UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos

Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduaçãoe em Toxicologia, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 12/12/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Gomes, Tarsila Daysy Ursula Hermogenes.

Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos. Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes. Ribeirão Preto, 2013.

116 p: Il:30cm

Tese de Doutoradoapresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.- Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora Lusânia Maria Greggi Antunes.

1. Metionina. 2. Deficiência. 3. Suplementação. 4. Estresse oxidativo. 5. Danos ao DNA. 6. Expressão de RNAm.

FOLHA DE APROVAÇÃO

GOMES, T. D. U. H. Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Tarsila Daysy Ursula Hermogenes Gomes

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedico

A meus pais, com amor e gratidão por todo o amor e apoio por toda a minha vida, especialmente ao meu pai *Severino* que não pode mais estar presente fisicamente junto a mim, mas permanece eternamente no meu coração.

Agradecimentos

Às professoras Doutoras *Lusânia Maria Greggi Antunes* e *Maria de Lourdes Pires Bianchi* pela orientação durante o doutorado, pelos ensinamentos que levarei para minha vida acadêmica e pelo apoio fora do ambiente da universidade e compreensão e apoio nos últimos meses.

À *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto* da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* pela concessão da bolsa de estudos.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* pelo financiamento do projeto.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* pelos recursos para a execução do projeto.

Aos funcionários do laboratório de Nutrigenômica*Regislane, Jefferson* e, principalmente,*Joana D'Árc*, pela ajuda inestimável para a realização dos experimentos e convívio.

Aos colegas de laboratório *Lívia, Marina, Vinicius, Mara, Rita, Carla, Juliana Mara, Juliana Ribeiro, Patrícia, Cátia, Graciela, Fabíola, Farah, Michela, Patrick, Bruno, Fábio* e, principalmente, *Alexandre* pela ajuda para a realização dos experimentos e os diversos momentos dentro e fora da universidade, em especial nos últimos meses pelo apoio que recebi.

Aos colegas da organização do V SINPOSPQ*Beatriz, Bianca, Camila, Cristiane, Diego, Erick, Fabrício, Fernanda Almeida, Fernanda Moreira, Fernanda Amorim, Francielle, Gabriela Buqui, Ivan, Josimar, Juliana Souza, Karina, Leonardo, Lizziane,Luca, Maria Augusta, Nádia, Otávio, Paulo, Priscilla, Raquel, Renan eTatiane* pela convivência antes, durante e depois do evento.

Às colegas da American Association of Pharmaceutical Sciences/ Student Chapter *Lívia Cardoso, Lívia Depieri, Patrícia, Erika, Ana Luiza, Jéssica, Gabriela Bianchi, Juliana Freitas e Juliana Cardoso*pela convivência e oportunidade de realizar eventos importantes no meio acadêmico e pelo apoio durante os últimos meses.

Às colegas *Mariana e Alecsandra* pelo convívio, apoio e diversos momentos de diversão.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelas disciplinas cursadas.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Às funcionárias da Egali, *Luciana* e *Maiara,* por terem me orientado para a realização do meu intercâmbio.

Aos meus colegas de intercâmbio, brasileiros ou não, pela torcida.

Aos meus professores de inglês e espanhol *Alexandre, Maurício e Humberto* pelos momentos divertidos das aulas.

Aos colegas dos cursos de inglês e espanhol pela convivência e torcida.

Aos meus colegas de graduação e mestrado com os quais mantive contato, que me apoiam em conversas *online* e nos encontros que sempre tivemos e continuaremos a ter.

Aos professores de colégio, da gradução e mestrado que fizeram parte dessa caminhada em especial à*Marcieni* pela orientação no mestrado e incentivo para o doutorado.

Às minhas amigas de colégio *Francine, Ana Paula, Aline e Fernanda* que sempre me apoiaram e incentivaram e também fazem parte dessa caminhada.

A todos os meus colegas e amigos de colégio e infância que, de alguma forma, me apoiaram pessoalmente ou por conversas *on line*.

Às minhas amigas de infância *Carolina*e *Andréia*pela amizade sempre verdadeira, conversas e incentivos.

Aos meus pais *Marilza* e *Severino* e irmão *Warygton* pelo amor incondicional, torcida e apoio distante ou pessoalmente, com todas as dificuldades pelas quais já passamos juntos.

"Mas nós vibramos em outra frequência, sabemos que não é bem assim. Se fosse fácil achar o caminho das pedras, tantas pedras no caminho não seria ruim."

