

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA**

**Consumo de carnes e aminas heterocíclicas como
fatores de risco para câncer**

Aline Martins de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública
para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Assoc. Dirce Maria Lobo
Marchioni

**São Paulo
2016**

Consumo de carnes e aminas heterocíclicas como fatores de risco para câncer

Aline Martins de Carvalho

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Assoc. Dirce Maria Lobo Marchioni

**São Paulo
2016**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

Dedicatória

Dedico este trabalho à população de São Paulo, que financiou meus estudos e que contribuiu participando do inquérito. Dedico também à minha família e amigos que me ajudaram com seus pensamentos e palavras de incentivo, especialmente à minha avó que ficaria muito orgulhosa com mais uma conquista!

Agradecimentos

Àgradeço imensamente a Deus por ter me dado a oportunidade de continuar a estudar e trabalhar na Universidade de São Paulo e de conhecer e fazer um estágio na Harvard School of Public Health, uma das melhores Universidades do mundo. Foram momentos especiais de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais pelo apoio de sempre, pela paciência, amor, carinho e incentivo. Sem eles não teria conseguido. À minha irmã Fanti e irmã de coração Cici, que sempre se orgulharam e me incentivaram muito com suas palavras, além dos momentos de risadas, comilanças e viagens.

Ao meu lindo avô e amorosa avó (em memória), que me amam mais que tudo no mundo e me proporcionaram equilíbrio espiritual, me fazendo sempre refletir sobre as coisas mais importantes da vida.

Ao Rafael, pelo apoio, amor, entendimento, leituras, conversas infinitas e pela vida que me proporciona ao seu lado, que só me faz crescer a cada dia.

Aos meus padrinhos Celso e Cleide (em memória) e meus padrinhos de coração Fátima e Heitor, pelo amor, incentivo de sempre!

À minha orientadora Dirce Marchioni que, como sempre, me incentivou e me animou nos momentos de dúvida, e me colocou no chão nos momentos de ilusão. Foram anos de grande aprendizado ao lado dela, que me inspiram como um grande líder deve ser.

Aos professores Regina Fisberg, Thomas Ong, Marcelo Rogero, Ana Paula Loureiro, Paulo Lotufo, Gilka Gattás e Sandra Vivolo pelos ensinamentos e contribuições.

Às amigas Anelise, Catarina, Mariana Foresto, Aline Vial, Diva, Ana Luiza e Camila Negrão pelo apoio, amizade, pelos risos e choros, pelo equilíbrio espiritual que me proporcionaram nesse período.

À eterna amiga Soraya, que apesar de longe, é uma das amigas mais próximas, que acredita em todas as minhas ideias, que me oferece diariamente apoio

incondicional, amor, carinho, e me ajuda a trilhar meu caminho na seara do bem e do amor.

À Josi que, como uma irmã mais velha, me acompanha sempre, me dá conselhos, me anima e enche minha vida de alegrias!

Às grandes amigas Aline Mendes e Jaque, pelas conversas, confidências, viagens e amizade verdadeira!

Aos amigos de prefeitura: Mariana, Eliza, Karla, Julia, Diego, Michelle, Heloisa, Ana Paula, Agnes, Ligia, Monica, Maíra, Natalia, Kamila, Fernanda, Vanessa, Larissa, Tais e à equipe de trabalho: Gabriela, Ludmila, Elisete, Eder, Nayla, Marcia, Silvia, Gustavo, Débora, Cristiane, Adriana, Samuel e Ana, além dos demais colegas e funcionários da CODAE, que me incentivaram na reta final do doutorado.

Aos amigos juniores que apesar do pouco contato me tornam uma pessoa especialmente melhor, mais dedicada e mais eficiente: Pamela, Hage, Hugo, Allan, Simone, Hana, André e Higa.

Aos meus amigos da Sociedade Espírita Inspiração: Anderson, Nelma, Beto, Dudu, Pati, Gina, Zena, Tati, Josi, Camila, Anna Julia, Bento, Meire, Zezé, Luiz, Cristal, Cibele, Gustavo, Marcia e Kelly, pelos encontros semanais de autoconhecimento, preces e conforto espiritual, mesmo quando estava longe.

Aos colegas da gafieira: Máximo, Thais, Anna, Aninha, Yuri, Jeff, Carol, Thiago, João, Nina e Silvia pelas danças semanais, que acalmaram e relaxaram para enfrentar a semana.

Ao amigo Anax pelos ensinamentos, discussões, conversas, cafés e análises e tudo mais que tornaram o doutorado bem mais leve e divertido.

Ao pessoal de Boston, em especial a Paula e Diana, pelo carinho, amizade, receptividade, entendimento, choros, risos e gordices; ao pessoal do PUB-Boston: Larissa, Lucy, Monica, Rodrigo, Pedro, Lucas, Pedro, Sarah, Ana, Sinara, Flavia, Giovana, Felipe, Lucas, Jason, Adam, Jacques, Cris, Ana Paula e Juliana, por tornarem minha vida bem mais alegre naquela linda cidade gelada. Além do meu orientador Lu Qi, sua equipe e meus companheiros de aulas e de trabalhos na HSPH.

Aos amigos de Faculdade: Eliseu, Bartira, Roberta, Samantha, Viviane, Andreia, Augusto, Alex, Juliana, Roberta, Mariane, pela companhia, pelos momentos de café e descontração, pelos ensinamentos.

A toda equipe do Sustentarea: Camila, Jacqueline, Vanessa, Luma, Vitória, Flavia, Paloma, Edilson, Mayara e Aline, que me ajudou a tornar o projeto realidade, em especial a Jéssica, que trabalhou muito e me ajudou ao extremo para a realização e sucesso do mesmo, e a Lucia e Higa, que me ajudaram na campanha de arrecadação de fundos.

Aos funcionários da FSP, em especial ao Diego, Alessandra e Eduardo, que foram atenciosos e eficientes.

À Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro ao projeto, e a FAPESP pelas bolsas de estudos.

Aos outros tantos colegas, amigos e familiares que torceram por mim!

*Enfim, a todos: **muito obrigada!!***

Resumo

Carvalho AM. Consumo de carnes e aminas heterocíclicas como fatores de risco para câncer/Meat and heterocyclic amines intake as risk factors for cancer. [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2016.

Introdução. O alto consumo de carne, principalmente vermelha e processada, tem sido relacionado com aumento de risco de doenças crônicas, especialmente o câncer. Uma das explicações possíveis são os métodos de preparo culinário a altas temperaturas, que acarretam na formação aminas heterocíclicas. Estes compostos são detoxificados no nosso organismo, passando por um processo, no qual podem ser geradas espécies reativas, relacionadas ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA. Entretanto, os indivíduos apresentam respostas diferentes à mesma exposição dietética, podendo ter diferentes níveis de risco ou benefício com a mesma ingestão de alimentos. O código genético individual pode ser uma das causas dessa variação interpessoal. **Objetivo.** Investigar a relação entre o consumo de carnes e aminas heterocíclicas com estresse oxidativo e dano no DNA, considerando polimorfismos genéticos, fatores demográficos e de estilo de vida em residentes do Município de São Paulo. **Métodos.** Foram utilizados dados dietéticos, genéticos, bioquímicos e estilo de vida de um estudo transversal com amostra probabilística de múltiplo estágio chamado Inquérito de Saúde de São Paulo (ISA-Capital). Os dados de carne e aminas heterocíclicas foram obtidos a partir de um recordatório alimentar de 24 horas e questionário sobre métodos de cocção e graus de cozimento das carnes. A extração do DNA ocorreu pelo método por sal e utilizou-se a técnica PCR em tempo real para determinação dos seguintes polimorfismos de nucleotídeo único: *CYP1A1* (rs1048943), *CYP1A2* (rs762551, rs35694136), *CYP1B1* (rs1056836, rs10012), *NAT2* (rs1208, rs1041983, rs1799929, rs1801280, rs1799931, rs1799930, rs1801279), *NAT1* (rs4986782, rs5030839, rs56379106, rs56318881, rs6586714), *SULT1A1* (rs928286), *UGT1A9* (rs3832043), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316), *GSTA1* (rs3957357), *GSTP1* (rs1695), e deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1*. Foram utilizados os biomarcadores malonaldeído (MDA) no plasma para estimar o estresse oxidativo e o 8-OHdG no plasma para estimar dano ao DNA. As associações foram examinadas por meio de modelos de regressão múltipla linear e logística ajustadas por sexo, idade, IMC, consumo de frutas e calorias, atividade física e fumo. **Resultados.** O consumo médio de aminas heterocíclicas foi de 437ng/dia e a carne de boi foi a que mais contribuiu para o consumo de aminas. Participantes que consumiram carne de boi grelhada muito bem passada apresentaram maiores concentrações de MDA do que os demais. Encontrou-se associação positiva entre consumo de aminas heterocíclicas com estresse oxidativo e dano ao DNA, isto é, indivíduos que consumiram maiores teores de aminas heterocíclicas apresentaram maiores chances de ter elevados concentrações de MDA ($OR=1,17$; $P=0,04$) e maiores concentrações de 8-OHdG ($\beta=1,62$; $P=0,04$). Observou-se também que esta associação pode ser modificada pelas características genéticas individuais, sendo que polimorfismos nos genes das enzimas de detoxificação NAT2 e CYP1B1 interagiram com o consumo de aminas, diminuindo o estresse oxidativo. **Conclusão.** Verificou-se que o alto consumo de aminas heterocíclicas contribuiu para maiores níveis de estresse oxidativo e dano ao DNA independente de fatores demográficos e de estilo de vida, aumentando o risco de doenças crônicas. Observou-se também que esta relação pode ser alterada na presença de polimorfismos genéticos individuais.

Descritores: Aminas heterocíclicas, Estresse oxidativo, Polimorfismo genético, Adutos de DNA, Câncer.

Abstract

Carvalho AM. Meat and heterocyclic amines intake as risk factors for cancer [thesis]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2016.

Introduction. The excessive meat intake, especially red and processed meat, has been linked to chronic diseases, especially cancer. One of the reasons for that is the cooking process at high temperatures that can form heterocyclic amines (HCA). During HCA metabolism, reactive species can be formed, which can cause oxidative stress and DNA damage. However, people can show different answers to the same food intake, increasing or decreasing the risk of diseases. The DNA code can be one of the causes of this between-person variations.

Objective. To investigate the association between meat/heterocyclic amine intake with oxidative stress and DNA damage, considering polymorphism, demographic and life style factors among population of São Paulo city.

Methods. Information on food intake, genetics, biochemical, and lifestyle was obtained from a representative, multistage probability-based cross-sectional study titled Health Survey for São Paulo (ISA-Capital). Meat and heterocyclic amine intake was estimated by a 24-hour dietary recall complemented by a detailed questionnaire with preferences of cooking methods and level of doneness for meats. The salt method was used for DNA extraction and real time PCR to identify the following single nucleotide polymorphisms: *CYP1A1* (rs1048943), *CYP1A2* (rs762551, rs35694136), *CYP1B1* (rs1056836, rs10012), *NAT2* (rs1208, rs1041983, rs1799929, rs1801280, rs1799931, rs1799930, rs1801279), *NAT1* (rs4986782, rs5030839, rs56379106, rs56318881, rs6586714), *SULT1A1* (rs928286), *UGT1A9* (rs3832043), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316), *GSTA1* (rs3957357), *GSTP1* (rs1695), *GSTM1* and *GSTT1* (null or not). We used malondialdehyde (MDA) concentration in plasma to estimate oxidative stress, and 8-OHdG concentration in plasma to estimate DNA damage. Analyses were performed using multivariate logistic and linear regressions adjusted for smoking, sex, age, body mass index, energy intake, fruit intake, smoking and physical activity.

Results. Mean HCA intake was 437ng/day and beef was the meat that contributed more to HCA. Participants who consumed grilled beef very well-done presented more MDA concentration than other participants. We found significant association between heterocyclic amine intake with oxidative stress and DNA damage. Participants who consumed high levels of heterocyclic amines showed higher odds to show high MDA concentration ($OR=1.17$; $P=0.04$) and high 8-OHdG concentration ($\beta=1.62$; $P=0.04$). These associations could be modified by individual genetic characteristics. Polymorphisms in genes that codify NAT2 and CYP1B1 detoxification enzymes interacted with HCA intake, decreasing oxidative stress. **Conclusions.** The high heterocyclic amine intake contributed to increase oxidative stress independently of lifestyle and demographic factors, increasing risk of chronic diseases. These relationships can be modified by genetic polymorphisms.

Key-words: heterocyclic amines, oxidative stress, genetic polymorphisms, DNA adducts, cancer

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 As doenças crônicas	15
1.2 O consumo de carne e câncer	16
1.3 O consumo de carne no Brasil e no mundo.....	17
1.4 Epidemiologia do câncer	18
1.4.1 Mecanismos que ligam a carne ao câncer	19
1.4.2 Aminas heterocíclicas	19
1.5 Estresse oxidativo.....	23
1.5.1 Radicais livres e espécies reativas	23
1.5.2 As defesas contra o estresse oxidativo	25
1.5.3 Dano oxidativo em DNA, proteína e lipídeo	26
1.5.4 Estresse oxidativo, dano no DNA e as aminas heterocíclicas.....	31
1.5.5 Metabolização das aminas heterocíclicas e sua suscetibilidade genética	32
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVO.....	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos	40
4. MÉTODOS	40
4.1 Consumo dietético	42
4.2 Avaliação antropométrica	42
4.3 Amostra de sangue	43
4.3.1 Extração do DNA e Genotipagem	44
4.3.2 Determinações de malondialdeído e adutos de DNA.....	45
4.4. Forma de análises dos resultados	48
4.5. Aspectos éticos da pesquisa	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Primeiro manuscrito	49
5.2 Segundo manuscrito	67
5.3 Terceiro manuscrito	85
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
7. REFERÊNCIAS	103
8. ANEXOS.....	116

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de aminas heterocíclicas térmicas e pirolíticas.....	21
Figura 2 - Formação de aduto de DNA 8-OHdG a partir de um radical hidroxila.....	29
Figura 3 - Reações de peroxidação lipídica.....	30
Figura 4 - Metabolismo geral de aminas heterocíclicas.....	35
Tabela 1 - Características de polimorfismos presentes nas enzimas que atuam no metabolismo das aminas heterocíclicas e estresse oxidativo.....	39

Primeiro manuscrito

Tabela 1 - Descriptive characteristics of participants in ISA-Capital study.....	64
Tabela 2 - Cooking methods, doneness level preferences and heterocyclic amines (HCA) intake in ISA-Capital Study.....	65
Tabela 3 - Mean and 95% CI of MDA concentration level by cooking methods and doneness levels for each meat intake in ISA-Capital Study.....	66
Tabela 4 - Association between MDA concentration levels (above and below 0.71 µmol/L) and kinds of HCA and meat intake in ISA-Capital Study.....	66

Segundo manuscrito

Tabela 1 - Descriptive characteristics of participants, according to levels of HCA intake in ISA-Capital study.....	83
Tabela 2 - Association between 8-OHdG and fruit, vegetable and HCA intake in ISA-Capital study.....	84
Figura 1 - Joint associations between HCA intake and fruit and vegetable (or fruit) intake on 8-OHdG levels.....	84
Figura suplementar 1 - Design of the study.....	85

Terceiro manuscrito

Tabela 1 - Frequência dos polimorfismos nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação das aminas heterocíclicas na população de São Paulo.....	91
Tabela 2 - Média e DP das concentrações de MDA de acordo com variantes nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação na população de São Paulo.....	92
Tabela 3 - Associação entre AH e MDA de acordo com variantes nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação na população de São Paulo.....	93
Figura 1 – Associações e interações entre consumo de AH e MDA segundo polimorfismo no gene <i>CYP1B1</i> e <i>NAT2</i>	94

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
8-OhdG	8-oxo-deoxiguanosina
8-OHG	8-oxo-7,8-dihidroguanina
AH	Aminas heterocíclicas
AMPM	Automated Multiple-Pass Method
A α C	2-Aminopirido [2,3-b] indole
BHT	Butil-hidroxitolueno
CHARRED	Computerized Heterocyclic Amines Resource for Research in Epidemiology of Disease
Cu(II)	Cobre II
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP1A2	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
CYP1B1	Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
DALY	Disability-adjusted life years
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DiMeIQx	Dimetilaminoquinoxalina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GPx	Glutationa-peroxidase
GR	Glutationa-redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GSTA	Glutationa-S-transferase A
GSTM1	Glutationa-S-transferase M1
GSTP1	Glutationa-S-transferase P1
GSTT1	Glutationa-S-transferase T1
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HO^\cdot	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC-EC	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
IgG	Imunoglobulina G
IMC	Índice de Massa Corporal

IPAQ	International Physical Activity Questionnaire
IQ	2-Amino-3-metil-imidazo[4,5- f]quinolina
Iqx	2-Amino-3-metilimidazo [4,5- f]quinoxalina
ISA – Capital 2008	Inquérito de Saúde de São Paulo 2008
Kcal	Quilocalorias
L'	Radical lipídico
LC-ESI-MS/MS	Cromotografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray
L-O•	Alcoxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidro peróxido de lipídeo
MDA	Malonaldeído
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5- f]quinolina
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5- f]quinoxalina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de sódio
NAT1	N-acetyltransferase 1
NAT2	N-acetyltransferase 2
NDSR	Nutrition Data System for Research
NO•	Óxido nítrico
O ₂ •-	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO•	Peroxinitritos
OR	Odds ratio
PhIP	2-Amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- b]piridina
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
R24h	Recordatório alimentar de 24 horas
RO•	Alcoxila
ROO•	Peroxila
ROOH	Hidro peróxidos orgânicos
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOD	Superóxido dismutase
SULT	Sulfotransferase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TE	Tampão tris
UGT1A9	UDP-glucuroniltransferases
WCRF	World Cancer Research Fund

APRESENTAÇÃO

Este trabalho utilizou dados do estudo ISA – Capital, Inquérito de Saúde realizado na cidade de São Paulo nos anos de 2008 a 2011, e foi orientado por Dirce Maria Lobo Marchioni.

A estrutura desta tese foi elaborada de acordo com as diretrizes aprovadas na 9^a sessão de 05/6/2008 da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, e com as recomendações do Guia de Apresentação de Teses desta instituição (CUENCA et al., 2006). Inclui as seções: (1) Introdução; (2) Justificativa do trabalho; (3) Objetivos, que descreve os propósitos gerais e específicos do estudo; (4) Métodos, com definições, procedimentos e materiais utilizados; (5) Resultados e Discussão, que apresenta três manuscritos resultantes do projeto de pesquisa de doutorado; (6) Considerações Finais, com resumo das principais contribuições do estudo; (7) Referências bibliográficas; (8) Anexos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 As doenças crônicas

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são um grande problema de saúde pública, pois geram um grande número de mortes prematuras e perda da qualidade de vida, causando impactos econômicos para famílias e sociedade em geral (MALTA et al., 2014).

No ano de 2010, 19% dos anos de vida perdidos ajustados por incapacidade (DALYs - disability-adjusted life years) foram atribuídos às doenças circulatórias e cânceres (MURRAY et al., 2012). Em 2013, 32% das mortes mundiais foram devido a doenças cardiovasculares e 15% devido ao câncer. Apesar das altas prevalências, houve redução de 22% na taxa de mortalidade ajustada por idade para doenças cardiovasculares e redução de 15% na taxa para câncer em ambos os sexos de 1990 a 2013 (GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS, 2015).

No Brasil em 2011, 31% das mortes foram devido a doenças cardiovasculares, sendo que houve redução de 24% na taxa de mortalidade ajustada por idade de 2000 a 2011 (RIBEIRO et al., 2016). Já as mortes por câncer corresponderam a 15% do total em 2007 e houve redução de 2% na taxa de mortalidade ajustada por idade entre 1996 e 2007 (SCHMIDT, 2011).

Os principais fatores de risco modificáveis para tais doenças são alimentação inadequada, inatividade física, tabagismo e consumo abusivo de álcool (MS, 2011). Segundo dados do Vigitel de 2014, observa-se que 9% dos adultos é fumante, 16% é inativo fisicamente (pratica qualquer atividade física no tempo livre nos últimos três

meses), 44% consomem frutas regularmente, apenas 29% consomem cinco porções de frutas e hortaliças em cinco ou mais dias por semana e 27% consomem carnes com elevado teor de gordura (MS, 2015).

1.2 O consumo de carne e câncer

O consumo de carne vem sendo estudado em relação à elevação de risco para doenças crônicas como doenças cardiovasculares, infarto, diabetes tipo 2, obesidade e câncer. As carnes vermelhas (carnes de boi e porco) e processadas (carnes curadas, salgadas, fermentadas, defumadas ou com adição de conservantes ou flavorizantes) são as que se mostram mais associadas a estas doenças (WCRF, 2007; ANAND et al., 2008; MICHA et al., 2010; IARC, 2015a).

Em 2007, o “World Cancer Research Fund” (WCRF) publicou uma abrangente revisão da literatura com mais de 80 estudos, mostrando 21% de aumento no risco de câncer de cólon e reto por 50g/dia de carne processada e 15% de aumento no risco por 50g de carne vermelha/dia (WCRF, 2007). AUNE et al. (2013) mostraram em sua metanálise que o consumo de 100g/dia de carne vermelha foi associado com aumento de 27% no risco de câncer de cólon e reto; e 50g/dia de carne processada foi associado com aumento do risco desse câncer em 29%. Outras recentes metanálises mostram associação entre consumo de carne, especialmente vermelha e processada, e aumento do risco de câncer em diversos sítios como estômago (ZHU et al., 2013), esôfago (CHOI et al., 2013; SALEHI et al., 2013).

Em 2015, a “International Agency for Research on Cancer” (IARC) da Organização Mundial da Saúde avaliou mais de 800 estudos que investigaram a associação entre carne vermelha e processada com vários tipos de câncer em vários

países e populações e concluiu que a carne vermelha é provavelmente um carcinogênico para os humanos e as carnes processadas foram consideradas carcinogênicas. Apesar do risco individual de câncer por consumo elevado de carne processada ser pequeno; em termos de saúde pública, 50g/dia de carne processada aumenta em 18% o risco de câncer de cólon e reto segundo o relatório (IARC, 2015a). O IARC ainda considera que os métodos de cocção a altas temperaturas podem contribuir com o risco de câncer, mas declaram que o papel destes compostos ainda não está completamente elucidado e que ainda não há dados suficientes para tirar conclusões (IARC, 2015b).

1.3 O consumo de carne no Brasil e no mundo

Dados do Inquérito de Saúde de São Paulo realizado em 2008 mostraram que o consumo médio de carnes vermelha e processada na cidade é de 113g/dia (CARVALHO et al., 2014), superando a recomendação do “World Cancer Research Fund” (300 g/semana) para prevenção de câncer (WCRF, 2007). Além disso, observou-se que o consumo destes tipos de carne aumentou de 2003 para 2008 de 100g/dia para 113g/dia ($P<0,001$) e a carne bovina foi a mais consumida com 76g/dia (CARVALHO et al., 2014). No Brasil, o consumo também é alto: dados da Pesquisa de Orçamento Familiar mostram que o consumo médio de carnes vermelha e processada foi de 88g/dia em 2008. A região Centro-Oeste foi a região com maior consumo (99g/dia) (CARVALHO et al., 2016). Estes índices são maiores do que os de outros países, como os Estados Unidos, que apresentam média de 94g/dia (DANIEL et al., 2010), e países europeus como Holanda, Alemanha, Espanha, Dinamarca e Itália, que apresentam média cerca de 90g/dia (MCAFEE et al., 2010).

1.4 Epidemiologia do câncer

O câncer vem atingindo países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo que a maior taxa se encontra nos países em desenvolvimento, principalmente os de média e baixa renda, como os do Norte e Sudeste da África, África subsaariana e Oceania, onde houve aumento de 20% do total dos casos de câncer (exceção de sarcoma Kaposi e câncer de pele não melanoma) de 1990 a 2013 (GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015).

Sabe-se que hoje, o câncer é a segunda causa de morte no Brasil e no mundo (WCRF, 2007; INCA, 2011). No Brasil, as estimativas para o ano de 2016 são de mais de 596 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não melanoma, próstata e pulmão para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama e cólon e reto para o sexo feminino. As regiões com maior número de casos são a Sul e Sudeste do país (INCA, 2015).

A etiologia do câncer é múltipla, incluindo fatores ambientais e genéticos. Alguns fatores ambientais conhecidos são: fumo, obesidade, uso abusivo de álcool, baixo consumo de frutas e verduras, agentes infeciosos (como vírus da hepatite B, C e papiloma vírus) poluição do ar, inatividade física (DANAEI et al., 2005; GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, 2015). A dieta contribui tanto para proteção quanto para o risco de câncer, e diversos estudos vem sendo feitos para tentar elucidar tais relações, uma vez que a dieta interage com diversos outros fatores durante toda a vida, incluindo variáveis genéticas, aumentando ou diminuindo o risco

para câncer (DEMARINI, 1998; GUERRA et al., 2005; ANAND et al., 2008; STEWART e WILD, 2014).

1.4.1 Mecanismos que ligam a carne ao câncer

Diversas explicações têm sido investigadas para verificar a relação entre carne e câncer (FERGUSON, 2010), os principais são: altos teores de gorduras (LIN et al., 2004), alto teor de ferro (SESINK et al., 1999) e substâncias potencialmente carcinogênicas formadas no preparo culinário, como as aminas heterocíclicas (SUGIMURA et al., 2004), além de nitritos adicionados às carnes processadas (KNEKT et al., 1999). Recentemente, as mudanças na microbiota relacionada ao consumo de carne e seus metabólitos que afetam as células do cólon e sua homeostase também vem sendo alvo de investigação (KIM et al., 2013; FENG et al., 2015).

