para fazer uma estimativa quantitativa da adequação da ingestão habitual deste nutriente. Apesar da RDA ser a meta de ingestão individual, não é recomendado seu uso para averiguar esta adequação. Obviamente, há uma variação da necessidade de consumo entre os indivíduos, mesmo sendo estes pertencentes ao mesmo estágio de vida e gênero. Assim, é importante levar em conta esta variabilidade, que é dada pelo coeficiente de

variação (CV) do nutriente. Para a maioria dos nutrientes, foi assumido uma variação de 10% do valor de EAR (IOM, 2000; Barr, Murphy e Poos, 2002). Considerando esta variação, é fundamental obter uma estimativa da variabilidade do consumo intrapessoal, que é o componente que explica a variação do consumo de alimentos do indivíduo no dia a dia (Sempos *et al.*, 1991). Embora, ao avaliarmos dois ou mais dias, tenhamos uma medida de variabilidade intrapessoal, o "*Subcomitê para Uso e Interpretação das DRIs*" recomenda que seja utilizada a estimativa desta variabilidade obtida em estudos de consumo alimentar em populações. No Brasil, não temos disponíveis dados de base populacional sobre a variabilidade do consumo intrapessoal. Portanto, a única alternativa, até o presente, é a utilização dos dados americanos (IOM, 2000).

De posse das informações necessárias, as estimativas da ingestão e da variabilidade da ingestão do nutriente; as estimativas da necessidade (EAR) e da variação da necessidade (CV) do nutriente passa-se a calcular a adequação aparente. Para isso, desenvolveu-se uma abordagem estatística que permite estimar o grau de confiança com que a ingestão do nutriente alcança a necessidade do indivíduo. Esta abordagem compara a diferença entre a ingestão relatada (a melhor estimativa da ingestão habitual) e a EAR. A equação desenvolvida também leva em conta a variabilidade da necessidade e a variação intrapessoal (do dia a dia). O resultado é um *score-Z*, por meio do qual se determina a probabilidade da dieta estar adequada, ou seja, o grau de confiança que a ingestão alcança as necessidades (IOM 2000).

Conforme Cuppari (2002), as Ingestões Dietéticas de Referência (DRIs) incluem quatro conceitos de referência para o consumo de nutrientes, conforme pode ser observado na Tabela 1

**Tabela 1.** Conceitos de referência das DRIs.

---

<i>RDA</i> ( <i>Recommended Dietary Allowance</i> , ou "Recomendações de Doses ou Cotas Alimentares"):	É o nível de consumo alimentar de cada nutriente, suficiente para satisfazer os requerimentos de quase todo indivíduo saudável (entre 97 e 98%), compreendido num determinado grupo, por gênero, faixa etária e estágio de vida (o termo continua em uso e denota a recomendação mais apurada à qual se possa chegar).
<i>AI</i> ( <i>Adequate Intake</i> , ou "Ingestão Adequada"):	É um valor de consumo recomendável, baseado em levantamentos, determinações ou aproximações de dados experimentais, ou ainda de estimativas de ingestão de nutrientes para grupo(s) de pessoas saudáveis, e que se considera adequado. É usado quando a RDA não pode ser determinada.
<i>UL</i> ( <i>Tolerable Upper Intake Level</i> , ou "Limite de Ingestão Máxima Tolerável"):	É o mais alto nível de ingestão de um nutriente que não causará efeitos adversos à saúde da maioria das pessoas. Acima do <i>UL</i> , o risco de efeitos adversos aumenta sensivelmente.
<i>EAR</i> ( <i>Estimated Average Requirement</i> ou "Estimativa do Requerimento Médio"):	É o valor (mediana) suficiente para garantir o requerimento de 50% dos indivíduos saudáveis compreendidos num determinado estágio da vida (prefere-se o termo 'estágio-de-vida' ao invés de 'faixa etária').

---

Fonte: Adaptado de Cuppari (2002)

### **I.2.3 CONSUMO HABITUAL E VARIABILIDADE DA DIETA**

A estimativa do consumo de alimentos tem merecido destaque nos estudos epidemiológicos, pois possibilita a estimativa do efeito de nutrientes e alimentos no desenvolvimento ou prevenção de doenças, bem como o papel dos nutrientes sobre a expressão de genes que podem estar envolvidos com doenças crônicas (Fisbergl *et al.*, 2005).

A variabilidade da dieta é a principal característica do consumo alimentar de indivíduos e de populações. Ainda que os indivíduos tenham um padrão estável de alimentação, o consumo diário de alimentos pode ser caracterizado como evento aleatório. O dia a dia, o dia da semana, a sazonalidade, entre outros, contribuem para a variabilidade alimentar diária e podem ser potencializados por aspectos socioculturais, econômicos e ecológicos. A ingestão alimentar varia entre os indivíduos (variabilidade interpessoal) e para um mesmo indivíduo (variabilidade intrapessoal). A variação entre os indivíduos está relacionada às diferenças entre gênero, idade, estado nutricional e a atividade

física (Willet e Lenart, 1998). Essas flutuações podem ser parcialmente removidas durante a análise dos dados, desde que a variabilidade intrapessoal seja conhecida.

Uma estimativa correta da dieta habitual do indivíduo envolve o conhecimento da variabilidade intrapessoal e a escolha de um método sensível para estimar o consumo. Assinala-se que não há método de avaliação de ingestão alimentar livre de erro, nem é factível obter estimativas de ingestão de um grande número de dias, por problemas de tempo e custo (Liu *et al.*, 1978; Nusser *et al.*, 1996).

Além disso, é necessário procurar estabelecer o padrão habitual de consumo alimentar, reconhecendo-se que este é um grande desafio, uma vez que há variabilidade intrapessoal. Deve-se ter especial atenção com o consumo de alimentos que são fontes de determinados nutrientes e que não são consumidos diariamente (Beaton, 1994). A medida da dieta feita por meio do registro de um único dia, como é feito no recordatório de 24 horas (R24h), não tem esta propriedade. Sugere-se a utilização do registro de três ou mais dias, ou, como alternativa, a aplicação de vários R24h. Devem-se aplicar quaisquer métodos selecionados, em dias alternados e abrangendo um dia de final de semana (Willet, 1998).

Sabendo que o erro é inerente a medida da ingestão e que a coleta e análise de dados dietéticos são essenciais para que seja possível identificar a relação entre a dieta e doença, torna-se necessário estimar o erro de medida para classificar de forma mais precisa os indivíduos por níveis de ingestão (Beaton, 1994). Mesmo com certa dificuldade de medição, o consumo habitual pode ser verificado (Margetts e Pietnen, 1997). Ferro-Luzzi classifica o R24h como um método retrospectivo.

O Recordatório de 24hs, considerado como método retrospectivo, tem como objetivo avaliar a dieta dos indivíduos e consiste em definir e quantificar todos os alimentos e bebidas ingeridos no período anterior à entrevista (Thompson e Byers, 1994; Willett e Lenart, 1998; Fisberg *et al.*, 2005). Porém, um único recordatório não reflete a ingestão habitual do indivíduo, devido à variação intrapessoal. Assim, um dos principais erros dos estudos envolvendo consumo

alimentar está relacionado à medida de variabilidade diária de ingestão alimentar. Uma das vantagens deste método é a fácil e rápida aplicação, imediato período de recordação após o consumo, e não exigir que os participantes sejam alfabetizados por ser aplicado por entrevistador (Bingham, 1987; Tarasuk e Beaton, 1992). Uma limitação importante é o papel da memória para identificação e quantificação das porções, sendo que a melhoria da estimativa da porção consumida pelo indivíduo pode ser facilitada pelo uso de modelos de tamanho de porção e álbuns de fotografias (Zaboto *et al.*, 1996; Ccade *et al.*, 2002; Flisberg 2002; Pinheiro *et al.*, 2008).

#### **1.2.4 ÁCIDO FÓLICO E DIETA**

Diversas vitaminas participam na proteção do DNA e na estabilização genômica. Assim, pode-se imaginar que deficiências dietéticas poderiam levar a um aumento no dano do DNA e subseqüentes disfunções celulares (Paoloni-giacobino *et al.*, 2003).

Folato é o termo utilizado para caracterizar a forma natural da vitamina hidrossolúvel do complexo B, cuja denominação deriva da planta nativa *folium*, que significa folha, já que foi isolada de folhas de espinafre, em 1941. A forma natural é encontrada em frutas, legumes e verduras, particularmente nos vegetais de folhas verdes escuras como o espinafre, a couve, aspargo e o brócolis, e outras fontes como leguminosas e vísceras, principalmente o fígado. Também é encontrado no feijão, abacate, abóbora, batata, carne de vaca, carne de porco, cenoura, leite, maçã, milho, ovo, queijo, vagens, peixe e em suco de frutas cítricas como a laranja e limão (Philippi, 2008).

O ácido fólico (ácido pteroilmonoglutamato), forma oxidada e estável do folato, embora seja raramente encontrado nos alimentos, é a forma utilizada em suplementos vitamínicos e produtos alimentícios fortificados, representando 20% do folato da dieta. Nos alimentos naturais, o chamado folato alimentar é encontrado na forma de pteroilpoliglutamato, que representa aproximadamente 80% do folato da dieta.

A tabela 2 mostra o conteúdo de folato, Vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> encontrado em frutas, legumes e verduras. Os folatos encontrados nos alimentos estão, predominantemente, na forma de poliglutamatos, sendo o 5-metiltetrahidrofolato o congênera majoritário; além disso, são prontamente oxidados e as taxas de oxidação variam diretamente com a concentração de oxigênio, temperatura, alcalinidade, exposição à luz e concentração de íons cobre e ferro. Uma quantidade considerável de folato pode ser destruída na cocção, processamento e estocagem (Van der put *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2003).

**Tabela 2.** Conteúdo de folato, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> encontrado em alguns alimentos

<b>FOLATO</b>		<b>B<sub>12</sub></b>		<b>B<sub>6</sub></b>	
Fonte	CONTEÚDO (µg /100g)	Fonte	CONTEÚDO (µg /100g)	Fonte	CONTEÚDO (mg/100 g)
Banana	20	Fígado bovino grelhado	70,5	Abacate	0,36
Batata cozida	9	Leite de vaca integral	0,4	Banana	0,25
Brócolis cru	71	Queijo tipo mussarela	2,2	Batata cozida	0,26
Couve crua	29	Ovo cozido	1,3	Brócolis cozido	0,20
Espinafre cozido	73	Carne bovina	2,4	Farelo de trigo	0,34
Farelo de trigo	44	Camarão cozido	1,8	Farinha de aveia	0,16
Farinha de aveia	52	Peixe grelhado	2,8	Feijão cozido	0,06
Farinha de soja	303	Fígado de galinha grelhado	16,8	Fígado bovino grelhado	1,00
Feijão cozido	149			Fígado de galinha grelhado	0,87
Fígado bovino grelhado	253			Oleaginosas	0,27
Fígado de galinha grelhado	560				
Laranja	30				
Ovo cozido	44				
Pão branco	25				
Tomate cru	15				

É amplamente reconhecido que a alta ingestão de folato, vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> são determinantes de baixas concentrações plasmáticas de homocisteína, tanto em homens quanto em mulheres (Almeida, 2007). O metabolismo inter-relacionado da homocisteína com as vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e folato explica por que distúrbios nutricionais relacionados a deficiência destas vitaminas podem resultar em hiperhomocisteinemia. Estima-se que 70% dos casos de hiperhomocisteinemia deve, em parte, ao estado nutricional inadequado relativo a vitaminas do complexo B (Selhub, 2002).

Além dos fatores congênitos (deficiência heterozigótica de metileno tetra-hidrofolato redutase), outros fatores também podem provocar elevação da homocisteinemia tais como os micronutrientes (déficit de vitaminas

B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> e folato), os fisiológicos (idade, sexo) a ação de alguns fármacos (óxido nítrico, isoniazida, teofilina, carbamazepina, metotrexate, niacina, colestiramina) e algumas doenças (insuficiência renal crônica, psoríase) (Gravina-Taddei *et al.*, 2005).

O *Institute of Medicine* (IOM), em 1998, publicou as recomendações para a ingestão de folato (*DRIs*) segundo as variações em função da idade, sexo, estado fisiológico (gravidez e lactação). Os valores recomendados de ingestão de ácido fólico estão apresentados na Tabela 3, 4 e 5.