Humberto Gessinger

Resumo

GOMES, T. D. U. H.**Efeito da concentração de metionina na dieta durante o período pré e pós-natal sobre o estresse oxidativo, a instabilidade genômica e expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs* em camundongos**. 2013. 116 folhas. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

A metionina é doadora de grupos metil para metilação do DNA, processo responsável por modificações da expressão gênica. Diante da importância da metionina para o crescimento e desenvolvimento normais, variações desse aminoácido na dieta podem alterar a estabilidade do DNA. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de dietas deficiente e suplementada em metionina sobre a instabilidade genômica e o estresse oxidativo em camundongos e suas mães tratadas durante gestação e lactação e destas também foi realizada a expressão de RNAm de *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs*das vias de transmetilação, remetilação e transsulfuração da metionina, respectivamente, em fígado. As fêmeas foram divididas nos grupos de dietas de metionina (controle, 0,3% DL-metionina; suplementado, 2,0%; e deficiente 0%) até o fim da lactação (10 semanas) e, para cada grupo de fêmeas, os filhotes foram subdivididos e também receberam essas dietas durante 18 semanas após desmame. Foram avaliados o consumo de ração, massa corpórea e massa relativa de fígado e rinse a taxa de sobrevivência dos filhotes. Também foram realizadas a avaliação da peroxidação lipídica (quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBARS), da quantificação de glutationa (GSH)e da atividade da catalase, da instabilidade genômica (ensaio do cometa) e a análise do RNAm de*Mat1a*, *Bhmt*e*Cbs* somente em fígado das fêmeas. A dieta deficiente resultou em menor consumo de ração e massa corpórea em ambas fases e reduziu a sobrevivência dos filhotes que receberam essa dieta.A suplementação reduziu a concentração de TBARS nas fêmeas em ambos tecidos e a deficiência não diferiu. Nos filhotes, a suplementação reduziu a concentração de TBARS em fígado, enquanto que a deficiência aumentou. A suplementação aumentou a concentração de GSH em fígado das fêmeas, assim como a deficiência em rins. Nos filhotes, houve uma inversão de respostas, ou seja, a suplementação reduziu a concentração de GSH em fígado, assim como a deficiência, também observada em rins. Não houve diferença na catalase das fêmeas, mas houve redução em ambos tecidos dos filhotes. A suplementação e a deficiência reduziram os danos ao DNA hepático das fêmeas, mas em rins a suplementação aumentou e a deficiência reduziu. Nos filhotes, a suplementação e a deficiência aumentaram os danos ao DNA em ambos tecidos. A suplementação de metionina em fêmeas não alterou a expressão dos RNAm avaliados e a deficiência reduziu em *Cbs* somente. Concluiu-se que na fase materna, a suplementação ou a deficiência de metionina não resultou em estresse oxidativo, mas a suplementação reduziu a instabilidade genômica no fígado e aumentou no rim. A deficiência resultou em menor instabilidade nos dois tecidos. Na fase descendente, a suplementação e a deficiência de metionina apresentaram variação de estresse oxidativo em ambos tecidos e também resultaram em maior instabilidade genômica.

Palavras-chave: metionina, deficiência, suplementação, estresse oxidativo, danos ao DNA,expressão de RNAm.

Abstract

GOMES, T. D. U. H.**Effect of dietary methionine concentration during pre and post-natal on oxidative stress, genomic instability, and the expression of *Mat1a, Bhmt* and *Cbs* mRNA in mice**.2013. 116 folhas. Thesis (Doctoral)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

Methionine is the main methyl donor for the DNA methylation, a process responsible for gene expression modifications. Since this essential amino acid is required for normal growth and development, variations of this compound in the diet may lead to alterations on DNA stability. Thus, this study aimed to evaluate the effect of deficient and supplemented methionine diets on oxidative stress and genomic instability in mice and their dams treated during pregnancy and lactation, and the expression of *Mat1a, Bhmt* and *Cbs* mRNA of transmethylation, remetthylation, and transulfuration pathways, respectively, in dams livers. The dams were divided into three methionine diets groups (control, 0,3% DL-methionine; supplemented, 2,0%; and deficient, 0%) until the end of lactation (10 weeks). For each dams groups, the offspring were subdivided and were also treated with the same diets during 18 weeks after weaning. The parameters evaluated were food intake, body weight, relative liver and kidney weights, and survival of the offspring. Also, it was carried out theevaluation of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS), quantification of glutathione (GSH) and catalase activity, and genomic instability (comet assay) in liver and kidneys; and*Mat1a*, *Bhmt*, and *Cbs*mRNA analysis only in dams liver. The deficient diet resulted in lower food intake and body weights in both phases and reduced the survival of the offspring that were treated with this diet. The supplemented diet reduced the TBARS concentration in both tissues of dams and the deficient diet did not differ. In the offspring, the supplementation reduced liver TBARS, whereas the deficiency raised. The supplementation increased the liver GSH concentration of dams, as well as the deficiency in kidneys. In the offspring, the responses were different; the supplementation reduced the liver GSH, as well as the deficiency, also observed in kidneys. There were no differences of catalase parameter of dams, but there was a reduction in both tissues of the offspring. Both supplementation and deficiency reduced the liver DNA damage of dams, however the supplementation increased and the deficiency reduced the DNA damage of kidneys. In the offspring, both diets increased the DNA damage in both tissues. The methionine supplementation did not differ the mRNA expression and the deficiency only reduced the Cbs, mRNA expression. It was concluded that the methionine supplementation or deficiency did not resulted in oxidative stress in dams, but the supplementation reduced the genomic instability of liver and raised the kidney one. The deficiency resulted in lower genomic instability in both tissues in dams. In the offspring, both methionine supplementation and deficiency presented variation of oxidative stress in both tissues and resulted more genomic instability.