1.4.2 Aminas heterocíclicas

As aminas heterocíclicas (AH) foram descobertas na década de 70 por pesquisadores japoneses, que verificaram seu potencial carcinogênico 100 a 100.000 vezes maior que os compostos estudados até então (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e nitrosaminas). Elas têm estrutura química de dois a cinco anéis (geralmente três) com um ou mais átomos de nitrogênio, e um grupo amino exocíclico (NAGAO et al., 1977; JÄGERSTAD e SKOG, 2005).

Podem ser divididas em dois sub-grupos: **2-aminoimidazóis ou térmicas**, formadas entre 100 e 300°C, provavelmente a partir de reações de Maillard e **2-aminopiridinas ou pirolíticas**, formadas a partir de 300°C por meio da decomposição

térmica de proteínas ou aminoácidos (Figura 1) (JÄGERSTAD e SKOG, 2005; TURESKY et al., 2005; ALAEJOS et al., 2008; MARQUES et al., 2009).

Os fatores que influenciam em suas formações são: **temperatura** (temperaturas inferiores a 160°C, geralmente, não se detecta a presença de AH, porém a partir deste valor, o nível aumenta progressivamente (SKOG et al., 1995)); **tempo de cozimento** (quanto maior a duração do processamento culinário maior a quantidade de AH formadas no alimento (KNIZE et al., 1994)); **método de processamento culinário** (o forno convencional em baixas temperaturas produz níveis baixos de AH, o uso prévio do microondas durante dois minutos de exposição pode diminuir em 90% a formação destes compostos. (FELTON et al., 1994)); **a fonte de calor** (a grelha é a que mais proporciona formação de AH, pois há contato direto entre o alimento e a fonte de calor (SINHA et al., 1998)), **tipo de produto** (varia em relação a carnes de vaca, porco, peixe, frango e embutidos; a carne de porco parece apresentar maiores teores que a carne de vaca e frango (SUGIMURA et al., 2004; PUANGSOMBAT et al., 2012)) entre outros fatores. De todos os já mencionados, a temperatura é o que mais afeta a produção de AH (JÄGERSTAD e SKOG, 2005; MARQUES et al., 2009).

Diversos estudos foram realizados a fim de verificar a quantidade de AH nas diversas preparações de carnes e a exposição de populações às AH. Os dados mostram que as concentrações variam de 1 a 500ng de AH/g de carne (0,001 ppm a 0,5 ppm), e que o consumo varia de 1 a 25ng de AH/kg de peso (KOBAYASHI et al., 2002; ROHRMANN e BECKER 2002; WONG et al., 2005; TURESKY e MARCHAND, 2011; LI et al., 2013).

O potencial mutagênico das AH foi demonstrado por Sugimura e colaboradores que utilizaram um sistema de ativação metabólica com *Salmonella typhimurium* (teste

Ames). Este mostrou que algumas AH possuem mutagenicidade consideravelmente maior que a de alguns agentes mutagênicos, como o benzo(a)pireno e aflatoxina B1 (ALAEJOS et al., 2007). A capacidade mutagênica difere entre as AH, sendo as mais potentes: 2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinolina (MeIQ), 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinolina (IQ), Dimetilaminoquinoxalina (DiMeIQx), 2-Amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxalina (MeIQx), 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxalina (Iqx) e as menos potentes: 2-Amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) e 2-Aminopirido [2,3-b] indole (AαC) (SUGIMURA et al., 2004).

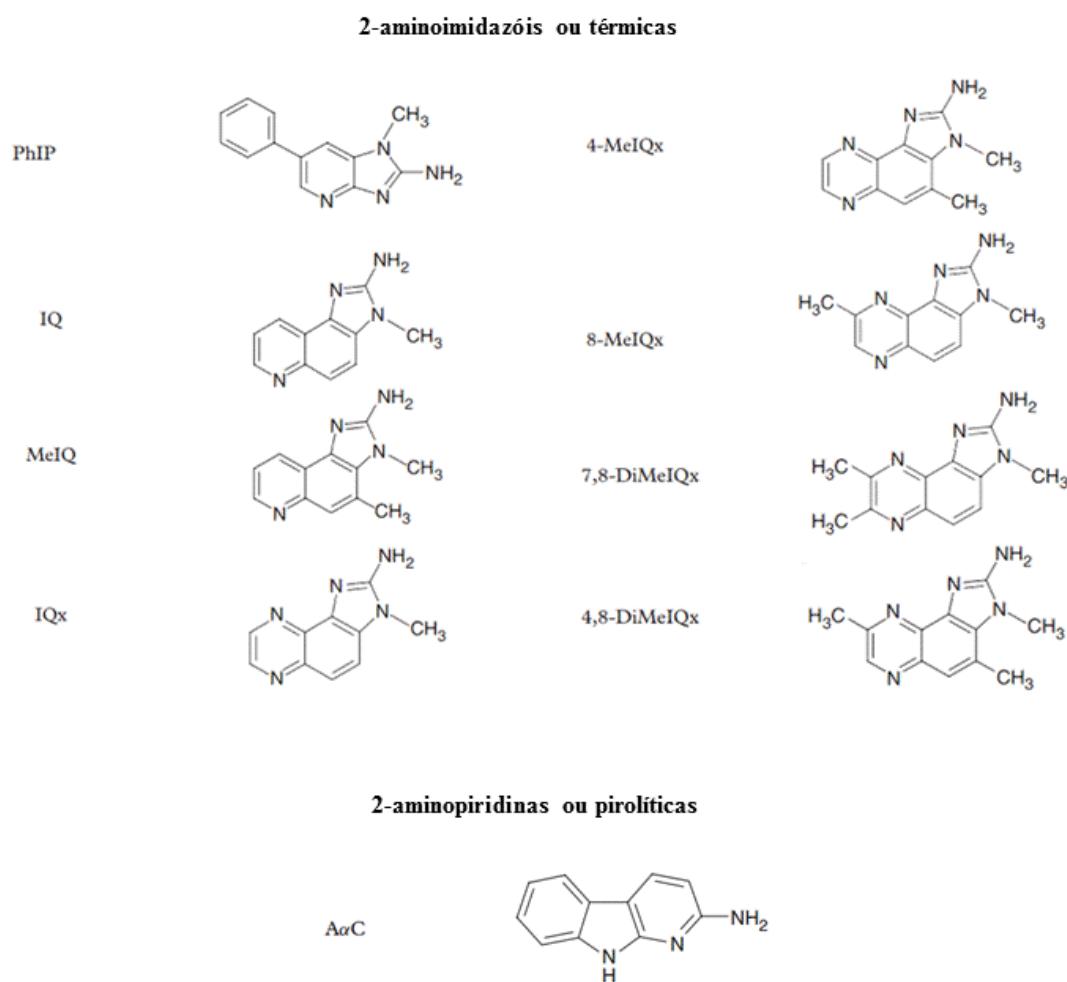


Figura 1. Estruturas químicas de aminas heterocíclicas térmicas e pirolíticas.

A atividade genotóxica das AH tem sido estudada em vários organismos como bactérias, drosófilas, roedores, e *in vitro* (células mamárias) (SUGIMURA et al., 2004). Verificou-se em animais que o consumo de aminas heterocíclicas está associado a neoplasias malignas em glândulas mamárias, próstata, pulmão, cólon, pele, pâncreas, bexiga e fígado (ITO et al., 1991; SHIRAI et al., 1997; JÄGERSTAD e SKOG, 2005; MARQUES et al., 2009). Apesar da PhIP ser considerada menos potente, a depuração desta amina é mais longa que as demais, prolongando a exposição celular a mesma. Modelos celulares e animais mostram a mutação de genes como p21 a partir da exposição à PhIP, o que pode aumentar o risco de câncer (GOODERHAM et al., 2002).

KAMPMAN et al. (1999), SINHA et al. (1999), MARCHAND et al. (2001), NOWELL et al. (2002), BUTLER et al. (2003), BARBIR et at., (2012), HELMUS et al., (2013) verificaram evidências para associação positiva entre consumo de carne bem passada e exposição a AH com risco de câncer de cólon e reto em humanos. A coorte europeia EPIC – “European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Heidelberg Study” verificou correlação entre ingestão de AH, principalmente PhIP (obtido a partir de questionários de frequência alimentar), e risco para desenvolver câncer de cólon e reto (ROHRMANN et al., 2009). A coorte americana “NIH-American Association of Retired Persons” encontrou suporte para a hipótese de ingestão de carne vermelha cozida a altas temperaturas e AH na etiologia do câncer de pâncreas (STOLZENBERG-SOLOMON et al., 2007). LI et al. (2007) também verificaram associação entre preferência por carnes bem passadas, exposição a AH e aumento do risco de câncer de pâncreas.

Alguns estudos relatam que o mecanismo pelo qual isto acontece é a formação de espécies reativas formadas nas reações das enzimas de detoxificação, o que pode causar estresse oxidativo e dano ao DNA, sendo que se estes processos não forem reparados podem levar ao câncer (MAEDA et al., 1999; FELTON e MALFATTI, 2006; TURESKY e MARCHAND, 2011).

1.5 Estresse oxidativo

1.5.1 Radicais livres e espécies reativas

As reações de oxidação são parte inerente à vida aeróbia, sendo que radicais livres e espécies reativas são formados a partir de processos naturais, como a fosforilação oxidativa, o metabolismo de substâncias e a defesa contra patógenos, mas também podem ser formados por consequência de alguma disfunção biológica (MENA et al., 2009).

Radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados. Já o termo espécies reativas engloba tanto espécies radicalares quanto não radicalares, sendo que as de principal interesse biológico são centradas no oxigênio e no nitrogênio (AUGUSTO, 2006).

Dentre as principais espécies reativas radicalares, tem-se: radical hidroxila (HO^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^\bullet), alcoxila (RO^\bullet), óxido nítrico (NO^\bullet), entre outras. Dentre as espécies reativas não radicalares tem-se: peroxinitritos (ONOO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlete (${}^1\text{o}_2$), hidroperóxidos orgânicos (ROOH), entre outras. Algumas delas são extremamente reativas,

como o radical hidroxila, e outros poucos reativos como o óxido nítrico (AUGUSTO, 2006; BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Estas espécies podem ser formadas em diversos processos como: ação de radiação iônica, radiação solar, poluição, fumo, álcool, metais e outras substâncias químicas (fontes exógenas), e no metabolismo normal do corpo humano como: cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, enzimas do citocromo P450, ativação de células inflamatórias e macrófagos, peroxissomos, na hidroxilação de purinas pela xantina oxidase (fontes endógenas) (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004; VALKO et al., 2006; RADAK e BOLDOUGH, 2010; SEDELNIKOVA et al., 2010).

O NO[•] é sintetizado a partir de aminoácidos no endotélio de vasos, nos fagócitos e outros. Ele tem diversas funções como regulação da pressão arterial, morte de patógenos por macrófagos, entre outros. O O₂^{•-} pode ser produzido nas reações de auto-oxidação e reações enzimáticas como pelas enzimas xantina oxidase, NADPH oxidase, flavina desidrogenase, além do sistema NADPH-citocromo P-450 redutase. Durante o processo de respiração celular, o oxigênio é reduzido à água, entretanto 1 a 2% do oxigênio que entra na mitocôndria é reduzido a radical superóxido. As células fagocíticas também produzem grandes quantidades de ânion superóxido durante a fagocitose, ajudando na destruição de microorganismos. O H₂O₂ é produzido por oxidases e também a partir da dismutação do O₂^{•-} pela enzima superóxido dismutase (SOD). Ele tem papel importante no controle do ciclo celular, participa de vias de sinalização e é capaz de atravessar membrana nuclear e induzir danos no DNA (HALLIWELL, 2001; AUGUSTO, 2006). Já o radical hidroxila pode ser formado pela radiólise da água por meio de radiações ionizantes (raios X, raios gama), e por meio da

reação do $O_2^{\cdot-}$ com H_2O_2 , através da reação de Haber-Weiss, catalisada por metais de transição (AUST et al., 1993; AUGUSTO, 2006).

O tempo de vida e a capacidade de difusão variam entre as espécies, sendo maiores nas espécies menos reativas. O radical hidroxila tem uma meia-vida de menos de 10^{-9} segundo, diferente do NO^{\cdot} que pode ter um tempo de vida de alguns segundos (VALKO et al., 2007). Há evidências de que, dependendo da concentração intracelular e a natureza da espécie reativa, os efeitos podem ser diversos como ativação da transcrição gênica, indução de dano no DNA ou apoptose. Um aumento brando de $O_2^{\cdot-}$, por exemplo, pode inibir a apoptose, ao contrário de um aumento de H_2O_2 que induz a morte celular (LEE e PERVAIZ, 2011).

Quando em excesso, as espécies reativas predominam em relação a defesa antioxidante, levando a oxidação de biomoléculas num processo chamado estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). Recentes evidências indicam que este desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes levam a uma perturbação da sinalização e controle redox, assim como podem levar a dano molecular (JONES, 2006).

1.5.2 As defesas contra o estresse oxidativo

Para manter o equilíbrio entre a formação e o controle de espécies reativas e prevenir o estresse oxidativo, a célula possui um sistema antioxidante enzimático composto por SOD, catalase, glutationa-peroxidase (GPx), glutationa-redutase (GR), entre outras enzimas além de um sistema não-enzimático, composto por vitaminas C e E, betacaroteno e glutationa, ácido úrico, transferrina, ceruplasmina (AUGUSTO, 2006; HALLIWELL, 2007; ZIECH et al., 2010).

A GPx é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio e hidro peróxidos lipídicos a seus correspondentes álcoois, convertendo GSH (glutationa reduzida) a GSSG (glutationa oxidada), assim mantendo concentrações de peróxido no organismo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ROVER-JUNIOR et al., 2001). Já a GR é um dos mecanismos mais importantes de defesa antioxidante da célula, pois regenera a glutationa a sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH, a fim de manter o ciclo metabólico da glutationa (ROVER-JUNIOR et al., 2001; BARREIROS et al., 2006).

A catalase é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio nos perixossomos e a SOD catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, na presença de H⁺ (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Existem duas formas de SOD no organismo, a CuZn-SOD presente no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo, e a Mn-SOD presente na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BARREIROS et al., 2006).

O consumo de frutas, verduras e legumes vem sendo relacionado com proteção contra as espécies reativas (MENA et al., 2009) tanto por promoverem o aumento da atividade das enzimas antioxidantes citadas acima, quanto por serem fontes de antioxidantes, como a vitamina C, vitamina E, carotenoides, polifenóis, entre outros (CERQUEIRA et al., 2007).

1.5.3 Dano oxidativo em DNA, proteína e lipídeo

O estresse oxidativo pode provocar danos ao DNA, proteínas ou lipídeos, promovendo mudanças na estabilidade cromossômica, mutações, modulação do crescimento celular, entre outras alterações na homeostase (FERREIRA e

MATSUBARA, 1997; KOVACIC e JACINTHO, 2001; AUGUSTO, 2006; KLAUNIG et al., 2010).

1.5.3.1 Dano oxidativo no DNA

Os danos no DNA podem acontecer pela ligação covalente entre as espécies reativas e as bases de DNA, gerando os chamados adutos de DNA, que são importantes marcadores da exposição à carcinógenos, pois promovem uma medida integrada da exposição a substâncias potencialmente carcinogênicas, da ativação metabólica dessas substâncias, e do dano celular causado pelo ligamento a molécula de DNA. Há diversos estudos em animais que mostram forte correlação entre exposição de carcinógenos, formação de adutos de DNA, mutagênese e desenvolvimento de tumores (POIRIER, 1997; AGUDO et al., 2009).

Dentre as bases do DNA, a guanina é considerada o principal alvo para o ataque de espécies químicas, devido ao seu menor potencial de oxidação (1,29V). Vários adutos resultantes da oxidação do DNA já foram descritos e o mais estudado entre eles é formado pela ligação de um radical hidroxila ou oxigênio singlete com o carbono 8 da guanina no DNA, resultando no chamado 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-OHG) ou sua forma de nucleosídeo 8-oxo-deoxiguanosina (8-OhdG) (Figura 2). Ele apresenta alta mutagenicidade, uma vez que se não for reparado antes da replicação do DNA, pode provocar transversão de G:C para T:A, uma mutação comum observada em câncer em humanos (KAMIYA et al., 1995; LEE e PERVAIZ, 2011).

Carcinógenos como aflatoxina B1, etilbenzeno, benzopireno, assim como o cigarro têm mostrado serem capaz de induzir a formação de 8-OHdG em células e órgãos (SHEN et al., 1995; IZZOTTI et al., 1999; UMEMURA et al., 1999; LIN et al.,

2002; BRIEDE et al., 2004; MIDORIKAWA et al., 2004). Em estudos clínicos, as concentrações deste aduto foram maiores em pacientes com tumores em vários sítios do que em indivíduos controle (LI et al., 2001; BRETON et al., 2005; OBTULOWICZ et al., 2010).

Além de ser um marcador de carcinogênese, a 8-OHdG também tem recebido atenção por ser um marcador genuíno de dano ao DNA induzido por estresse oxidativo (LOUREIRO, et al., 2002; AUGUSTO, 2006; VALAVANIDIS et al., 2009; LEE e PERVAIZ, 2011).

Muitos métodos sensíveis de detecção de adutos vêm sendo utilizados, incluindo cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray (LC-ESI-MS/MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC-EC), radioimunoensaio, marcação com fósforo radioativo (^{32}P -postlabeling) e imunoensaio com anticorpos específicos (LOUREIRO et al., 2002).

As concentrações de adutos de DNA nos diversos estudos são discrepantes devido às diferenças nos métodos empregados para isolamento e análise do DNA. Cada método de detecção possui suas especificidades, forças e fraquezas, como por exemplo o HPLC-MS/MS, que é considerado padrão ouro, pois possui alta sensibilidade e é rápido, embora seja considerado de alto custo. Já o imunoensaio com anticorpos específicos (ELISA) é um método simples, rápido, porém não apresenta grande sensibilidade e precisão, sendo utilizado mais de forma qualitativa (LEE e PERVAIZ, 2011). Apesar de tal fato, existe uma correlação aceitável entre resultados obtidos por espectrometria de massa e ELISA (YOSHIDA et al., 2002; HU et al., 2004).

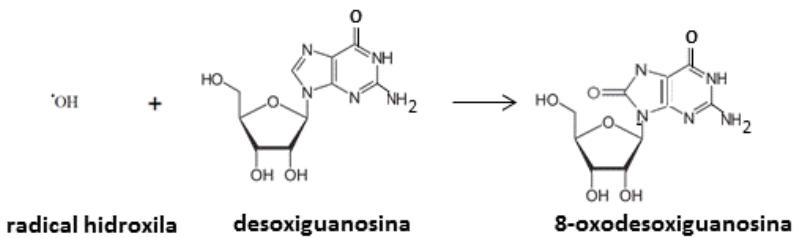


Figura 2. Formação de aduto de DNA 8-OhdG a partir de um radical hidroxila.

1.5.3.2 Dano oxidativo em proteínas e lipídeos

Se as alterações provenientes do estresse oxidativo acontecem em aminoácidos, podem ser gerados radicais de aminoácidos e as proteínas podem ter sua atividade alterada ou inibida. Este dano pode ser medido pela determinação de carbonilas em tecidos e fluídos; entretanto um fator que dificulta esta medida é a possível interferência de proteínas oxidadas da dieta (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Já se o ataque de espécies reativas se dá nos ácidos graxos, o processo é chamado peroxidação lipídica (PISOSCHI e POP, 2015), que pode alterar a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, acarretando um influxo excessivo de cálcio, o qual ativa enzimas autolíticas causando proteólise e morte celular. Esse processo é formado por uma cadeia de reações com as fases de iniciação, propagação e terminação. Na primeira ocorre o ataque aos ácidos graxos da membrana plasmática por um radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) ou alcoxila (lipídeo- $\text{O}\cdot$) formando um radical lipídico ($\text{L}\cdot$). Na propagação, o $\text{L}\cdot$ reage com O_2 , formando o radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$), que ataca novo hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado, formando novamente o radical lipídico e hidroperóxido de lipídeo (LOOH). A terceira fase ocorre quando os radicais produzidos nas fases anteriores reagem entre si, neutralizando-se (Figura 3) (FERREIRA e

MATSUBARA, 1997; LIMA e ABDALLA, 2001; LOUREIRO et al., 2002). O hidroperóxido de lipídeo (LOOH) pode sofrer outras reações gerando produtos eletrofílicos reativos, como cetonas, epóxidos e aldeídos, como o malonaldeído (MDA) (AUGUSTO, 2006).

O MDA é usado convenientemente como marcador de estresse oxidativo, devido à sua fácil detecção, e por vir sendo associado a diversas doenças crônicas (MARCHASSON et al., 2001; CIRAK et al., 2003; SCOTT et al., 2003). Ele foi considerado carcinogênico pela primeira vez em 1972 após sua administração tópica na pele de rato, e em 1976 verificou-se sua atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium* (MARNETT, 1999). Em humanos, diversos estudos já mostram maiores concentrações de MDA em indivíduos com câncer do que em indivíduos controles (MANO et al., 1997; GONENC et al., 2005; SREENIVASA e KUMARI, 2012; HOSSEINI-ZIJoud et al., 2016).

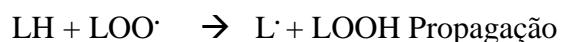
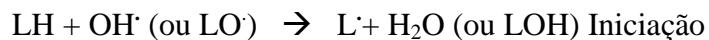


Figura 3. Reações de peroxidação lipídica.

Devido a sua grande utilização, desde de 1960 diversos métodos de detecção de MDA vêm sendo desenvolvidos, incluindo TBARS (método “thiobarbituric acid

reactive substances”), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa (GC), técnicas imunológicas. A maioria das técnicas medem o complexo MDA ligado ao ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA), entretanto o método TBARS possui baixa especificidade e sensibilidade, uma vez que o TBA reage com açúcares, aminoácidos, bilirrubina e albumina, se tornando inespecífico para peroxidação lipídica. Já a técnica por HPLC possui alta sensibilidade e reproduzibilidade, pois separa de maneira satisfatória o complexo MDA-TBA de outros interferentes por fase reversa do HPLC (GROTTI et al., 2009; SPIRLANDELI et al., 2014).

1.5.4 Estresse oxidativo, dano no DNA e as aminas heterocíclicas

Diversos estudos em animais mostram a relação entre aminas heterocíclicas e estresse oxidativo. LI et al. (2012) submeteram três grupos de ratos a diferentes doses de PhIP por gavagem e um grupo controle não recebeu a amina heterocíclica. Os pesquisadores verificaram concentrações maiores de MDA no coração, pulmão, rim e fígado dos animais que tiveram maior exposição à AH. Em 2013, o mesmo grupo mostrou que células do estômago de ratos expostos à PhIP apresentaram uma infiltração de células inflamatórias, além de maiores concentrações de MDA e carbonilas totais comparado com os animais controles. Além disso, eles verificaram que o grupo de ratos que recebeu maiores doses de PhIP (15mg/kg de peso) apresentou maiores níveis de RNA mensageiro e proteína c-fos e c-jun (relacionadas à ativação de proto-oncogenes) e menores níveis de RNA mensageiro e proteína p16 (relacionadas a inativação de genes supressores de tumor) comparado aos outros grupos (LI et al., 2013).

Outros estudos também mostraram relação entre exposição a aminas heterocíclicas e dano de DNA em animais. Murata e colaboradores mostraram que

metabólitos de AH (N-hidroxi-MeIQx e N-hidroxi-IQ) podem gerar lesões no DNA, incluindo a 8-OhdG *in vitro*. Eles sugerem que a reação aconteceu não-enzimaticamente na presença de NADH e Cu(II) (MURATA et al., 1999^a; MURATA et al., 1999^b). Em 2002, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que a exposição do DNA ao metabólito N-hidroxi-PhIP em baixas concentrações também aumentou as concentrações de 8-OhdG na presença de NADH e Cu(II) (MURATA et al., 2002). EL-BAYOUMY et al. (2000) mostraram relação entre administração oral de PhIP e formação do aduto 8-OhdG em células mamárias de ratos.

Entretanto a relação entre a exposição a aminas heterocíclicas e estresse oxidativo/dano ao DNA pode ser alterada por fatores genéticos individuais, isto é, a biotransformação de AH e reparo do DNA podem ser mais ou menos ativos dependendo da atividade das enzimas específicas que atuam neste processo (WÜNCH e GATTAS, 2001). A principal forma de variação genética em humanos é representada por SNPs (“single nucleotide polymorphisms”), que são trocas de nucleotídeo na sequência de DNA com frequência de pelo menos 1% da população. Essas trocas podem resultar em mudança no aminoácido da proteína codificada, podendo alterar o fenótipo e atividade das proteínas (HUNT et al., 2009).

1.5.5 Metabolização das aminas heterocíclicas e sua suscetibilidade genética

No metabolismo das aminas heterocíclicas, elas sofrem um processo chamado bioativação, por meio da ação de enzimas de detoxificação (enzimas de fase I e fase II) a fim de transformá-las em substâncias hidrossolúveis para serem eliminadas na urina e/ou bile. Entretanto, nessa tentativa de eliminar essas AH do organismo, são geradas espécies reativas, que podem causar estresse oxidativo e dano ao DNA, que se não

forem reparadas podem levar ao câncer (MAEDA et al., 1999; FELTON e MALFATTI, 2006; TURESKY e MARCHAND, 2011).