**Tabela 3.** Valores da DRI para o ácido fólico

Estágio da vida	EAR ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	RDA/AI ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	UL ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )
<b>Homens</b>			
9 – 13 anos	250	300	600
14 – 18 anos	330	400	800
19 – 30 anos	320	400	1.000
31 – 50 anos	320	400	1.000
51 – 70 anos	320	400	1.000
> 70 anos	320	400	1.000
<b>Mulheres</b>			
9 – 13 anos	250	300	600
14 – 18 anos	330	400	800
19 – 30 anos	320	400	1.000
31 – 50 anos	320	400	1.000
51 – 70 anos	320	400	1.000
> 70 anos 65	320	400	1.000

Fonte: Adaptado de IOM (2005)

**Tabela 4.** Valores da DRI para vitamina B<sub>12</sub>

Estágio da vida	EAR ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	RDA/AI ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	UL ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )
<b>Homens</b>			
9 – 13 anos	1.5	1.8	ND
14 – 18 anos	2.0	2.4	ND
19 – 30 anos	2.0	2.4	ND
31 – 50 anos	2.0	2.4	ND
51 – 70 anos	2.0	2.4	ND
> 70 anos	2.0	2.4	ND
<b>Mulheres</b>			
9 – 13 anos	1.5	1.8	ND
14 – 18 anos	2.0	2.4	ND
19 – 30 anos	2.0	2.4	ND
31 – 50 anos	2.0	2.4	ND
51 – 70 anos	2.0	2.4	ND
> 70 anos 65	2.0	2.4	ND

Fonte: Adaptado de IOM (2005)



**Tabela 5 .** Valores da DRI para vitamina B<sub>6</sub>

Estágio da vida	<i>EAR (mg/d)</i>	<i>RDA/AI (mg/d)</i>	<i>UL (mg/d)</i>
<b>Homens</b>			
9 – 13 anos	0.8	1.0	60
14 – 18 anos	1.1	1.3	80
19 – 30 anos	1.1	1.3	100
31 – 50 anos	1.1	1.3	100
51 – 70 anos	1.4	1.7	100
> 70 anos	1.4	1.7	100
<b>Mulheres</b>			
9 – 13 anos	0.8	1.0	60
14 – 18 anos	1.0	1.2	80
19 – 30 anos	1.1	1.3	100
31 – 50 anos	1.1	1.3	100
51 – 70 anos	1.3	1.5	100
> 70 anos 65	1.3	1.5	100

Fonte: Adaptado de IOM (2005)

Muitos países suplementam com ácido fólico, como medida preventiva de malformações, determinados alimentos (Lumley *et al.*, 1998). O Brasil não dispõe de informações recentes, de representatividade nacional, sobre carências de micronutrientes em adultos. Mesmo assim, houve decisão governamental sobre a fortificação universal das farinhas de trigo e milho produzidas no País com ácido fólico com base em estudos de abrangência local realizados por diferentes instituições em várias regiões geográficas (Brasil, Ministério da Saúde, 2005).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou a partir de maio de 2002 e tornou obrigatório a partir de 2004 a adição de 150 microgramas de ácido fólico para cada 100 gramas de farinha de trigo e milho, além dos produtos derivados do milho comercializados no Brasil. Devido algumas dificuldade tecnológica a resolução excluiu a farinha de trigo integral (Philippi, 2008). Os indivíduos que apresentam o polimorfismo *C677T MTHFR* necessitam de um maior aporte nutricional de ácido fólico para a manutenção da homocisteinemia. Quantidades maiores de ácido fólico podem aumentar a estabilidade da enzima MTHFR, prevenindo desse modo a hiperhomocisteinemia (Hhcy) (Selhub, 1999). Portanto, pessoas com essa variante do gene identificado são estimuladas a consumir alimentos ricos em folato (Trujillo, 2006).

### I.3 FUMICULTORES

A cultura do fumo é desenvolvida em 700 municípios dos três Estados do Sul, 400 destes municípios são gaúchos. O setor fumageiro exerce grande importância na atividade econômica e social do país. Na área econômica, o fumo é responsável pela arrecadação de grandes somas em impostos e no campo social, a atividade fumageira é grande geradora de empregos diretos e indiretos, considerando desde o seu plantio até a comercialização do cigarro, o envolvimento no setor de aproximadamente 2,4 milhões de pessoas (Afubra, 2005).

O Brasil é um dos maiores produtores de tabaco do mundo, sendo que a região Sul se destaca como a principal produtora no país. Praticada em regime de cultivo familiar, a cultura do tabaco requer trabalho intensivo, além de utilizar grandes quantidades de agrotóxicos para garantir uma folha de boa qualidade (Etges et al., 2002). Neste aspecto o uso de pesticidas em larga escala tem provocado danos à saúde dos agricultores e de suas famílias, como intoxicações agudas e incapacidade para o trabalho, danos ao ecossistema com a contaminação dos alimentos, do solo, da fauna, dos rios além de desmatamento e perda de biodiversidade (Schoenhals *et al.*, 2009).

O fumo requer grande quantidade de pesticidas para protegê-lo de insetos e doenças. A aplicação de agrotóxicos é a atividade de manejo da cultura que oferece maior perigo aos fumicultores e suas famílias. A elevada demanda de pulverizações e o uso pesado e repetido de agrotóxicos causam danos aos fumicultores e exigem cuidados com a segurança no trabalho através da utilização adequada de Equipamentos de Proteção Individual (EPI) (Agostinetto *et al.*, 2000).

A prevalência de problemas de saúde mental e de suicídios em famílias envolvidas com a plantação de fumo é significativa, estando o uso de agrotóxicos organofosforados associado a este fato. Aplicado via de regra, em quantidades excessivas e sem equipamento de proteção individual, os resíduos deste agrotóxico são absorvidos através da respiração, pele e cabelos, podendo causar “síndromes cerebrais orgânicas ou doenças mentais de origem não psicológica”.

Além disso, a nicotina presente nas folhas penetra pelos cabelos e pele atuando como imunodepressora sobre o organismo de quem a manuseia (Falk *et al.*, 1996).

De acordo com a Associação dos Fumicultores do Brasil, os produtos químicos mais utilizados nesta cultura são: Oxicloreto de cobre (fungicida inorgânico a base de cobre), Mancozeb (fungicida ditiocarbamato), Metalaxyl (fungicida metil ester), Ipridione (fungicida dicarboximide), Acephato (inseticida organofosforado), Thiamethoxam (inseticida nitroguanidina), Imidacloprid (inseticida nitroguanidina e piridimetilamina), Clomazone (herbicida isoxazolidinona), Sulfentazone (herbicida) e Sethoxydim (herbicida) (Afubra, 2005).

Além da grande quantidade de pesticidas utilizados no cultivo do tabaco, a manipulação das folhas de fumo molhadas é outra ameaça à saúde dos trabalhadores (Niosh, 1996), pois estão presentes nas folhas do tabaco, substâncias antropogênicas persistentes, citadas acima e outros compostos orgânicos com potencial pesticida como, por exemplo, a nicotina. Em humanos, a nicotina é facilmente absorvida pela pele. Assim, quando os trabalhadores rurais entram em contato com a folha do fumo, alta quantidade de nicotina transdermal é observada (Arcury *et al.*, 2003), porém os possíveis danos genotóxicos ocasionados são ainda desconhecidos.

O potencial genotóxico da nicotina foi demonstrado em linfócitos periféricos humanos e em tecido linfático de tonsilas palatinas, demonstrando significativo aumento na migração do DNA pelo ensaio cometa (Kleinsasser *et al.*, 2005), assim como em células do epitélio nasal (Sassen *et al.*, 2005).

A nicotina também é responsável pela doença da folha verde que é considerada uma doença ocupacional. Esta doença é observada em trabalhadores que manipulam as folhas de fumo molhadas. Os sintomas incluem náusea, vômitos, fraqueza, dor de cabeça, tontura, dores abdominais e dificuldade de respirar, assim como flutuações na pressão sanguínea (Quandt *et al.*, 2000; Parikh *et al.*, 2005; Arcury *et al.*, 2008).

## **I.4 BIOMARCADORES PARA BIOMONITORAMENTO**

Para estudos de monitoramento populacional são usados marcadores biológicos, os biomarcadores. Este termo é usado para expressar uma medida específica de uma interação entre determinado sistema biológico com um agente genotóxico. Os biomarcadores são classificados em três categorias: (i) biomarcadores de exposição, (ii) biomarcadores de efeito, (iii) biomarcadores de suscetibilidade (Pastor *et al.*, 2003; Norppa, 2004).

### **I.4.1 Biomarcador de exposição – Ensaio Cometa**

O desequilíbrio nutricional pode induzir lesões no DNA, que podem ser detectadas através do ensaio cometa (Collins, 2004). Esse teste é muito utilizado para investigação do dano oxidativo em estudos de nutrientes, sendo uma importante ferramenta para a detecção precoce de danos no DNA servindo de auxílio à saúde preventiva (Wasson *et al.*, 2008).

Através da técnica do ensaio cometa é possível a avaliação de dano e de reparo do DNA em células proliferantes e não proliferantes em nível individual. Esse teste auxilia na detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção. Essa metodologia consiste na lise celular, relaxamento do DNA e eletroforese, sendo possível observar após coloração, os fragmentos de DNA provindos da quebra causada pelo agente xenobiótico, que, ao serem submetidos a eletroforese migram formando uma “cauda”. O ensaio cometa sob condições alcalinas é uma técnica eletroforética sensível, reprodutível, simples e rápida para a detecção da presença de quebras de fita única de DNA e de lesões em sítios álcali-sensíveis em células de mamífero *in vitro* e *in vivo* empregando-se amostras celulares extremamente pequenas (Danadevi *et al.*, 2003; Collins, 2004).

#### **I.4.2 Biomarcador de efeito - Teste do Micronúcleo e Aberrações Cromossômicas**

O teste dos micronúcleos é um sistema utilizado para determinar o dano potencial em células humanas por agentes químicos sendo, portanto, um bom modelo para a monitorização humana. Em estudos de biomonitoramento em humanos, o teste dos micronúcleos é bastante utilizado como biomarcador genotóxico de exposição e efeitos biológicos precoces, quer em cultura de linfócitos como em células epiteliais. Estas últimas têm a grande vantagem de facilmente serem colhidas da boca, nariz e bexiga, através de procedimentos não invasivos (Fenech, 2006; Kirsh-Volders, 2006).

Os micronúcleos que são formados por cromossomas inteiros, têm a sua origem em defeitos na maquinaria de segregação de cromossomas, tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha no fuso mitótico, cinetócoro ou outras entidades do aparato mitótico, dano em sub-estruturas cromossômicas, disrupção mecânica e hipometilação de DNA centromérico.

#### **I.4.3 Biomarcadores de Suscetibilidade**

Os biomarcadores de suscetibilidade indicam quais os fatores podem aumentar ou diminuir um risco individual no desenvolvimento da resposta do organismo decorrente da exposição aos agentes químicos ambientais (World Health Organization, 1993).

Portanto, Indica a maior ou menor sensibilidade do indivíduo expostos a substâncias químicas. Devido a variações na suscetibilidade biológica, os indivíduos podem apresentar respostas e assim produzir doses diferentes no sítio crítico mesmo expostos ao mesmo ambiente (World Health Organization, 1993; Akgür, 1999).

Hiper-susceptibilidade pode ser definida como a falta de capacidade de tolerar ou responder efetivamente a patógenos ou tóxicos exógenos além dos limites da variabilidade humana (Rudiger, 1999).

Um grupo de potenciais biomarcadores de suscetibilidade para uso em humanos expostos a compostos químicos é representado pela avaliação in vivo

de enzimas de metabolização (e dos genes que as codificam) envolvidas em reações de ativação ou detoxificação químicas e reparação de DNA, como em polimorfismos nos genes de reparo de DNA e genes de metabolização de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTM1* e outros) (Manno *et al.*, 2009).

## **II OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

A interação entre suscetibilidade genética, a nutrição, a exposição a xenobióticos e a relação destes fatores na instabilidade genômica, pode resultar em proteção ou não na saúde de populações expostas ocupacionalmente. Desse modo é importante a realização de estudos que determinam a importância de cada um destes fatores ou a combinação destes nos efeitos genotóxicos dos compostos presentes na folha do fumo e a alta exposição a agrotóxicos.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

1. Analisar os hábitos alimentares através de 3 recordatórios de 24 horas e índice de massa corporal (IMC).
2. Avaliar a quantidade ingerida de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e a relação com a instabilidade genômica.
3. Avaliar a relação entre o polimorfismo *C776T* com instabilidade genômica.
4. Investigar a relação entre o consumo de ácido fólico, vitaminas B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> com o polimorfismo *MTHFR* com a instabilidade genômica.

### **2.3 DELINEAMENTOS DO ESTUDO**

O estudo foi realizado numa amostra de trabalhadores do setor fumageiro do Rio Grande do Sul. Os testes avaliados previamente foram: Ensaio cometa, teste MN, Aberrações cromossômicas e estabelecimento de banco de DNA.

Estes testes foram realizados pelo grupo de pesquisa da Dra Kátia Kvitko, mais especificamente e fizeram parte da tese de doutoramento Dra. Fernanda Rabaioli da Silva.

Este trabalho foi uma proposta retrospectiva de uma amostra já coletada, para analisar o polimorfismo aqui proposto, avaliação antropométrica, questionário de dados e anamnese alimentar através de três recordatórios de 24 horas aplicado com intervalos de quatro meses, em diferentes dias da semana e relacionar com os dados obtidos anteriormente de instabilidade genômica (Anexo I e Anexo II).

### **III CASUÍSTICA**

#### **3.1 Critérios de Inclusão**

Foram incluídos indivíduos maiores de 18 anos, trabalhadores do setor fumageiro e que assinaram TCLE.

#### **3.2 Critérios de Exclusão**

Foram excluídos os indivíduos com idade inferior a 18 anos, que utilizassem suplemento vitamínico, apresentassem insuficiência renal crônica e psoríase.

### **IV ASPECTOS ÉTICOS**

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número de 2007835.

## **V PROCEDIMENTOS**

Foram convidados a participar da entrevista, os indivíduos localizados a partir do banco de dados do estudo do projeto dos fumicultores realizado pelo nosso grupo. O estudo seguiu conforme os os procedimentos:

- Localização dos indivíduos da amostra por telefone marcando hora;
- Orientação quanto aos objetivos do estudo;
- Assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido;
- Preenchimento do questionário com características sociodemográficas (Anexo 1);
- Preenchimentos do recordatório de 24 horas (Anexo 2).

Os questionários e avaliação antropométrica foram aplicados por entrevistadores treinados (nutricionistas e estudantes de nutrição) que se identificaram, descreveram os objetivos, informaram aos entrevistados quanto a natureza das perguntas e a duração da entrevista. O tempo médio de preenchimento foi de aproximadamente 45 minutos - variação de 30 a 90 minutos – na primeira entrevista dependendo da variabilidade da dieta habitual, faixa etária e motivação do participante e 20 minutos na segunda e terceira entrevista.

## **VI COLETA DE DADOS**

### **6.1 Questionários de dados**

Por meio da ficha de coleta de dados (Anexo 1) foram obtidas as seguintes variáveis: identificação, data de nascimento, idade, gênero, grau de escolaridade, tabagismo, presença de restrição alimentar, consumo de álcool e uso de medicamento.