Key words: methionine, deficiency, supplementation, oxidative stress, DNA damage, mRNA expression

Lista de Figuras

Figura 1: Metionina 18
Figura 2: Biotransformação da metionina. 19
Figura 3: S-adenosilmetionina (SAM) 19
Figura 4: Autoxidação da homocisteína. 25
Figura 5: Fases da peroxidação lipídica 26
Figura 6: Ação do sistema antioxidante. A: Neutralização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo sistema antioxidante. B: Ciclo de regeneração da glutationa GSH. 28
Figura 7: Protocolo experimental da Fase Materna. 38
Figura 8: Protocolo experimental da Fase Descendente. 39
Figura 9: Consumo médio de ração semanal das fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina. 50
Figura 10: Massa corpórea de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas de tratamento. 51
Figura 11: Peroxidação lipídica obtida em tecidos hepático e renal de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. 53
Figura 12: Quantificação de GSH (glutationa reduzida) nos tecidos hepático e renal em fêmeas de camundongos tratadas com dieta suplementada em metionina durante 10 semanas. 54
Figura 13: Atividade da catalase em tecidos hepático e renal de fêmeas de camundongos tratadas com dieta suplementada em metionina durante 10 semanas.. 55
Figura 14: Instabilidade genômica pelo ensaio do cometa em células hepáticas e renais de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. ... 56
Figura 15: Expressão relativa dos RNAm de genes envolvidos na biotransformação da metionina em amostras de fígado de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. 58
Figura 16: Taxa de sobreviência dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas. 59
Figura 17: Consumo semanal de ração dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas. 60
Figura 18: Massas corpóreas dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas. 61
Figura 19: Peroxidação lipídica nos tecidos hepático e renal dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas.. 63
Figura 20: Quantificação de GSH (glutationa reduzida) em tecidos hepático e renal de filhotes de camundongos tratados com difererentes dietas de metionina durante 18 semanas. 64
Figura 21: Quantificação da atividade da catalase em tecidos hepático e renal de filhotes de camundongos tratados com difererentes dietas de metionina durante 18 semanas. 65
Figura 22: Instabilidade genômica pelo ensaio do cometa de células hepáticas e renais dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas. ... 67

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição das dietas 37
Tabela 2: *Primers* selecionados para as reações de RT-qPCR 46
Tabela 3. Eficiências das amplificações dos transcritos de fígado da Fase Materna na reação de RT-qPCR 47
Tabela 4:Massas absolutas de fígado e rim, massa corpórea e relação entre massa do órgão e massa corpórea em fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas 52
Tabela 5: Quantidade de RNA total e as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} indicadoras da pureza em amostras de fígado de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. 57
Tabela 6: Massas absolutas de fígado e rim, massa corpórea e relação entre massa do órgão e massa corpórea em filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas 62

SUMÁRIO

1 Introdução 15
1.1 Nutrigenômica e Epigenética 15
1.2 Metionina 17
1.2.1 Biotransformação 18
1.3 Nutrição Materna e Hipótese Fetal de Origem de Doenças 22
1.4 Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante 24
1.4.1 Peroxidação Lipídica 25
1.4.2 Sistema Antioxidante 27
1.5 Instabilidade Genômica e Ensaio do Cometa 29
1.6 Expressão Gênica por RT-qPCR 30
2 **Objetivos 34**
2.1 Objetivo Geral 34
2.2 Objetivos Específicos 34
3 Material e Métodos 36
3.1 Animais 36
3.2 Delineamento Experimental 36
3.2.1 Estabelecimento das Dietas de Metionina 36
3.2.2 Fase Materna 38
3.2.3 Fase Descendente 38
3.3 Metodologia 40
3.3.1 Consumo de Ração 40
3.3.2 Relação Massa do Órgão e Massa Corpórea 40
3.3.3 Estresse Oxidativo 41
3.3.4 Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa ou Eletroforese em Gel de Célula Única 43
3.3.5 Análise da Expressão do RNAm dos Genes *Mat1a, Bhmt* e *Cbs* em Fígado da Fase Materna 44
3.3.6 Análise Estatística 48
4 Resultados 50
4.1 Fase Materna 50

4.1.1 Consumo de Ração 50
4.1.2 Massa Corpórea 51
4.1.3 Relação Massa Órgão e Massa Corpórea 52
4.1.4 Estresse Oxidativo 53
4.1.5 Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa 55
4.1.6 Expressão dos RNAm de *Mat1a, Bhmt e Cbs* por RT-qPCR 56
4.2 Fase Descendente 59
4.2.1 Taxa de Sobrevivência 59
4.2.2 Consumo de Ração 60
4.2.3 Massa Corpórea 60
4.2.4 Relação Massa Órgão e Massa Corpórea 62
4.2.5 Estresse Oxidativo 63
4.2.6 Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa 66
5 Discussão 69
6 Conclusões 87
7 Referências 89
Anexo 111