O processo de metabolização se dá principalmente pela ação do citocromo P450 (CYP) com as enzimas CYP1A1 e CYP1A2 (família 1, subfamília A, polipeptídeo 1 e 2) do fígado na presença de NADPH. Elas são responsáveis pela ativação metabólica (N-oxidação do grupo amino exocíclico) de grande parte das AH, formando um N-hidroxi-AH (N-OH-AH) e produzindo ânion superóxido e radical hidroxila (MAEDA et al., 1995; LI et al., 2013). Estudos *in vitro*, sugerem que o ânion superóxido tende a se ligar a ácidos graxos provocando peroxidação lipídica; já o radical hidroxila pode se ligar a aminoácidos e bases de DNA formando adutos de proteína e DNA, respectivamente (LI et al., 2013).

A CYP1A1 é principalmente expressa em tecidos como mama, cólon e próstata. Já a CYP1A2 representa cerca de 15% das enzimas do citocromo P450 do fígado humano e metaboliza em torno de 90% da PhIP e 70% da MeIQx, produzindo metabólitos relativamente estáveis que podem se ligar ao DNA e biomoléculas, ou podem sofrer ação de enzimas de fase II no fígado ou ainda sair do tecido hepático e sofrer ações das enzimas de fase II em outros tecidos (TURESKY, 2004).

A expressão da enzima CYP1A2 em humanos possui uma grande diferença intrapessoal, variando cerca de 25 vezes a quantidade de proteína no fígado dos indivíduos analisados, sendo que quanto maior a quantidade da enzima, maior o teor de produtos oxidados, principalmente de MeIQx, que podem provocar dano celular (TURESKY, 2004).

Há diversos SNPs descritos nas enzimas do citocromo P450. Alguns estudos mostram que o SNP *CYP1A2* (rs762551) apresenta modificação C>A na posição 163

promovendo maior indução da enzima, sendo que indivíduos com genótipo AA são considerados metabolizadores rápidos, isto é, promovem mais oxidação. O SNP *CYP1A1* (rs1048943) apresenta modificação C>T, com troca do aminoácido isoleucina por valina na posição 462, aumentando a oxidação (AGUDO et al., 2009). Já o SNP *CYP1A2* (rs35694136) apresenta deleção na posição 2467, sendo que indivíduos com variantes homozigóticas apresentaram metabolismo mais lento (KIM et al., 2013).

O SNP *CYP1B1* (rs10012) apresenta modificação C>G com a troca de uma arginina por glicina na posição 48 e o SNP *CYP1B1* (rs1056836) também apresenta modificação C>G com troca de uma leucina por valina na posição 432. Ferrucci e colaborados encontraram interação entre a ingestão de PhIP e estas variantes com adenoma de cólon e reto, isto é, observou-se maior risco de câncer de cólon e reto de acordo com aumento do consumo de PhIP em indivíduos que apresentavam GG para o SNP rs10012 e CC para o SNP rs1056836 (FERRUCCI et al., 2011).

As enzimas de fase II promovem reações de conjugação com substratos endógenos (glutationa, sulfato, glicose, acetato) por meio das Glutatona-S-transferase (GST), sulfotransferase (SULT), UDP-glucuroniltransferases (UGT) e N-acetiltransferase (NAT), formando produtos detoxificados que serão eliminados na urina ou formando ésteres instáveis capazes de reagir com DNA e biomoléculas como proposto na Figura 4 (TURESKY, 2004; WCRF, 2007; TURESKY e MARCHAND, 2011).

As N-acetiltransferases (NAT1 e NAT2) são enzimas criticamente envolvidas no metabolismo das AH, atuando, na maioria, na bioativação das mesmas, isto é, elas acetilam os hidroxi-AH formando compostos intermediários (ésteres reativos) capazes de se ligar ao DNA (TURESKY e MARCHAND, 2011; FU et al., 2012), sendo que a

NAT1 é principalmente expressa no fígado e NAT2 em tecidos extra-hepáticos. Apesar da maior expressão da NAT2/NAT1 fora do fígado, a NAT1 parece ter maior especificidade que a NAT2, sendo que uma menor quantidade da enzima pode já ser suficiente para bioativar os compostos (WINDMILL et al., 1997). Além disso, foram descritos mais de 20 polimorfismos genéticos nos genes que codificam as NAT capazes de alterar a atividade da proteína em relação à sequência original, promovendo maior ou menor atividade da enzima codificada (TOMALIK-SCHARTE, 2008).

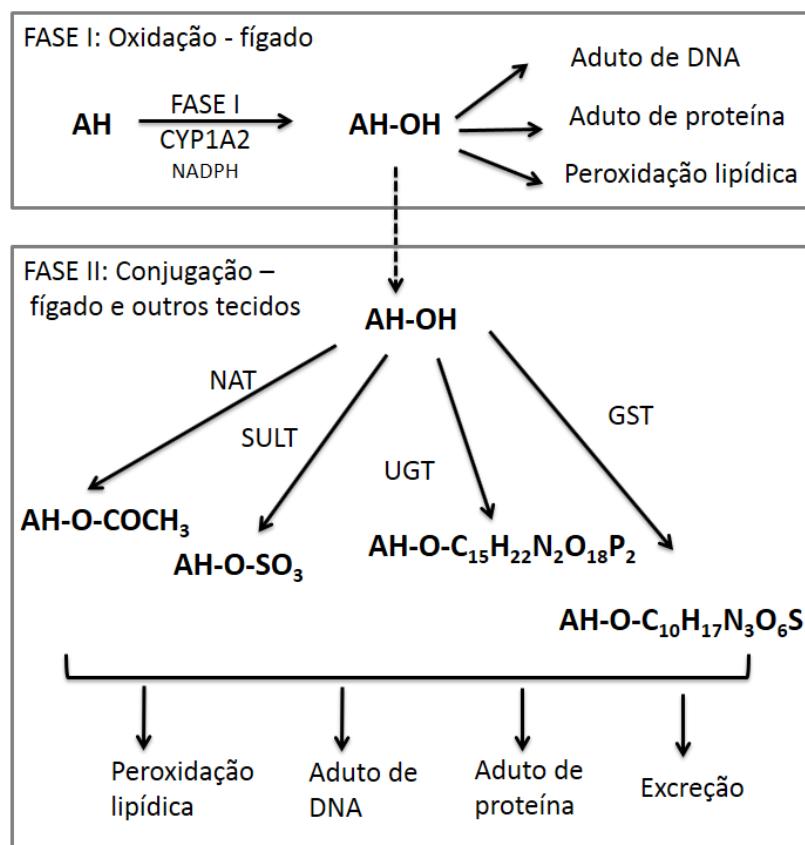


Figura 4. Metabolismo geral de aminas heterocíclicas (Adaptado de TURESKY, 2004; TUERSKY, 2007; TURESKY e MARCHAND, 2011).

A presença de polimorfismos no gene *NAT2* confere aos indivíduos um perfil de acetilação lenta, intermediária ou rápida, e pode ser predita pela combinação de zero, um ou dois haplótipos funcionais, respectivamente (SABBAGH et al., 2009).

A presença dos polimorfismos no gene *NAT2* (rs1799929 [C481T], rs1208 [G803A], rs1041983 [C282T]) confere aos indivíduos um perfil de acetilação rápida, que leva a um metabolismo mais rápido, formando mais metabólitos de AH; ou um perfil de acetilação lenta (rs1801280 [T341C], rs1799931 [G857A], rs1801279 [G191A], rs1799930 [G590A]) que possui um metabolismo mais lento (WALKER et al., 2009; BARBIR et al., 2012; FU et al., 2012; BOUKOUVALA, 2016). Já a presença de polimorfismo no gene *NAT1* (rs4986782 [G560A], rs5030839 [C559T], rs56379106 [C190T], rs56318881 [C97T] e rs6586714 [A2978G]) confere aos indivíduos um perfil de acetilação lenta (FU et al., 2013; BOUKOUVALA, 2016).

Alguns estudos têm relatado interação entre consumo de carnes grelhadas e presença de polimorfismos nas NATs aumentando o risco de câncer de mama; outros estudos não encontraram associação entre acetiladores rápidos e câncer de mama. Já no tecido do cólon se observou associação entre acetiladores rápidos e risco de câncer de cólon e reto entre indivíduos que consumiam elevado teor de carnes muito bem passadas, entretanto outros estudos não encontraram associação (AIROLDI et al., 2004; TURESKY, 2004). Uma das razões para tal fato é a alta variabilidade interpessoal da expressão de *NAT1* e *NAT2*, que depende da região do tecido, a frequência genotípica na população, suas interações com fatores ambientais e genéticos, além de outros compostos que podem atuar para aumentar ou diminuir a expressão das enzimas (HICKMAN et al., 1998; HEIN et al., 2000; HEIN, 2002; TEIXEIRA et al., 2007).

As SULT também atuam na bioativação e detoxificação das AH. A SULT1A1 é expressa no trato gastrointestinal e no fígado, e catalisa a reação que forma o sulfamato de MeIQx, excretado na urina de humanos (TURESKY e MARCHAND, 2011). O polimorfismo do gene da enzima da SULT1A1 (rs9282861) apresenta modificação C>T com troca de uma arginina por histidina na posição 213, promovendo menor atividade enzimática (YU et al., 2010; BARBIR et al., 2012). Além disso, tal SNP foi associado com menor risco de câncer de mama em mulheres que consumiam frequentemente carnes bem passadas; entretanto não apresentou associação significativa para câncer de próstata e de cólon e reto (TURESKY e MARCHAND, 2011).

A família da UGT é expressa no trato gastrointestinal e no fígado e atua na detoxificação das AH, fazendo a N-glucuronidação do PhIP e MeIQx, excretados na urina humana. Estudos mostram grande variabilidade interpessoal da quantidade destes compostos na urina. (TURESKY e MARCHAND, 2011). A UGT1A9 é uma das enzimas mais ativas, que participa da conjugação das AH. O polimorfismo no gene *UGT1A9* (rs3832043) apresenta deleção na posição 127 e pode influenciar na eliminação dos metabólitos de AH (EICHHOLZE et al., 2012).

As enzimas GST atuam na detoxificação de metabólitos reativos de AH, tornando-os menos tóxicos e facilitando a excreção, o que diminui a possibilidade da ligação destes com DNA. Dentre as mais estudadas estão a GSTM1 e GSTT1, que possuem genes polimórficos podendo apresentar fenótipo presente ou nulo. O fenótipo nulo reduz a capacidade do organismo de detoxificar os metabólitos reativos, aumentando risco de neoplasias (AIROLDI et al., 2004). Já a GSTA é largamente expressa no fígado comparado ao cólon e pâncreas. O polimorfismo no gene que

codifica a GSTA1 (rs3957357) apresenta modificação A>G na posição 135, resultando em menor atividade enzimática (AHN et al., 2006; RESZKA et al., 2014).

Outras enzimas que atuam como antioxidantes são a Mn-superóxido dismutase (SOD2), a glutationa peroxidase 1 (GPx1) e a catalase (CAT). O gene *SOD2* possui o polimorfismo (SNP rs4880), onde há a substituição C>T na posição 47 do exón 2, ocorrendo troca do aminoácido valina por alanina na posição 16 da proteína, que vem sendo relacionado a menor eficiência do processo contra o estresse oxidativo, aumentando risco de câncer (MOHAMMEDI et al., 2014). Já a GPx1 é expressa principalmente nos eritrócitos e contém o polimorfismo (SNP rs1050450), onde há a substituição C>T na posição 599 do gene, ocorrendo troca do aminoácido prolina por leucina que diminui a atividade da enzima, podendo aumentar risco de câncer, porém os dados não são conclusivos (HIRAGI et al., 2010). O gene *CAT* apresenta um polimorfismo (SNP rs1001179), onde há a substituição C>T na posição 262 a partir do sítio do início de transcrição, o que parece resultar em menor atividade enzimática, aumentando risco de câncer (CHOI et al., 2007). Mais informações sobre as enzimas e seus polimorfismos podem ser encontradas na Tabela 1.

2. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a população de São Paulo consome grandes teores de carne, e que portanto, deve consumir altos teores de AH, o que vem sendo associado com estresse oxidativo e dano ao DNA em animais e *in vitro*. Entretanto, essa relação pode ser modificada por outros fatores como alimentação, estilo de vida, polimorfismos genéticos, entre outros. Assim é de fundamental importância para saúde pública estudar o consumo de aminas heterocíclicas na população de São Paulo, quais fatores

associados ao seu consumo, sua relação com estresse oxidativo e dano ao DNA, assim como sua relação com outros fatores que podem potencializar ou diminuir sua ação.

Tabela 1. Características de polimorfismos presentes nas enzimas que atuam no metabolismo das aminas heterocíclicas e estresse oxidativo.

Gene	dbSNP	Polimorfismo	Cromossomo	Localização	Mudança de aminoácido
<i>CYP1A2</i>	rs762551	163C>A	15	Intron	
<i>CYP1A1</i>	rs1048943	4889C>T	15	Exon	Ile462Val
<i>CYP1A2</i>	rs35694136	2467T>del	15	Promotora	
<i>CYP1B1</i>	rs10012	142C>G	2	Exon	Arg48Gly
<i>CYP1B1</i>	rs1056836	4326C>G	2	Exon	Leu432Val
<i>NAT2</i>	rs1799929	481C>T	8	Exon	Leu161Leu
<i>NAT2</i>	rs1208	803G>A	8	Exon	Arg268Lys
<i>NAT2</i>	rs1041983	282C>T	8	Exon	Tir94Tir
<i>NAT2</i>	rs1801280	341T>C	8	Exon	Ile114Thr
<i>NAT2</i>	rs1799931	857G>A	8	Exon	Gly286Glu
<i>NAT2</i>	rs1801279	191G>A	8	Exon	Arg64Gln
<i>NAT2</i>	rs1799930	590G>A	8	Exon	Arg197Gln
<i>NAT1</i>	rs4986782	560G>A	8	Exon	Arg187Gln
<i>NAT1</i>	rs5030839	559C>T	8	Exon	Arg187
<i>NAT1</i>	rs56379106	190C>T	8	Exon	Arg64Trp
<i>NAT1</i>	rs56318881	97C>T	8	Exon	Arg33
<i>NAT1</i>	rs6586714	2978A>G	8	Intron	
<i>SULT1A1</i>	rs9282861	638C>T	16	Exon	Arg213His
<i>UGT1A9</i>	rs3832043	127T>del	2	Intron	
<i>GSTA1</i>	rs3957357	135A>G	6	Promotora	
<i>SOD2</i>	rs4880	47T>C	6	Exon	Val16Ala
<i>GPx1</i>	rs1050450	599C>T	3	Exon	Pro200Leu
<i>CAT</i>	rs1001179	262C>T	11	Promotora	
<i>GSTP1</i>	rs1695	313A>G	11	Exon	Ile105Val

Fonte: <http://www.ensembl.org/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar a relação entre consumo de carne e aminas heterocíclicas com marcadores de peroxidação lipídica e adutos de DNA, considerando polimorfismos genéticos selecionados, fatores demográficos e de estilo de vida em residentes do

Município de São Paulo, participantes do Inquérito de Saúde de São Paulo ISA – Capital 2008/09.

3.2 Objetivos específicos

1. Estimar o consumo de aminas heterocíclicas e suas principais fontes de consumo em adultos e idosos residentes do município de São Paulo;
2. Verificar a relação entre o consumo de aminas heterocíclicas e biomarcadores de peroxidação lipídica e adutos de DNA;
3. Investigar se variantes polimórficas nos genes de enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação das aminas heterocíclicas¹ modificam a relação entre as aminas e os biomarcadores estudados, considerando fatores demográficos e de estilo de vida.

4. MÉTODOS

O presente estudo possui delineamento transversal, de base populacional, por meio de inquérito domiciliar e utilizou dados secundários de três projetos².

O ISA – Capital 2008/09 possui uma amostragem estratificada, por conglomerados, em dois estágios: setores censitários e domicílio. A amostra utilizada foi uma subamostra da PNAD 2006 realizada pelo IBGE no município de São Paulo. O tamanho amostral foi estimado em 4024 indivíduos de acordo com os oito domínios de idade e sexo: crianças menores de um ano; crianças de 1 a 11 anos; adolescentes;

¹ CYP1A1; CYP1A2; CYP1B1; SULT1A1; UGT1A9; GSTM1; GSTT1; GSTA1; GSTP1; NAT2; NAT1; SOD2; GPX1; CAT.

² “Homocisteina, polimorfismos do gene MTHFR, fatores dietéticos e risco cardiovascular: estudo de base populacional – ISA-Capital” financiado pelo CNPq, processo nº. 461176/2008-0, edital MCT/CNPq 14/2008, Universal e FAPESP nº 2009/15831-0.

“Associação entre os polimorfismos dos genes das enzimas GSTM1 e GSTT1, consumo de carnes, aminas heterocíclicas e seus efeitos sobre o estresse oxidativo em estudo de base populacional – ISA-Capital” financiado pelo CNPq, processo nº. 473778/2010.

“Consumo de carnes, frutas, verduras e legumes, relação com marcadores de estresse oxidativo e risco de doenças crônicas: estudo ISA – Capital” financiado pela FAPESP nº processo 2012/08702-1.

adultos e idosos de ambos os sexos. Devido a perdas por recusa, falecimento e mudanças de endereço, a amostra final totalizou em 3271 indivíduos, sendo 2691 adolescentes, adultos e idosos. A amostragem utilizada possibilita estimar uma prevalência de 0,5 com erro de 0,07, níveis de confiança de 95% e um efeito de delineamento de 1,5.

A primeira coleta de dados foi realizada entre 2008 e 2009. As informações foram obtidas nos domicílios, por meio de questionários aplicados por entrevistadores previamente treinados, respondidos pelos moradores sorteados. Foram coletadas variáveis demográficas, socioeconômicas, de estilo de vida (atividade física, pelo IPAQ longo, tabagismo e etilismo), morbidade referida, história familiar de doenças, uso de suplementos, medicamentos e foi aplicado um recordatório alimentar de 24 horas (R24h). Foi considerado que as informações fornecidas neste questionário se mantiveram as mesmas até o fim do estudo.

Na segunda coleta de dados, conduzida durante 2010 realizou-se novo inquérito dietético por telefone, que foi composto por uma repetição do R24h e pela aplicação de questionário com detalhamento sobre os métodos de cocção e graus de cozimento das carnes. Também foram aferidas as medidas antropométricas e coletada uma amostra de sangue venoso. Fatores de exclusão do estudo foram: estar gestante e mudar hábito alimentar no ano anterior ao inquérito.

Responderam ao inquérito dietético 1662 adolescentes, adultos e idosos. O presente estudo utilizou apenas adultos e idosos que possuem dados dietéticos e bioquímicos, totalizando 561 indivíduos. A grande perda de indivíduos se deu pela dificuldade de encontrar as pessoas no domicílio, agendar nova visita para coleta de sangue, além de perdas por recusa, falecimento e mudanças de endereço.

4.1 Consumo dietético

No presente estudo foi utilizado o segundo R24h e o questionário baseado em CANTWELL et al, (2004) com detalhamento sobre os métodos de cocção (frito, grelhado, assado, cozido ou no microondas) e graus de cozimento das carnes (mal passado, ao ponto, bem passado ou muito bem passado para carne de boi e passado, bem passado ou muito bem passado para frango e carne de porco). Para padronização na coleta de dados foi realizado treinamento dos entrevistadores, utilização de formulário padrão para aplicação do R24h e manual explicativo para o seu preenchimento.

Para obtenção do R24h utilizou o método AMPM (“Automated Multiple-Pass Method”) que visa manter o indivíduo interessado e engajado na entrevista, ajudando-o a se recordar de todos os itens consumidos e tornando os dados mais fidedignos (RAPER et al., 2004). O R24h aplicado por telefone acoplado ao software “Nutrition Data System for Research” (MOSHFEGH et al., 2008), que usa a base de dados da tabela de composição da USDA (NDSR, 2007). As coletas foram realizadas em todos os dias da semana e meses do ano, a fim de minimizar o viés de mudanças alimentares nos finais de semana e diferentes estações do ano.

Para quantificar o consumo de AH em ng/dia, foram utilizados o banco de dados do “Computerized Heterocyclic Amines Resource for Research in Epidemiology of Disease” (CHARRED).

4.2 Avaliação antropométrica

Para avaliação do peso corporal foi utilizada uma balança eletrônica do tipo plataforma, com capacidade para 150 kg, sensibilidade de 100 gramas, da marca

TANITA®. Os indivíduos foram pesados com roupas leves e descalços, foram posicionados em postura ereta, com os pés inteiramente compreendidos na plataforma da balança, de forma paralela, com braços ao longo do corpo e olhar no horizonte. Para a aferição da altura foi utilizado um estadiômetro com escala em milímetros, da marca Seca bodymeter 208®, fixado na parede. Estes dados foram coletados por profissionais de enfermagem previamente treinados. A partir destes dados, foi calculado o Índice de Massa Corporal (IMC) para avaliação do estado nutricional dos indivíduos conforme a equação: IMC = peso/(altura)². Os adultos foram classificados de acordo com os pontos de corte da WHO, (1997) e idosos segundo LIPSCHITZ, (1994).

4.3 Amostra de sangue

A coleta da amostra de sangue foi realizada no domicílio com agendamento prévio de acordo com a disponibilidade dos participantes por profissionais de enfermagem, utilizando materiais descartáveis e procedimentos padronizados. Os participantes foram orientados a realizar jejum de 12 horas. Foram coletados, aproximadamente, 20ml de material sanguíneo em tubos secos e com EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) por meio de punção venosa. Os tubos foram armazenados em isopor com gelo reciclável e transportados ao laboratório, onde foram centrifugados e processados em alíquotas de soro e plasma. Após a retirada das alíquotas de plasma de interesse dos tubos com EDTA, o material restante no tubo foi armazenado em refrigeração para o processo de extração do DNA. Todas as alíquotas de soro e plasma para as determinações bioquímicas posteriores foram congeladas a -80°C.

4.3.1 Extração do DNA e Genotipagem

A extração do DNA ocorreu no laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Legal, Ética Médica e Medicina Social e do Trabalho da Faculdade de Medicina da USP, sob responsabilidade da Profª Drª Gilka Jorge Figaro Gattás. Os procedimentos realizados seguiram o protocolo do laboratório que utiliza como metodologia padronizada a extração de DNA por sal em plasma (MILLER et al., 1988). Posteriormente, a quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do espectrofotômetro – Nanodrop®.

A partir de 5 ml de sangue periférico coletados em tubo com EDTA foi feita a lise de hemácias com tampão, seguida da homogeneização por inversão e refrigeração dos tubos em geladeira por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos. Logo depois eles foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C; desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se tampão de lise e homogeneizou-se os mesmos. Os tubos foram deixados em geladeira e centrifugados novamente, desprezando o sobrenadante e congelados. Em seguida, foi feita a lise de leucócitos com solução de lise a 10% e proteinase K. Os tubos foram colocados em banho maria a 60°C por 1 hora para se obter uma solução clara viscosa, indicativa de completa digestão com proteinase. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente com as mãos por 15 segundos e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 18°C. O sobrenadante contendo o DNA desproteinizado foi transferido para um tubo limpo e foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto gelado, invertendo o tubo diversas vezes até o DNA precipitar. O DNA precipitado foi retirado com uma ponteira de plástico, transferido para um microtubo contendo 1000uL etanol 70% e centrifugado a 6000rpm por 5 minutos a 4°C. Desprezou-se o etanol e procedeu a mesma lavagem por mais 2 vezes. Finalmente, desprezou-se o etanol e o

tudo foi deixado em lugar limpo e fresco para secar. Foi adicionado 100uL de TE (tampão tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0) para cada 1mL de sangue e o material foi congelado.

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada pela empresa *Helixxa Importação, Exportação e Serviços Genômicos* utilizando o sistema *Taqman Open Array (Life Technologies)*, que se baseia no método cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Os polimorfismos escolhidos para analisar são os com função conhecida ou sugerida das enzimas envolvidas no metabolismo de estresse oxidativo e das aminas heterocíclicas. São eles: *CYP1A1* (rs1048943), *CYP1A2* (rs762551, rs35694136), *CYP1B1* (rs1056836, rs10012), *NAT2* (rs1208, rs1041983, rs1799929, rs1801280, rs1799931, rs1799930, rs1801279), *NAT1* (rs4986782, rs5030839, rs56379106, rs56318881, rs6586714), *SULT1A1* (rs928286), *UGT1A9* (rs3832043), *SOD2* (rs4880), *CAT* (rs7943316), *GPx* (rs1050450), *GSTA1* (rs3957357), *GSTP1* (rs1695), *GSTM1* e *GSTT1* (presença ou ausência).

4.3.2 Determinações de malondialdeído e adutos de DNA

A determinação de malonaldeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, foi realizado no laboratório da Prof^a Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, e baseado no método proposto por BASTOS et al. (2012), que utiliza cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (HPLC-UV).

Este método consiste na reação de entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (TBA) em plasma dos indivíduos, que produz o composto MDA-TBA, determinado por HPLC-UV. Em 250 uL plasma dos indivíduos foram adicionados 1500 uL de solução de ácido

tricloroacético (7,2% e 1% de iodeto de potássio) na presença de antioxidante (36 uL de solução de BHT 0,2% de etanol e 12,5 uL de NaOH 10 N) para precipitar as proteínas. Logo após, houve a adição de 500 uL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 0,6% em água, seguida de incubação a 90° C por 45 minutos a fim de formar um complexo com o composto de interesse (TBA-MDA). Em seguida, foi feita a extração com 250 uL *n*-butanol, seguida da injeção em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de diodos modelo PDA-20AV, um injetor automático (Proeminence SIL-20AC), um forno de coluna (CTO-10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20^a e o software LC-Solution. O sistema de eluição foi feito com uma coluna Luna C18 (2) (150 × 4,6 mm, id 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) e um cartucho pré coluna C18 SecurityGuard (4,0 × 3,0 mm (Phenomenex) no modo isocrático com fase móvel preparada a partir de 35% de metanol grau HPLC e 65% de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) filtrado em filtro de membrana Millipore (0,22 µm) com fluxo de 1ml/min a 30° C. O detector de arranjo de diodo foi configurado para 532 nm para detecção do complexo MDA-TBA obtido na reação descrita acima.