### **6.2 Avaliações Antropométricas**

A avaliação antropométrica foi realizada por meio de aferição do peso e altura com balança eletrônica da marca Plena® com capacidade mínima de 1,25 quilogramas (kg) e máximo 150 quilogramas (kg), com sensibilidade 0,1 kg, em local firme e plano, zerada antes de cada pesagem com os pacientes sem calçados, usando roupas leves e sem portar objetos pesados. Os indivíduos foram orientados a estar em posição ortostática para aferição das medidas em estadiometro (Kamimura *et al.* 2002).



O estado nutricional foi determinado pelo Índice de Massa Corporal (IMC) obtido pela divisão do peso (quilogramas) pela estatura (metros) elevada ao quadrado [IMC= P (kg) / E<sup>2</sup> (m)] e classificado segundo critérios da Organização mundial da Saúde (WHO, 1995).

**Tabela 6** - Valores de referência para determinação do IMC – adultos.

<b>Estado Nutricional</b>	<b>IMC ( kg/m<sup>2</sup>)</b>
Desnutrição	< 18,49
Eutrófico	18,50-24,99
Sobrepeso ( pré obesidade)	25,00-29,99
Obesidade grau I	30,00-34,99
Obesidade grau II	35,00-39,99
Obesidade grau III	>40,00

Para os indivíduos acima de 60 anos os valores de referência serão os propostos pela OPAS (2001), dividido entre ambos os sexos:

**Tabela 7** - Valores de referência para determinação do IMC – idosos

<b>Estado Nutricional</b>	<b>IMC ( kg/m<sup>2</sup>)</b>
Baixo peso	< 23
Eutrófico	23-28
Sobrepeso	28-30
Obesidade	>30,00

### 6.3 Recordatório de 24 Horas – Método de Referência

Para a aplicação do Recordatório de 24 horas foi perguntado sobre todos os alimentos consumidos no dia anterior à entrevista, bem como a forma de preparo e quantidades em medidas caseiras, para cada entrevistado.

Para padronização e apoio na identificação das porções foram utilizados utensílios de medidas caseiras (Colher de servir, escumadeira, concha, colher de

sopa, colher de sobremesa, colher de chá, xícara de chá, “copo americano” e “copo de requeijão”, juntamente com algumas figuras do registro fotográfico para inquéritos dietéticos (Zaboto *et al.*, 1996) ( anexo3) .

Para a determinação da quantidade de consumo de alimentos-fonte de folato, vitamina B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub> foram utilizados 3 recordatórios de 24 horas com intervalos de quatro meses, em diferentes dias da semana (anexo II) e calculado em programa nutricional específico na qual foram levantados todos os alimentos e suas respectivas quantidades ingeridas no dia anterior a entrevista, e 1 QFCA semiquantitativo, não validado, no qual não pode ser utilizado para análise do estudo.

Os dados dos R24h foram convertidos em nutrientes por meio do programa Food Processor SQL 10.9 (ESHA Research, Salem, Oregon), que tem como principal base de dados a tabela norte-americana do United States Department of Agriculture. Alimentos brasileiros que não constavam no programa tiveram seu valor nutritivo inserido de acordo com informações nacionais. Dos vários parâmetros nutricionais, o presente estudo focar-se-à apenas em micronutrientes folato, B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub>. Todos os dados obtidos foram, posteriormente, comparados com as Ingestões dietéticas de referência (DRI) e com os limites máximos de ingestão toleráveis para os micronutrientes conhecidos (UL).

Para minimizar possíveis inferências errôneas a respeito da ingestão de nutrientes em virtude da média de poucos dias como estimativa da ingestão habitual, levando-se em consideração a elevada variabilidade do consumo, foi realizado o ajuste da distribuição do consumo pela variabilidade com utilização do software Multiple source method (MSM) (versão 1.0.1, 2011); disponibilizado pelo departamento de epidemiologia do instituto alemão de nutrição Humana Potsdam-Rehbrücke (DIfE). Este recurso produz uma estimativa empírica do consumo habitual de cada nutriente e utiliza-se a metodologia proposta por NUSSER *et al.* (1996). A interpretação dos resultados de adequação/ inadequação encontra-se na tabela 8.

**Tabela 8** Valores para a razão D/Dp e a probabilidade correspondente em concluir corretamente que a ingestão habitual está adequada ou inadequada.

Critério D/Dp	Conclusão	Probabilidade de concluir corretamente
> 2,00	Ingestão habitual adequada	0,98
>1,65	Ingestão habitual adequada	0,95
> 1,50	Ingestão habitual adequada	0,93
> 1,00	Ingestão habitual adequada	0,85
> 0,50	Ingestão habitual adequada	0,70
> 0,00	Ingestão habitual adequada/inadequada	0,50
< - 0,50	Ingestão habitual inadequada	0,70
< - 1,00	Ingestão habitual inadequada	0,85
< - 1,50	Ingestão habitual inadequada	0,93
< - 1,65	Ingestão habitual inadequada	0,95
< - 2,00	Ingestão habitual inadequada	0,98

Fonte: Adaptado de Snedecore e Cochran( 1980).

## VII ANÁLISE DOS DADOS

### 7.1 Análise de micronutrientes

A ingestão de micronutrientes (ácido fólico, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub>) foi avaliada conforme critério proposto pelas DRIs, pelo cálculo de adequação aparente do nutriente( tabela 2 ) adotando-se a formula abaixo:

$$Z = D/Dpd = \frac{y - EAR}{\sqrt{V_{nec} + (V_{int}/n)}}$$

Onde:

Y= a ingestão média dos micronutrientes obtidos através 3 recordatórios 24horas

EAR= mediana da necessidade do micronutriente de acordo com idade e sexo

V<sub>nec</sub>= variância das necessidades , que corresponde a 10% da EAR= 0,1 XEAR

V<sub>int</sub>= variância intrapessoal conforme idade e sexo. Obtida através da DP intrapessoal

A probabilidade correspondente em concluir corretamente que a ingestão habitual estava adequada ou inadequada foi interpretada (Isli Brasil, 2005).

## 7.2 Proporção de adequação dos micronutrientes

Foi realizada a proporção de adequação conforme tabela 8 e indivíduos com 50% de probabilidade de adequação ou inadequação foram excluídos da amostra.

**Tabela 9** Proporção de adequação dos micronutrientes ( folato, B<sub>12</sub> e B<sub>6</sub>)

Micronutriente	Indivíduos
<b>Folato</b>	
70 á 98 % de probabilidade de adequação	43 (39,09%)
50% de probabilidade de adequação/ inadequação	1 ( 0,9%)
70 á 93 % de probabilidade de inadequação	66 (60%)
<b>B<sub>12</sub></b>	
70 á 98 % de probabilidade de adequação	49 (44,5%)
50% de probabilidade de adequação/ inadequação	2 (1,2%)
70 á 93 % de probabilidade de inadequação	59 (53,64%)
<b>B<sub>6</sub></b>	
70 á 98 % de probabilidade de adequação	28 (25,45%)
50% de probabilidade de adequação/ inadequação	1 ( 0,9%)
70 á 93 % de probabilidade de inadequação	81 (73,63 %)

\*Critério de adequação para micronutrientes proposto pelas Dietary reference Intakes (Marchioni, Slater e Fisberg 2004).

Dos 113 entrevistados, 3 indivíduos foram excluídos por apresentar adequação dos micronutrientes com 50% de probabilidade e desses, 2 deles faziam uso de suplementos.

## ***CAPÍTULO II***

**INFLUENCE OF FOLATE, VITAMIN B12, B6 and *MTHFR* C677T  
POLYMORPHISM ON THE LEVELS OF DNA DAMAGE IN TOBACCO  
FARMERS**

Fernandes SP<sup>1</sup>; Silva FR<sup>1</sup>; Rohr P<sup>1</sup>; Bandinelli E<sup>1</sup>; da Silva J<sup>2</sup>; Mai C<sup>3</sup>; Brenner N<sup>3</sup>;  
Kvitko K<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of  
Rio Grande do Sul, RS, Brazil;

<sup>2</sup> Laboratory of Genetic Toxicology, Lutheran University of Brazil, RS, Brazil;

<sup>3</sup> School of Nutrition, University of Santa Cruz do Sul, RS, Brazil;

\*Correspondence to: Kátia Kvitko, Departamento de Genética e Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS, Brazil. E-mail: [katia.kvitko@ufrgs.br](mailto:katia.kvitko@ufrgs.br)

Article to be submitted to Nutrition Research

## **Abstract**

Genetic damage can occur spontaneously under normal metabolic circumstances and can also be present in situations of dietary deficiency or inadequate intake of nutrients and excessive exposure to environmental mutagens. The purpose of this study was to evaluate the influence of the intake of micronutrients B<sub>12</sub>, B<sub>6</sub> and folate and of polymorphism *MTHFR C677T* in the induction of DNA damage in individuals exposed to pesticides. The study involved 69 men and 41 women who were tobacco farmers in the region of Venâncio Aires (Rio Grande do Sul state, Brasil). DNA damage was analyzed by the Comet Test and Micronucleus Test (MN); dietary intake was evaluated based on the mean of three 24-hour Diet Recall questionnaires. The nutrient intake data were computerized and estimated in the *Food Processor SQL 10.9* program. The DNA damage results showed a significant increase in MN frequency in the lymphocytes of individuals who had an inadequate intake of folate and B<sub>12</sub> ( $p = 0.030$  and  $p = 0.014$ , respectively). No significant association was found between DNA damage and polymorphism *MTHFR C677T*. Correlations between DNA damage and polymorphism *MTHFR C677T* and nutrient intake were not significant. In conclusion, our results indicated that the adequate intake of folate and vitamin B<sub>12</sub> can provide protection from the mutagenic action of pesticides. A dietary adaptation of folate and B<sub>12</sub> can ensure adequate repair, showing that diet is a protective factor in this population.

**Keywords** Folate, DNA damage, polymorphism *MTHFR C677T*, tobacco farmers, occupational health, nutrition.

**Abbreviations:** personal protective equipment (PPE) micronucleus (MN), Body mass index (BMI), 24 h dietary recall(24hR), single-nucleotide polymorphism (SNP) Estimated Average Requirement (EAR).

## 1. Introduction

Nutrigenomics and nutrigenetics are recent research areas that seek to understand the effects of diet and food as genetic response modulators. The effects of deficiency and the imbalance of certain nutrients, as well as the toxic concentrations of some dietary compounds have been the subject of nutritional research. To understand these effects, based on research regarding interventions and the use of biomarkers, gene function and expression have been explored in studies with different diets [1, 2, 3, 4].

The role of micronutrients in maintaining genomic stability has been the subject of many studies. The genomic damage caused by moderate micronutrient deficiency is studied on the same order of magnitude as the levels of genomic damage caused by exposure to high doses of environmental toxins [5, 6, 7, 8].

Folate and other B-complex vitamins perform key functions in the biological processes that are important to health. They maintain genome stability by regulating DNA synthesis, repair and methylation. Dark green vegetables, cereals, fruit, seeds and animal meat contribute to folate intake [9]. Besides dietary intake, the levels of folate in the organism are influenced by dietary supplementation, and by the variation of genes related to folate metabolism enzymes [10, 11, 12, 13].



Folate deficiency is associated with increased breaks in DNA, chromosomal aberrations and micronuclei (MN) formation in human lymphocytes. However, there are contradictions as to whether these markers are present due to individual genetic susceptibility or to inadequate consumption of these micronutrients and/or their cofactors [14, 15, 16].

The MN analysis in peripheral blood lymphocytes (PBL) is one of the best methods to measure genomic instability in humans [17, 18, 19]. It is the most valid and the one most commonly used in toxicological studies to investigate the effects of age, gender, lifestyle factors, environmental exposure to toxins and nutritional imbalance [20, 21, 22, 23]. In vivo studies in humans showed that the frequency of MN in PBL is associated significantly with inadequate levels of consumption or low plasma concentrations of folate, vitamin B<sub>12</sub>, riboflavin, biotin, beta-carotene, vitamin E, retinol and calcium [24, 25].

The methylenetetrahydrofolate reductase enzyme, encoded by gene *MTHFR*, converts 5,10-methylene-THF into 5-methyl-THF, generating the methyl groups that will be used for DNA methylation and nucleotide synthesis. Individuals who are homozygous for the *T* allele and heterozygous individuals present a reduction of 70% and 35%, respectively, of the activity of enzyme MTHFR, compared to homozygous *CC* genotype [26].

Individuals with genotypes involved in enzyme activity present a significant increase in the levels of homocysteine and diminished levels of folate compared to heterozygous and homozygous individuals. Hyperhomocysteinemia has been identified as a major risk factor in several non-degenerative chronic diseases [27, 28, 29, 30, 31].

Kimura *et al* (2004) showed that there is a significant association between polymorphism *MTHFR C677T*, folic acid and the riboflavin co-factor with genomic instability [32]. This relation is demonstrated by: (a) reduction of nuclear buds in *TT* individuals compared to *CC* for *MTHFR C677T* and (b) the observation that high concentrations of riboflavin increase the frequency of nuclear buds under conditions of low concentrations of folate (12 nm- folic acid), probably due to the increased activity of MTHFR, deviation of folate on the pathway of dTTP synthesis and increased incorporation of uracyl to the DNA, chromosome breaks and subsequent amplification of the gene and formation of nuclear buds [33,34].

Exposure to pesticides and to other chemical compounds used in agriculture is acknowledged as toxic to human health. The effects of short or long term exposure can be mild or severe [35]. The quantity and frequency of application of pesticides to protect plants against insects and diseases can cause poisoning, skin diseases, irritations of the skin and eyes, as well as nervous and respiratory system problems and kidney damage [36, 37]. Some studies have shown the genotoxic effects of the pesticides using the Comet Assay and the MN test on exposed populations [38, 39, 40].

Tobacco farmers are routinely exposed to a complex mixture of organic and inorganic pesticides, and also to the compounds present in the tobacco leaf. The penetration of these mixtures, including dust and liquids containing toxic and carcinogenic substances, occurs via various pathways of exposure, such as inhalation and dermal absorption [41, 42].