Introdução

1 Introdução

1.1 Nutrigenômica e Epigenética

A exposição de populações humanas a carcinógenos e mutágenos presentes no ambiente pode desencadear diversas alterações a nível genômico. Entretanto, essa exposição não é considerada a única fonte para modificações no material genético. O consumo inadequado de importantes nutrientes requeridos para a manutenção do DNA pode induzir efeitos similares aos causados por genotóxicos ambientais, tais como os carcinógenos químicos e radiação ionizante (AMES, 2001). A dieta pode ser um fator importante no metabolismo do DNA, cujos nutrientes atuam como substrato ou cofatores em vias metabólicas relacionadas não somente à síntese e reparo do DNA, mas também às de detoxificação de carcinógenos (FENECH, 2002; FENECH; FERGUSON, 2001). Dessa forma, o DNA está continuamente suscetível a alterações causadas por uma variedade de mecanismos, que incluem mutações pontuais, modificação de bases devido à reação com as espécies reativas de oxigênio (EROs), quebras e rearranjos cromossômicos, perda ou ganho de cromossomos, silenciamento gênico devido à metilação em regiões promotoras e redução do tamanho de telômeros (BULL; FENECH, 2008). Portanto, torna-se crescente a necessidade de estudo dos efeitos genotóxicos não somente da deficiência, mas também do excesso de nutrientes importantes para a alimentação humana. Nessa importante e crescente área das ciências nutricionais, a nutrigenômica surge para avaliar o efeito da dieta na estabilidade do DNA e expressão gênica, o que pode afetar o balanço entre saúde e doença (HERRERA; KEILDSON; LINDGREN, 2011; KAPUT; RODRIGUEZ, 2004).

A nutrigenômica baseia-se no estudo da interação gene-nutriente, buscando entender como os nutrientes afetam o balanço entre saúde e doença pela alteração na expressão e/ou estrutura genética de um indivíduo. Assim, esta ciência recente tem como objetivo principal o estabelecimento de dietas personalizadas, com base no genótipo, para a promoção da saúde e a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis e que apresentam interações complexas entre genes e ambiente, como

as doenças cardiovasculares, o câncer, o diabetes, entre outras (FIALHO; MORENO; ONG, 2008; KAPUT; RODRIGUEZ, 2004).

Para a nutrigenômica, os nutrientes são sinais da dieta que são detectados por sistemas sensores celulares que influenciam a expressão de genes e proteínas, e subsequentemente, produção de metabólitos. Portanto, padrões de expressão de genes, de proteínas e produção de metabólitos em resposta a determinados nutrientes ou regimes nutricionais podem ser vistos com “assinaturas da dieta” (AFMAN; MÜLLER, 2006). A nutrigenômica procura examinar essas assinaturas da dieta em células específicas, tecidos e organismos e entender como a nutrição influencia a homeostase. Além disso, nutrigenômica busca identificar os genes que influenciam o risco de doenças relacionadas a dietas em uma escala genômica e entender os mecanismos que estão sujeitos essas predisposições genéticas. Ferramentas genômicas podem ser usadas em duas estratégias diferentes e complementares na pesquisa de nutrição molecular: a abordagem tradicional (genes e proteínas específicos podem ser influenciados por nutrientes e são identificados por transcriptômica, proteômica e metabolômica, em que as vias regulatórias influenciadas pela dieta são identificadas) e a abordagem dos sistemas biológicos (assinaturas de genes, proteínas e metabólitos são associados a nutrientes específicos ou a regimes nutricionais, são catalogados e podem fornecer os biomarcadores moleculares das mudanças induzidas) (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Os objetivos da nutrigenômica podem ser definidos como a identificação de fatores transcricionais que funcionam como sensores nutricionais e os genes-alvo, a elucidação de vias de sinalização envolvidas e a caracterização dos principais sinais da dieta, a medida e validação das assinaturas da expressão gênica órgão- e célula-específica das consequências metabólicas de micro e macronutrientes específicos, a elucidação de interações entre vias regulatórias específicas relacionadas a nutrientes e vias próinflamatórias para entender o processo de desregulação metabólica que leva a doenças relacionadas à dieta, a identificação de genótipos que são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas a dietas (diabetes, hipertensão, aterosclerose) e quantificação dos seus impactos, o uso de sistemas biológicos

nutricionais para o desenvolvimento de biomarcadores de desregulação metabólica e suscetibilidade (assinaturas de sinais) que são influenciados pela dieta (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