Para quantificação do complexo nas amostras foi feita uma curva de calibração utilizando-se uma solução de MDA, proveniente de uma reação de bisdietilacetato de malonaldeído em H₂SO₄ 1%. A concentração da solução foi determinada medindo-se a absorbância a 245 nm contra um branco de H₂SO₄ 1%. A curva foi construída a partir de concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 7,5uM da solução da solução descrita acima. A curva foi submetida aos mesmos procedimentos detalhados acima para as amostras de plasma sanguíneo. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de cerca de 5% e os coeficientes de variação inter-ensaio foram de 16%.

Foi quantificado o aduto de DNA 8-OhdG em plasma de uma subamostra de adultos e idosos com alto e baixo consumo de aminas heterocíclicas (n=146) utilizando o kit *DNA damage ELISA (Enzo Life Sciences)*. Devido ao custo da análise, elegeu-se os grupos de maior e menor consumo de aminas heterocíclicas para permitir uma comparação.

Segundo o fabricante, o método utilizado possui sensibilidade de 0,59ng/ml (varia de 1,875 até 60ng/ml) e vem sendo usado em diversas matrizes como soro, saliva, urina, plasma, fluido seminal, extrato de DNA entre outros. O método foi escolhido por sua rapidez, por não exigir equipamentos caros, por ser válido e possuir grande número de poços para realizar a análise com diversas amostras de uma só vez.

Nos poços do kit foram adicionados 50µL das amostras e da curva padrão. Depois foram adicionados 50µL de anticorpo anti-8-OhdG para incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após a incubação os poços foram lavados seis vezes com 300µL de tampão de lavagem/poço. Foi adicionado 100µL de “anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate” e incubado por mais uma hora. Após a incubação os poços foram novamente lavados seis vezes com 300µL de tampão de lavagem/poço e adicionou-se 100µL de substrato TMB em cada poço e incubou-se por mais 15 minutos no escuro. Finalmente, foram adicionados 100µL da solução de parada e medida a absorbância a 450nm. A curva padrão foi plotada e calculado a concentração de 8-OhdG em cada amostra. Os coeficientes de variação intra-ensaio foram de cerca de 5% e os coeficientes de variação inter-ensaio foram de 11%.

Sabe-se que a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa é um método mais eficaz, com melhor sensibilidade e especificidade para determinação de adutos de DNA do que ensaios imunológicos, que não diferenciam 8-OhdG de

oligonucleotídeos contendo 8-OhdG, diminuindo a acurácia do método. Entretanto, a espectrometria de massa exige equipamentos de alto custo e pessoal treinado. Devido à falta destes recursos, optou-se por fazer a análise de dano do DNA em plasma via ELISA, uma vez que alguns artigos mostram uma correlação significativa entre os métodos (HU et al., 2004; YOSHIDA et al., 2002).

4.4. Forma de análises dos resultados

As estimativas de consumo habitual das AH e carnes foram realizadas de acordo com o método descrito no item *4.1 Consumo dietético*. A descrição dessas estimativas, juntamente com a descrição das concentrações plasmáticas de malondialdeído e adutos de DNA e das estimativas de prevalência dos polimorfismos, foram apresentadas por meio de medidas de tendência central e dispersão.

Utilizaram-se modelos de regressão múltipla linear e logística para verificar a associação entre consumo de AH e concentrações de malondialdeído e adutos de DNA. Os modelos foram ajustados por variáveis de confusão como: sexo, idade, ingestão de frutas e energia, IMC, atividade física e fumo. Foram testados termos de interação entre polimorfismos e AH por meio da adição de um termo multiplicativo destas variáveis nos modelos.

4.5. Aspectos éticos da pesquisa

O presente projeto e os estudos que originaram os dados para esta tese foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública/USP e foram elaborados respeitando os aspectos éticos e requisitos da resolução 196/96, garantindo a

confidencialidade dos dados. A participação foi voluntária, após assinatura do termo de consentimento esclarecido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão da presente tese são apresentados na forma de três manuscritos. O primeiro intitulado “High heterocyclic amines intake from meat is associated with oxidative stress”, publicado pela revista “British Journal of Nutrition”, o segundo intitulado “Joint association of fruit and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population” publicado pela revista “Nutrition” e terceiro intitulado: Interação entre consumo de aminas heterocíclicas e polimorfismo nos genes que codificam enzimas de detoxificação no estresse oxidativo, que será submetido a um periódico da área oportunamente.

5.1 Primeiro manuscrito

High heterocyclic amines intake from meat is associated with oxidative stress

Aline Martins de Carvalho, Andreia Miranda, Fabiana Almeida dos Santos, Ana Paula de Melo Loureiro, Regina Mara Fisberg, Dirce Maria Marchioni.

ABSTRACT

High meat intake has been related to chronic diseases, such as cancer and cardiovascular diseases. One hypothesis is that heterocyclic amines, which are formed during cooking process of meat, can generate reactive species. These compounds can cause oxidation of lipids, proteins, and DNA, resulting in oxidative stress, cell damage

and loss of biological function. This association has been seen in vitro, but it remains unclear in vivo. The aim of the study was to investigate the association between oxidative stress and heterocyclic amines intake, and oxidative stress and meat intake. Data were from Health Survey for Sao Paulo – ISA-Capital (561 adult and elderly). Food intake was estimated by one 24-hour dietary recall (24HR) complemented by a detailed food frequency questionnaire with preferences of cooking methods and level of doneness for meats. Heterocyclic amines intake was estimated linking the meats from the 24HR to a database of heterocyclic amines. Oxidative stress was estimated by malondialdehyde concentration in plasma, after derivatization with thiobarbituric acid and quantitation by HPLC/DAD. Analyses were performed using multivariate logistic regressions adjusted for smoking, sex, age, body mass index, skin color, energy intake, fruit and vegetable intake, and physical activity. A positive association between heterocyclic amines intake and the malondialdehyde concentration (OR=1.17 95% CI=1.01;1.38) was observed, showing that heterocyclic amines from meat may contribute to increase oxidative stress, and consequently, risk of chronic diseases.

Keywords: Meat, Heterocyclic amines, Oxidative stress

INTRODUCTION

Meat is an important food item for human nutrition ⁽¹⁾; however, excessive meat intake, especially red and processed meat, has been linked to chronic diseases ⁽²⁾ such as cardiovascular diseases (CVD) ⁽³⁾ and cancer ⁽⁴⁾. According to a recent systematic review and meta-analysis, involving more than 1 million people, the intake of 50g/day of processed meat increased the risk of CVD by 42%, and of diabetes by 19% ⁽³⁾.

Another meta-analysis⁽⁵⁾ reported that 110g/day of red meat was associated with a 27% increased risk of colorectal cancer and 50g/day of processed meat with a 29% increased risk of colorectal cancer. Other studies reported an association between red and processed meat and risk of cancer of the stomach⁽⁶⁾, esophagus^(7, 8) lung⁽⁹⁾ and other organs.

There are some reasons for meat to be linked to risk of chronic diseases, such as heterocyclic amines (HCAs) that are potentially carcinogenic substances, formed during the cooking process of meat (baking, frying, and barbequing)^(3,10), besides high saturated fat content, high cholesterol content, sodium and nitrates that are added to processed meats.

During HCA metabolism, reactive species are formed, especially by cytochrome P450, which can cause oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids, resulting in oxidative stress, cell damage and loss of biological function, thus increasing the risk of CVD and cancer^(4, 11, 12, 13).

The levels of HCA formed are highly dependent on the type of meat cooked, the method, the temperature, and the duration of cooking^(14, 15), ranging from 1 to 80 ng/g of meat for PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine), the most abundant HCA in the human diet, followed by MeIQx (2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline) with usual amounts up to 6 ng/g of meat and DiMeIQx (2-amino-3,4,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline) with amounts up to 1 ng/g of meat⁽¹⁶⁾.

Despite the proven genotoxicity in various organisms, such as bacteria, *Drosophila*, cells in vitro and experimental rodents in vivo, the data are inconsistent in humans because it is difficult to identify the specific cell damage caused by heterocyclic amines metabolism and to estimate HCA intake^(10, 17, 18, 19).

The aim of the present study was to investigate the association between HCA intake and oxidative stress, and the association between meat intake and oxidative stress.

EXPERIMENTAL METHODS

Study population and data collection

Data came from a representative, complex, multistage probability-based cross-sectional study titled Health Survey for Sao Paulo (ISA-Capital) conducted in Sao Paulo, Brazil in 2008 and 2009. This survey collected information on health, food intake, and lifestyle factors of the population of Sao Paulo city, an important financial and commercial center in Latin America, and the most populous city in Brazil with approximately 11 million inhabitants in 2008.

A two-stage cluster sampling was used: census tracts and household. In the first stage, the census tracts were drawn using probability of the number of households. In the second stage, the households were drawn using inverse probability of the number of households. The drawing was systematic, and six study domains were defined by age groups and sex: females and males aged 13 to 19 years old (adolescents), 20 to 59 years old (adults) and 60 years old or over (elderly). It was estimated that a minimum sample size of 300 in each of the six domains was needed based on a prevalence of 0.5 with a standard error of 0.07 at a 5% significance level and a design effect of 1.5. A total of 2,691 individuals were selected to answer questions about life conditions and socio-demographic information.

One year later, a new contact was attempted with the same 2,691 participants to new data collection (dietetic, biochemical, anthropometrical and socio-demographic information). After three tentative visits, made at different times (during weekdays and

weekends), and six tentative telephone contacts, 62% of the initial sample (1,662 individuals) agreed to participate. From that, 750 subjects (adolescents, adults and elderly) donated a blood sample. For the present study, only adults and elderly (n=561) were included.

Although the proportion of individuals who completed the study was similar by census tract and socio-demographic characteristics compared to the original sample, sampling weights were recalculated for each individual considering the sample design, non-response, and post-stratification adjustment for sex and age group, in order to equalize the socio-demographic features of the sample. The School of Public Health of the University of São Paulo Ethics Committee approved the project. An informed consent form was obtained from all participants.

Assessment of dietary intake

For the present study, dietary intake was estimated by one 24-hour dietary recall (24HR). It was collected over one year covering all weekdays, weekends and seasons⁽²⁰⁾, administered by telephone using the Automated Multiple Pass Method⁽²¹⁾. The telephone calls were made to the participant's home or their mobile phone. This method is structured in five steps: 1) quick list, that participants list all the foods and beverages consumed uninterruptedly; 2) forgotten list, that participants are asked about commonly forgotten foods consumed, such as candies, coffees and sodas; 3) time and location of food and beverage intake; 4) detailing cycle, that the way of preparation and amounts consumed are described; and 5) final review, that verifies whether a certain food consumed during the day was not previously recorded^(21, 22).

The household measures reported in 24HR were converted into grams and milliliters according to standard Brazilian references, which measured many foods using

a precision balance^(23, 24). Recipes were broken down into ingredients to estimate the amount of meat in each preparation.

Data from the 24HR were entered into the Nutrition Data System for Research – NDSR (version 5.0, 2007, Nutrition Coordinating Center at the University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA)⁽²⁵⁾ and were converted into energy and nutrients. The American database for the nutrition facts (energy, protein, carbohydrate and lipid) from the NDSR and the Brazilian nutrition facts database were compared. Only the foods from the NDSR that were similar (between 0.8 until 1.2 times) to Brazilian nutrition facts in terms of energy and macronutrients were considered.

Additionally, a detailed food frequency questionnaire (FFQ), based on FFQ developed and validated by Cantwell *et al.*⁽²⁶⁾, was administered to each participant, containing information regarding the frequency of consumption of each food item; meat cooking preference (pan-fried, grilled, boiled, baked, microwaved), and level of meat doneness preference (medium, well-done, very well-done for poultry and pork, and rare, medium, well-done, very well-done for beef).

The amount of meat intake was estimated by the 24HR. The preferences of cooking methods and degrees of cooking, collected in FFQ, were inputted in the 24HR to estimate the HCA intake. These data were linked to the Computerized Heterocyclic Amines Resource for Research in Epidemiology of Disease (CHARRED) database to estimate values of three HCA (PhIP, MeIQx, and DiMeIQx).

Biochemical marker

Blood samples were obtained by venipuncture after a 12-hour overnight fast by a nursing assistant. They were kept in a polystyrene box with ice packs and transported to

the laboratory for immediate centrifugation for 15 minutes at room temperature. After centrifugation, plasma samples were aliquoted and frozen at -80 °C until analysis.

The concentration of malondialdehyde (MDA) in plasma was determined after derivatization with thiobarbituric acid and quantitation by high-performance liquid chromatography/diode array (HPLC/DAD), as described by Bastos *et al.*⁽²⁷⁾ and Hong *et al.*⁽²⁸⁾. Internal tests revealed within-assay coefficient of variation around 5%, and between-assay coefficient of variation around 16%. The participants were divided into two groups based on the median of MDA concentration. The variable MDA was normally distributed, as determined by the Kolmogorov-Smirnov test.

Anthropometric measures

A trained research nurse measured body weight and height, using a standardized protocol. BMI was calculated by dividing weight (kilograms) by the square of height (meters). Nutritional status was determined based on body mass index (BMI), using the cut points proposed by WHO⁽²⁹⁾ for adults and Lipschitz⁽³⁰⁾ for elderly.

Statistical analysis

Multivariate logistic regression models were estimated to verify associations between the dependent variable (MDA concentration) and the following independent variables: meat intake (continuous variable); heterocyclic amines intake (continuous variable); PhIP intake (continuous variable); MeIQx intake (continuous variable); DiMeIQx intake (continuous variable). The first model was a crude model (without co-variables); the second model was adjusted for age (continuous variable) and sex (female, male); the third model was further adjusted for energy intake (continuous variable); smoking (yes, no); body mass index (healthy; overweight), skin color (white,

non-white), fruit and vegetable intake (continuous variable) and physical activity (active or not). Odds ratios (Ors) and 95% confidence intervals (Cis) were estimated.

In the stratified analysis, mean and 95% CI of MDA concentration were estimated according to cooking methods and doneness levels for each kind of meat studied.

Differences between means were analyzed using the Wald test, which calculates point estimates using F-statistics and considers the weights from complex samples. For categorical variables, the chi-square test was performed to compare the distribution of demographic characteristics. All analyses were conducted using the appropriate sample weights to account for the complex survey design. For all analyses, STATA® statistical software package version 10 was used and a $p<0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The sample was comprised of 39% men and 61% women; 52% adults and 48% elderly. The means and standard error of food intake and socio-demographic information are presented in Table 1. Participants were divided into two groups based on the median of MDA concentration.

The median MDA concentration was 0.71 $\mu\text{mol/L}$ (25^{th} percentile: 0.49 $\mu\text{mol/L}$; 75^{th} percentile: 0.92 $\mu\text{mol/L}$), and it was not different between sex, smoking, skin color and physical activity. Participants, who presented a MDA concentration above the median, consumed more HCA and PhIP than the below median participants. The same was not observed with DiMeIQx, MeIQx and meat intake (Table 1).

PhIP was the HCA most consumed, and beef was the meat most consumed (Table 1). Well-done was the doneness most cited among all meats and pan-fried was the cooking method most mentioned. Beef was the meat that contributed more to HCA amounts, followed by poultry and then pork (Table 2).

Participants who consumed grilled beef very well-done presented more MDA concentration than other participants (Table 3).

Table 4 shows the multivariate-adjusted Odds ratios for MDA > 0.71 μmol/L by total meat intake and kinds of HCA intake. Positive and significant relationships between total HCA intake and MDA, as PhIP intake and MDA ($p<0.05$) were observed. They remained significant after adjustment for smoking, sex, age, BMI, skin color, energy, fruit and vegetable intake, and physical activity. However, MeIQx, DiMeIQx and meat intake were not significant associated with MDA concentration.

DISCUSSION

This study presented positive relationships between MDA concentration and HCA and PhIP intake in a population-based study. It showed that MDA concentration in plasma can be increased by an intake of high total HCA and PhIP from meat, even after adjustment for sex, age, skin color, physical activity and intake of fruit, vegetable and energy, which can increase the risk of cardiovascular disease and cancer.

Many studies showed that HCA, especially PhIP, can produce reactive species and induce lipid peroxidation in vitro^(31, 32, 33). A recent study showed the relationship between PhIP intake and increased oxidative stress assessed by lipid peroxidation and protein oxidation in rats⁽³⁴⁾. Other studies presented that oxidative stress increases risk of chronic diseases^(35, 36).

A hypothesis to explain that relationship between HCA and MDA is the biotransformation of HCA, which is a complex process to facilitate the excretion of these molecules. However, during the metabolism, unstable products (reactive species) can be formed^(32, 37, 38). These reactive species have important biological functions, such as gene activation and participation in defense mechanisms, nevertheless, when overproduced, they may favor the oxidation of lipids, proteins, and nucleic acids, resulting in oxidative stress, cell damage and loss of biological function⁽³⁹⁾, increasing the risk of chronic diseases^(40, 41). MDA is the most used biomarker of lipid peroxidation and its levels have been positively related to cancer and cardiovascular diseases^(40, 42, 43).

The amount of HCA intake is variable worldwide. The HCA intake was lower in the EPIC study⁽¹⁶⁾ (69ng/day) and in Sweden⁽⁴⁴⁾ (160ng/day) than in Brazil. In the US, more than 25,000 people consumed a mean of 455 ng/day⁽⁴⁵⁾, similar to what was found in the present study.

Brazilians in particular are vastly exposed to these compounds because overcooked meat is a very popular food item⁽⁴⁶⁾. In Sao Paulo, meat intake is excessive; more than 70% of people consume above the national and international meat recommendations^(46, 47). However, meat intake was not significantly associated with oxidative stress in the present study.

We reported that participants who consumed grilled beef very well-done had higher MDA concentration than other participants, evidencing that very well-done grilled beef intake may have contributed to increase oxidative stress when compared with other doneness levels. This suggests that intake of beef prepared as above could

increase the exposure to a potentially harmful component of diet, supporting previous findings relating intake of red meat cooked at high temperature to colon cancer^(48, 49).

An important consideration is that there are many sources of oxidative stress, such as smoking, radiation exposure, medication use, mitochondrial respiratory chain function, food intake, physical activity besides heterocyclic amines intake. For this reason, we adjusted regression models for other variables that could also contribute to increased oxidative stress.

HCA and PhIP were reported to induce damage to other biological molecules, such as nucleic acids and proteins, leading to genetic damage and abnormal cell proliferation that may result in cancer^(34, 50, 51). Further studies exploring HCA intake and other early damage biomarkers, such as DNA adducts, are needed.

This study showed that the high intake of HCA and PhIP may contribute to increase oxidative stress independently of lifestyle factors, increasing risk of chronic diseases, such as cancer and cardiovascular diseases.

REFERENCES

1. Pereira PM e Vicente AF (2013) Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Sci* **93**(3), 586-592.
2. Daniel CR, Cross AJ, Koebnick C *et al.* (2011) Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutr* **14**, 575-583.
3. Micha R, Wallace SK, Mozaffarian D (2010) Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation* **121**, 2271-2283.
4. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research (2007) Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington DC: AICR.

5. Aune D, Chan DS, Vieira AR *et al.* (2013) Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control* **24**, 611-627.
6. Zhu H, Yang X, Zhang C *et al.* (2013) Red and Processed Meat Intake Is Associated with Higher Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiological Observational Studies. *PLoS ONE* **8**, e70955.
7. Choi Y, Song S, Song Y, Lee JE (2013) Consumption of red and processed meat and esophageal cancer risk: meta-analysis. *World J Gastroenterol* **19**, 1020-1029.
8. Salehi M, Moradi-Lakeh M, Salehi MH *et al.* (2013) Meat, fish, and esophageal cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Nutr Rev* **71**, 257-267.
9. Yang WS, Wong MY, Vogtmann E *et al.* (2012) Meat consumption and risk of lung cancer: evidence from observational studies. *Ann Oncol* **23**, 3163-3170.
10. Jägerstad M e Skog K (2005) Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res* **1**, 156-172.
11. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE (2008) Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* **60**(2), 131-144.
12. Ferguson LR (2010) Meat and cancer. *Meat Sci* **84**, 308-313.
13. Hu J, La Vecchia C, Morrison H *et al.* (2011) Salt, processed meat and the risk of cancer. *Eur J Cancer Prev* **20**: 132-139.
14. Knize MG, Dolbeare FA, Carroll KL *et al.* (1994) Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem Toxicol* **32**, 595-603.
15. Skog K, Steineck G, Augustsson K *et al.* (1995) Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis* **16**, 861-867.
16. Rohrmann S, Zoller D, Hermann S *et al.* (2007) Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort. *Br J Nutr* **98**(6), 1112-1115.
17. Gunter MJ, Probst-Hensch NM, Cortessis VK *et al.* (2005) Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis* **26**(3), 637-642.

18. Alaejos MS, Gonzalez V, Afonso AM (2008) Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **25**(1), 2-24.
19. Ollberding NJ, Wilkens LR, Henderson BE *et al.* (2012) Meat consumption, heterocyclic amines and colorectal cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Int J Cancer* **131**(7), E1125–1133.
20. Thompson FE e Byers T (1994) Dietary assessment resource manual. *J Nutr* **124**, 224S-2317S.
21. Dwyer J, Picciano MF, Raiten DJ (2003) Future directions for the integrated CSFII-NHANES: What we eat in America-NHANES. *J Nutr* **133**, 576S-581S.
22. Raper N, Perloff B, Ingwersen L *et al.* (2004) An overview of USDA's dietary intake data system. *J Food Compos Analysis* **17**, 545-555.
23. Pinheiro ABV, Lacerda EMA, Benzecri EH *et al.* (2000) Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras. São Paulo: Ed. Atheneu.
24. Fisberg RM e Villar BS (2002) Manual de receitas e Medidas caseiras para Cálculo de Inquéritos Alimentares: manual elaborado para auxiliar o processamento de inquéritos alimentares. São Paulo: Signus.
25. NDSR (2005) Nutrition Data System for Research. Version 2005. Minneapolis: University of de Minnesota.
26. Cantwell M, Mittl B, Curtin J *et al.* (2004) Relative Validity of a Food Frequency Questionnaire with a Meat-Cooking and Heterocyclic Amine Module. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**, 293-298.
27. Bastos AS, Loureiro APM, Oliveira TF *et al.* (2012) Quantitation of malonaldehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid-chromatography-based method. *Analytical Biochemistry* **423**, 141-146.
28. Hong YL, Yeh SL, Chang CY *et al.* (2000) Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem* **33**, 619–625.
29. World Health Organization (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a World Health Organization Consultation. WHO Obesity Technical Report Series no. 284. Geneva: WHO.

30. Lipschitz DA (1994) Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care* **21**(1), 55-67.
31. Maeda H, Sato K, Akaike T (1995) Superoxide radical generation from heterocyclic amines. *Princess Takamatsu Symp* **23**, 103-112.
32. Maeda H, Sawa T, Yubisui T *et al.* (1999) Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH. *Cancer Lett* **1**; 143(2), 117-121.
33. Li R, Li W, Xie J *et al.* (2012) Lipid peroxidation in different tissues of rats treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Wei Sheng Yan Jiu* **41**(1), 102-105.
34. Li R, Tian J, Li W *et al.* (2013) Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) on histopathology, oxidative stress, and expression of c-fos, c-jun and p16 in rat stomachs. *Food Chem Toxicol* **55**, 182-191.
35. Stocker R e Keaney JF Jr (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* **84**, 1381–1478.
36. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R *et al.* (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* **52**(4), 601-623.
37. Felton JS e Malfatti MA (2006) What do diet-induced changes in phase I and II enzymes tell us about prevention from exposure to heterocyclic amines? *J Nutr* **136**, 2683S-2684S.
38. Turesky RJ e Le Marchand L (2011) Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol* **24**, 1169-1214.
39. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG *et al.* (2010) Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev Nutr* **23**, 629–643.
40. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P *et al.* (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* **711**, 193–201.
41. Vassalle C, Bianchi S, Bianchi F *et al.* (2012) Oxidative stress as a predictor of cardiovascular events in coronary artery disease patients. *Clin Chem Lab Med* **50**, 1463–1468.
42. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF *et al.* (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue

- humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova* **30**, 1323-1338.
43. Perse M (2013) Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: cause or consequence? *Biomed Res Int* 1-9.
 44. Augustsson K, Skog K, Jagerstad M *et al.* (1997) Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* **18**, 1931–1935.
 45. Bogen KT e Keating GA (2001) US dietary exposures to heterocyclic amines. *J Expo Anal Environ Epidemiol* **11**, 155–168.
 46. Carvalho AM, Cesar CLG, Fisberg RM *et al.* (2013) Meat consumption in São Paulo Excessive meat consumption in Brazil: diet quality and environmental impacts. *Public Health Nutrition* **16**, 1893-1899.
 47. Carvalho AM, Cesar CLG, Fisberg RM *et al.* (2014) Meat consumption in São Paulo – Brazil: trend in the last decade. *Plos One* **9**, e96667-e96667.
 48. World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research (2010) Systematic Literature Review Continuous Update Project Report: The Associations between Food, Nutrition and Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer. Washington DC: AICR.
 49. Sinha R, Peters U, Cross AJ *et al.* (2005) Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma. *Cancer Res* **65**, 8034-8041.
 50. Schraufstätter I, Hyslop PA, Jackson JH *et al.* (1988) Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest* **82**, 1040–1050.
 51. Lin DX, Kaderlik KR, Turesky RJ *et al.* (1992) Identification of N-(deoxy-guanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b] pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine, with DNA. *Chem Res Toxicol* **5**, 691–697.