Therefore it is important to evaluate the levels of environmental exposure considering the effects of inadequate intake of micronutrients in the diet

in populations that are occupationally exposed. The purpose of our study was to evaluate the influence of an adequate intake of micronutrients folate, vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub>, and the participation of polymorphism *MTHFR C677T* in association with the incidence of DNA damages in a population exposed occupationally to pesticides.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Subjects**

We evaluated 110 individuals of both genders, living in the city of Venâncio Aires, center-south region of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The individuals participated voluntarily and they could drop out of the study at any time. The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), and a letter of consent was obtained from all participants.

### **2.2 Anthropometric Measurement and Questionnaires and Assessment of Vitamin Intake**

The following variables were obtained using the data collection form: identification, age, gender, smoking, dietary restrictions, alcohol consumption and use of medications. In addition, dietary consumption was obtained using questionnaires. The nutritional status was determined by Body Mass Index (BMI) obtained by dividing weight (kilograms) by height (meters), squared [BMI= P (kg) / E<sup>2</sup> (m)] and classified according to the criteria of the World Health Organization for adults and the elderly [43]. Three 24 h dietary recall (R24h) were used at four-month intervals, on different days of the week to determine consumption of food-

sources of folate, vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub>. The R24h data were converted into nutrients using the Food Processor SQL 10.9 (ESHA Research, Salem, Oregon) program, whose main data base is the North American table of the United States Department of Agriculture. The nutritional value of Brazilian foods that were not in the program was included according to Brazilian information. Of the several nutritional parameters, the present study focused only on micronutrients folate, B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub>, and the mean of the 3 recalls calculated was considered the daily intake of each individual. To standardize and support the identification of the portions, domestic measuring utensils were used (serving spoon, skimmer, ladle, soup spoon, dessert spoon, tea spoon, cup of coffee, "American glass"), together with some figures from the photographic record for dietary enquiries. Adequate folate consumption according to Estimated Average Requirement (EAR) was the values of  $\geq 320$  ( $\mu\text{g}$  /day) and B<sub>12</sub> of 2.0 ( $\mu\text{g}$  /day) for adults >19 years [44].

### 2.3 Sample collection

The blood samples were drawn by venipuncture using vacutainers with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Polymorphism *C677T MTHFR* was detected using the PCR-RFLP method described by Frosst *et al* [45].

### 2.4 MN test: cytokinesis-blocked human lymphocyte micronucleus

MN frequency was analyzed using the cytokinesis-block method with Giemsa staining. MN was scored among 1000 binucleated lymphocyte cells according to the published criteria [46].

### 2.5 Buccal micronucleus cytome assay (BMNCyt assay)

For each individual, the frequency of cell types in the assay is represented by a total number of 2,000 cells as suggested by Thomas *et al.* (2009) [47].

### 2.6 Comet assay

Comet assay was performed as described by Singh *et al* [48] with the modifications suggested by Tice *et al* [49]. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed for the same person using bright-field optical microscopy.

### 2.7 Statistical methods

The mean significance of MN frequency, adequation of folate intake, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> and polymorphism *MTHFR* was estimated using the Kruskal-Wallis test. The Exact Fisher's Test was used to calculate the Hardy-Weinberg equilibrium, using the INSTAT software program. All statistical analyses were calculated using program SPSS 15.0 and the level of significance considered were the P values below 0.05.

## 3. Results

Analyses included 110 individuals (69 men and 41 women) with a mean age of  $42.3 \pm 13.32$  years ( $\pm$ standard deviation). The reported time of exposure was  $30.34 \pm 15.35$  years ( $\pm$ standard deviation). The demographic characteristics of this population are shown in table 1.

The relations between DNA damage and adequate dietary intake of micronutrients folate, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> are shown in table 2. The results of the analyses showed increased frequency of MN in lymphocytes and inadequate consumption of folate and B<sub>12</sub>, (P = 0.030 and P = 0.014 respectively). The DNA damage (MN frequency, Comet assay) did not show significant results related to age, gender (Figure1) smoking habit, years of exposure and BMI (data not shown). No significant associations were found between DNA damage (according to the tests used) and polymorphism *MTHFR C677T* (table 3).

The correlation between DNA damage and polymorphism of *MTHFR* genes with adequate intake of folate de folate, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> did not show significant results (data not shown).

The genotypic distribution of polymorphism *MTHFR C677T* among the tobacco farmers was 36.4%(CC), 45.5%(CT) and 18.2%(TT). The allelic frequency was T=0.41. Genotypic distribution was consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium ( $P_{HWE} = 0.53$ ).

#### **4. Discussion**

The relation between nutrition, xenobiotics and genetics is complex and may affect similar biological paths. Interindividual differences in the ability to activate and detoxify substances and repair damage to DNA may explain the individual susceptibility to DNA damage after exposure to xenobiotics [50, 51]. Therefore the evaluation of human exposure, associated with the analyses of effects on biomarkers of exposure, effect and susceptibility in exposed individuals allows preventing or diminishing the interaction of chemical substances with the

human organism. Nutrition is a factor that can modulate the toxicity of pollutants, but these can cause modifications in the metabolic activity of the nutritional factors [52, 53, 54].

In previous studies with this same sample/population, results showed that these farmers were exposed to mixture of substances with genotoxic and cytotoxic potential. Our group of research demonstrated nuclear anomalies in cells of these tobacco farmers exposed to a mixture of substances both during pesticide application and leaf harvest, probably due to the nicotine exposure [46]. Thus, previous results considering this sample showed that the period of occupational risk is continuous over the season for these farmers [46,55].

In this present study we try to explore the relation between genetics and nutrition, in order to contribute to the identification of factors important for the occupational health of these exposed workers. In our findings we observed a difference between the consumption of micronutrients folate, B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> and their adequation to current dietary recommendations in population studies for age and gender [56]. The adequacy of consuming portions of various food groups as related to recommendations for age and gender observed in this study appears to reflect the eating pattern of this population group, ie. in the rural area of Venâncio Aires- RS.

Data from the study of the *Third National Health and Nutrition Examination Survey -NHANES III* – indicated that 50% of the American populations have a folate intake lower than the daily recommended intake [57]. In women in our survey, the mean found was 352.8µg/day, less than described by Ferreira *et al* 2005 (404.7 µg/day) when they evaluated the consumption of folate

in women of reproductive age in the city of Porto Alegre – southern Brazil. The scarcity of data and the variations in the methodology and cutoff points found in the literature make it difficult to compare data referring to the frequency of women whose folate intake approaches or moves away from the values proposed by the Dietary Reference Intakes (DRIs) [55, 58].

Beetstra *et al* (2005) showed that folic acid deficiency increases chromosomal instability [13]. Vitamin B<sub>12</sub> is a major co-factor in folate metabolism, and all clinical manifestations resulting from the inadequate intake of this vitamin may give rise to changes in DNA. Folic acid is an essential component to prevent chromosome breaks and hypomethylation of DNA, therefore the chromosome repair mechanism may also be compromised when the vitamin B<sub>12</sub> concentration is low [59]. Tuimala *et al*, (2004) demonstrated that the repair of DNA and genes of the folate metabolism like *MTHFR*, influence MN formation [60].

Studies on intervention in humans showed that the hypomethylation of DNA, chromosome breaks, the incorporation of uracyl and formation of micronuclei are minimized when the folate concentration in the red cells are greater than 700 nmol/L and the formation of micronuclei is minimized when the plasma concentration of vitamin B<sub>12</sub> is greater than 300 pmol/L and lower than 7.5 µmol/L. These concentrations are measured at intake levels equal to or higher than DRIs, where folate has a greater intake than 320 µg/day and vitamin B<sub>12</sub> greater than 2 µg/day, depending on an individual's capacity to absorb and metabolize these vitamins and their genetic and epigenetic differences [61]. In our study, individuals with a folic acid and vitamin B<sub>12</sub> deficiency presented a significant increase in the formation of lymphocyte micronuclei, compared to



individuals with an adequate folate intake, indicating that adequate levels of folate and B<sub>12</sub> protect from the mutagenic action of pesticides. A diet with both adequate folate and Vitamin B<sub>12</sub> could help to perform an adequate repair. In vivo studies demonstrated that vitamin B<sub>12</sub> deficiency and high levels of homocysteine are strongly correlated with the increased formation of micronuclei [62].

Some results show the importance of adjusting the diet for protection against DNA damage in populations exposed to pesticides. In vitro studies suggest that folate deficiency increases the DNA damage levels, and thus increases the genotoxicity of chemical agents. Others point out that some polymorphisms in the genes that encode metabolizing enzymes of xenobiotics, DNA repair, or folate metabolism are associated with a higher risk of cancer, depending on exposure to carcinogens, type of tumor and ethnicity [63, 64].

Some studies discuss the metabolic importance of gene *MTHFR* C677T and its impact on the required folate intake, showing that the need for this micronutrient may vary in mutant homozygous individuals (TT) compared to heterozygous (CT) and wild homozygous (CC) [14, 65, 66, 67, 68].

The genotypic distribution of gene *MTHFR* and the allelic frequency of the sample of tobacco farmers, compared to the other Brazilian populations, is similar to the frequencies in the populations of Rio Grande do Sul and São Paulo. Comparing these populations to the others, they are seen to be more closely identified with European populations, probably because these states were settled mainly by Europeans [69].

In our study we did not observe an association between polymorphism *MTHFR* and the results obtained by the Comet assay and the MN

tests in binucleate lymphocytes, corroborating Crott *et al*, 2001 and Smolkova *et al*, 2004 who showed that MTHFR 677C>T does not influence the MN frequency [22,70].

As to time of exposure, we did not find a correlation with any parameter such as age, gender or polymorphism evaluated in our work. Our result was similar to that observed by Paiva *et al* (2011) where the levels of DNA damage, stratified by times of exposure, were not different among individuals in the rural communities [71,72].

Age and gender are the other confounding factors, which may possibly modulate the level of DNA damage. Fenech and Bonassi (2011) say that the damage to DNA increases because of age, probably to due to the combination of several factors: inadequate nutrition, occupational or environmental exposure to genotoxins, as well as a wide variety of unhealthy lifestyle factors [73]. Some studies found a significant correlation between age and the amount of DNA damage [24]. In our sample there was no significant difference in these parameters.

We did not find significant differences between men and women as regard establishing adequate mean consumption and DNA damage. However, when we compare the mean consumption of folate by women with the mean consumption by men, our results indicate that women consume more folate than men. When we compare the frequency of micronuclei in men and women, higher values are noted in men [46], differently from previous studies [73, 74, 75]. This issue was discussed in a previous study, where it is related to the division of labor itself, in which men apply pesticides [46].

Alcoholism is associated with significantly reduced levels of folate, vitamin B<sub>12</sub> and vitamin B<sub>6</sub> in human beings and the promotion of DNA lymphocyte hypomethylation; in our study, 40% of individuals drink alcoholic beverages, and about 84% of these consumed moderately or little, which is a level lower than 3.0g/kg/d of alcohol, suggesting that there was no interference from this association [59].

Folate and vitamin B<sub>12</sub> are important micronutrients to prevent DNA damage, but the genetic polymorphisms of genes involved in their uptake, transport and metabolism are also important. *MTHFR C677T* is one of the polymorphisms involved, but other polymorphisms such as *MTHFR A1298T*, *MTR A2756G*, *MTR (RS-1805087)*, *MTRR (RS-1801394)*, and *SHMT (RS-1979277)*, have also already been described as influential in the metabolic individual response to the use of folate and vitamin B<sub>12</sub> [76].

The fact that the enquiries were completed by nutritionists also favored greater clarity in the records due to the detailed information collected on food consumed, such as how the food is prepared and the ingredients used. Supporting material, such as photographs and home measuring utensils, also proved useful, giving the participants the same measure of consumption as reference for the different moments of application, which helped standardize the data. Considering the results of this study, an association was identified between inadequate consumption of folate and genomic instability in human lymphocytes, showing diet to be a protective factor in an exposed population.

## **Acknowledgements**

The authors thank the farmers who participated in this study, the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Funding for this project was provided by the Brazilian Research Agency (CNPq), Conselho Nacional para o Desenvolvimento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

There are no conflicts of interests.

## **References**

- [1] Elliott R, Ong TJ. Nutritional genomics. *BMJ* 2002; 324(7351):1438-1442.
- [2] Ames BN. Low micronutrient intake may accelerate the degenerative diseases of aging through allocation of scarce micronutrients by triage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 17589–17594.
- [3] Ballard T, et al. Green tobacco sickness: occupational nicotine poisoning in tobacco workers. *Archives of Environmental Health* 1995; 50:384–389.
- [4] Arcury TA, et al. High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farm workers. *Nicotine & Tobacco Research* 2003; 5:315–321.
- [5] The Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators. Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 2006; 354:1567-77.
- [6] Dangour AD, Whithouse PJ, Rafferty K, Mitchell SA, Smith L, Hawkesworth S, et al. B-vitamins and fatty acids in the prevention and treatment of

- Alzheimer's disease and dementia: a systematic review. *J Alzheimer's Dis* 2010; 22:205-24.
- [7] Wald DS, Kasturiratne A, Simmonds M. Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive disorders: meta-analysis of randomized trials. *Am J Med* 2010; 123: 522-527.
- [8] Kym YI. Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51:267-92.
- [9] Chen J, Gammon MD, Chan W, Palomeque C, Wetmur JG, Kabat GC, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Neugut AI, Santella RM: One-carbon metabolism, MTHFR polymorphisms, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65:1606-14.
- [10] Fenske R. Pesticide exposure assessment of workers and their families. *Occup Med: State Art Rev* 1997; 12:221–237.
- [11] Fenech, M. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am. J. Clin. Nutr* 2010; 91: 1438S–1454S.
- [12] Ames, BN and Wakimoto, P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 694--704.
- [13] Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J and Fenech M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutat Res* 2005; 578: 317–326.
- [14] Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JAE, et al. Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular

- disease, cancer, and cause-specific mortality. *Arch Intern Med* 2010; 170:1622-31.
- [15] Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 2007; 369:1876-82.
- [16] Fenech M. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutr. Res. Rev* 2003; 16: 109--122.
- [17] Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P and Fenech M. MTHFR C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* 2004; 134: 48–56.
- [18] Blount BC, Mack MM, WehrCM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, EversonRB, Ames BN. Folate deficiency causes uracilmisincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997; 94: 3290–3295.
- [19] Fenech, M and Rinaldi, J. The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B<sub>12</sub> and folic acid. *Carcinogenesis* 1994; 15:1405–1411.
- [20] Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch- Volders, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006; 88: 1515–1531.
- [21] Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi, S. The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of

the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res* 1999; 16: 271–283.