Para buscar esclarecer como os compostos presentes na dieta podem influenciar o funcionamento do material genético, diversas abordagens podem ser utilizadas. Nesse contexto, a epigenética surge como o estudo das mudanças hereditárias da expressão gênica sem que ocorram mudanças na sequência do DNA, fazendo com que haja uma variação dessa expressão por meio de diversas associaçoes. McGowan, Meaney e Szyf (2008) definem a epigenética como uma combinação de mecanismos que conferem programação genética e que desencadeiam mudanças na função dos genes sem alteração na sequência do DNA. Esses mecanismos estão envolvidos em funções celulares variadas, como diferenciação, resposta ao estresse e desenvolvimento anormal, podendo desencadear o surgimento de doenças(PORTELA; ESTELLER, 2010). Os mecanismos envolvidos na modulação epigenética incluem a metilação do DNA, remodelação da cromatina e empacotamento do DNA e ação de RNAs não codificantes. Pela combinação desses mecanismos, a organização da cromatina pode ser alterada, fazendo com que uma determinada região do DNA seja mais expressa ou silenciada (HO; TANG, 2007). Tais modificações são herdáveis e essenciais para o desenvolvimento normal e manutenção das funções celulares em organismos adultos, sendo suscetíveis a fatores ambientais, como a dieta(POGRIBNY; BELAND, 2009).

1.2 Metionina

O consumo recomendado de proteínas para um indivíduo adulto é de 0,8g/kg de massa corpórea/dia. Estima-se que 97,5% da população necessitem menos proteínas que esse valor, uma vez que a dieta ocidental contém de 2 a 3,3 vezes mais proteínas que essa média recomendada (LOPEZ-TORRES; BARJA, 2008). No conteúdo proteico da dieta, a metionina é um dos aminoácidos sulfurados essenciais (Figura 1). A Organização Mundial de Saúde recomenda o consumo de 10,4 mg de metionina/Kg de

massa corpórea/dia, que juntamente com 4,1mg/kg/dia de cisteína, representam a quantidade adequada de aminoácidos sulfurados para o desenvolvimento humano ideal (WHO, 2007).

Além de exercer função na constituição de proteínas, a metionina é o principal doador de grupos metil para o processo de metilação do DNA, um dos mecanismos responsáveis por modular a expressão gênica (REES, 2002; SZYF, 2011).

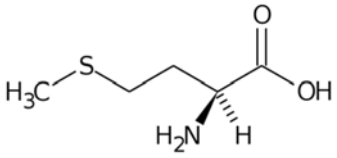

Figura 1: Metionina

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amminoacido_metionina_formula.svg

1.2.1 Biotransformação

A biotransformação do aminoácido metionina é apresentada na Figura 2. A metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 3) pela enzima metionina adenosiltransferase (MAT), principalmente a forma MAT1A presente em fígado de animais adultos. Outra enzima, a DNA metiltransferase (DNMT) transfere o grupamento metil da SAM para a citosina que precede uma guanina na sequência de DNA (o dinucleotídeo CpG). Após a transferência do grupo metil, SAM é convertida a S-adenosilhomocisteína (SAH) e, posteriormente, hidrolizada a homocisteína. Nesse momento, a homocisteína pode ser convertida a cistationina pela cistationina β-sintase (CBS) e, ao final da via de transsulfuração, originar a glutationa. Além dessa via, a metionina pode ser novamente sintetizada a partir da homocisteína, pela ação da betaína homocisteína metiltransferase (BHMT) ou pela enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) na via de remetilação (DAVIS; UTHUS, 2004; LEE; JACOBS;

PORTA, 2009; MATO; MARTINEZ-CHANTAR; LU, 2008; ROWLING; MCMULLEN; SCHALINSKE, 2002).

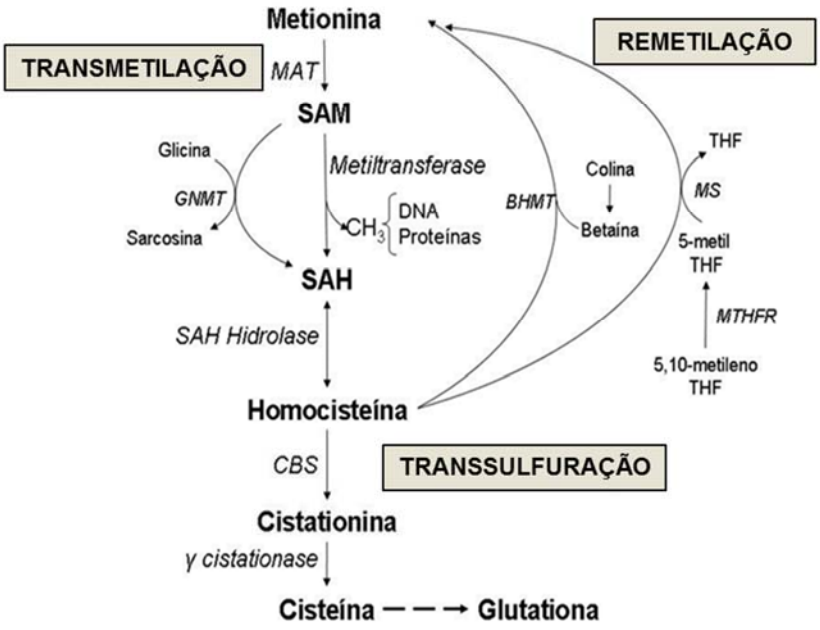

Figura 2: Biotransformação da metionina.