Table 1. Descriptive characteristics of participants in ISA-Capital study.

	Mda<0.71μmol/L	mda>0.71μmol/L	p value*	
	Mean (SE)	Mean (SE)	Mean (SE)	
Energy intake (kcal/day)	1689 (56.8)	1625 (63.7)	1749 (99.6)	0.30
HCA intake (ng/day)	436.8 (45.6)	329.8 (43.4)	503.8 (61.3)	0.01
Total PhIP (ng/day)	324.3 (36.2)	233.9 (33.7)	385.3 (50.3)	0.01
Total MeIQx (ng/day)	102.7 (13.0)	87.6 (12.9)	108.1 (19.1)	0.33
Total DiMeIQx (ng/day)	9.8 (1.5)	8.3 (1.6)	10.3 (2.3)	0.45
Energy adjusted HCA intake (ng/1,000 kcal)	258.6 (26.0)	209.9 (27.0)	287.8 (34.9)	0.04
Energy adjusted PhIP intake (ng/1,000 kcal)	194.0 (21.0)	146.8 (19.0)	226.4 (30.3)	0.01
Energy adjusted MeIQx intake (ng/1,000 kcal)	59.0 (6.9)	57.6 (9.4)	56.1 (8.1)	0.89
Energy adjusted DiMeIQx intake (ng/1,000 kcal)	5.6 (0.8)	5.7 (1.1)	5.6 (0.9)	0.97
Total meat (g/day)	135.1 (7.1)	123.7 (10.2)	144.0 (9.8)	0.16
Beef intake (g/day)	64.8 (6.3)	66.8 (8.7)	62.5 (7.6)	0.68
Poultry intake (g/day)	33.2 (4.0)	26.2 (4.9)	36.9 (4.9)	0.11
Pork intake (g/day)	23.3 (4.3)	18.5 (2.5)	28.7 (7.5)	0.15
Processed meat intake (g/day)	23.4 (3.2)	24.2 (3.1)	22.6 (5.4)	0.80
Fruit and vegetable (g/day)	189.2 (16.1)	177.1 (17.2)	199.1 (22.4)	0.32
Malondialdehyde (μmol/L)	0.72 (0.02)	0.48 (0.02)	0.96 (0.02)	<0.01
Age	46.1 (1.2)	44.3 (1.5)	47.8 (1.3)	0.03
Body mass index	26.5 (0.3)	25.4 (0.4)	27.5 (0.4)	<0.01
Sex (% of men)	39.1	34.0	44.1	0.12
Smoking (%)	23.0	22.9	23.1	0.97
Skin color (% of eter)	60.6	43.4	36.7	0.25
Physical activity (% of active)	21.6	23.4	20.4	0.58

* Chi-square for categorical variables; Wald-test for continuous variables.

PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline; DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline

Table 2. Cooking methods, doneness level preferences and heterocyclic amines (HCA) intake in ISA-Capital Study.

Doneness level		Cooking methods		Heterocyclic Amines	
Beef	%	Beef	%	Beef	Mean (SE)
Rare	5.2	Boiled	37.8	MeQIx	74.3 (9.9)
Medium	27.4	Pan-fried	41.0	PhIP	201.5 (29.0)
Well done	57.5	Baked	6.7	DiMeQIx	7.0 (1.3)
Very well done	9.9	Grilled	14.5	Total HCA	282.9 (38.9)
		Microwaved	*		
Pork	%	Pork	%	Pork	Mean (SE)
Medium	18.6	Boiled	17.0	MeQIx	22.3 (8.0)
Well done	65.0	Pan-fried	59.9	PhIP	0
Very well done	16.4	Baked	17.4	DiMeQIx	2.0 (0.6)
		Grilled	5.6	Total HCA	24.3 (8.6)
		Microwaved	0.1		
Poultry	%	Poultry	%	Poultry	Mean (SE)
Medium	8.6	Boiled	29.4	MeQIx	6.2 (1.3)
Well done	60.0	Pan-fried	38.1	PhIP	122.5 (17.2)
Very well done	31.4	Baked	17.1	DiMeQIx	0.8 (0.1)
		Grilled	15.4	Total HCA	129.7 (18.3)
		Microwaved	*		

*No one reported meat intake in the specific cooking method

PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline; DiMeIQx:2-amino-3,4,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline

Table 3. Mean and 95% CI of MDA concentration level by cooking methods and doneness levels for each meat intake in ISA-Capital Study.

Doneness levels	Cooking methods	MDA mean ($\mu\text{mol/L/day}$)					
		Beef		Pork		Poultry	
		Mean	95% CI	Mean	95% CI	Mean	95% CI
rare	boiled	0.73	0.53; 0.92				
	baked	0.66	0.47; 0.85				
	grilled	*	*				
	pan fried	0.66	0.47; 0.85				
	microwaved	*	*				
done	boiled	0.75	0.65; 0.85	0.67	0.52; 0.81	0.60	0.45; 0.74
	baked	0.80	0.64; 0.97	0.74	0.34; 1.13	0.58	0.27; 0.88
	grilled	0.76	0.60; 0.92	*	*	0.80	0.59; 1.01
	pan fried	0.67	0.58; 0.76	0.58	0.41; 0.74	0.82	0.61; 0.76
	microwaved	*	*	*	*	*	*
well-done	boiled	0.73	0.66; 0.80	0.84	0.73; 0.94	0.75	0.68; 0.82
	baked	0.60	0.40; 0.80	0.72	0.63; 0.81	0.77	0.65; 0.89
	grilled	0.83	0.67; 0.99	0.66	0.32; 0.99	0.80	0.69; 0.91
	pan fried	0.71	0.62; 0.80	0.68	0.62; 0.75	0.73	0.65; 0.92
	microwaved	*	*	*	*	*	*
very well- done	boiled	0.73	0.45; 1.00	0.95	0.63; 1.26	0.71	0.56; 0.86
	baked	0.66	0.43; 0.89	0.72	0.57; 0.86	0.51	0.34; 0.68
	grilled	1.83	1.36; 2.30	0.70	0.07; 1.32	1.00	0.69; 1.30
	pan fried	0.68	0.54; 0.82	0.66	0.57; 0.75	0.64	0.57; 0.70
	microwaved	*	*	*	*	*	*

*Less than two participants reported meat intake in the specific cooking method and doneness level

Table 4. Association between MDA concentration levels (above and below 0.71 $\mu\text{mol/L}$) and kinds of HCA and meat intake in ISA-Capital Study

	Model 1		Model 2		Model 3	
	OR (CI95%)	p-value	OR (CI95%)	p-value	OR (CI95%)	p-value
Meat intake (100g)	1.00 (0.99; 1.00)	0.20	1.00 (0.99; 1.00)	0.25	1.00 (0.99; 1.00)	0.51
HCA intake (500ng)	1.18 (1.03; 1.35)	0.02	1.18 (1.02; 1.36)	0.03	1.17 (1.01; 1.38)	0.04
PhIP intake (500ng)	1.26 (1.05; 1.50)	0.01	1.26 (1.04; 1.52)	0.02	1.26 (1.04; 1.53)	0.02
MeIQx intake (100ng)	1.05 (0.95; 1.17)	0.31	1.05 (0.94; 1.16)	0.40	1.05 (0.93; 1.17)	0.45
DiMeIQx intake (1ng)	1.00 (0.99; 1.01)	0.42	1.00 (0.99; 1.01)	0.52	1.00 (0.99; 1.01)	0.55

Model 1: Crude model. Model 2: Adjusted for age and sex. Model 3: Adjusted for age, sex, smoking, BMI, energy intake, fruit and vegetable intake, skin color, and physical activity.

PhIP: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine; MeIQx: 2-amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline; DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-dimethylimidazo [4,5-f]quinoxaline

5.2 Segundo manuscrito

Joint association of fruit and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population

Aline Martins de Carvalho, Antonio Augusto Ferreira Carioca, Regina Mara Fisberg, Lu Qi, Dirce Maria Marchioni.

ABSTRACT

Objective: To assess joint effects of heterocyclic amine (HCA), fruit, and vegetable intake on DNA damage in a general population.

Research Methods e Procedures: A cross-sectional survey (ISA-Capital) was performed among adults and older adults in Brazil. We selected 73 participants with high HCA intake and 73 gender-and-age-matched participants from non-HCA intake ($n = 146$) for the present study. Diet was assessed by a 24-hour dietary recall and a structured questionnaire with cooking methods and levels of meat doneness. DNA damage was measured by 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OhdG). The association between DNA damage and dietary intake was analyzed by linear regression models.

Results: Fruit intake showed significantly inverse association with 8-OhdG ($\beta, -0.787$; $P = 0.035$), while HCA intake was significantly associated with increased DNA damage ($\beta, 1.621$; $P = 0.036$) after adjustment for covariates including sex, age, body mass index, energy intake, smoking, physical activity, and C-reactive protein. Vegetable intake were not significantly associated with 8-OhdG. We also found a significant association between combination of fruit and HCA intake on DNA damage, the difference in 8-OhdG levels between participants with the lowest fruit intake and

highest HCA intake was significantly higher than those with the highest fruit intake and non-HCA intake ($P = 0.049$).

Conclusions: Lower intake of fruit and higher intake of HCA were associated with higher DNA damage levels, and showed an additive effect pattern.

KEYWORDS: Fruit; heterocyclic amines; DNA damage; risk of cancer; DNA adducts.

INTRODUCTION

There is consistent evidence that high meat intake, especially red and processed meat, confers an increased risk of cancer, particularly colon and rectal cancer [1]. High iron content, high saturated fat content, sodium and nitrates added in processed meat have been proposed as potential factors linking to elevated cancer risk. In addition, heterocyclic amines (HCA), which are mainly formed during the process of cooking meat, are also potential carcinogenic substances [1–3], with more mutagenic activity than other well-known compounds such as benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 [4,5]. HCA is mainly formed during baking, frying, and grilling meat, varying according to temperature, type of meat, and duration of cooking [6,7]. High HCA has been associated with an increased risk of cancer in vitro studies [8,9], in vivo studies [4,10,11], and in humans [12–14].

Intake of fruit and vegetables (FV) has shown protective effect on cancer [15–17], probably due to phytochemicals (carotenoids, vitamin C, vitamin E, flavonoids, isothiocyanates, and glucosinolates) that inhibit the genotoxic action of food-borne carcinogens, decreasing the risk of cancer. Previous studies have reported several phytochemicals from fruit and vegetables could decrease the toxicity of HCA, in vitro and in vivo [16,18–20].

Diet is a complex exposure, and a single food product intake or an individual compound cannot reflect the overall risk or protection against diseases, including cancer. Previous studies reported that intake of meat can increase the risk of cancer, and fruit and vegetable intake can prevent against cancer [17,21]; however no study has analyzed the joint effect of HCA with fruit and vegetable intake on biomarkers related to risk of cancer in a general population. In this study, we assessed the association of HCA, fruit, and vegetables, individually and jointly, with a marker of DNA damage.

MATERIAL AND METHODS

Study population and data collection

The Health Survey of Sao Paulo (ISA–Capital), a cross-sectional representative survey, was conducted in Sao Paulo, Brazil in 2008 and 2009 with a multistage probability-based sample based on census tracts and households that have already drawn in the PNAD 2005 (National Household Sample Survey 2005).

In 2008, we collected information on lifestyle, socio demographic, and health status from 1100 adults (20-89 years). One year later, 45% of participants (n=500) refused to continue participating, or changed their address/telephone, or could not be located at home, even after three visits made at different times (during weekdays and weekends). Thus, we collected dietetic, anthropometric and socio information from 600 participants, and 561 donated a blood sample and completed the survey.

According to previous studies, only high HCA intake could contribute to increase in cancer risk [22]. Thus, the sample population (n = 561) was divided into five quintiles by HCA intake, and we selected 73 participants from the fifth quintile (with

the highest HCA intake – mean: 1537 ng/day), and 73 gender-and-age-matched participants from the first quintile part (who presented non-HCA intake – mean: 0ng/day). Due to the wide range in the fifth quintile of HCA intake (632 ng to 5421ng/day), we also divide it by the median. The final sample consisted of 146 participants (**Supplementary Figure 1**).

Despite participants having not been diagnosed with cancer or other diseases, other factors (age, smoking) can also increase DNA damage. Thus, we attempted to minimize this bias using final models adjusted for age, smoking, and C-reactive-protein, which is a biomarker of inflammation and can be related to cardiovascular disease and oxidative stress [23].

The School of Public Health of the University of São Paulo Ethics Committee approved the project. Written informed consent was obtained from all participants.

Assessment of dietary intake

Meat and fruit intake was assessed by a 24-hour dietary recall (24HR), administered by telephone using the Automated Multiple Pass Method [24].

A detailed qualitative food frequency questionnaire (FFQ), based on a FFQ developed and validated by Cantwell et al. [25], was also completed by each participant, containing information regarding the cooking preference for meat (pan-fried, grilled, boiled, baked, microwaved), and the preference for levels of meat doneness (rare, medium, well-done, very well-done for beef; and medium, well-done, very well-done for poultry and pork).

The preferences of cooking methods and degrees of cooking, collected in the qualitative FFQ, were inputted in the 24HR and linked to the Computerized Heterocyclic Amines Resource for Research in Epidemiology of Disease (CHARRED) database to estimate values of total HCA and three kinds of HCA: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP); 2-amino-3, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (MeIQx); 2-amino-3, 4, 8-dimethylimidazo [4, 5-f] quinoxaline (DiMeIQx). CHARRED is a software application developed by Division of Cancer Epidemiology e Genetics from National Cancer Institute and it is used to estimate intake of the mutagenic compounds in cooked meats, considering three kinds of meat (beef, pork, and chicken), cooking methods (boiled, pan-fried, baked, grilled, and microwaved), and doneness level (medium, well-done, very well-done, and very well-done).

Biochemical marker

Blood samples were obtained at participants' homes during the second study visit at 2009 by venipuncture after a 12-hour overnight fast and transported to the laboratory in a polystyrene box with ice packs for centrifugation; plasma and serum samples were aliquoted and stored at -80°C until analysis. DNA damage was measured by 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OhdG) in plasma using a competitive ELISA kit (EIA DNA Damage, Enzo Life Sciences, Inc). High sensitivity C-reactive protein concentration (CRP) was measured by IMMAGE® assay (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, USA, cat no 474630).

Anthropometric measures

Body weight and height were measured using the standardized protocol by an assistant nurse using a calibrated scale and portable stadiometer brought by the health professional. Body mass index (BMI) was calculated by dividing weight (kilograms) by height squared (meters).

Statistical analysis

Demographic, lifestyle, biochemical and diet intake variables were described as means for continuous variables and percentages for categorical variables for each population and according to HCA intake groups: 73 participants with non-HCA intake (mean: 0ng/day), 37 participants with high HCA intake (mean: 908ng/day), and 36 participants with very high HCA intake (mean 2183ng/day) (**Supplementary Figure 1**).

Association between fruit and vegetable intake and DNA damage

General linear regression models were used to examine associations between 8-OhdG concentration and the following continuous variables: fruit intake; vegetable intake; combination of fruit and vegetable intake. The general models were presented as follows: a crude first model was used without covariates; a second model was adjusted for age, sex, and BMI; a third model was further adjusted for energy intake, smoking, physical activity, and CRP.

Association between HCA intake and DNA damage

General linear regression models were estimated to verify associations between 8-OhdG concentration and HCA intake in three groups (non-HCA intake, high HCA intake, and very high HCA intake). The general models were presented as follows: a crude first model was used without covariates; a second model was adjusted for age,

sex, and BMI; a third model was further adjusted for energy intake, smoking, physical activity, CRP, and fruit intake.

Jointly association between HCA, fruit, and vegetable intake on DNA damage

The joint effect between HCA with fruit and vegetable (FV) intake on DNA damage was examined by general linear regression models between 8-OhdG and combination of intake of HCA and FV adjusted for age, sex, BMI, energy intake, smoking, physical activity, and CRP.

Participants were divided by FV intake median in: lowest FV intake and highest FV intake. They were also divided by HCA intake median in non-HCA intake, and highest HCA intake.

Jointly association between HCA and fruit intake on DNA damage

The joint effect between HCA with fruit intake on DNA damage was examined by general linear regression models between 8-OhdG and combination of intake of HCA and fruit adjusted for age, sex, BMI, energy intake, smoking, physical activity, and CRP.

Participants were divided by fruit intake median in: lowest fruit intake, and highest fruit intake, and they were also divided by HCA intake median in non-HCA intake, and highest HCA intake.

All statistical analyses were conducted using the STATA package (Stata statistical software: release 10, StataCorp 2011, College Station, TX, USA), and a $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The sample population comprised 50% men and women and mean age was 51 years. **Table 1** shows food intake, biochemical and socio-demographic characteristics of participants according to HCA intake. The mean energy intake was 1694 kcal/day and the mean fruit and vegetable intake was 199 g/day.

Fruit intake was significantly associated with DNA damage after adjustment for age, sex, BMI, physical activity, CRP, smoking, and energy intake ($P = 0.035$). For each 100 g of fruit intake, the levels of 8-OhdG decreased in 0.79 ng/mL. However, vegetable intake and the combination of fruit and vegetable intake were not significantly associated with 8-OhdG ($P > 0.05$) (**Table 2**).

After adjustment for age, sex, BMI, physical activity, CRP, smoking, and intake of energy and fruit, a significant relationship between 8-OhdG levels and HCA intake was observed ($P = 0.036$). For each change in HCA intake group (non-HCA intake to high HCA intake to very high HCA intake), the 8-OhdG levels increased by 1.62ng/mL (Table 2).

We then analyzed the joint association of HCA and fruit and vegetable, and between HCA and fruit intake with 8-OhdG. We found a significant trend in 8-OhdG levels from participants with the highest fruit intake and non-HCA intake group to participants with lowest fruit intake and highest-HCA intake ($P = 0.049$); however the joint HCA, fruit, and vegetable intake was not significant ($P > 0.05$) (**Figure 1**).

DISCUSSION

In the current study, we found that fruit intake was associated with reduced levels of DNA damage, and higher HCA intake was related to increased levels of DNA damage. In addition, we reported an additive effect of low fruit with high HCA intake on DNA damage levels.

Evidence has shown that phytochemicals in fruit and vegetables could decrease DNA damage by inhibiting DNA oxidation [14,18,27–30]. Our study found that intake of fruit, but not vegetable, was inversely related to DNA damage. Most of the vegetables consumed in Brazil are cooked, and the high temperatures can decrease the phytochemical concentrations [31,32] and the capacity for protection against oxidation. This may partly explain the discrepancy between our findings and previous studies.

The levels of HCA formed during the meat cooking are dependent on the type of meat, the cooking method, the duration and temperature of cooking [6,7]. Ni et al., (2008) quantified HCA amounts in different kinds of meat and cooking conditions, and reported that very well done barbecued chicken, and broiled/fried bacon presented the highest amounts of HCA [33].

In a previous study, people who consumed high amounts of very well done grilled beef had higher HCA intake and oxidative stress levels than other participants [34]. This can be explained, because HCA are metabolized especially in the liver, by a complex process with detoxification enzymes to facilitate their excretion by urine. However, during this metabolism, reactive species can be formed and they can bind nucleic acids, lipids, and protein, resulting in oxidative stress [35] and DNA adducts, increasing risk of cancer [2,3,36–38].

HCA have been linked to DNA damage, due to high mutagenic potential, especially in vitro bacterial tests [5,35,39,40]. Studies have shown that HCA also induce tumors in multiple organs including the liver, lungs, stomach, colon, prostate, and mammary glands in animals, such as rodents and non-human primates [4,39]. In addition, PhIP, the most abundant HCA, was related to lymphomas in mice, adenocarcinomas of the intestine, and mammary adenocarcinomas in rats [11,41]. Epidemiologic studies have suggested that high HCA intake might increase risk of cancers, such as colon and rectal cancer among humans [22,42–47]. Consistent with these observations, we found that participants who consumed higher intake of HCA presented higher 8-OhdG than those who did not consume.

Several other studies also reported HCA, especially PhIP, was capable of increasing 8-OhdG levels in the rat tissue *in vivo* [37,48–50]. 8-OhdG is a common DNA adduct produced by the reactive oxygen species, and present at high levels in human and other animal tumors [51]. Even though 8-OhdG is a promutagenic DNA lesion [50,52–54], it is not sufficient for cancer development [51].

Several antioxidants have been also reported to inhibit HCA carcinogenicity [19,55], PhIP mutagenicity [16], and to decrease 8-OhdG levels in rats and humans [56,57]. Fruit juices, such as sweet cherry, kiwi, plum, blueberry, watermelon, blackberry, strawberry, black currant, and ‘red delicious’ apple have exhibited an inhibitory effect on HCA genotoxicity in cells, possibly by inhibition of activating cytochrome P450 enzymes or other unknown enzymatic mechanisms [20]. Similar to these observations, we found that fruit intake might contribute to inhibit reactive oxygen species from HCA metabolism in a general population.

This study had some limitations such as small sample size, cross-sectional design and the use of a general biomarker of DNA damage instead a specific HCA-DNA adduct. However, this is the first study associating the separate and the joint effect of HCA and fruit intake on DNA damage in a general population. Our findings may contribute to clarifying a possible pathway relating HCA and fruit with DNA damage.

CONCLUSIONS

The present study reported that lower intake of fruit and higher intake of HCA were associated with higher DNA damage levels, separately and in an additive pattern. Our data suggest that elaboration of campaigns to reduce meat intake, specially grilled meat intake, and increase fruit intake may potentially lower cancer risk in countries with high meat intake.

REFERENCES

- [1] World Cancer Research Fund AI for CR. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washingt DC AICR 2007.
- [2] Hu J, La Vecchia C, Morrison H, Negri E, Mery L. Salt, processed meat and the risk of cancer. Eur J Cancer Prev 2011;20:132–9.
- [3] Ferguson LR. Meat and cancer. Meat Sci 2010;84:308–13.
- [4] Jägerstad M, Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods. Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen 2005; 574:156–72.
- [5] Alaejos MS, Gonzalez V, Afonso AM. Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: A review. Food Addit Contam 2008;25:2–24.
- [6] Knize MG, Dolbeare F a, Carroll KL, Moore DH, Felton JS. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. Food Chem Toxicol 1994;32:595–603.
- [7] Skog K, Steineck G, Augustsson K, Jägerstad M. Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. Carcinogenesis 1995;16:861–7.

- [8] Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA. Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines. *Mutat Res – Fundam Mol Mech Mutagen* 2007;616:90–4.
- [9] Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci* 2004;95:290–9.
- [10] Marques C, Valente TB. Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e as possíveis eterocíclica para o organismo humano Toxin formation during food processing and. *Rev Nutr* 2009;22:283–93.
- [11] Gooderham NJ, Zhu H, Lauber S, Boyce A, Creton S. Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat Res* 2002;506-507:91–9.
- [12] Rohrmann S, Lukas Jung S-U, Linseisen J, Pfau W. Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue. *Mutagenesis* 2009;24:127–32.
- [13] Stolzenberg-Solomon RZ, Cross AJ, Silverman DT, Schairer C, Thompson FE, Kipnis V, et al. Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:2664–75.
- [14] Li D, Day RS, Bondy ML, Sinha R, Nguyen NT, Evans DB, et al. Dietary mutagen exposure and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:655–61.
- [15] Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992;18:1–29.
- [16] Weisburger JH, Dolan L, Pittman B. Inhibition of PhIP mutagenicity by caffeine, lycopene, daidzein, and genistein. *Mutat Res – Genet Toxicol Environ Mutagen* 1998;416:125–8.
- [17] Kapiszewska M. A vegetable to meat consumption ratio as a relevant factor determining cancer preventive diet: The Mediterranean versus other European countries. *Forum Nutr* 2006;59:130–53.
- [18] Schwab CE, Huber WW, Parzefall W, Hietsch G, Kassie F, Schulte-Hermann R, et al. Search for compounds that inhibit the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Crit Rev Toxicol* 2000;30:1–69.
- [19] Shishu, Kaur IP. Antimutagenicity of curcumin and related compounds against genotoxic heterocyclic amines from cooked food: The structural requirement. *Food Chem* 2008;111:573–9.

- [20] Platt KL, Edenharder R, Aderhold S, Muckel E, Glatt H. Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells. *Mutat Res* 2010; 703:90-8.
- [21] Marchioni DM, Fisberg RM, Francisco de Gois Filho J, Kowalski LP, Brasilino de Carvalho M, Abrahao M, et al. Dietary patterns and risk of oral cancer: a case-control study in Sao Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica* 2007;41:19–26.
- [22] Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Dickman PW, Steineck G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: A population-based study. *Lancet* 1999;353:703–7.
- [23] Noren Hooten N, Ejigu N, Zonderman a. B, Evans MK. Association of Oxidative DNA Damage and C-Reactive Protein in Women at Risk for Cardiovascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:2776–84.
- [24] Dwyer J, Picciano MF, Raiten DJ. Future directions for the integrated CSFII-NHANES: What We Eat in America-NHANES. *J Nutr* 2003;133:576S–81S.
- [25] Cantwell M, Mittl B, Curtin J, Carroll R, Potischman N, Caporaso N, et al. Relative Validity of a Food Frequency Questionnaire with a Meat-Cooking and Heterocyclic Amine Module. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:293–8.
- [26] Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care* 1994;21:55–67.
- [27] Knize MG, Kulp KS, Salmon CP, Keating G a, Felton JS. Factors affecting human heterocyclic amine intake and the metabolism of PhIP. *Mutat Res* 2002;506-507:153–62.
- [28] Møller P, Loft S. Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2002;76:303–10.
- [29] Møller P, Loft S. Interventions with antioxidants and nutrients in relation to oxidative DNA damage and repair. *Mutat Res – Fundam Mol Mech Mutagen* 2004;551:79–89.
- [30] Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, et al. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 2009;100:715–21.
- [31] Link LB, Potter JD. Raw versus cooked vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1422–35.