- [22] Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN, Fenech M. The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 1089–1096.
- [23] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc* 2007; 2:1084–1104.
- [24] Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat. Res.* 1985; 148:29–36.
- [25] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101 (Suppl. 3):101–107.
- [26] Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP. The effect of 6767C→T and 1298 A→C mutations on plasma homocysteine and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 2000; 83:593-596.
- [27] Cox C. Chlorpyrifos Factsheet, Part 2. *Journal of Pesticide Reform.* 1995.
- [28] Coppola G, Ingrosso D, Operto FF, Signoriello G, Lattanzio F, Barone E, Matera S, Verrotti A. Role of folic acid depletion on homocysteine serum level in children and adolescents with epilepsy and different MTHFR C677T genotypes. *Seizure.* 2012

- [29] Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, Youhanna S, Abchee AB, Stewart K, Badro DA, Haber M, Salloum AK, Douaihy B, El Bayeh H, Othman R, Shasha N, Kibbani S, Chammas E, Milane A, Nemr R, Kamatani Y, Hager J, Cazier JB, Gauguier D, Zalloua PA; FGENTCARD Consortium. Genetic and environmental influences on total plasma homocysteine and its role in coronary artery disease risk. *Atherosclerosis*. 2012
- [30] Nachum-Biala Y, Troen AM. B-vitamins for neuroprotection: Narrowing the evidence gap. *Biofactors*. 2012.
- [31] Brambila-Tapia AJ, Durán-González J, Sandoval-Ramírez L, Mena JP, Salazar-Páramo M, Gámez-Nava JI, González-López L, Lazalde-Medina B B, Dávalos NO, Peralta-Leal V, Del Mercado MV, Beltrán-Miranda CP, Dávalos IP. MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Dis Markers* 2012; 32(2):109-14.
- [32] Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. MTHFR C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* 2004; 134: 48–56.
- [33] Eussen SJPM, Vollset SE, Inghand J, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, *et al.* Plasma folate, related genetic variants and colorectal cancer risk in EPIC. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1328-40.
- [34] Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ, Blom HJ. A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to



- MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. *J Mol Med (Berl)*. 2001 9:522-8.
- [35] Ames BN, Wakimoto P. Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat Rev Cancer* 2002 ;2: 694– 704.
- [36] Fenech M, Ferguson LR. Micronutrients and genomic stability. *Mutat Res* 2001; 475: 1–183.
- [37] Fenech M. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutr Res Rev* 2003; 16: 109–122.
- [38] Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology*, 2001;165: 153-62.
- [39] Paiva JC, Cabral IO, Soares BM, Sombra CM, Ferreira, JR, Moraes MO, Cavalcanti, BC, Pessoa C. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen* 2011.
- [40] Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 2011; 26:19-26.
- [41] Gnagnarella P, Salvini S, Parpinel M (2008) Food Composition Database for Epidemiological Studies in Italy, version 1. <http://www.ieo.it/bda> (accessed December 2011).
- [42] Fox JT, Stover PJ. Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 2008; 79: 1-44.

- [43] World Health Organization. Report of WHO Consultation in Obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 1998.
- [44] Bailey LB. Folate and vitamin B12 recommended intakes and status in the United States. *Nutr Rev.* 2004; 62: 14-20.
- [45] Frosst P, Blom HJ, Milos R, *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111 – 3.
- [46] Da Silva, FR., da Silva, J., Allgayer, MC., Simon, CF., Dias JF., Santos CEI., Salvador, M., Branco, C., Schneider, NB., Kahl, V., Rohr, P., Kvitko, K . Genotoxic biomonitoring of tobacco farmers: Biomarkers of exposure, of early biological effects and of susceptibility. *J of Hazardous Materials* 2012; 225– 226 : 81– 90
- [47] Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009; 4(6):825-37.
- [48] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1):184-91.
- [49] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson, B., Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206-21.

- [50] Hennig B, Ettinger A S, Jandacek R J, Koo S, McClain C, Seifried H, Silverstone A, Watkins B, Suk WA. Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environ. Health Perspect.* 2007;115: 493–495.
- [51] Bolognesi C, Creus A, Ostrosky-Wegman P, Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 2011; 26: 19-26.
- [52] Zhao XJ, Li C, Paez JG, Chin K., Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C, Gray JW, Sellers WR, Meyerson M. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004; 64: 3060–3071.
- [53] Kussmann M, Daniel H. Editorial overview. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008; 19, 63–65.
- [54] Kussmann M, Fay LB. Nutrigenomics and personalized nutrition: science and concept. *Per. Med.* 2008; 5, 447–455.
- [55] Da Silva, FR., da Silva, J., Nunes M., Benedetti D., Kahl, V., Rohr, P., Abreu M., Thiesen FV., Kvitko, K. Application of the Buccal Micronucleus Cytome Assay and Analysis of PON1Gln192Arg and CYP2A6\*9(248T>G) Polymorphisms in Tobacco Farmers. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2012: DOI 10.1002/em.21713
- [56] Institute of medicine (IOM). Dietary reference Intakes: applications in dietary assessment. Washington, DC: National Academy Press. 2000.
- [57] Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study

- population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 2000;28:117-45.
- [58] Ferreira AF, Giugliani R. Consumption of folic acid-fortified flour and folate-rich foods among women at reproductive age in South Brazil. *Community Genet.* 2008;11(3):179-184.
- [59] Swanson DA, Liu MJ, Baker PJ, Garrett L, Stitzel M, Wu J, Harris M, Banerjee R, Shane B, Brody LC Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol Cell Biol* 2001; 21:1058–1065.
- [60] Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Järventaus H, Hirvonen A, Gundy S, Norppa H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 2004; 554(1-2):319-33. Erratum in: *Mutat Res.* 2005 1;570(2):303.
- [61] Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res.* 2011.
- [62] Fenech M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res.* 2001; 457:57-67.
- [63] McIlwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 2006;25: 1639–1648.
- [64] Agúndez JA. Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr. Drug Metab.*, 2008; 9, 520–531.

- [65] Bailey LB, Gregory JF 3<sup>rd</sup>. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 1999; 129(5):919-22.
- [66] Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G. Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? *BMJ* 2005; 331: 1053.
- [67] The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 2011; 43: 339–344.
- [68] Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* 2011; 378: 584–594.
- [69] Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal riskfactors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009; 149: 2080-7.
- [70] Smolkova B, Dusinska M, Raslova K, Barancokova M, Kazimirova A, Horska A, Spustova V, Collins A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. *Mutagenesis* 2004; 19: 469–476.
- [71] Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antonio Pegas Henriques J, Kvitko K. BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and

XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 2011; 52(1):20-7.

[72] Paiva JC, Cabral IO, Soares BM, Sombra CM, Ferreira JR, Moraes MO, Cavalcanti BC, Pessoa C. Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen* 2011.

[73] Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2011; 26: 43-49.

[74] Rozgaj R, Kasuba V, Jazbec A. Preliminary study of cytogenetic damage in personnel exposed to anesthetic gases. *Mutagenesis*. 2001; 16(2):139-43.

[75] Milic M, Kasuba V, Orescanin V et al. Chromosome damage in workers in cigarette manufacturing industry. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 399-404.

[76] Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR, El-Zein RA. Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(1):1-12.

Table 1. Characteristics of the studied population with respect to BMI, PPE utilization, smoking, alcohol and medicine intake

<b>Parameters</b>	<b>N° of subjects ( %)</b>
<b>BMI</b>	
Underweight = <18.5	01 (0.9)
Normal weight = 18.5–24.9	42 (38.2)
Overweight = 25–29.9	51 (46.4)
Obesity (Class 1) = 30 –34.99	15 (13.6)
Obesity (Class 2)= 35 – 39.99	01 (0.9)
<b>PPE</b>	
Do Not	30 (27.3)
Yes	36 (32.7)
Some	27 (24.5)
<b>Medication</b>	
No medication	87 (79.1)
Antihypertensive drugs	04 (3.6)
Antibiotics	01 (0.9)
Tranquilizing drugs	06 (5.5)
Muscle relaxant drugs	05 (4.5)
Other	04 (3.6)
<b>Smoking</b>	
Never smoked	69 (62.7)
Have stopped smoked	38 (34.5)
Current smoking	08 (7.27)
<b>Ingestion of alcohol</b>	
Yes	44 (40)
Not	63 (57.3)
<b>Frequency alcohol</b>	
Little < 1.0 g/kg/d	09 (20.4)
Moderately >1.0 g/kg/d < 3.0 g/kg/d	28 (63.6)
Heavy > 3.0 g/kg/d	07 (15.9)

Table 2. Distribution of adequacy / inadequacy of folate, B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> according to DNA Damage.

DNA Damage	Folate Consumption		B <sub>12</sub> Consumption		B <sub>6</sub> Consumption	
	intake Inadequate / adequate	p	intake Inadequate / adequate	p	intake Inadequate / adequate	p
	mean±standard deviation (n)		mean±standard deviation (n)		mean±standard deviation(n)	
Damage frequency	13.08±10.65 (38) / 11.05 ± 7.91(64)	0.572	12.09± 9.70 (46) / 11.57 ± 8.52(56)	0.968	11.95± 8.10 (25) / 11.36 ± 9.36 (77)	0.944
Damage index	19.50±17.56 (38) / 16.34 ± 12.09(64)	0.561	17.57± 5.67 (56) / 17.48 ± 13.35(56)	0.788	17.76±11.85 (25) / 17.44 ±15.17 (77)	0.559
MN lymphocytes	11.25±4,85 (36) / 9.05 ± 4.04(57)	*0.029	10.96± 4.60 (46) / 8.87 ± 4.15(47)	*0.014	9.56± 4.24 (25) / 10.03 ± 4.59 (68)	0.741
MN mucosa	7.97± 5.63 (34) / 7.66 ± 4.42(58)	0.709	7.95± 5.41 (41) / 7.63 ± 4.46(51)	0.768	9.13± 5.21 (24) / 7.29 ± 4.70 (68)	0.096

n= number of individuals, independent ;non-parametric Wilcoxon Test for related samples; \* = statistically significant



Table 3. Distribution of polymorphism *MTHFR C677T* the according to DNA Damage.

<b>MTHFR</b>	<b>Damage frequency (n)</b>	<b>p</b>	<b>Damage index (n)</b>	<b>p</b>	<b>MN lymphocytes (n)</b>	<b>p</b>	<b>MN mucosa (n)</b>	<b>p</b>
<i>CC</i>	12.37± 8.48 (40)		18.25±13.50 (40)		10.58±5.37 (38)		8.38±5.18 (32)	
<i>CT</i>	11.66±9.16 (44)	0,531	17.77±15.55 (44)	0,557	9.35±3.56 (40)	0,660	6.91±4.30 (43)	0.366
<i>TT</i>	10.89±10.26 (18)		15.28±13.83 (18)		9.67±4.27 (15)		8.82±5,56 (17)	

non-parametric Wilcoxon Test for related samples.

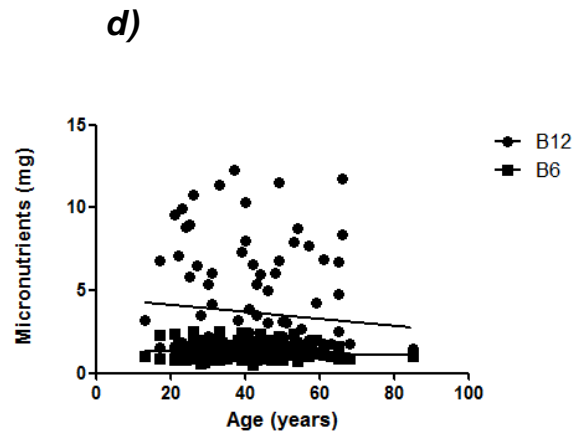
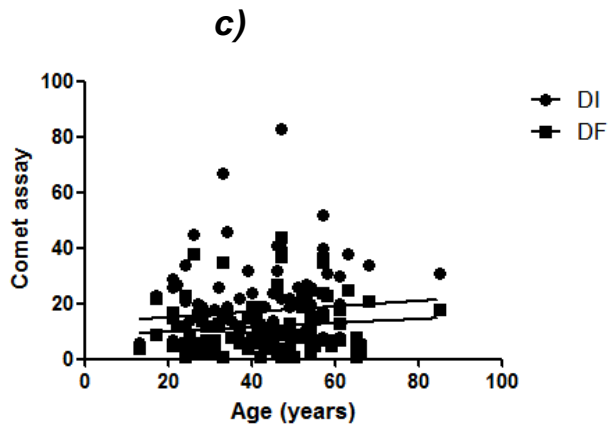
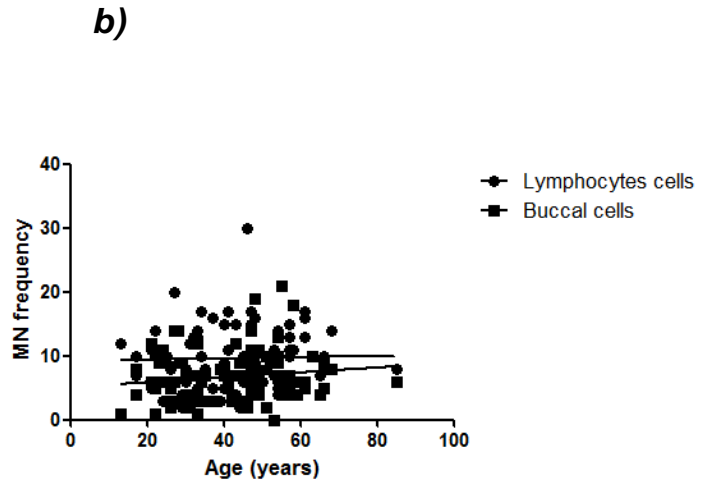
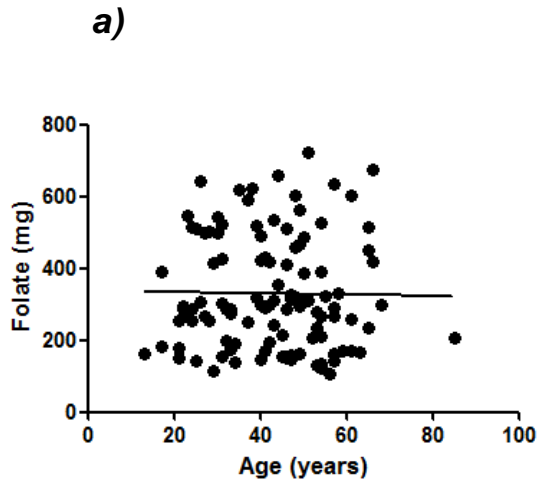


Figure 1: **a)** Correlation of the Folate intake Mean with age (years);  
**b)** correlation of MN frequency with age (Spearman'test).  
**c)** Correlation of the comet assay with age (Spearman'test).  
**d)** Correlation of the B<sub>12</sub> and B<sub>6</sub> intake Mean with age (years).