Fonte: Rowling, McMullen e Schalinske (2002) com adaptações.

MAT= metionina adenosiltransferase; SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína; CBS = cistationina β-sintetase; BHMT = betaína homocisteína metiltransferase; MS = metionina sintetase; THF = tetrahidrofolato)

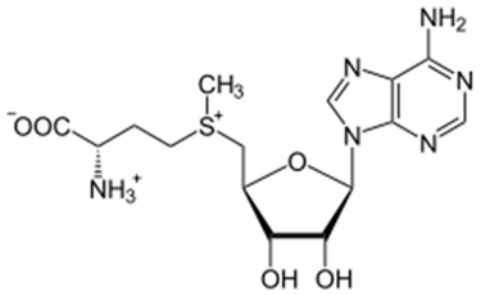

Figura 3: S-adenosilmetionina (SAM)

Fonte: http://www.coenzima.com/s-adenosil_metionina_sam

A metionina é biotransformada em SAM em todas as células de mamíferos, porém o tecido hepático é o local onde aproximadamente metade do consumo diário de metionina e 85% das reações de metilação ocorrem, fornecendo grupos metil para proteínas, nucleotídeos no DNA e RNA, açúcares, dentre outros (AVILA et al., 2002; LU; MATO, 2012). A biotransformação é catalizada pela única enzima responsável pela geração de SAM, sob as formas de isoenzimas MAT I, II e III, sendo MATI/III codificadas pelos genes *Mat1a* e MATII por *Mat2a*(KOTB et al., 1997; TOMASI et al., 2012). A enzima MATI é responsável pela biotransformação logo após o nascimento e transforma-se no tipo principal em tecidos adultos e MATII é expressa em tecidos não hepáticos e no fígado durante períodos de rápido crescimento (HUANG et al., 1998; LU; MATO, 2012).

SAM é a ligação de quatro vias metabólicas, incluindo a de transmetilação e a de transsulfuração, que constituem o metabolismo de 1-carbono, e também a de síntese de poliaminas e de transformação bioquímicas mediada pelo radical 5'-deoxiadenosil 5'. SAM atua como molécula doadora de grupo metil em reações realizadas por metiltransferases para diversas moléculas aceptoras, tais como nucleófilos (oxigênio, enxofre, nitrogênio) e átomos de carbono em proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, dentre outras (LU; MATO, 2012). No fígado, a concentração de SAM controla o fluxo da biotransformação, direcionando a homocisteína posteriormente originada para as duas vias para restabelecer a homeostase. Assim, elevadas concentrações de SAM podem inibir a enzima MTHFR e ativar CBS, direcionando a homocisteína para a via de transsulfuração irreversível, na síntese de cisteína e de GSH ou é excretada para o plasma e catabolizada, enquanto que baixos níveis direcionam para a via de remetilação para regenerar metionina (FINKELSTEIN et al., 1982; MARTINOV et al., 2000; PRUDOVA et al., 2006). Por outro lado, quando a disponibilidade de metionina é baixa, o conteúdo de SAM é reduzido e não há a inibição que essa molécula exerce sobre BHMT e MTHFR. Com isso, há o direcionamento do fluxo para via de remetilação, objetivando restabelecer os níveis normais do conteúdo de metionina.

Em modelos de camundongos *Matknockout*, em que as concentrações de SAM e GSH hepáticos são reduzidos, o fígado torna-se maior e mais suscetível a danos, com

desenvolvimento espontâneo de esteatose (LU et al., 2001; PRUDOVA et al., 2006). Além disso, ocorre decréscimo nos níveis de metilação, gerando acúmulo de quebras no DNA e expressão de oncogenes, alteração da conformação do DNA e estrutura da cromatina, tornando-a mais acessível a agentes genotóxicos (POGRIBNY et al., 1995; TOMASI et al., 2009).

A enzima BHMT cataliza a ressíntese de metionina usando homocisteína e o doador de metil obtido da dieta, betaína. Essa reação é responsável por processar aproximadamente 25% do conteúdo de homocisteína em hepatócitos (FINKELSTEIN; MARTIN, 1984).

A enzima CBS é a primeira enzima envolvida na via de transsulfuração, utilizando homocisteína como substrato. Nessa via, inicialmente a homocisteína liga-se a uma molécula de serina para formar cistationina em reação irreversível que é catalisada pela CBS, utilizando como cofator o piridoxal-5'-fosfato, um derivado da piridoxina ou vitamina B6. Posteriormente, a cistationina é hidrolisada em cisteína e ácido α-cetobutirato, reação esta que também requer vitamina B6 e é catalisada pela enzima γ-cistationase. A partir desse ponto, a cisteína pode originar taurina e sulfato ou formar glutationa, sendo essa última reação catalizada pela glutationa sintase (NEVES; MACEDO; LOPES, 2002).