- [32] Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *J Sci Food Agric* 2014;94:1057–70.
- [33] Ni W, McNaughton L, LeMaster DM, Sinha R, Turesky RJ. Quantitation of 13 heterocyclic aromatic amines in cooked beef, pork, and chicken by liquid chromatography-electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2008;56:68–78.
- [34] Carvalho AM, Miranda A, Santos F, Loureiro A, Fisberg R, Marchioni DM. High heterocyclic amines intake from meat is associated with oxidative stress. *Br J Nutr* 2015;in press.
- [35] Turesky RJ, Le Marchand L. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: Lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol* 2011;24:1169–214.
- [36] Ohnishi S, Murata M, Oikawa S, Totsuka Y, Takamura T, Wakabayashi K, et al. Oxidative DNA damage by an N-hydroxy metabolite of the mutagenic compound formed from norharman and aniline. *Mutat Res – Genet Toxicol Environ Mutagen* 2001;494:63–72.
- [37] Murata M, Kawanishi S. Oxidation of 5'-site guanine at GG and GGG sequences induced by a metabolite of carcinogenic heterocyclic amine PhIP in the presence of Cu(II) and NADH. *Carcinogenesis* 2002;23:855–60.
- [38] Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. HAL Archives Ouvertes – France Author Manuscript Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence HAL-AO Author Manuscript 2008:1–21.
- [39] Wakabayashi K, Ushiyama H, Takahashi M, Nukaya H, Kim SB, Hirose M, et al. Exposure to heterocyclic amines. *Environ. Health Perspect* 1993;103:129–34.
- [40] Kato T, Hasegawa R, Nakae D, Hirose M, Yaono M, Cui L, et al. Dose-dependent induction of 8-hydroxyguanine and preneoplastic foci in rat liver by a food-derived carcinogen, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, at low dose levels. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:127–33.
- [41] Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Sugimura T. Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn J Cancer Res* 1989;80:1176–8.
- [42] Butler LM. Heterocyclic Amines, Meat Intake, and Association with Colon Cancer in a Population-based Study. *Am J Epidemiol* 2003;157:434–45.

- [43] Helmus DS, Thompson CL, Zelenskiy S, Tucker TC, Li L. Red meat-derived heterocyclic amines increase risk of colon cancer: a population-based case-control study. *Nutr Cancer* 2013;65:1141–50.
- [44] Zheng W, Lee S-A. Well-done meat intake, heterocyclic amine exposure, and cancer risk. *Nutr Cancer* 2009;61:437–46.
- [45] Anderson KE, Kadlubar FF, Kulldorff M, Harnack L, Gross M, Lang NP, et al. Dietary intake of heterocyclic amines and benzo(a)pyrene: Associations with pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:2261–5.
- [46] De Stefani E, Ronco A, Mendilaharsu M, Guidobono M, Deneo-Pellegrini H. Meat intake, heterocyclic amines, and risk of breast cancer: a case-control study in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:573–81.
- [47] Sonestedt E, Ericson U, Gullberg B, Skog K, Olsson H, Wirfält E. Do both heterocyclic amines and omega-6 polyunsaturated fatty acids contribute to the incidence of breast cancer in postmenopausal women of the Malmö diet and cancer cohort? *Int J Cancer* 2008;123:1637–43.
- [48] El-Bayoumy K, Chae Y-H, Rosa JG, Williams LK, Desai D, Amin S, et al. The effects of 1-nitropyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the rat mammary gland and modulation by dietary 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Carcinogenesis* 2002;23:855–60.
- [49] Tavan E, Cayuela C, Antoine J-M, Trugnan G, Chaugier C, Cassand P. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002;23:477–83.
- [50] S. Fukushima, H. Wanibuchi, K. Morimura, S, Iwai D, Nakae H, Kishida H, Tsuda N, Uehara K, et al. Existence of a Threshold for Induction of Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon with Low Doses of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol Sci* 2004;80:109–14.
- [51] Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007;401:1–11.
- [52] Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* 1992;267:166–72.
- [53] Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 1996;74:297–312.

- [54] Djuric Z, Depper JB, Uhley V, Smith D, Lababidi S, Martino S, et al. Oxidative DNA damage levels in blood from women at high risk for breast cancer are associated with dietary intakes of meats, vegetables, and fruits. *J Am Diet Assoc* 1998;98:524–8.
- [55] Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, et al. Inhibitory effects of *Bifidobacterium*-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine-induced rat mammary carcinogenesis, with a partial contribution of its component isoflavones. *Carcinogenesis* 2000;21:937–41.
- [56] Codoñer-Franch P, Betoret E, López-Jaén AB, Betoret N, Fito P, Valls-Bellés V. Dried apple enriched with mandarin juice counteracts tamoxifen-induced oxidative stress in rats. *Int J Food Sci Nutr* 2013;64:815–21.
- [57] Kawashima A, Madarame T, Koike H, Komatsu Y, Wise JA. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16:411–21.

Table 1. Descriptive characteristics of participants, according to levels of HCA intake in ISA-Capital study

	HCA intake groups				P-value*
	All (n = 146)	Non-HCA intake (n = 73)	High HCA intake (n = 37)	Very high HCA intake (n = 36)	
Variables					
Energy intake (kcal/day)	1693.51 (66.26)	1551.15 (96.89)	1694.84 (117.00)	1980.83 (128.81)	0.003
HCA intake (ng/day)	773.86 (86.16)	0.00 (0.00)	908.35 (28.86)	2183.37 (175.02)	<0.001
Total PhIP intake (ng/day)	599.25 (69.26)	0.00 (0.00)	703.99 (36.26)	1690.10 (152.50)	<0.001
Total MeIQx intake (ng/day)	157.48 (24.18)	0.00 (0.00)	185.98 (24.05)	443.14 (72.83)	<0.001
Total DiMeIQx intake (ng/day)	17.14 (2.96)	0.00 (0.00)	18.38 (2.71)	50.13 (9.48)	<0.001
Total meat intake(g/day)	177.84 (12.51)	139.57 (16.91)	158.00 (11.53)	272.16 (30.31)	<0.001
Fruit intake (g/day)	107.01 (14.86)	74.07 (13.66)	129.62 (26.61)	149.63 (45.01)	0.019
Vegetable intake (g/day)	92.30 (9.15)	90.53 (12.59)	89.32 (14.66)	98.93 (22.71)	0.812
Fruit and vegetable intake (g/day)	199.31 (19.14)	164.60 (19.70)	218.93 (36.04)	248.56 (54.56)	0.048
8-OhdG (ng/mL)	18.27 (0.69)	18.36 (1.02)	16.17 (1.09)	20.21 (1.47)	0.468
C reactive protein (mg/dL)	5.70 (1.16)	5.96 (2.18)	4.65 (1.13)	6.25 (1.42)	0.850
Age (years)	51.13 (1.57)	50.95 (2.21)	55.58 (3.45)	47.04 (2.73)	0.469
Body mass index (kg/m ²)	25.97 (0.47)	25.46 (0.62)	26.07 (0.80)	26.76 (1.13)	0.198
Smoking (%)†	20.00	26.39	5.41	22.22	0.055
Physical activity (% of active) †	20.83	26.76	8.11	22.22	0.075
Sex (% of men) †	50.00	50.00	48.65	51.35	0.973

* Multiple linear regression model between dependent variables and levels of HCA intake (3 groups: no, high and higher intake) adjusted for age, sex, and BMI

† χ^2 test

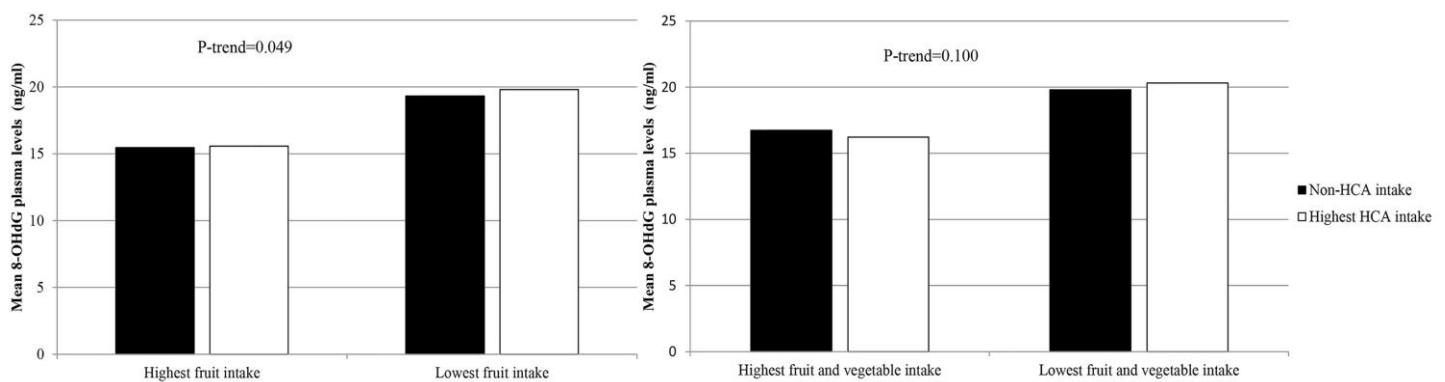
Table 2. Association between 8-OhdG and fruit, vegetable and HCA intake in ISA-Capital study

	8-OhdG (ng/ml)		
	β	SE	P-value
Fruit and vegetable intake (100g/day)			
Model 1	-0.585	0.300	0.053
Model 2	-0.348	0.309	0.262
Model 3	-0.226	0.298	0.450
Vegetable intake (100g/day)			
Model 1	0.421	0.635	0.509
Model 2	1.028	0.630	0.105
Model 3	1.051	0.580	0.072
Fruit intake (100g/day)			
Model 1	-1.131	0.380	0.003
Model 2	-0.940	0.383	0.015
Model 3	-0.787	0.369	0.035
HCA intake (groups*)			
Model 1	0.654	0.833	0.434
Model 2	0.989	0.814	0.227
Model 3†	1.621	0.764	0.036

Model 1 was a crude model; model 2 was adjusted for age, sex, and BMI; model 3 was further adjusted for physical activity, CRP level, smoking status, and energy intake

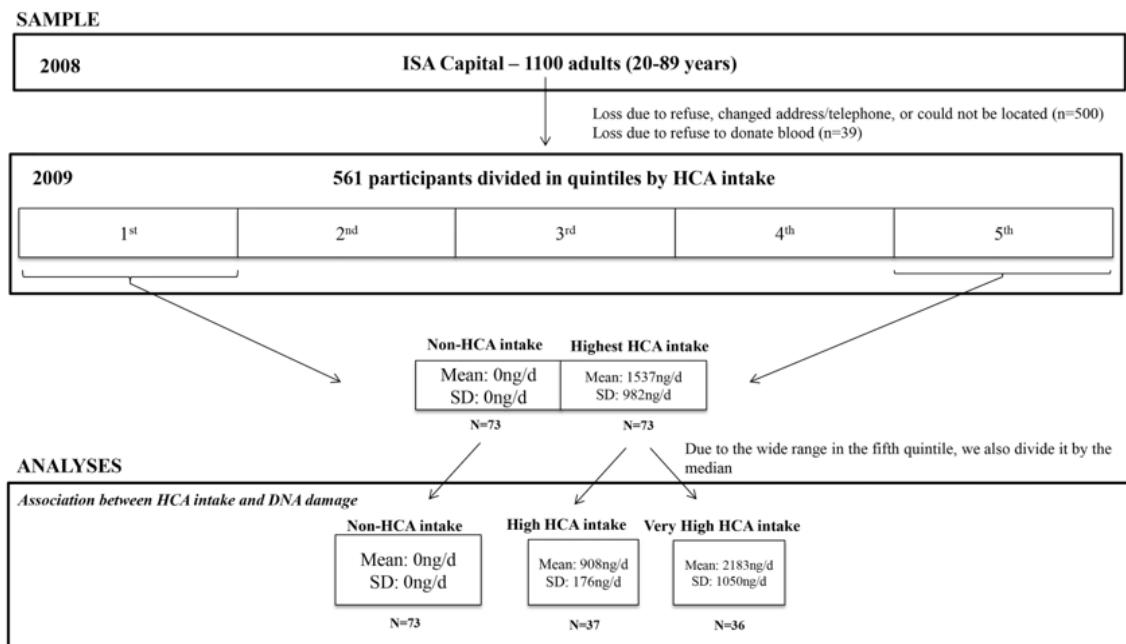
* Groups of HCA intake: no intake (mean: 0ng/day; 73 participants), high (mean: 908ng/day; 37 participants) and very high HCA intake (mean 2183ng/day; 36 participants).

† This model was further adjusted for fruit intake.

Figure 1. Joint associations between HCA intake and fruit and vegetable (or fruit) intake on 8-OhdG levels.

Models were adjusted for age, sex and BMI, physical activity, CRP level, smoking status, and energy intake.

Supplementary Figure 1. Design of the study.



HCA: heterocyclic amines; SD: standard deviation

5.3 Terceiro manuscrito

Interação entre aminas heterocíclicas e polimorfismos nos genes que codificam as enzimas de detoxificação no estresse oxidativo

Resumo

Introdução. O consumo elevado de carnes e aminas heterocíclicas (AH) vem sendo relacionado com aumento de risco de doenças crônicas, especialmente câncer. Uma das explicações para este fato, é que durante o metabolismo das AH são geradas espécies

reativas de oxigênio, relacionadas ao estresse oxidativo e risco de doenças. Entretanto, os indivíduos apresentam respostas diferentes à mesma exposição dietética, podendo ter diferentes níveis de risco ou benefício com a mesma ingestão de alimentos. O código genético individual pode ser uma das causas dessa variação interpessoal.

Objetivo. Investigar a associação entre o consumo de AH e um marcador de estresse oxidativo, considerando polimorfismos genéticos, fatores demográficos e de estilo de vida. Além disso, avaliar se existe uma interação entre consumo de AH e polimorfismos nos genes de enzimas de detoxificação no estresse oxidativo em residentes do Município de São Paulo.

Métodos. Foram utilizados dados secundários de um estudo transversal, de base populacional, por meio de inquéritos e coleta de amostra de sangue. Os dados dietéticos e de AH foram coletados por um recordatório alimentar de 24 horas e questionário sobre métodos de cocção e graus de cozimento das carnes. A extração do DNA ocorreu pelo método por sal, com o auxílio do espectrofotômetro para quantificação. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada utilizando a técnica PCR em tempo real – sistema taqman. Foi utilizado malonaldeído como marcador de estresse oxidativo.

Resultados. O consumo de AH aumentou o risco de estresse oxidativo ($\beta=0,03 \mu\text{mol/L}$ de MDA [EP: $0.01 \mu\text{mol/L}$] para cada 500ng de AH [$P=0.018$]), sendo que na presença de variantes nos genes das enzimas CYP1A2, SOD e CAT a relação entre AH e MDA deixou de ser significativa após ajuste por sexo, idade, IMC, consumo de frutas e calorias, atividade física e fumo. Na presença das demais variantes, a associação se manteve significativa. Verificou-se que polimorfismos nos genes das enzimas NAT2 (rs1799929) e CYP1B1 (rs10012) interagiram com o consumo de AH, diminuindo o estresse oxidativo.

Conclusão. Este estudo sugere novos resultados sobre consumo de AH e estresse oxidativo na presença de polimorfismos em humanos, e também sugeriu uma interação gene-ambiente, mostrando que polimorfismos em alguns genes pode proteger ou potencializar a exposição às AH. Novos estudos devem ser feitos para confirmar os presentes achados.

Palavras-chave: Aminas heterocíclicas, Estresse oxidativo, Polimorfismo genético, Doenças crônicas.

INTRODUÇÃO

O consumo de carne e compostos carcinogênicos formados na cocção das carnes, como as aminas heterocíclicas (AH), tem sido associado ao aumento do risco de doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares (1–3).

Uma das explicações para este fato, é que durante o metabolismo das AH são geradas espécies reativas de oxigênio, que causam oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos, resultando em dano celular e perda de função biológica (4–7). Alguns estudos mostram que a exposição a AH aumentam os níveis de estresse oxidativo e dano ao DNA em animais e células (8–11). Recentemente, verificou-se que o consumo de AH foi associado a marcadores de estresse oxidativo e dano de DNA na população brasileira (12,13).

A metabolização das AH é feita por enzimas específicas do metabolismo. As enzimas de fase I (principalmente as CYP1A1 e CYP1A2: citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1 e 2) são responsáveis pela ativação metabólica de grande parte das AH, que produz metabólitos tóxicos, que podem se ligar ao DNA ou sofrer a

ação de outras enzimas, como as de fase II (14). As enzimas de fase II promovem reações de conjugação com substratos endógenos (glutatona, sulfato, glicose, acetato) por meio das GST, SULT, UGT e NAT, a fim de eliminar os compostos reativos via urina/bile (4). Entretanto a presença dos polimorfismos genéticos nos genes que codificam tais enzimas podem alterar a atividade das mesmas, e portanto, modificar a associação entre consumo de AH e risco de doenças (14–19). Estudos sobre interações entre polimorfismos, consumo de AH e estresse oxidativo são escassos na literatura.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é investigar a associação entre o consumo de AH e um marcador de estresse oxidativo, considerando polimorfismos genéticos, fatores demográficos e de estilo de vida. Além disso, avaliar se existe uma interação entre consumo de AH e polimorfismos nos genes de 14 enzimas de detoxificação no estresse oxidativo em residentes do Município de São Paulo.

MÉTODOS

Foi utilizada uma subamostra do estudo transversal de base populacional (ISA-Capital – 2008) com amostra probabilística de adolescentes, adultos e idosos do município de São Paulo em 2008/2009. A amostragem do ISA-Capital foi estratificada por conglomerados em dois estágios: setores censitários e domicílio. Em 2008, foram coletados dados sociodemográficas e de condições de vida de 2691 indivíduos. Em 2009, novo contato foi feito com mesmos participantes para coletar dados dietéticos, bioquímicos, antropométricos e demográficos. Encontrou-se 1662 indivíduos e 750 aceitaram doar uma amostra de sangue. Para o presente estudo, utilizou-se apenas dados de adultos e idosos que tinham informações dos polimorfismos de interesse ($n=550$).

O consumo de alimentos e AH foi estimado por um recordatório alimentar de 24 horas (R24h) e um questionário com informações sobre métodos de cocção e grau de cozimento das carnes. Para quantificar o consumo de AH, utilizou-se o banco de dados do CHARRED (“Computerized Heterocyclic Amines Resource for Research In Epidemiology of Disease”).

Amostras de sangue e medidas de peso e altura foram coletadas nos domicílios dos participantes por um assistente de enfermagem capacitado. Os dados antropométricos foram utilizados para o cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), e os indivíduos foram classificados em sem e com excesso de peso segundo os pontos de corte propostos pela WHO (20) para adultos e Lipschitz (21) para idosos.

O DNA foi extraído por método de sal, proposto por Miller et al. (22). Foi usado método cadeia da polimerase (PCR) em tempo real sistema taqman para detectar polimorfismos nos genes das seguintes enzimas: **fase I** (CYP1A1; CYP1A2; CYP1B1); **fase II** (SULT1A1; UGT1A9; GSTM1; GSTT1; GSTA1; GSTP1; NAT2; NAT1); **estresse oxidativo** (SOD2; CAT; GPx). Estes polimorfismos foram escolhidos a priori por sua atividade conhecida ou sugerida na literatura. Determinou-se malonaldeído (MDA) no plasma por cromatografia líquida de alta eficiência com detector “diode array” para estimar o estresse oxidativo, baseado em Bastos et al. (23).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado pelo teste χ^2 . Dados foram expressos em média e desvio padrão. Diferenças entre concentrações de MDA foram verificadas por análise de variância de acordo com número de alelos mutantes.

As associações entre consumo de AH e MDA na presença de variantes polimórficas foram examinadas por meio de modelos de regressão linear ajustados por sexo, idade, IMC, consumo de frutas e energia da dieta, atividade física e fumo. Testou-

se interação entre os polimorfismos genéticos e o consumo de AH por meio da adição de um termo multiplicativo destas variáveis em cada um dos modelos. Utilizou-se o software STATA® versão 13 e P<0,05 foi considerado estatisticamente significante.

RESULTADOS

As frequências dos alelos mutantes dos polimorfismos de interesse estão descritas na **Tabela 1**, assim como se a distribuição dos genótipos seguiu o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$). Os dados para o polimorfismo no gene que codifica a enzima GPx não foram apresentados, pois ocorreu falha no desenho da lâmina para este SNP.

As concentrações de MDA variaram de acordo com a presença do número de alelos mutantes de cada enzima. Indivíduos que possuíam alelos mutantes no gene *SULT1A1*, apresentaram significativamente maior concentração de MDA, já indivíduos que possuíam alelos mutantes do *GSTA1*, apresentaram significativamente menor concentração de MDA, conforme **Tabela 2**.

A associação entre consumo de aminas heterocíclicas e o estresse oxidativo foi de 0,03 µmol/L de MDA (EP: 0,01 µmol/L) para cada 500ng de AH ($P=0,018$). Entretanto, esta relação se modificou de acordo com o polimorfismo nos genes das enzimas de detoxificação. Na presença de variantes nos *CYP1A2*, *SOD2* e *CAT* a relação entre AH e MDA deixou de ser significativa após ajuste por sexo, idade, IMC, consumo de frutas e energia da dieta, atividade física e fumo. Na presença das demais variantes, a associação se manteve significativa (**Tabela 3**).

Observou-se uma interação significativa entre SNPs nos genes das enzimas CYP1B1 e NAT2 e consumo de AH nas concentrações de MDA plasmático (**Tabela 3**).

Participantes que consumiram maior quantidade AH e carregavam maior número de alelos mutantes apresentaram menores níveis de estresse oxidativo do que as outras (**Figura 1 A e B**).