### ***CAPÍTULO III***

### III.1 DISCUSSÃO

A dieta representa um fator ambiental importante na saúde humana e por isso, as pesquisas em nutrição contemporânea centram no entendimento dos componentes alimentares e a sua interação com o genoma. Para isso, são considerados, atualmente os estudos com Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). (Zhao *et al.*, 2004 ; Kussmann e Daniel, 2008 ; Kussmann e Fay, 2008).

No contexto clínico e preventivo, as bases genéticas associadas com alterações metabólicas podem modificar o risco para doenças crônicas se coincidirem com deficiência de micronutrientes. Além disso, um mecanismo sinérgico ou antagônico pode existir entre as deficiências de nutrientes essenciais e exposição a agentes tóxicos ambientais (Hennig *et al.*, 2004; Hennig *et al.*, 2007).

A relação entre a nutrição, xenobióticos e genética é complexa, e pode afetar semelhantes caminhos biológicos, além disso, as diferenças interindividuais na habilidade de ativar e detoxificar substâncias e de reparar dano ao DNA podem explicar a suscetibilidade diferencial à exposição de pesticidas (Bolognesi *et al.*, 2011). Por isso a avaliação da exposição humana, associada aos conhecimentos relativos aos efeitos em biomarcadores de exposição, de efeito e de suscetibilidade em indivíduos expostos, permite prevenir ou amenizar a interação das substâncias químicas com o organismo humano, visto que a nutrição pode modular a toxicidade de poluentes e os mesmos podem causar modificações na atividade metabólica dos fatores nutricionais (Hennig *et al.*, 2004). Os indivíduos analisados no estudo eram fumicultores, todos expostos a pesticidas e, em trabalho anterior, (Da Silva *et al.*, in prep) a exposição a estes agentes mostrou efeitos genotóxicos com aumento de MN e danos do DNA pelo ensaio cometa. No presente estudo tentou-se explorar a relação entre genética e nutrição, a fim de contribuir na identificação da importância destes fatores na saúde ocupacional de trabalhadores expostos.

Em nossos achados observamos diferença entre o consumo de micronutrientes folato, B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> e a adequação deste às recomendações dietéticas vigentes para a idade e sexo (de acordo com o que *Food and Nutrition*

*Board/Institute of Medicine* (IOM) preconizado para DRIs). A adequação do consumo das porções de diversos grupos alimentares em relação às recomendações para a idade e gênero observado no presente trabalho parece refletir o padrão alimentar deste grupo populacional, ou seja, da região rural de Venâncio Aires-RS.

Os dados do estudo do *Third National Health and Nutrition Examination Survey -NHANES III* - indicaram que 50% da população americana têm ingestão de folato bem abaixo da ingestão diária recomendada (Selhub et al, 1999). Nas mulheres de nossa pesquisa, a média encontrada foi 352,8µg/dia, inferior ao descrito por Ferreira *et al.* (404,7 µg/dia) ao avaliar o consumo de folato em mulheres em idade reprodutiva da cidade de Porto Alegre – sul do Brasil. Dietrich *et al.* (2005), utilizando dados do *NHANES*, conduzidos durante 1988-1994 e 1999-2000, mencionaram que o consumo de folato na população americana, pós-fortificação, era de 294±12,6 µg/dia e 302 ± 15,8 µg/dia em mulheres de 20-39 anos e 40-59 anos, respectivamente. A escassez de dados e as variações na metodologia e pontos de cortes encontrados na literatura dificultaram a comparação de dados referentes à frequência de mulheres cuja ingestão de folato se aproxima ou afasta-se dos valores propostos pelas DRIs.

Beetstra *et al* (2005) mostraram que a deficiência de ácido fólico aumenta a instabilidade cromossômica. A vitamina B<sub>12</sub> é um co-fator importante no metabolismo do folato e as manifestações clínicas decorrentes da deficiência desta vitamina podem dar origem a alterações no DNA. O ácido fólico é um componente fundamental na prevenção de rupturas cromossômicas e hipometilação do DNA, portanto o mecanismo de reparo cromossômico também pode estar comprometido quando a concentração de vitamina B<sub>12</sub> é baixa (Swanson *et al.*, 2001). Tuimala *et al* (2004) demonstraram que o reparo de DNA e genes do metabolismo do folato (*MTHFR*) influenciam na formação de Micronúcleos (MN). Estudos de intervenção em humanos mostram que hipometilação de DNA, as quebras cromossômicas, a incorporação de uracil e formação de micronúcleos são minimizadas quando a concentração de folato das células vermelhas é maior do que 700 nmol / L e a formação de micronúcleos é minimizado quando a concentração plasmática de vitamina B<sub>12</sub> é maior de 300

pmol / L e menor que 7,5  $\mu$ mol / L. Estas concentrações são medidas em níveis de ingestão iguais ou superiores a DRIs onde folato representa ingestão maior que 320  $\mu$ g / dia e vitamina B<sub>12</sub> maior que 2  $\mu$ g / dia, dependendo da capacidade de um indivíduo em absorver e metabolizar estas vitaminas e as suas diferenças genéticas e epigenéticas (Fenech, 2011). Em nosso estudo, indivíduos com deficiência de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> apresentaram significativo aumento na formação de micronúcleos de linfócitos em relação aos indivíduos com ingestão adequada de folato, indicando que níveis adequados de folato e de B<sub>12</sub> protegem da ação mutagênica dos pesticidas.

A dieta adequada, tanto em folato quanto em vitamina B<sub>12</sub> poderia estar auxiliando em um reparo adequado. Entretanto, uma vez que esta população tem exposição contínua, não é suficiente para não ter danos comparado com uma amostra sem exposição (Da Silva *et al.*, in prep), mas é possível um nível de proteção observado pela dieta.

Estudos in vivo demonstraram que a deficiência de vitamina B<sub>12</sub> e elevados níveis de homocisteína têm forte correlação com o aumento da formação de micronúcleos (Fenech, 2001). Estudos in vitro sugerem que a deficiência de folato aumenta os níveis de danos no DNA e pode aumentar a genotoxicidade de agentes químicos, outros apontam que alguns polimorfismos nos genes que codificam enzimas metabolizantes de xenobióticos, reparação do DNA ou o metabolismo de folato são associados com maior risco de cancer, dependendo da exposição agentes cancerígenos, tipo de tumor e etnia (McIlwain *et al.*, 2006; Agúndez, 2008).

Algum estudo de coorte tem indicado que um nível elevado de danos cromossomais de linfócitos está associada com maior risco de câncer independentemente da exposição ocupacional a cancerígenos ou ser tabagista. Além da exposição detectada, o nível elevado de danos cromossomais de linfócitos pode sugerir um papel para fatores de susceptibilidade individual (Norppa *et al.*, 2006 ; Musak L *et al.*, 2008 ).

Vários estudos discutem a importância metabólica do gene *MTHFR C677T* e seu impacto sobre a exigência de ingestão de folato, mostrando que a necessidade deste micronutriente pode variar em indivíduos homocigotos

mutantes (TT) em relação aos heterozigotos (CT) ou aos homozigotos selvagens (CC). (Bailey e Gregory, 1999; Lewis, Ebrahim e Davey 2005; Clarke *et al.*, 2010; Peden *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2011 ). Em nosso trabalho não observamos associação entre o polimorfismo *MTHFR* e os resultados obtidos pelo ensaio Cometa e pelo teste de MN em linfócitos binucleados corroborando com Crott *et al.*, 2001 e Smolkova *et al.*, 2004 que mostraram que *MTHFR* 677C>T não influencia a frequência de MN (Crott *et al.*, 2001; Smolkova *et al.*, 2004).

A distribuição genotípica do gene *MTHFR* e a frequência alélica, quando comparadas às outras populações brasileiras, as frequências genotípicas e alélicas do SNP *MTHFR*C677T da amostra de fumicultores assemelham-se às frequências das populações do Rio Grande do Sul e de São Paulo. Comparando essas populações às demais, vê-se que têm maior identidade com as populações européias, provavelmente devido à colonização desses estados, que ocorreu com prevalência de europeus (Brandalize *et al.*, 2009).

Em relação ao tempo de exposição, não encontramos correlação com nenhum parâmetro como idade, gênero ou polimorfismo avaliado em nossos trabalhos. Nosso resultado foi similar ao observado por Paiva *et al.* (2011) onde os níveis de dano ao DNA, estratificado por tempo de exposição, não foi diferente entre os indivíduos das comunidades rurais.

Idade e gênero são os outros fatores de confusão, o que possivelmente modulam o nível de danos no DNA. Fenech e Bonassi (2011) afirmam que o dano ao DNA aumenta em decorrência da idade, provavelmente devido à combinação de vários fatores: a nutrição inadequada, a exposição ocupacional ou ambiental a genotoxinas, bem como a uma ampla variedade de fatores de estilo de vida não saudáveis. Estudos encontraram uma correlação significativa entre a idade e o nível de danos no DNA (Fenech e Morley 1986; Migliore *et al.*, 1991) . Em nossa amostra não houve diferença significativa nesses parâmetros ( Figura 1).

Não encontramos diferenças significativas entre homens e mulheres em relação adequação de consumo, média de consumo e dano DNA (dados não mostrados). No entanto, quando observamos a média de consumo de folato entre as mulheres com a média de consumo dos homens, nossos resultados indicam que o gênero feminino apresenta um maior consumo de folato quando comparado

com o consumo dos homens. Quando comparamos a frequência de micronúcleos em homens e mulheres notam-se valores mais elevados em homens (Da Silva *et al.*, in prep) . Diferenciando de achados de estudos anteriores (Rozgaj *et al.*, 2001 ; Milic *et al.*, 2008 ; Fenech e Bonassi, 2011). Esta questão foi abordada em trabalho anterior, onde está relacionado com a própria divisão do trabalho onde os homens seriam os responsáveis pela aplicação do pesticida (Da Silva *et al.*, in prep) . O alcoolismo está associado com níveis significativamente reduzidos de folato, vitamina B<sub>12</sub> e vitamina B<sub>6</sub> nos seres humanos e promoção de hipometilação do DNA de linfócitos; em nosso estudo 40% dos indivíduos ingerem bebida alcoólica e destes, cerca de 84% apresentaram consumo moderado ou pouco na ingestão, o que representa um nível menor que 3,0 g / kg / d de álcool, não sugerindo interferência dessa associação (Fenech, 2011). O folato e a vitamina B<sub>12</sub> são micronutrientes importantes para a prevenção de danos ao DNA, mas, os polimorfismos genéticos de genes envolvidos na sua captação, transporte e metabolismo também tem importância. O *MTHFR C677T* é um dos polimorfismos envolvidos, no entanto, outros polimorfismos como *MTHFR A1298T*, *MTR A2756G*, *MTR* (RS-1805087), *MTRR* (RS-1801394), and *SHMT* (RS-1979277), também já foram descritos como influentes na resposta individual da resposta metabólica da utilização de folato e vitamina B<sub>12</sub> (Piskac-Collier *et al.*, 2011).

O preenchimento dos inquéritos por nutricionistas também favoreceu maior clareza nos registros devido ao detalhamento nas informações colhidas sobre o consumo alimentar, como modo de preparo dos alimentos e utilização de ingredientes em receitas. O uso de material de apoio, como fotografias e utensílios de medidas caseiras, também se mostrou útil, fazendo com o que os participantes pudessem ter como referência a mesma medida de consumo para os diferentes momentos da aplicação, o que contribuiu para a padronização dos dados. Devido à instabilidade no consumo alimentar que o R24h apresenta, o ajuste pela variabilidade intrapessoal foi adotado com intuito de atenuar o erro pela correção da distribuição do consumo. Considerando estas limitações, os resultados deste estudo identificou associação entre consumo inadequado de



folato e instabilidade genômica em linfócitos humanos. Mostrando a dieta como fator de proteção em população exposta.