Desta forma, além da produção de cisteína, a via de transsulfuração é responsável pelo catabolismo da homocisteína tóxica, que não é necessária no ciclo de transferência de grupos metil. Portanto, essa via de metabolização visa à excreção renal da homocisteína, diminuindo a concentração sérica desse aminoácido. Em condições metabólicas normais, a metabolização da homocisteína é distribuída igualmente entre essas duas vias, que são coordenadas e competem pela utilização da homocisteína disponível (MOSHAROV; CRANFORD; BANERJEE, 2000; SELHUB, 1999). Entretanto, em casos de hiperhomocisteinemia pode ser atribuída ao excesso de ingestão de metionina, mas também pode relacionar-se a falhas na via de remetilação, como inibição da enzima BHMT, metionina sintase e/ou as outras reações que fornecem o substrato 5-metiltetrahidrofolato e deficiência de folato (MOSHAROV; CRANFORD; BANERJEE, 2000; SELHUB, 1999; UELAND et al., 1993).

Com o envelhecimento, o metabolismo da metionina altera-se, ocorrendo um decréscimo da atividade de algumas enzimas do ciclo de metabolização, enquanto outras apresentam aumento de expressão (UTHUS; BROWN-BORG, 2003). Alterações na atividade enzimática podem acarretar em desequilíbrio de grupos metil e comprometer o padrão de metilação do DNA (HEIL et al., 2007; UTHUS; BROWN-BORG, 2003). Além disso, o processo de metilação pode ser considerado como um dos mecanismos responsáveis pela programação fetal e metabólica (CHMURZYNSKA, 2010).

1.3 Nutrição Materna e Hipótese Fetal de Origem de Doenças

A expressão gênica pode ser afetada por fatores ambientais, como os componentes da dieta, sobretudo durante períodos críticos do desenvolvimento. Eventos epigenéticos que ocorrem *in utero* podem levar a mudanças persistentes na expressão gênica, influenciadas pelos padrões de metilação e podem ser modificadas pela dieta (CHMURZYNSKA, 2010; WATERLAND; JIRTLE, 2004). Durante o desenvolvimento embrionário, ainda entre a fertilização e implantação, o embrião sofre uma ampla desmetilação. Após a implantação, os padrões de metilação são restabelecidos e realizados pelas DNMT *de novo*, originando os diferentes tipos celulares (JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012; SZYF, 2011). Devido a esses processos, falhas podem ocorrer e ocasionar desregulação da expressão gênica irreversível, sendo que a exposição a determinados nutrientes principalmente durante o período gestacional pode influenciar o desenvolvimento fetal e a saúde do indivíduo na fase adulta (DOLINOY et al., 2007; JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012). Por exemplo, a nutrição durante a gestação pode influenciar a estrutura e o desenvolvimento funcional do sistema nervoso central de fetos, devido às alterações epigenéticas influenciadas por manipulações da dieta durante os períodos pré e neo-natal(BAYDAS et al., 2007; CHMURZYNSKA, 2010; LEE; JACOBS; PORTA, 2009). É proposto que os nutrientes podem influenciar os padrões de metilação do DNA pelo fornecimento de substratos necessários para metilação, pelo fornecimento de cofatores que modulam as DNMT e

pela alteração da atividade das enzimas que regulam o ciclo da metionina e consequentemente a biodisponibilidade de grupos metil (JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012).

Dessa maneira, foi proposta uma hipótese fetal de origem de doenças, em que a exposição nutricional durante o desenvolvimento inicial pode permanentemente determinar a estrutura e função dos órgãos pelo processo de programação epigenética, produzindo alterações estáveis na expressão gênica (JACKSON; BURDGE; LILLYCROP, 2010; LILLYCROP et al., 2005). É possível, portanto, associar as condições ambientais, os padrões de crescimento iniciais e a subsequente função de tecidos ao desenvolvimento de uma vida saudável ou ao risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta, tais quais as cardiovasculares, diabetes tipo 2, câncer e obesidade (LANGLEY-EVANS, 2009; SINCLAIR, 2009; WATERLAND; MICHELS, 2007).