Tabela 1. Frequência dos polimorfismos nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação das aminas heterocíclicas na população de São Paulo

Gene	dbSNP	Fase I	n	Alelos mutantes						EHW
				0		1		2		
			N	%	N	%	N	%		
<i>CYP1A1</i>	1048943	340	73	21,5	79	23,2	188	55,3	0,000	
<i>CYP1A2</i>	762551	316	28	8,9	133	42,1	155	49,1	0,944	
	35694136	344	64	18,6	103	29,9	177	51,5	0,000	
<i>CYP1B1</i>	1056836	308	36	11,7	159	51,6	113	36,7	0,075	
	10012	355	77	21,7	179	50,4	99	27,9	0,816	
Fase II										
	1208	335	104	31,0	110	32,8	121	36,1	0,000	
	1041983	356	88	24,7	137	38,5	131	36,8	0,000	
	1799929	366	101	27,6	165	45,1	100	27,3	0,060	
<i>NAT2</i>	1801280	337	79	23,4	84	24,9	174	51,6	0,000	
	1799931	314	69	22,0	80	25,5	165	52,5	0,000	
	1799930	198	69	34,8	51	25,8	78	39,4	0,000	
	1801279	298	9	3,0	46	15,4	243	81,5	0,000	
	4986782	372	4	1,1	94	25,3	274	73,7	0,190	
	5030839	322	233	72,4	78	24,2	11	3,4	0,169	
<i>NAT1</i>	56379106	360	181	50,3	85	23,6	94	26,1	0,000	
	56318881	414	302	72,9	83	20,0	29	7,0	0,000	
	6586714	365	37	10,1	111	30,4	217	59,5	0,000	
<i>SULT1A1</i>	9282861	318	61	19,2	137	43,1	120	37,7	0,055	
<i>UGT1A9</i>	3832043	321	234	72,9	44	13,7	43	13,4	0,000	
<i>GSTA1</i>	3957357	366	110	30,1	74	20,2	182	49,7	0,000	
<i>GSTP1</i>	1695	355	148	41,7	160	45,1	47	13,2	0,718	
<i>GSTM1</i>		550	233	42,4	317	57,6				
<i>GSTT1</i>		539	100	18,6	439	81,4				
Estresse oxidativo										
<i>SOD2</i>	4880	349	123	36,2	139	40,9	87	25,6	0,000	
<i>CAT</i>	1001179	310	163	51,6	81	23,8	66	19,4	0,000	

EHW: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Tabela 2. Média e DP das concentrações de MDA de acordo com variantes nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação na população de São Paulo

Gene	dbSNP	N	Concentrações de MDA (umol/L)						ANOVA
			0 alelo mutante		1 alelo mutante		2 alelos mutantes		
			Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Fase I									
<i>CYP1A1</i>	1048943	340	0,71	0,33	0,69	0,32	0,73	0,36	0,695
<i>CYP1A2</i>	762551	316	0,69	0,32	0,69	0,37	0,70	0,31	0,976
<i>CYP1A2</i>	35694136	344	0,68	0,33	0,71	0,34	0,69	0,30	0,799
<i>CYP1B1</i>	1056836	308	0,75	0,29	0,71	0,33	0,65	0,32	0,197
<i>CYP1B1</i>	10012	355	0,70	0,32	0,69	0,34	0,72	0,30	0,821
Fase II									
<i>NAT2</i>	1799929	366	0,72	0,35	0,68	0,30	0,74	0,33	0,360
<i>NAT2</i>	1208	335	0,75	0,32	0,72	0,35	0,65	0,32	0,077
<i>NAT2</i>	1041983	356	0,72	0,35	0,69	0,31	0,69	0,32	0,764
<i>NAT2</i>	1801280	337	0,64	0,32	0,72	0,32	0,71	0,33	0,248
<i>NAT2</i>	1799931	314	0,73	0,30	0,68	0,30	0,69	0,35	0,720
<i>NAT2</i>	1801279	298	0,77	0,15	0,64	0,30	0,73	0,36	0,293
<i>NAT1</i>	4986782	372	0,39	0,27	0,70	0,32	0,69	0,33	0,181
<i>NAT1</i>	5030839	322	0,72	0,33	0,71	0,28	0,81	0,27	0,638
<i>NAT1</i>	56379106	360	0,73	0,33	0,65	0,31	0,69	0,30	0,226
<i>NAT1</i>	56318881	414	0,73	0,34	0,64	0,28	0,73	0,28	0,129
<i>NAT1</i>	6586714	365	0,72	0,34	0,66	0,33	0,72	0,34	0,415
<i>SULT1A1</i>	9282861	318	0,62	0,31	0,70	0,37	0,76	0,33	0,041
<i>UGT1A9</i>	3832043	321	0,68	0,31	0,68	0,30	0,78	0,36	0,176
<i>GSTA1</i>	3957357	366	0,75	0,36	0,74	0,40	0,64	0,28	0,018
<i>GSTP1</i>	1695	355	0,72	0,32	0,68	0,35	0,67	0,30	0,493
<i>GSTM1</i>		550	0,73	0,30	0,72	0,36			0,619
<i>GSTT1</i>		539	0,70	0,35	0,73	0,34			0,430
Estresse oxidativo									
<i>SOD2</i>		349	0,77	0,34	0,69	0,33	0,69	0,33	0,085
<i>CAT</i>		310	0,70	0,33	0,67	0,35	0,75	0,27	0,100

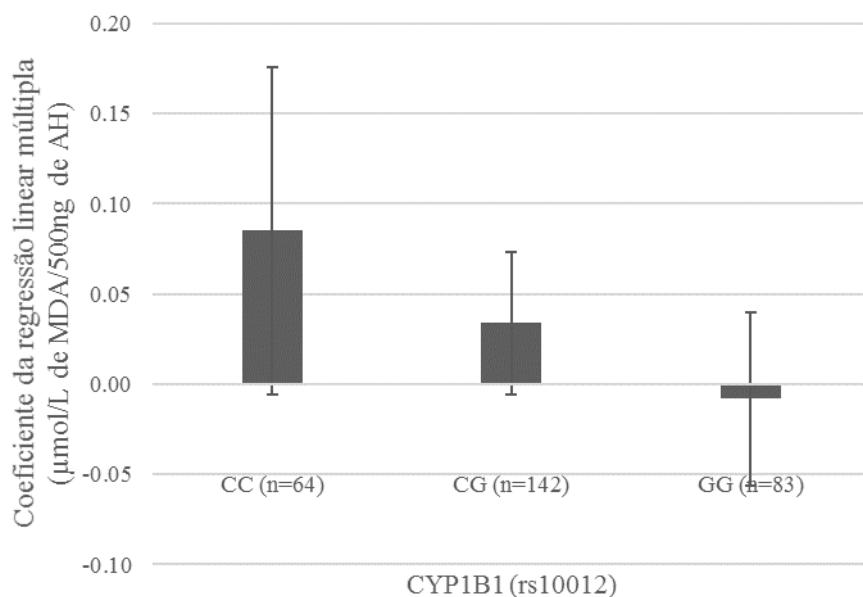
Tabela 3. Associação entre AH e MDA de acordo com variantes nos genes que codificam as enzimas envolvidas no metabolismo de detoxificação na população de São Paulo

Gene	dbSNP	N	Associação entre AH e concentração de MDA				
			β não ajustado	P não ajustado	β ajustado	P ajustado	P interação
Fase I							
<i>CYP1A1</i>	1048943	340	0,03	0,079	0,03	0,026	0,339
<i>CYP1A2</i>	762551	316	0,02	0,110	0,03	0,142	0,685
<i>CYP1A2</i>	35694136	344	0,02	0,083	0,02	0,157	0,535
<i>CYP1B1</i>	1056836	308	0,03	0,020	0,03	0,028	0,056
<i>CYP1B1</i>	10012	355	0,02	0,193	0,02	0,167	0,037
Fase II							
<i>NAT2</i>	1799929	366	0,02	0,058	0,02	0,059	0,048
<i>NAT2</i>	1208	335	0,03	0,038	0,02	0,111	0,557
<i>NAT2</i>	1041983	356	0,02	0,051	0,03	0,028	0,668
<i>NAT2</i>	1801280	337	0,01	0,318	0,02	0,213	0,147
<i>NAT2</i>	1799931	314	0,02	0,130	0,02	0,234	0,294
<i>NAT2</i>	1799930	198	0,06	0,006	0,05	0,014	0,825
<i>NAT2</i>	1801279	298	0,03	0,089	0,04	0,070	0,501
<i>NAT1</i>	4986782	372	0,02	0,085	0,02	0,067	0,613
<i>NAT1</i>	5030839	322	0,04	0,009	0,04	0,012	0,747
<i>NAT1</i>	56379106	360	0,03	0,024	0,03	0,048	0,862
<i>NAT1</i>	56318881	414	0,02	0,095	0,02	0,083	0,813
<i>NAT1</i>	6586714	365	0,03	0,031	0,03	0,030	0,807
<i>SULT1A1</i>	9282861	318	0,03	0,041	0,03	0,040	0,160
<i>UGT1A9</i>	3832043	321	0,03	0,035	0,03	0,032	0,783
<i>GSTA1</i>	3957357	366	0,03	0,009	0,03	0,021	0,306
<i>GSTP1</i>	1695	355	0,03	0,021	0,03	0,017	0,799
<i>GSTM1</i>		550	0,03	0,019	0,03	0,007	0,822
<i>GSTT1</i>		539	0,02	0,023	0,03	0,007	0,391
Estresse oxidativo							
<i>SOD2</i>	4880	349	0,02	0,242	0,02	0,196	0,092
<i>CAT</i>	1001179	310	0,02	0,107	0,03	0,079	0,888

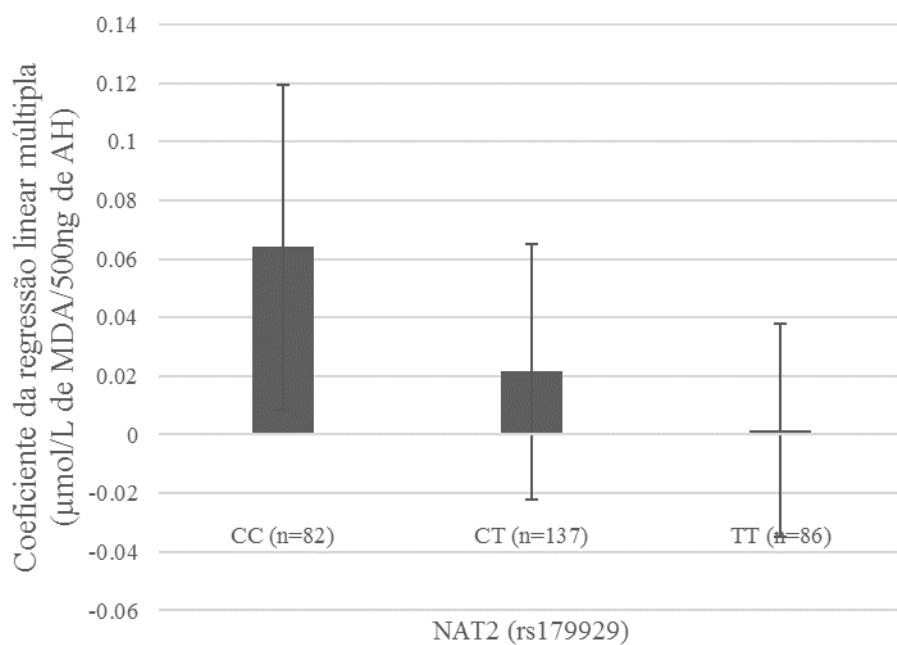
*Modelos de regressão linear entre malondialdeído e aminas heterocíclicas ajustados por sexo, idade, IMC, consumo de frutas, calorias, atividade física e fumo

Figura 1. Associações e interações entre consumo de AH e MDA segundo polimorfismo no gene *CYP1B1* e *NAT2*.

A)



B)



DISCUSSÃO

O consumo de AH aumentou o risco de estresse oxidativo, sendo que na presença de alguns polimorfismos esta relação se manteve significativa e na presença de outros, esta associação não se manteve significativa. Verificou-se que polimorfismos nos genes das enzimas NAT2 e CYP1B1 interagiram com o consumo de AH, diminuindo o estresse oxidativo, mesmo depois do ajuste por idade, sexo, IMC, atividade física, fumo, e ingestão de energia e frutas.

Alguns trabalhos anteriores já mostraram que as AH podem produzir peroxidação lipídica *in vitro* e em ratos (2,24–27). O presente grupo de pesquisa mostrou recentemente que o consumo de AH pode estar associado ao estresse oxidativo e ao dano de DNA (12,13). Porém, pelo que sabemos, este é o primeiro trabalho a apresentar que esta relação pode ser modificada por variantes genéticas.

Já é sabido que o consumo de AH interage com polimorfismos nas enzimas de fase I e fase II, aumentando ou diminuindo o metabolismo das AH e o risco pra câncer, porém os resultados são controversos (18,28,29). Em relação às enzimas de fase I, Kim *et al.* relatam que as variantes homozigóticas *CYP1A1* (rs4646903) e *CYP1A2* (rs35694136) mostraram metabolismo mais lento, levando a maior excreção do PhIP, e provavelmente menor formação de adutos de DNA (29). Já Ferrucci *et al.* encontraram associação entre a ingestão de PhIP e variantes de *CYP1B1* (rs10012 e rs1056836) no risco adenoma de cólon e reto, sendo que indivíduos com alelo mutante da variante rs10012 apresentaram maior OR que os demais, e os indivíduos com alelo mutante da variante rs1056836 apresentaram menor OR que os demais (28). No presente artigo, verificamos que a associação entre AH e MDA se manteve positiva e significativa independente de polimorfismos nos genes que codificam as enzimas CYP1A1 e

CYP1B1. Além disso, verificamos que o SNP no gene *CYP1B1* (rs10012) interagiu com consumo de AH, reduzindo o coeficiente de associação entre AH e MDA quando os participantes possuíam dois alelos mutantes do SNP em questão.

Em relação às enzimas de fase II, as N-acetiltransferases (NAT1 e NAT2) são enzimas criticamente envolvidas no metabolismo das AH, atuando na detoxificação das mesmas (18). Além disso, as NAT possuem polimorfismos genéticos capazes de alterar a atividade da proteína em relação à sequência original, promovendo maior ou menor atividade da enzima codificada (30). A presença de polimorfismo no gene *NAT2* (rs1799929, rs1208, rs1041983) confere aos indivíduos um perfil de acetilação rápida, que leva a um metabolismo mais rápido, formando mais metabólitos de AH; ou um perfil de acetilação lenta (rs1801280, rs1799931, rs1799930, rs1801279) que possui um metabolismo mais lento (31–33). A acetilação rápida parece estar associada com maior risco de câncer de cólon e reto, porém os dados ainda são controversos (34). No presente artigo, verificamos que associação entre AH e MDA se manteve positiva e significativa na presença de alguns SNPs nos genes *NAT1* e *NAT2* e que o *NAT2* (rs1799929) interagiu com consumo de AH, reduzindo o coeficiente de associação entre AH e MDA quando os participantes possuíam dois alelos mutantes do SNP em questão.

Observou-se também um alto índice de SNPs que não seguiram o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que pode ser devido a falha da genotipagem, mutação, população miscigenada e pequeno tamanho da amostra, podendo impactar nas análises de associação (35,36). Schaid e Jacobsen demonstraram em estudos caso-controle que a chance de falso positivo pode ser substancialmente maior se homozigotos para o alelo mutante for mais comum do que o predito pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (37). Portanto, os resultados devem ser interpretados com cautela.

O presente artigo possui algumas outras limitações como a falha da genotipagem em alguns indivíduos, resultando em restrito número de participantes; não ter analisado ancestralidade; não ter analisado associações e interações entre os polimorfismos, uma vez que o tamanho amostral era pequeno, o que poderia ter sido importante na determinação no fenótipo (38). Além disso não foram coletadas e analisadas todas as variáveis relacionadas ao estresse oxidativo. Entretanto, ajustou-se os modelos de regressão por diversas covariáveis que poderiam contribuir também com aumento de estresse oxidativo.

Conclui-se que, neste estudo, o consumo de AH aumentou o risco de estresse oxidativo, porém, ao considerar polimorfismos em genes envolvidos neste metabolismo, esta relação apresentou alterações. Além disso, observou-se uma interação gene-ambiente, sugerindo que polimorfismos em genes determinados (*NAT* e *CYP1B1*) podem modular a exposição ao meio ambiente. Entretanto novos estudos devem ser feitos para confirmar os presentes achados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Micha R, Wallace SK, Mozaffarian D. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation*. 2010; 121, 2271-2283.
2. Jägerstad M, Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res.* 2005; 1:156-172.
3. Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Dickman PW, Steineck G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet*. 1999;353(9154):703–7.
4. World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. *Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington DC: AICR, 2007.

5. Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer*. 2008;60(2):131–44.
6. Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Sci*. 2010;84(2):308–13.
7. Hu J, La Vecchia C, Morrison H, Negri E, Mery L. Salt, processed meat and the risk of cancer. *Eur J Cancer Prev*. 2011;20(2):132–9.
8. Murata M, Kawanishi S. Oxidation of 5'-site guanine at GG and GGG sequences induced by a metabolite of carcinogenic heterocyclic amine PhIP in the presence of Cu(II) and NADH. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):855–60.
9. S. Fukushima, H. Wanibuchi, K. Morimura, S, Iwai D, Nakae H, Kishida H, Tsuda N, Uehara K, et al. Existence of a Threshold for Induction of Aberrant Crypt Foci in the Rat Colon with Low Doses of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol Sci*. 2004;80(1):109–14.
10. El-Bayoumy K, Chae Y-H, Rosa JG, Williams LK, Desai D, Amin S, et al. The effects of 1-nitropyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the rat mammary gland and modulation by dietary 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Carcinogenesis*. 2002;23(5):855–60.
11. Tavan E, Cayuela C, Antoine J-M, Trugnan G, Chaugier C, Cassand P. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2002;23(3):477–83.
12. Carvalho AM, Miranda A, Santos F, Loureiro A, Fisberg R, Marchioni DM. High heterocyclic amines intake from meat is associated with oxidative stress. *Br J Nutr*. 2015; 113(8):1301-7.
13. Carvalho AM, Carioca AAF, Fisberg RM, Qi L, Marchioni DM. Joint association of fruit, vegetable, and heterocyclic amine intake with DNA damage levels in a general population. *Nutrition*. 2016;32(2):260–4.
14. Turesky RJ. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Curr Drug Metab*. 2004;5(2):169–80.
15. Girard H, Butler LM, Villeneuve L, Millikan RC, Sinha R, Sandler RS, et al. UGT1A1 and UGT1A9 functional variants, meat intake, and colon cancer, among Caucasians and African-Americans. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2008;644(1-2):56–63.
16. Koutros S, Berndt SI, Sinha R, Ma X, Chatterjee N, Alavanja MCR, et al. Xenobiotic metabolizing gene variants, dietary heterocyclic amine intake, and risk of prostate cancer. *Cancer Res*. 2009; 69(5):1877–84.

17. Gilsing AMJ, Berndt SI, Ruder EH, Graubard BI, Ferrucci LM, Burdett L, et al. Meat-related mutagen exposure, xenobiotic metabolizing gene polymorphisms and the risk of advanced colorectal adenoma and cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1332–9.
18. Turesky RJ, Le Marchand L. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: Lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(8):1169–214.
19. Wünsch Filho V, Gattás G. Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. *Cad Saude Publica*. 2001;17(3):467–80.
20. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity; 1997.
21. Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care*. 1994;21(1):55–67.
22. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
23. Bastos AS, Loureiro APDM, Oliveira TF De, Corbi SCT, Caminaga RMS, Rossa C, et al. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem*. 2012;423(1):141–6.
24. Alaejos MS, Gonzalez V, Afonso AM. Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: A review. *Food Addit Contam*. 2008;25(1):2–24.
25. Gunter MJ, Probst-Hensch NM, Cortessis VK, Kulldorff M, Haile RW, Sinha R. Meat intake, cooking-related mutagens and risk of colorectal adenoma in a sigmoidoscopy-based case-control study. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):637–42.
26. Li R, Li W, Xie J, Zhang Y. Lipid peroxidation in different tissues of rats treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2012;41(1):102–5.
27. Li R, Tian J, Li W, Xie J. Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) on histopathology, oxidative stress, and expression of c-fos, c-jun and p16 in rat stomachs. *Food Chem Toxicol*. 2013;55:182–91.
28. Ferrucci L, Cross A, Gunter M, Ahn J, Mayne S, Ma X, et al. Xenobiotic Metabolizing Genes, Meat-Related Exposures, and Risk of Advanced Colorectal Adenoma. *J Nutr Nutr*. 2011;3(4):170–81.

29. Kim D, Lee YJ, Ryu HY, Lee JH, Kim HK, Kim E, et al. Genetic polymorphisms in metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine. *J Appl Toxicol.* 2013;33(1):63–70.
30. Tomalik-Scharte D, Lazar a, Fuhr U, Kirchheimer J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2008;8(1):4–15.
31. Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B. Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *J Toxicol Env Heal B.* 2009;12(5-6):440–72.
32. Barbir A, Linseisen J, Hermann S, Kaaks R, Teucher B, Eichholzer M, et al. Effects of phenotypes in heterocyclic aromatic amine (HCA) metabolism-related genes on the association of HCA intake with the risk of colorectal adenomas. *Cancer Causes Control.* 2012;23:1429–42.
33. Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Chen Z, et al. Using gene-environment interaction analyses to clarify the role of well-done meat and heterocyclic amine exposure in the etiology of colorectal polyps. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(5):1119–28.
- Airoldi L, Magagnotti C, Pastorelli R, Fanelli R. Enzyme polymorphisms influencing the metabolism of heterocyclic aromatic amines. *J Chromatogr B.* 2004; 802:175–181.
35. Rodriguez S, Gaunt TR, Day INM. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):505–14.
36. Trikalinos TA, Salanti G, Khoury MJ, Ioannidis JPA. Impact of violations and deviations in Hardy-Weinberg equilibrium on postulated gene-disease associations. *Am J Epidemiol.* 2006;163(4):300–9.
37. Schaid D, Jacobsen S. Biased Tests of Association: Comparisons of Allele Frequencies when Departing from Hardy-Weinberg Proportions. *Am J Epidemiol.* 1999;149:706–11.
38. Newton-Cheh C, Hirschhorn JN. Genetic association studies of complex traits: design and analysis issues. *Mutat Res.* 2005;573(1-2):54–69.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo de carne é alto no Brasil e no mundo e vem sendo associado a diversas doenças crônicas incluindo câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras. Uma das causas da relação entre carne e câncer é o consumo de aminas heterocíclicas, que são compostos carcinogênicos formados na cocção de carnes a altas temperaturas por longos períodos de tempo. Diversos estudos mostraram associação positiva entre consumo de carne bem passada e exposição a AH com risco de câncer, especialmente de cólon e reto em humanos. Um mecanismo pelo qual isto pode acontecer é a formação de espécies reativas nas reações das enzimas de detoxificação, o que pode causar estresse oxidativo e dano ao DNA, sendo que se este processo pode ser mais ou menos ativo dependendo da suscetibilidade genética individual. Nenhum estudo em humanos havia avaliado se o consumo elevado de aminas heterocíclicas poderia estar associado a tais marcadores.

Observamos que o consumo médio de aminas heterocíclicas na cidade de São Paulo foi de 437ng/dia e o consumo de carne de 135g/dia. A PhIP foi a amina mais consumida e as carnes fritas bem passadas foram as mais escolhidas pelos participantes. A carne de boi foi a que mais contribuiu para o consumo de aminas, sendo que participantes que consumiram carne de boi grelhada muito bem passada apresentaram maiores concentrações de MDA do que os demais. Encontrou-se associação positiva entre consumo de aminas heterocíclicas com estresse oxidativo, isto é, indivíduos que consumiram maiores teores de aminas heterocíclicas apresentaram maiores chances de ter elevadas concentrações de MDA ($OR=1,17; P=0,04$).

O consumo de frutas e hortaliças foi baixo na população, com média de 199g/dia. Observou-se que participantes que consumiram maiores níveis de frutas

apresentaram menores concentrações de adutos de DNA, já os participantes com maiores níveis de aminas heterocíclicas apresentaram maiores concentrações de 8-OHdG ($\beta=1,62$; $P=0,04$). Analisados conjuntamente, indivíduos com consumo alto de aminas heterocíclicas e baixo de frutas apresentaram concentrações de dano ao DNA ainda maiores.

Além disso, verificou-se que a associação entre aminas e MDA pode ser modificada pelas características genéticas individuais, sendo que polimorfismos nos genes que codificam as enzimas de detoxificação NAT2 ou CYP1B1 interagiram com o consumo de aminas, diminuindo o estresse oxidativo, isto é, a associação entre aminas heterocíclicas e MDA foi modificada dependendo do número de alelos mutantes das enzimas NAT2 ou CYP1B1 que os indivíduos apresentaram.

Com isso, observou-se que o consumo de aminas heterocíclicas esteve associado a marcadores de estresse oxidativo e dano ao DNA em uma população geral de São Paulo e variações genéticas puderam minimizar a exposição ao meio ambiente. Tais achados são importantes para saúde pública, uma vez que grande parte da população é exposta a tais carcinógenos e quase 30% apresentou polimorfismos nestes genes. Dados genéticos apresentados devem ser interpretados com cautela, devido a algumas falhas no processo de genotipagem. Entretanto, estas informações podem ser consideradas na prática clínica e devem ser aprofundadas em novos estudos epidemiológicos de caráter longitudinal, a fim de verificar o impacto do consumo de aminas heterocíclicas e concentrações de MDA e 8-OHdG no risco de doenças crônicas, considerando fatores genéticos e ambientais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agudo A, Peluso M, Sala N, Capellé G, Munnia A, Piro S et al. Aromatic DNA adducts and polymorphisms in metabolic genes in healthy adults: findings from the EPIC-Spain cohort. *Carcinogenesis*. 2009; 30:968-976.
- Ahn J, Gammon MD, Santella RM, Gaudet MM, Britton JA, Teitelbaum SL, Terry MB, Neugut AI, Eng SM, Zhang Y, Garza C, Ambrosone CB. Effects of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) genotype and potential modifiers on breast cancer risk. *Carcinogenesis*. 2006; 27:1876-1882.
- Alaejos MS, Gonzalez V, Afonso AM. Exposure to heterocyclic aromatic amines from the consumption of cooked red meat and its effect on human cancer risk: a review. *Food Addit Contam*. 2008; 25:2–24.
- Airoldi L, Magagnotti C, Pastorelli R, Fanelli R. Enzyme polymorphisms influencing the metabolism of heterocyclic aromatic amines. *J Chromatogr B*. 2004; 802:175–181.
- Agusto O. Radicais Livres: Bons, maus e naturais. Oficina de Textos: São Paulo, 2006.
- Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes *Pharmaceutical Research*. 2008; 25:2097-2116.
- Aune D, Chan DS, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, Norat T. Red and processed meat intake and risk of colorectal adenomas: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Cancer Causes Control*. 2013; 24:611-627.
- Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free Radicals in Toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1993; 120(2): 168-178.
- Barbir A, Linseisen J, Hermann S, Kaaks R, Teucher B, Eichholzer M, Rohrmann S. Effects of phenotypes in heterocyclic aromatic amine (HCA) metabolism-related genes on the association of HCA intake with the risk of colorectal adenomas. *Cancer Causes Control*. 2012; 23:1429-1442.
- Barreiros ALBS, David JMD, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím Nova*. 2006; 29:113-123.
- Bastos AS, Loureiro AP, de Oliveira TF, Corbi SC, Caminaga RM, Júnior CR, Orrico SR. Quantitation of malondialdehyde in gingival crevicular fluid by a high-performance liquid chromatography-based method. *Anal Biochem*. 2012;423(1):141-6.
- Boukouvala S. Database of arylamine *N*-acetyltransferases (NATs). Department of molecular biology and genetics. Democritus University of Thrace; 2016 [acesso em 30

mar 2016]. Disponível em http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm

Breton J, Sichel F, Pottier D, Prevost V. Measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in peripheral blood mononuclear cells: optimisation and application to samples from a case-control study on cancers of the oesophagus and cardia. *Free Radic Res.* 2005; 39, 21–30.

Briede JJ, Godschalk RW, Emans MT, De Kok TM, Van Agen E, Van Maanen J, Van Schooten FJ, Kleinjans JC. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic Res.* 2004; 38, 995–1002.