## ***CAPÍTULO IV***

## IV.1 REFERÊNCIAS

- Afman L and Müller M (2006) Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. *J Am Diet Assoc* 106:569-76.
- Agostinetto D, Puchalski LEA, Azevedo R, Storch G, Bezerra AJA and Grützmacher AD (2000) Caracterização da Fumicultura no Município de Pelotas-RS. *Rev. Bras. de Agrociência* 6 (2): 171-175.
- Agúndez, J.A. (2008) Polymorphisms of human N-acetyltransferases and cancer risk. *Curr. Drug Metab.* 9: 520–531.
- Akgür AS (1999) Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in humans exposed to organophosphorous compounds. *J Toxicol Environ Health A* 58: 469-74.
- Ames BN and Wakimoto P (2002) Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat Rev Cancer* 2: 694– 704.
- Ames BN (2006) Low micronutrient intake may accelerate the degenerative diseases of aging through allocation of scarce micronutrients by triage. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17589–17594.
- Andreassi MG, Botto N, Cocci F, Battaglia D, Antonioli E, Masetti S, Manfredi S, Colombo MG, Biagini A and Clerico A (2003) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease. *Hum Genet* 112:171-177.
- Arcury TA, Quandt SA, Preisser JS, Bernert JT, Norton D and Wang J (2003) High levels of transdermal nicotine exposure produce green tobacco sickness in Latino farm workers. *Nicotine Tob Res* 5: 315-321.
- Associação dos Fumicultores do Brasil (Afubra), <http://www.afubra.com.br>, (August, 2005).
- Bailey LB and Gregory JF 3rd (1999) Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance risks and impact on folate requirement. *J Nutr* 129(5):919-922.

- Ballard T, Ehlers J, Freund E, Auslander M, Brandt V and Halperin W (1995) Green tobacco sickness: occupational nicotine poisoning in tobacco workers. *Archives of Environmental Health* 50:384–389.
- Barr SI, Murphy SP and Poos MI (2002) Interpreting and using the dietary reference intakes in dietary assessment of individual and groups. *J Am Diet Assoc* 102:780-788.
- Beaton GH (1994) Approaches to analysis of dietary data.relationship between planned analyses and choice of methodology. *Am J Clin Nutr* 59:253-261.
- Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J and Fenech M (2005) Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutat Res* 578: 317–326.
- Bingham AS (1987) The dietary assessment of individuals; methods, accuracy, new techniques and recommendations. *Nutr Abstr Rev.* 57(10):705-742.
- Blount B.C., Mack M.M., Wehr C.M., MacGregor J.T., Hiatt, G.Wang R.A., Wickramasinghe S.N, Everson R.B and Ames B.N (1997) Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 : 3290–3295.
- Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegman P and Marcos R (2011) Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26: 19-26.
- Botto N, Andreassi MG, Manfredi S, Masetti S, Cocci F, Colombo MG, Storti S, Rizza A and Biagini A (2003) Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage. *Eur. J. Hum. Genet.* 11:671–678.
- Brambila-Tapia AJ, Durán-González J, Sandoval-Ramírez L, Mena JP, Salazar-Páramo M, Gámez-Nava JI, González-López L, Lazalde-Medina B B, Dávalos NO, Peralta-Leal V, Del Mercado MV, Beltrán-Miranda CP and Dávalos IP( 2012) MTHFR C677T, MTHFR A1298C, and OPG A163G polymorphisms in Mexican patients with rheumatoid arthritis and osteoporosis. *Dis Markers* 32(2): 109-114.
- Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária [site na internet]. Farinha terá ácido fólico para combater anencefalia em bebês.

- Brasília: ANVISA; 2002. [citado: 2006 jul 23]. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2002>.
- Brasil, Ministério da Saúde (2005) Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável. Referencial teórico - Deficiências nutricionais. Brasília: Ministério da Saúde p. 20.
- Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L (2009) Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal riskfactors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 149: 2080-7.
- Cade J, Thompson R, Burley V and Warm D (2002) Development and utilization of food- frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr* 5:567-87.
- Carpenter KJ (2003) A short of Nutritional Science: Part 4 (1945-1985). *J. Nutr* 133: 3331-3342.
- Chait A, Malinow MR, Nevin DN, Morris CD, Eastgard RL, Kris-Etherton P, Pi-Sunyer FX, Oparil S, Resnick LM, Stern JS, Haynes RB, Hatton DC, Metz JA, Clark S, McMahon M, Holcomb S, Reusser ME, Snyder GW and McCarron DA (1999) Increased dietary micronutrients decrease serum homocysteine concentrations in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr* 70:881-887.
- Chango A, Boisson F, Barbé F, Quilliot D, Droesch S, Pfister M, Fillon-Emery N, Lambert D, Frémont S, Rosenblatt DS, Nicolas JP (2000). The effect of 6767C→T and 1298 A→C mutations on plasma homocysteine and 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase activity in healthy subjects. *Br J Nutr* 83:593-596.
- Chen J, Gammon MD, Chan W, Palomeque C, Wetmur JG, Kabat GC, Teitelbaum SL, Britton JA, Terry MB, Neugut AI and Santella RM (2005) One-carbon metabolism, MTHFR polymorphisms, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 65:1606-1614.
- Choi SW and Mason JB (2000) Folate and carcinogenesis: an integrated scheme. *J Nutr* 130(2):129-132.
- Clarke R, Halsey J, Lewington S, Lonn E, Armitage J, Manson JE, Bonna KH, Spence JD, Nygård O, Jamison R, Gaziano JM, Guarino P, Bennett D, Mir

- F, Peto R and Collins R (2010) Effects of lowering homocysteine levels with B vitamins on cardiovascular disease, cancer, and cause-specific mortality. *Arch Intern Med* 170:1622-1631.
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* 26: 249-261.
- Coppola G, Ingrosso D, Operto FF, Signoriello G, Lattanzio F, Barone E, Matera S and Verrotti A (2012) Role of folic acid depletion on homocysteine serum level in children and adolescents with epilepsy and different MTHFR C677T genotypes. *Seizure*.
- Cox C (1992) 1,3 – Dichloropropene. *Journal of Pesticide Reform*.
- Cox C (1995) Chlorpyrifos Factsheet, Part 2. *Journal of Pesticide Reform*.
- Cozzolino SMF (2005) Biodisponibilidade de micronutrientes. Sao Paulo: MANOLE, 878p.
- Cravo M, Fidalgo P, Pereira AD, Gouveia- Oliveira A, Chaves P, Selhub J, Mason JB, Mira FC and Leitao CN (1994) DNA methylation as an intermediate biomarker of colorectal cancer: modulation by folic acid supplementation. *Eur J Cancer Prev* 3(6):473-479.
- Crott J, Thomas P and Fenech M (2001) Normal human lymphocytes exhibit a wide range of methionine-dependency which is related to altered cell division but not micronucleus frequency. *Mutagenesis* 16: 317–322.
- Crott JW, Mashiyama ST, Ames BN and Fenech M (2001) The effect of folic acid deficiency and MTHFR C677T polymorphism on chromosome damage in human lymphocytes in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 1089–1096.
- Cuppari L (2002) Guia de nutrição: Nutrição clínica no adulto. São Paulo: Manole.
- Da Silva, FR., Kvitko, K, Rohr, P., Abreu, M.B., Thiesen, V.F and da Silva, J, in preparation. Occupational risk in tobacco farmers: genotoxic assessment at different crop times.
- Danadevi K, Rozati R, Banu BS, Rao PH and Grover P (2003) DNA damage in workers exposed to lead using comet assay. *Toxicology* 187: 183-193.
- Dangour AD, Whitehouse PJ, Rafferty K, Mitchell SA, Smith L, Hawkesworth S, Vellas B (2010) B-vitamins and fatty acids in the prevention and treatment

- of Alzheimer's disease and dementia: a systematic review. *J Alzheimer's Dis* 22:205-224.
- DeBusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM and Kornman KS (2005) Nutritional genomics in practice: where do we begin? *J Am Diet Assoc.* 105(4):589–598.
- Duthie SJ (2010) Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis* .
- Elliott R and Ong TJ (2002) Nutritional genomics. *BMJ* 324(7351):1438-1442.
- Eussen SJ, Vollset SE, Igland J, Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM, Jenab M, Slimani N, Boffetta P, Overvad K, Tjønneland A, Olsen A, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Morois S, Weikert C, Pischon T, Linseisen J, Kaaks R, Trichopoulos A, Zilis D, Katsoulis M, Palli D, Berrino F, Vineis P, Tumino R, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, van Duijnhoven FJ, Gram IT, Skeie G, Lund E, González CA, Martínez C, Dorronsoro M, Ardanaz E, Navarro C, Rodríguez L, Van Guelpen B, Palmqvist R, Manjer J, Ericson U, Bingham S, Khaw KT, Norat T and Riboli E (2010) Plasma folate, related genetic variants and colorectal cancer risk in EPIC. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:1328-1340.
- Falk JW, Carvalho LA, Silva LR e Pinheiro S (1996) Suicídio e doença mental em Venâncio Aires - RS: consequência do uso de agrotóxicos organofosforados? <http://galileu.globo.com/edic/133/agro2.doc>
- Fenech M and Ferguson LR (2001) Micronutrients and genomic stability. *Mutat Res* 475: 1–183.
- Fenech M (2001) The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 475:57– 67.
- Fenech M (2003) Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutr Res Rev* 16: 109–122.
- Fenech M (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 600(1-2):58-66.

- Fenech M (2008) Genome health nutrigenomics and nutrigenetics – diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1365-1370.
- Fenech M (2010) Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention – current status and a road map to the future. *Am. J. Clin. Nutr* 91: 1438-1454.
- Fenech M, Aitken C and Rinaldi J (1998) Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage young Australian adults. *Carcinogenesis* 19: 1163-1171.
- Fenech M, Dreosti IE and Rinaldi JR (1997) Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 18: 1329–1336.
- Fenech M and Morley AA (1985). Measurement of micronuclei in human lymphocytes, *Mutat. Res* 148: 29–36.
- Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect* 101 (Suppl. 3): 101–107.
- Fenech, M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc* 2: 1084–1104.
- Fenech, M and Rinaldi, J (1994) The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis* 15: 1405–1411.
- Fenech, M (2010) Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am. J. Clin. Nutr* 91: 1438S–1454S.
- Fenech, M and Bonassi, S (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 26: 43-49.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. and Bonassi, S (1999) The HUman MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res* 16: 271–283.

- Fenech, M. (2003) Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. *Nutr. Res. Rev* 16: 109--122.
- Fenech M (2011) Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res.*
- Fenske R (1997) Pesticide exposure assessment of workers and their families. *Occup Med: State Art Rev* 12:221–237.
- Ferreira AF, Giugliani R. Consumption of folic acid-fortified flour and folate-rich foods among women at reproductive age in South Brazil. *Community Genet.* 2008;11(3):179-184.
- Ferro-Luzzi A (2002) Individual food intake survey methods. In: Proceedings of International Scientific Symposium on Measurement and Assessment of Food Deprivation and Undernutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations 101-125.
- Fisberg RM, Colucci ACA, Morimoto JM and Marchioni DML (2008) Food frequency questionnaire for adults from a population-based study. *Rev Saude Publica* 42(3): 550-554.
- Fisberg RM, Martini LA and Slater B (2005). Métodos de Inquéritos alimentares. In: Fisberg RM, Slater B, Marchioni DML, Martini LA, editores. *Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos.* São Paulo: Manole; p.1-31.
- Fisberg RM e Slater B (2002) Manual de receitas e medidas caseiras para cálculo de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus.
- Fox JT and Stover PJ (2008) Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 79: 1-44.
- Franceschi S, Parpinel M, La Vecchia C, Favero A, Talamini R and Negri E (1998) Role of different types of vegetables and fruit in the prevention of cancer of the colon, rectum and breast. *Epidemiology* 9(3): 338-341.
- Franco G (2001) Tabela de composição de alimentos. 9ª Ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- Franke SIR, Boeira JM, Erdtmann B and Henriques JAP (2003) Genotoxicidade de Agentes Sintéticos e Naturais. In: Da Silva J, Erdtmann B & Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*, Editora Alcance. 307 – 321.



- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al (1993) A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10:111 – 113.
- Garaj-Vrhovac V and Zeljezic D (2001) Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165: 153-62.
- Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, Youhanna S, Abchee AB, Stewart K, Badro DA, Haber M, Salloum AK, Douaihy B, El Bayeh H, Othman R, Shasha N, Kibbani S, Chammas E, Milane A, Nemr R, Kamatani Y, Hager J, Cazier JB, Gauguier D and Zalloua PAFGENTCARD Consortium (2012) Genetic and environmental influences on total plasma homocysteine and its role in coronary artery disease risk. *Atherosclerosis*.
- Gnagnarella P, Salvini S and Parpinel M (2008) Food Composition Database for Epidemiological Studies in Italy, version 1. <http://www.ieo.it/bda> (accessed april 2012).
- Godard B and Ozdemir V (2008) Nutrigenomics and personalized diet: from molecule to intervention and nutri-ethics. *OMICS*: 12:227-228.
- Goode EL, Ulrich CM and Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 11: 1513–1530.
- Grillo E and Silva RJM (2003) Defeitos de tubo neural e hidrocefalia congênita: porque conhecer as suas prevalências? *J Pediatr* 79:105-106.
- Grilo and CM (2002) Recent research of relationships among eating disorders and personality disorders. *Curr. Psychiatry Rep* 4:18–24.
- Hennig B., Ettinger AS., Jandacek RJ., Koo S, McClain C, Seifried H, Silverstone A., Watkins B and Suk WA (2007). Using nutrition for intervention and prevention against environmental chemical toxicity and associated diseases. *Environ. Health Perspect.* 115: 493–495.
- Hennig B., Toborek M., Bachas LG and Suk WA (2004) Emerging issues: nutritional awareness in environmental toxicology. *J. Nutr. Biochem* 15: 194–195.

- Holmes MV, Newcombe P, Hubacek JA, Sofat R, Ricketts SL, et al. (2011) et al. Effect modification by population dietary folate on the association between MTHFR genotype, homocysteine, and stroke risk: a meta-analysis of genetic studies and randomised trials. *Lancet* 378: 584–594.
- Hu H, Kotha S and Brennan T (1995) The role of nutrition in mitigating environmental insults: policy and ethical issues. *Environ Health Perspect* 103(suppl 106):185-90.
- Institute of medicine (2000) Dietary reference Intakes: applications in dietary assessment. Washington,DC: National Academy Press. 306p.
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF and Rosenberg IH (1999) The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 340:1449-54.
- Kamimura MA, Baxmann A, Sampaio LR e Cuppari L (2002). Nutrição - nutrição clínica no adulto. In: Cuppari L, editor. Guias de medicina ambulatorial e hospitalar UNIFESP/Escola Paulista de Medicina. Barueri: Manole; 2002. p.71-109.
- Kaput J (2004) Diet-disease gene interactions. *Nutrition* 20(1):26-31.
- Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P and Fenech M (2004) MTHFR C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr* 134: 48–56.
- Kirsch-Volders M, Mateuca RA, Roelants M, Tremp A, Zeiger E, Bonassi S, Holland N, Chang WP, Aka PV, Deboeck M, Godderis L, Haufroid V, Ishikawa H, Laffon B, Marcos R, Migliore L, Norppa H, Teixeira JP, Zijno A and Fenech M (2006) The effects of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on micronucleus frequencies in human lymphocytes in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(5):1038-1042.
- Klee GG (2000) cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate. *Clin Chem* 46.
- Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Harréus UA, Licht A-K and Richter E (2005) The Tobacco Alkaloid Nicotine Demonstrates Genotoxicity in Human Tonsillar Tissue and Lymphocytes. *Toxicol Sci* 86(2): 309-317.

- Krishnaswamy, K.. and Nayr, K. M (2001). Importance of folate in human nutrition. Br. J. Nutr 85 (suppl 2):115-124.
- Kussmann, M and Daniel, H. (2008). Editorial overview. Curr. Opin. Biotechnol 19: 63–65.
- Kussmann, M and Fay, LB (2008). Nutrigenomics and personalized nutrition: science and concept. Per. Med. 5: 447–455.
- Kym YI (2007) Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review. Mol Nutr Food Res 51:267-92.
- Lee WN and Go VL (2005) Nutrient-gene interaction: tracer-based metabolomics. J Nutr 135:3027S-3032S.
- Lewis SJ, Ebrahim S, Davey Smith G (2005) Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocysteine and preventive potential of folate? BMJ 331: 1053.
- Li Y and Tollefsbol TO (2010) Impact on DNA Methylation in Cancer Prevention and Therapy by Bioactive Dietary Components. Curr Med Chem 17: 2141-2151.
- Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, Trijbels FJ and Blom HJ (2001) A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk. J Mol Med (Berl) 79(9):522-528.
- Lima HT, Saunders C e Ramalho A (2002). Ingestão dietética de folato em gestantes do município do Rio de Janeiro. Rev Bras Saúde Matern Infant 2:303-311.
- Lima JA, Catharino RR e Godoy HT (2003). Folatos em vegetais: importância, efeito do processamento e biodisponibilidade. Alim. Nutr 14(1):123-129.
- Liu K, Stamler J, Dyer A, Mckeever J and Mckeever P(1978). Statistical methods to assess and minimize the role of intra-individual variability in obscuring the relationship between dietary lipids and serum cholesterol. J Chron Dis 31:399-418.

- Lonn E, Yusuf S, Arnold MJ, Sheridan P, Pogue J, Micks M, McQueen MJ, Probstfield J, Fodor G, Held C, Genest J Jr and Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) 2 Investigators (2006) Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease. *N Engl J Med* 354(15):1567-77..Erratum in: *N Engl J Med*. 2006 17;355(7):746.
- Lumley J, Watson L, Watson M and Bower C (1998) Periconceptual supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library* 4.
- Mafra, D e Cozzolino, SMF (2009) Ácido fólico. In: COZZOLINO, S.M.F. *Biodisponibilidade de nutrientes*. 3 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2009, v. 1, p. 436-45.
- Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, Gluckman RA, Block PC, Upson BM. (1998). Reduction of plasma homocysteine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 338:1009-1015.
- Maluf SW and Erdtmann B (2003) Biomonitoramento do Dano Genético em Humanos. In: Da Silva J, Erdtmann B e Henriques JAP (eds) *Genética Toxicológica*. Editora Alcance. p 307 – 321.
- Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L, Mutti A, Nordberg M and Wang S (2010) Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). *Toxicol Lett* 192(1):3-16.
- Marcos R (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*.
- Margetts BM, Pietinen P (1997) European prospective investigation into cancer and nutrition: validity studies on dietary assessment methods. *Int J Epidemiol* 26:s1-5.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P. V., Decordier, I. and Kirsch- Volders, M. (2006) Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 88: 1515–1531.
- Mcllwain CC, Townsend DM and Tew KD (2006) Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. *Oncogene* 25: 1639–1648.

- Migliore L, Parrini M, Sbrana I, Biagini C, Battaglia A and Loprieno N (1991) Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutat Res* 256(1):13-20.
- Milic M, Kasuba V, Orescanin V et al (2008) Chromosome damage in workers in cigarette manufacturing industry. *J Appl Toxicol* 28: 399-404.
- Nachum-Biala Y and Troen AM( 2012) B-vitamins for neuroprotection: Narrowing the evidence gap. *Biofactors*.
- National Research Council (1989). Recommended dietary allowances, 10<sup>th</sup> ed, Washington, DC: National Academy Press.
- NIOSH Agricultural Health and Safety Center News (1996) Southeast Center Studies Ways to Prevent Green Tobacco Sickness, <http://www.cdc.gov/niosh/nora/symp06/pdfs>.
- Norppa H (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett* 149(1-3):309-334.
- Nusser SM, Carriquiry AL, Dood KW and Fuller WA (1996) A semiparametric transformation approach to estimating usual daily intake distributions. *J Am Stat Assoc* 91:1440-1449.
- OPAS - Organização Pan-americana. XXXVI Reunión del Comitê Asesor de Investigaciones em Salud – Encuesta Multicêntrica – Salud Beinestar y Envejecimeiento (SABE) em América Latina e el Caribe – Informe premilinar.2001.Avaliablefrom:<URL:<http://www.paho.org/Spanish/HDP/HD R/CAIS-01-05.PDF>> [2012 jan 12).
- Ordovas JM and Corella D (2004) Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:71-118.
- Paiva, J.C., Cabral, I.O., Soares, B.M., Sombra, C.M., Ferreira, J.R., Moraes, M.O., Cavalcanti, B.C. and Pessoa, C. (2011) Biomonitoring of rural workers exposed to a complex mixture of pesticides in the municipalities of Tiangua and Ubajara (Ceara state, Brazil): Genotoxic and cytogenetic studies. *Environ Mol Mutagen*.
- Pandey P, McGowen RM, Vogel EW and Butterworth FM (1995) Genotoxicity of polychlorinated biphenyl (PCB) and polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures in the white/white+ eye-mosaic assay. In: Butterworth BE,

- Corkum LD and Guzmán-Rincón J (eds) *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Plenum Press, New York, pp 183 – 191.
- Paoloni- Giacobino A, Grimbale R and Pichard C (2003) Genomic interactions with disease and nutrition. *Clinical Nutrition* 22(6):507–514.
- Pastor S, Creus A, Parrón T, Cebulska-Wasilewska A, Siffel C, Piperakis S and Marcos R (2003) Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*. 18(3):249-258.
- The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium (2011) A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43: 339–344.
- Philippi , Sonia Tucunduva (2008) *Pirâmide dos Alimentos: Fundamentos básicos da nutrição*. 1 ed. Barueri, São Paulo: Manole,. 387p.
- Phillips CM, Tierney AC and Roche HM (2008) Gene Nutrient Interactions in the Metabolic Syndrome. *J Nutrigenet Nutrigenomics* 1: 136-151.
- Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecry EH (2008) *Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras*. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu.
- Piskac-Collier AL, Monroy C, Lopez MS, Cortes A, Etzel CJ, Greisinger AJ, Spitz MR and El-Zein RA ( 2011) Variants in folate pathway genes as modulators of genetic instability and lung cancer risk. *Genes Chromosomes Cancer*. 50(1):1-12.
- Raqib R and Cravioto A (2009) Nutrition, immunology, and genetics: future perspectives. *Nutr Rev* 67: 227-236.
- Rohr P, da Silva J, Erdtmann B, Saffi J, Guecheva TN, Antonio Pegas Henriques J and Kvitko K (2011) BER gene polymorphisms (OGG1 Ser326Cys and XRCC1 Arg194Trp) and modulation of DNA damage due to pesticides exposure. *Environ Mol Mutagen* 52(1):20-27.
- Rozgaj R, Kasuba V and Jazbec A (2001) Preliminary study of cytogenetic damage in personnel exposed to anesthetic gases. *Mutagenesis*. 16(2):139 143.

- Rüdiger HW (1999) Biomonitoring in occupational medicine. In: Marquart H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F. Toxicology. San Diego: Academic Press; p.1027-39.
- Sassen AW, Richter E, Semmler MP, Harréus UA, Gamarra F and Kleinsasser NH (2005) Genotoxicity of Nicotine in Mini-Organ Cultures of Human Upper Aerodigestive Tract Epithelia. *Toxicol Sci* 88(1): 134-141.
- Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* 19:217-246.
- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PWF and Rosenberg IH (2000) . Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 28:117-145.
- Sempos CT, Looker AC, Johnson CL and Woteki CE(1991) The importance of withing –person variability in estimating prevalence. *In: Monitoring Dietary Intakes*. New York: Springer-Verlag; p.99-109.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184-91.
- Smolkova B, Dusinska M, Raslova K, Barancokova M, Kazimirova A, Horska A, Spustova V and Collins A (2004) Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. *Mutagenesis* 19: 469–476.
- Subbiah MT (2007) Nutrigenetics and nutraceuticals: the next wave riding on personalized medicine. *OMICS* 149:55-61.
- Sutandyo N (2010) Nutritional carcinogenesis. *Acta Med Indones* 42:36-42.
- Swanson DA, Liu MJ, Baker PJ, Garrett L, Stitzel M, Wu J, Harris M, Banerjee R, Shane B and Brody LC (2001) Targeted disruption of the methionine synthase gene in mice. *Mol Cell Biol* 21:1058–1065.
- Tarasuk V and Beaton GH (1992) Statistical estimation of dietary parameters: implications of patterns in within-subject variation: a case study of sampling strategies. *Am J Clin Nutr.* 55(1):22-27.
- Thier R, Bruning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y and Bolt HM (2003) Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and

- toxicology: the role of selected CYP,NAT and GST genes, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 149–171.
- Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S and Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 4(6):825-837.
- Thompson FE and Byers T (1994) Dietary assesment resource manual. *J Nutr* 124:2245s-317.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221.
- Trujillo E, Davis C and Milner J (2006) Nutrigenômica, proteômica, metabolômica, ea prática da dietética. *J Am Diet Assoc* 106:403-413.
- Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Jarventaus H, Hirvonen A, Gundy S and Norppa H (2004) Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations,*Mutat. Res* 554: 319–333.
- US Department of Agriculture, Agricultural Research Service [site na internet]. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 11. Nutrient Data Laboratory HomePage, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>.
- Van der Put NM, Van Straaten HW, Trijbels FJ and Blom HJ (2001). Folate, Homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp. Biol. Med.* 226(3):243-270.
- Wald DS, Kasturiratne A and Simmonds M (2010) Effect of folic acid, with or without other B vitamins, on cognitive disorders: meta-analysis of randomized trials. *Am J Med* 123: 522-527.
- Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y, Sun N, Liu L, Xu X ( 2007) Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *Lancet* 369:1876-1882.
- Wasson GR,McKelvey-Martin VJ and Downes CS (2008) The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis* 23: 153-62.
- WHO (1995) Physical status: use and interpretation of anthrometry. Geneva.



- Willet WC (1998). Nutritional epidemiology. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1998. 514p.
- Willett W and Lenart E (1998) Reproducibility and validity of food-frequency questionnaire In: Willet WC, editor. Nutritional epidemiology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 1998. p.101-147.
- Willett WC (1995) Diet, nutrition and avoidable cancer. Environ Health Perspect 103:165-170.
- World Health Organization – International Programme on Chemical Safety (IPCS) – Environmental Health Criteria 155 (1993) Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Geneva
- World Health Organization. Report of WHO Consultation in Obesity. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 1998.
- Zaboto CB, Viana RPT and Gil MF (1996). Registro fotográfico para inquéritos dietéticos: utensílios e porções. Campinas: UNICAMP; 1996.
- Zhao, X. J., Li, C., Paez, J. G., Chin, K., Janne, P. A., Chen, T. H., Girard, L., Minna, J., Christiani, D., Leo, C., Gray, J. W., Sellers, W. R., and Meyerson, M. (2004). An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. Cancer Res. 64: 3060–3071.

## ***CAPÍTULO V***

## V ANEXOS

### 5.1 Anexo 1 Questionário dados gerais

#### Dados Gerais

ID. \_\_\_\_\_

Data de Nascimento:

Sexo:

Anos de estudo:

Horários de atividade trabalho :

Fumo: ( ) sim ( ) não se sim, qual o numero de cigarros dia: \_\_\_\_\_

Ex fumante ( ) sim ( ) não fumante ocasional ( ) sim ( ) não

Uso medicamento:

Qual?

( ) vitaminas e suplementos; ( ) pílulas para pressão; ( ) antibióticos; ( ) insulina;  
tranqüilizantes; ( ) relaxantes musculares; ( ) outros: \_\_\_\_\_

Está fazendo algum tratamento? ( ) sim ( ) não – Qual?

Consome bebidas alcoólicas? ( ) sim ( ) não – Qual? Frequência:

Restrição alimentar ( ) sim ( ) não – Qual?

**Dados Antropométricos :** Peso:          Altura:          IMC :

**Dados qualidade Vida:** Prática de atividade física ( ) sim ( ) não          Qual?

( ) 1 vez semana ( ) 2-3 vezes semanas ( ) 4 -5 semanas ( ) +5 semanas

## 5.2 Anexo 2 Recordatório de 24 horas

ID=

( ) segunda ( ) terça ( ) quarta ( ) quinta ( ) sexta ( ) sábado ( ) domingo

Café da manhã:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

Colação:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

Almoço:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

Lanche:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

Janta:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

Ceia:

Horário	Local	Tipo de alimentação	Quantidade

### 5.3 Anexo 3 Material de apoio