Butler LM, Sinha R, Millikan RC, Martin CF, Newman B, Gammon MD, Ammerman AS, Sandler RS. Heterocyclic amines, meat intake and association with colon cancer in a population-based study. *Am J Epidemiol.* 2003; 157:434–445.

Cantwell M, Mittl B, Curtin J, Carroll R, Potischman N, Caporaso N. Relative Validity of a Food Frequency Questionnaire with a Meat-Cooking and Heterocyclic Amine Module. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13, 293-298.

Carvalho AM, César CLG, Fisberg RM, Marchioni DML. Meat Consumption in São Paulo – Brazil: Trend in the Last Decade. *PlosOne.* 2014; 9:e96667.

Carvalho AM, Selem SSC, Miranda A, Marchioni DML. Excessive red and processed meat intake: relations on health and environment in Brazil. *Brit J Nutr.* 2016; 111:2011-16.

Cerqueira FM, Medeiros MHG, Augusto O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quim Nova.* 2007; 30: 441-449.

Choi JY, Neuhouser ML, Barnett M, Hudson M, Kristal AR, Thornquist M, King IB, Goodman GE, Ambrosone CB. Polymorphisms in oxidative stress-related genes are not associated with prostate cancer risk in heavy smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:1115-1120.

Choi Y, Song S, Song Y, Lee JE. Consumption of red and processed meat and esophageal cancer risk: meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2013; 19:1020-1029.

Cirak B, Inci S, Palaoglu S, Bertan V. Lipid peroxidation in cerebral tumors. *Clinica Chimica Acta.* 2003; 327: 103-107.

Cuenca AMB, Andrade MTD, Noronha DP, Ferraz MLEF. Guia de apresentação de teses [guia na internet]. 2. ed. São Paulo: FSP/USP; 2008 [acesso em 30 mar 2016]. Disponível em: <http://www.biblioteca.fsp.usp.br/guia/>

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005;366(9499):1784-93.

Daniel CR, Cross AJ, Koebnick C, Sinha R. Trends in meat consumption in the USA. *Public Health Nutr.* 2011; 14:575-583.

DeMarini DM. Dietary interventions of human carcinogenesis. *Mutation Research.* 1998; 400:457–465.

Eichholzer M, Rohrmann S, Barbir A, Hermann S, Teucher B, Kaaks R, Linseisen J. Polymorphisms in heterocyclic aromatic amines metabolism-related genes are associated with colorectal adenoma risk. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012;3(2):96-106.

El-Bayoumy K, Chae YH, Rosa JG, Williams LK, Desai D, Amin S, Fiala E. The effects of 1-nitropyrene, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the rat mammary gland and modulation by dietary 1,4-phenylenebis(methylene) selenocyanate. *Cancer Lett.* 2000; 151:7-13.

Felton JS, Fultz E, Dolbeare FA, Knize MG. Effect of microwave pretreatment on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32:897-903.

Felton JS, Malfatti MA. What do diet-induced changes in phase I and II enzymes tell us about prevention from exposure to heterocyclic amines? *J Nutr.* 2006; 136:2683S-2684S.

Feng Q, Liang S, Jia H, Stadlmayr A, Tang L, Lan Z, Zhang D, Xia H, Xu X, Jie Z, Su L, Li X, Li X, Li J, Xiao J, Huber-Schonauer U, Niederseer D, Xu X, Al-Aama JY, Yang J, Kristiansen K, Arumugan M, Tilg H, Datz C, Wang J. Gut microbiome development along the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nat Commun.* 2015;6:6528.

Ferguson LR. Meat and cancer. *Meat Science.* 2010; 84:308-313.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 1997; 43:61-68.

Ferrucci LM, Cross AJ, Gunter MJ, Ahn J, Mayne ST, Ma X, Chanock SJ, Yeager M, Graubard BI, Berndt SI, Huang WY, Hayes RB, Sinha R. Xenobiotic metabolizing genes, meat-related exposures, and risk of advanced colorectal adenoma. *J Nutrigenet Nutrigenomics.* 2011; 3(4-6): 170–181.

Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Chen Z, Shyr Y, Cai Q, Ness RM, Zheng W. Using gene-environment interaction analyses to clarify the role of well-done

meat and heterocyclic amine exposure in the etiology of colorectal polyps. *Am J Clin Nutr.* 2012; 96:1119-1128.

Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Cai Q, Ness RM, Zheng W. Interaction of cigarette smoking and carcinogen-metabolizing polymorphisms in the risk of colorectal polyps. *Carcinogenesis.* 2013; 34(4): 779-786.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;385(9963):117-171.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* 2015 Jul;1(4):505-27.

Gonenc A, Tokgoz D, Aslan S, Torun M. Oxidative stress in relation to lipid profiles in different stages of breast cancer. *Indian J Bioch Biophisics.* 2005;42, 190-94.

Gooderham NJ, Zhu H, Lauber S, Boyce A, Creton S. Molecular and genetic toxicology of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Mutat Res.* 2002; 506-507:91-99.

Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Quím Nova.* 2009;32:199-174.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancer* 2005; 51: 227-234.

Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of Life Sciences,* 2001:1-7.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology.* 2004; 142:231-255.

Halliwell B. Biochemical of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions.* 2007; 35:1147-1150.

Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2002; 506-507:65-77.

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina U, Nangju NA, Feng Y. Molecular Genetics and Epidemiology of the NAT1 and NAT2 Acetylation Polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9:29.

Helmus DS, Thompson CL, Zelenskiy S, Tucker TC, Li L. Red meat-derived heterocyclic amines increase risk of colon cancer: a population-based case-control study. *Nutr Cancer*. 2013;65(8):1141-50.

Hickman D, Pope J, Patil S, Fakis, G., Smelt, V., Stanley, L. Sim, E. Expression of arylamine N-acetyltransferase in human intestine. *Gut*. 1998; 42:402-409.

Hiragi CO, Vilela ALM, Rocha DMS, Oliveira SF, Hatagima A, Klautau-Guimarães MN. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms in three Brazilian population groups. *Genet Mol Biol*. 2010; 34:11-18.

Hosseini-Zijoud SM, Ebadi SA, Goodarzi MT, Hedayati M, Abbasalipourkabir R, Mahjoob MP, Poorolajal J, Zicker F, Sheikh N. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Patients with Medullary Thyroid Carcinoma: A Case-Control Study. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(2): BC04–BC07.

Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, Wu KY. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(4):505-10.

Hunt R, Sauna ZE, Ambudkar SV, Gottesman MM, Kimchi-Sarfaty C. Silent (synonymous) SNPs: should we care about them? *Methods Mol Biol*. 2009;578:23-39.

IARC. International Agency for research on cancer. IARC Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat. 2015a.

IARC. International Agency for research on cancer. Q&A on the carcinogenicity of the consumption of red meat and processed meat. 2015b.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015.

Ito N, Hasegawa R, Sano M. A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*. 1991; 12:1503–1506.

Izzotti A, Bagnasco M, D'Agostini F, Cartiglia C, Lubet RA, Kelloff GJ, De Flora S. Formation and persistence of nucleotide alterations in rats exposed whole-body to environmental cigarette smoke. *Carcinogenesis* 1999; 20, 1499–1505.

Jägerstad M, Skog K. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res.* 2005; 1:156-172.

Jones DP. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2006; 8:1865-1879.

Kamiya H, Murata-Kamiya N, Koizume S, Inoue H, Nishimura S, Ohtsuka E. 8-Hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in hot spots of the c-Ha-ras gene: effects of sequence contexts on mutation spectra. *Carcinogenesis* 1995; 16, 883–889.

Kampman E, Slattery ML, Bigler J, Leppert M, Samowitz W, Caan BJ, Potter JD. Meat consumed genetic susceptibility, and colon cancer risk: a United States multicenter case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 1999; 8:15–24.

Kim D, Lee YJ, Ryu HY, Lee JH, Kim HK, Kim E, Moon JD, Chang DD, Yoon HS. Genetic polymorphisms in metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *J Appl Toxicol.* 2013;33(1):63-70.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:239-267.

Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol Pathol.* 2010; 38: 96-109.

Knekt P, Järvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer.* 1999 Mar 15;80(6):852-6.

Knize MG, Dolbeare FA, Carroll KL, Moore DH 2nd, Felton JS. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32:595-603.

Kobayashi M, Hanaoka T, Nishioka S, Kataoka H, Tsugane S. Estimation of dietary HCA intakes in a large-scale population-based prospective study in Japan. *Mutat Res.* 2002; 506-507:233-241.

Kovacic P, Jacintho JD. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem.* 2001;8:773-796.

Lee SF, Pervaiz S. Assessment of Oxidative Stress-Induced DNA Damage by Immunofluorescent Analysis of 8-OxodG. *Methods in cell biology.* 2011; 3: 99-113.

Li D, Zhang W, Zhu J, Chang P, Sahin A, Singletary E, Bondy M, Hazra T, Mitra S, Lau S, Shen J, DiGiovanni J. Oxidative DNA damage and 8-hydroxy-2-deoxyguanosine DNA glycosylase/apurinic lyase in human breast cancer. *Mol. Carcinog.* 2001; 31, 214–223.

Li D, Day RS, Bondy ML, Sinha R, Nguyen NT, Evans DB, Abbruzzese JL, Hassan MM. Dietary mutagen exposure and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(4):655-61.

Li R, Li W, Xie J, Zhang Y. Lipid peroxidation in different tissues of rats treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2012; 41(1):102-105.

Li R, Tian J, Li W, Xie J. Effects of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) on histopathology, oxidative stress, and expression of c-fos, c-jun and p16 in rat stomachs. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:182-191.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2001; 37:293-303.

Lin J, Zhang SM, Cook NR, Lee IM, Buring JE. Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. *Am J Epidemiol.* 2004;160(10):1011-22.

Lin PH, La DK, Upton PB, Swenberg JA. Analysis of DNA adducts in rats exposed to pentachlorophenol. *Carcinogenesis* 2002; 23, 365–369.

Lipschitz DA. Screening for nutritional status in the elderly. *Prim Care.* 1994;21(1), 55-67.

Loureiro APM, Mascio PD, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quim Nova.* 2002; 25:777-793.

Maeda H, Sato K, Akaike T. Superoxide radical generation from heterocyclic amines. *Princess Takamatsu Symp.* 1995; 23:103-112.

Maeda H, Sawa T, Yubisui T, Akaike T. Free radical generation from heterocyclic amines by cytochrome b5 reductase in the presence of NADH. *Cancer Lett.* 1999; 143: 117-121.

Malta DC, Moura L, Prado RR, Escalante JC, Schmidt MI, Duncan BB. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. *Epidemiol. Serv. Saúde,* Brasília. 2014; 23(4):599-608.

Mano T, Shinohara R, Iwase K, Kotake M, Hamada M, Uchimuro K, et al. Changes in free radical scavengers and lipid peroxide in thyroid glands of various thyroid disorders. *Hormone and metabolic research.* 1997; 29(7):351–54.

Marchasson I, Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Richard-Harston S, Decamps A, Reignier B, Emeriau JP, Rainfray M. Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients. *Age and Ageing.* 2001; 30:235-241.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999; 424:83-95.

Marques AC, Valente TB, Rosa CS. Formação de toxinas durante o processamento de alimentos e possíveis consequências para o organismo humano. *Rev Nutr.* 2009; 22:283-293.

Marchand LL, Hankin JH, Wilkens LR, Pierce LM, Franke A, Kolonel LN, Seifried A, Custer LJ, Chang W, Lum-Jones A, Donlon T. Combined Effects of Well-done Red Meat, Smoking, and Rapid N-Acetyltransferase 2 and CYP1A2 Phenotypes in Increasing Colorectal Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2001; 10:1259-1266.

McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JMW, Bonham MP, Fearon AM. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science.* 2010; 84:1-13.

Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res.* 2009; 674:36-44.

Micha R, Wallace SK, Mozaffarian D. Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2010; 121, 2271-2283.

Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, Toda C, Sakai Y, Ueda K, Hiraku Y, Murata M, Kawanishi S, Kojima N. Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage. *Chem Biol Interact.* 2004; 150, 271-281.

Miller S, Dykes D, Poleski H. A single salting out procedures for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215-1216.

Ministério da Saúde. Plano de ações estratégicas para enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2014: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Mohammed k, Bellili-Muñoz N, Driss F, Roussel R, Seta N, Fumeron F, Hadjadj S, Marre M, Velho G. Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with Type 1 Diabetes. *PlosOne.* 2014; 9(5): e96916.

Moshfegh AJ, Rhodes DG, Baer DJ, Murayi T, Clemens JC, Rumpler WV, Paul DR, Sebastian RS, Kuczynski KJ, Ingwersen LA, Staples RC, Cleveland LE. The US Department of Agriculture automated multiple-pass method reduces bias in the collection of energy intakes. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 324-332.

Murata M, Kawanishi S. Oxidation of 5'-site guanine at GG and GGG sequences induced by a metabolite of carcinogenic heterocyclic amine PhIP in the presence of Cu(II) and NADH. *Carcinogenesis*. 2002; 23:855-860.

Murata M, Kobayashi M, Kawanishi S. Nonenzymatic reduction of nitro derivative of a heterocyclic amine IQ by NADH and Cu(II) leads to oxidative DNA damage. *Biochemistry*. 1999; 38(24):7624-9.

Murata M, Kobayashi M, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by a heterocyclic amine, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5f]quinoxaline. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90(3):268-75.

Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2197-223.

Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, Hamer DH. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res*. 2001; 11:163-169.

Nagao M, Honda M, Seino Y, Yahagi T, Sugimura T. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett*. 1977; 2:221-226.

NDSR - Nutrition Data System for Research. [software]. Version 2005. Minneapolis: University of Minnesota; 2007.

Nowell S, Coles B, Sinha R, MacLeod S, Ratnasinghe DL, Stotts C, Kadlubar FF, Ambrosone CB, Lang NP. Analysis of total meat intake and exposure to individual heterocyclic amines in a case-control study of colorectal cancer. *Mutation Research*. 2002; 507:175–185.

Obtulowicz T, Swoboda M, Speina E, Gackowski D, Rozalski R, Siomek A, Janik J, Janowska B, Ciesla JM, Jawien A. et al. Oxidative stress and 8-oxoguanine repair are enhanced in colon adenoma and carcinoma patients. *Mutagenesis*. 2010; 25, 463–471.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*. 2015;97:55-74.

Poirier MC. DNA adducts as exposure biomarkers and indicators of cancer risk. *Environ Health Perspect*. 1997;105 Suppl 4:907-12.

Puangsombat K, Gadgil P, Houser TA, Hunt MC, Smith JS. Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products. *Meat Sci*. 2012;90:739-746.

Radak Z, Boldogh I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49:587-596.

Raper N, Perloff B, Ingwersen L, Steinfeldt L, Anand J. An overview of USDA's Dietary Intake Data System. *J Food Compos Analysis*. 2004; 17:545-555.

Reszka E, Jablonowski Z, Wieczorek E, Jablonska E, Krol MB, Gromadzinska J, Grzegorczyk A, Sosnowski M, Wasowicz W. Polymorphisms of NRF2 and NRF2 target genes in urinary bladder cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(10):1723-31.

Ribeiro AL, Duncan BB, Brant LC, Lotufo PA, Mill JG, Barreto SM. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. *Circulation*. 2016;133(4):422-33.

Rohrmann S, Becker N. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines *Public Health Nutr*. 2002; 5:699–705.

Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J. Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89:1418-1424.

Rover-Junior L, Hoehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quím Nova*. 2001; 24:112-119.

Sabbagh A, Darlu P, Vidaud M. Evaluating NAT2PRED for inferring the individual acetylation status from unphased genotype data. *BMC Med Genet*. 2009; 10: 148.

Salehi M, Moradi-Lakeh M, Salehi MH, Nojomi M, Kolahdooz F. Meat, fish, and esophageal cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Nutr Rev*. 2013; 71:257-267.

Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.

Scott B, Deman A, Peeters P, Braden CV, Stolear JC, Camp GV, Verbeelen D. Cardiac troponin T and malondialdehyde modified plasma lipids in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 737–742.

Sreenivasa Rao CS, Sarala Kumari D. Changes in plasma lipid peroxidation and the antioxidant system in women with breast cancer. *Int J Basic Appl Sci*. 2012; 1:429-38.

Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 2010; 704:152-159.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R. Red meat and colon cancer: The cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer Research*. 1999;59:5704–5709.

Shen HM, Ong CN, Lee BL, Shi CY. Aflatoxin B1-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* 1995; 16, 419–422.

Shirai T, Sano M, Tamano S. The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. *Cancer Res.* 1997; 57:195–198.

Sinha R, Rothman N, Salmon CP, Knize MG, Brown ED, Swanson CA, Rhodes D, Rossi S, Felton JS, Levander OA. Heterocyclic amine content in beef cooked by different methods to varying degrees of doneness and gravy made from meat. *Food Chem Toxicol.* 1998; 36:279-287.

Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Butler J, Garcia-Closas M, Weil R, Hoover RN, Rothman N. Well-done, Grilled Red Meat Increases the Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Research.* 1999; 59:4320–4324.

Skog K, Steineck G, Augustsson K, Jägerstad M. Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis.* 1995; 16:861-867.

Spirlandeli AL, Deminice R, Jordao AA. Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. *Int J Sports Med.* 2014;35(1):14-8.

Stewart BW, Wild CP, eds. World Cancer Report 2014. The International Agency for Research on Cancer, IARC; 2014.

Stolzenberg-Solomon RZ, Cross AJ, Silverman DT, Schairer C, Thompson FE, Kipnis V, Subar AF, Hollenbeck A, Schatzkin A, Sinha R. Meat and meat-mutagen intake and pancreatic cancer risk in the NIH-AARP cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16:2664-2675.

Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.* 2004; 95:290–99.

Teixeira RL, Miranda AB, Pacheco AG, Lopes MQ, Fonseca-Costa J, Rabahi MF, Melo HM, Kritski AL, Mello FC, Suffys PN, Santos AR. Genetic profile of the arylamine N-acetyltransferase 2 coding gene among individuals from two different regions of Brazil. *Mutat Res.* 2007;624(1-2):31-40.

Tomalik-Scharte D, Lazar A, Fuhr U, Kirchheimer J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics J.* 2008; 8:4–15.

Turesky RJ. The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. *Curr Drug Metabol.* 2004; 5:169-180.

Turesky RJ, Schnackenberg T, Holland F. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:3248-3259.

Turesky RJ, Le Marchand L. Metabolism and biomarkers of heterocyclic aromatic amines in molecular epidemiology studies: lessons learned from aromatic amines. *Chem Res Toxicol.* 2011; 24:1169-1214.

Umemura T, Kai S, Hasegawa R, Sai K, Kurokawa Y, Williams GM. Pentachlorophenol (PCP) produces liver oxidative stress and promotes but does not initiate hepatocarcinogenesis in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1999; 20, 1115–1120.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009; 27:120-139.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin NTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova.* 2007; 30:1323-1338.

Yoshida R, Ogawa Y, Kasai H. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine values measured by an ELISA correlated well with measurements by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:1076-81.

Yu X, Dhakal IB, Beggs M, Edavana VK, Williams S, Zhang X, Mercer K, Ning B, Lang NP, Kadlubar FF, Kadlubar S. Functional Genetic Variants in the 3'-Untranslated Region of Sulfotransferase Isoform 1A1 (*SULT1A1*) and Their Effect on Enzymatic Activity. *Toxicol Sci.* 2010; 118:391–403.

Walker K, Ginsberg G, Hattis D, Johns DO, Guyton KZ, Sonawane B. Genetic polymorphism in *N*-Acetyltransferase (NAT): population distribution of NAT1 and NAT2 activity. *J Toxicol Env Heal B.* 2009; 12:440–472.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity; 1997.

Windmill KF, McKinnon RA, Zhu X, Gaedigk A, Grant DM, McManus ME. The role of xenobiotic metabolizing enzymes in arylamine toxicity and carcinogenesis: functional and localization studies. *Mutat Res.* 1997; 376(1-2):153-60.

Wong KY, Su J, Knize MG, Koh WP, Seow A. Dietary exposure to heterocyclic amines in a chinese population. *Nutr Cancer.* 2005; 52:147–155.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington DC: AICR, 2007.

World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. Colorectal cancer 2011 report. Washington DC: AICR, 2011.

Wünsch Filho V, Gattás GJF. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. *Cad. Saúde Pública.* 2001; 17:467-480.

Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakila S, Malamou-Mitsi V, Schoneveld O, Pappa A, Panayiotidis MI. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact.* 2010; 188:334-339.

Zhu H, Yang X, Zhang C, Zhu C, Tao G, Zhao L, Tang S, Shu Z, Cai J, Dai S, Qin Q, Xu L, Cheng H, Sun X. Red and processed meat intake is associated with higher gastric cancer risk: a meta-analysis of epidemiological observational studies. *PLoS One.* 2013; 8:1-10.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – CURRÍCULO LATTES DO ORIENTADOR

English

Dados gerais Formação Atuação Projetos Produções Inovação Eventos Orientações Bancas Citações +



Dirce Maria Lobo Marchioni

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D - CA SN - Saúde Coletiva e Nutrição

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9059184202721558>

Última atualização do currículo em 14/09/2016

Possui graduação em Nutrição pela Universidade de São Paulo (1985), mestrado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (1999) e doutorado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo (2003) e pós doutorado no Imperial College London. Atualmente é pesquisador e professor Associado da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Nutrição, com ênfase em Consumo Alimentar, abordando principalmente nos seguintes temas: consumo alimentar, dieta, recomendações dietéticas, consumo de alimentos e estudos epidemiológicos. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome
Dirce Maria Lobo Marchioni

Nome em citações bibliográficas
MARCHIONI, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce Maria Lobo;Marchioni, Dirce M.;Marchioni, Dirce M. L.;Marchioni, D. M. L.;Marchioni, D.;Marchioni, Dirce Maria;MARCHIONI, DIRCE M.;MARCHIONI, DIRCE M.;Dirce Maria Lobo Marchioni;MARCHIONI, D.M.;MARCHIONI DM;MARCHIONI, DIRCE M.;LOBO MARCHIONI, DIRCE MARIA;DIRCE MARIA LOBO MARCHIONI;MARCHIONI, DIRCE MARIA L.

Endereço

Endereço Profissional
Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição.
Av Dr Arnaldo 715
01246-904 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30667771
Ramal: 257
URL da Homepage: <http://>

Formação acadêmica/titulação

1999 - 2003
Doutorado em Saúde Pública (Concelito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
com período sanduíche em International Agency for Research On Cancer (Orientador: Paulo Boffetta).
Título: Fatores dietéticos e câncer oral: um estudo caso-controle no Município de São Paulo, Ano de obtenção: 2003.
Orientador:  Regina Mara Fibberg.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: câncer oral; consumo de alimentos.
Grande área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Cuidado À Saúde das Populações Humanas.

1996 - 1999
Mestrado em Saúde Pública (Concelito CAPES 6).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Alimentação no primeiro ano de vida: prevalência de consumo de alimento em dois Centros de Saúde no Município de São Paulo, Ano de Obtenção: 1999.
Orientador:  Sonia Buxerminho de Souza.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
Palavras-chave: alimentação do lactente; aleitamento materno; desmame; suplementação alimentar.
Grande área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Nutrição e Alimentação; Cuidado À Saúde das Populações Humanas.

1980 - 1985
Graduação em Nutrição.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Pós-doutorado e Livre-docência

2011

ANEXO 2 – CURRÍCULO LATTES DOUTORANDO

English

Dados gerais Formação Abaixo Projetos Produções Educação e Popularização de C & T Eventos +

 [currículo Lattes](#)

[Aline Martins de Carvalho](#)

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/260059596840464>
Última atualização do currículo em 30/07/2016

Graduada em Nutrição e mestre em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (2012). Atualmente é doutoranda em Nutrição em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo com estágio em pesquisa no Department of Nutrition da Harvard School of Public Health, é coordenadora do projeto de extensão universitária SustentAREA A Rede Alimentar (sustentarea.com.br), e nutricionista da Coordenadoria de Alimentação Escolar (CODAE) da Secretaria Municipal de Educação da Prefeitura do Município de São Paulo. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome
Aline Martins de Carvalho
Nome em citações bibliográficas
CARVALHO, A. M.;De Carvalho, A. H.;De Carvalho, A.;DE CARVALHO, ALINE;CARVALHO, ALINE MARTINS DE

Endereço

Endereço Profissional
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.
Av. Dr. Arnaldo, 715
Carqueirinha César
01245-904 - São Paulo, SP - Brasil
URL da Homepage: www.fsp.usp.br

Formação acadêmica/butuação

2012
Doutorado em andamento em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP USP, Brasil.
com período sanduíche em Harvard School of Public Health (Orientador: Lu Qi).
Título: Consumo de carnes e amêias heterocíclicas e sua relação com biomarcadores de exposição e suscetibilidade para câncer no estudo ISA-Capital,
Orientador:  Dirce Maria Lobo Marchioni.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2010 - 2012
Mestrado em Nutrição em Saúde Pública.
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP USP, Brasil.
Título: Tendência temporal de consumo de carne no Município de São Paulo: estudo de base populacional ? ISA Capital 2003/2008, Ano de Obtenção: 2012.
Orientador:  Dirce Maria Lobo Marchioni.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2005 - 2009
Graduação em Nutrição.
Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP USP, Brasil.
Título: Iniciação Científica: Caracterização das propriedades funcionais do isolado protéico do amaranto (*Amaranthus cruentus* L.).
Orientador: José Alfredo Gómez Álvarez.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2002 - 2003
Curso técnico/profissionalizante.
Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas, ETEGV, Brasil.

Formação Complementar

2015