Estudos epidemiológicos mostraram que a má nutrição durante a vida fetal está relacionada com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças complexas, tais como câncer, doenças cardíacas e respiratórias (HOFFMAN, 2010; ROSEBOOM et al., 2001; WANG et al., 2010), assim como o comportamento materno após o nascimento dos filhotes pode induzir reprogramação epigenética nesses descendentes (MCGOWAN; MEANEY; SZYF, 2008; WEAVER; MEANEY; SZYF, 2006). Variações no consumo materno de metionina, por exemplo, podem induzir alterações no padrão de metilação do DNA e expressão gênica dos descendentes e possivelmente persistir na vida adulta dos indivíduos (WATERLAND; JIRTLE, 2004). É sugerido que os efeitos da nutrição materna em desequilíbrio estão relacionados com modificações na estrutura e metabolismo dos órgãos dos descendentes, como rins e pâncreas, defeitos estruturais do sistema nervoso e déficit de aprendizado dos descendentes (BAYDAS et al., 2007; ENGEHAM; HAASE; LANGLEY-EVANS, 2010; ZHENG et al., 2011). Embora a existência de tal modelo de herança apresente aspectos ainda não completamente esclarecidos, existe um aumento de evidências científicas sobre a influência da dieta na programação fetal em roedores e humanos (FRANKLIN; MANSUY, 2010; JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012; LANGLEY-EVANS, 2009). É proposto que

nutrientesinfluenciam os padrões de metilação do DNA pelo fornecimento de substratos necessários para metilação, pelo fornecimento de cofatores que modulam as DNMT e pela alteração da atividade das enzimas que regulam o ciclo da metionina e consequentemente a biodisponibilidade de grupos metil (JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012).

Estudos com animais mostraram que a quantidade de metionina na dieta materna é importante, sendo que o crescimento fetal não é somente retardado pelas dietas que são deficientes, mas também pelas que contêm excesso de metionina(REES; WILSON; MALONEY, 2006). Ross (2003) mostrou que a administração crônica de dietas deficientes em colina/metionina resultou em hipometilação de DNA hepático, levando a formação de tumor em ratos. Por outro lado, dietas ricas em metionina desencadearam efeitos tóxicos em alguns tecidos, como cardíaco, nervoso e hepático, provavelmente produzidos pelo excesso de homocisteína (JAKUBOWSKI, 2006) ou pelo estresse oxidativo e peroxidação lipídica induzidos pelas EROs produzidas por essa hiperhomocisteinemia (LOPEZ-TORRES; BARJA, 2008; YALCINKAYA; UNLUCERCI; UYSAL, 2007).

1.4 Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante

A homocisteína produzida ao final da via de transmetilação (Figura 2) é amplamente associada com diversas desordens que afetam o sistema nervoso central, doenças cardiovasculares e hepáticas (FENECH, 2003; FENECH, 2010; MARON; LOSCALZO, 2009; MATTE et al., 2009). Em condições intracelulares normais, a homocisteína é encontrada em baixas concentrações devido a seu potencial tóxico. A toxicidade da homocisteína é caracterizada pela formação de homocisteína-tiolactona e de EROs durante a autoxidação (Figura 4), ambos responsáveis por causar danos a estruturas biológicas (HUANG et al., 2001; JAKUBOWSKI, 2006; MARON; LOSCALZO, 2009; NEVES; MACEDO; LOPES, 2004).

As EROs são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (OH^-) e são formadas como resultado de diversos processos biológicos, atuando como mediadores e reguladores do metabolismo, diferenciação celular, ativação de genes, transmissão de sinais entre células e processo de defesa (DROGE, 2002; HALLIWELL, 2012). Entretanto, sob condições descontroladas de formação de EROs e capacidade antioxidante insuficiente, ocorre estresse oxidativo, que promove danos ao DNA, lipídeos e proteínas e que contribui para o desenvolvimento de doenças (HALLIWELL, 2012; STADTMAN; LEVINE, 2003). Estudos têm associado o estresse oxidativo a inúmeras condições clínicas como diabetes, aterosclerose e câncer (GIUSTARINI et al., 2009).

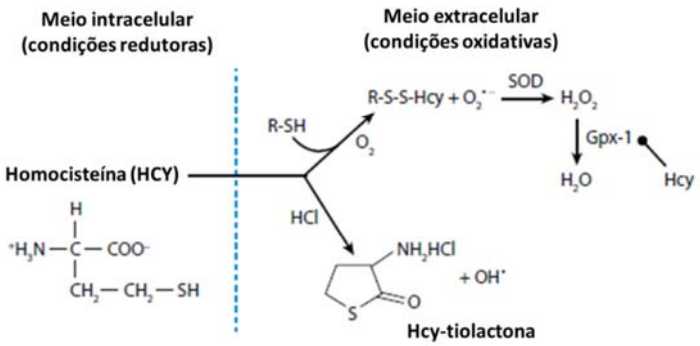

Figura 4: Autoxidação da homocisteína.

Fonte: MARON; LOSCALZO (2009)

1.4.1 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica é uma cadeia de processos de oxidação de ácidos graxos poliinsaturados ou seus resíduos (Figura 5), em função da ação das EROs, resultando na formação de peróxidos dos seus compostos (GUTTERIDGE, 1995). É caracterizada por três fases, sendo a fase de terminação o momento em que há a formação de substâncias, sobretudo aldeídos, que podem ser detectadas pela reação com o ácido tiobarbitúrico(TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*), em meio ácido a altas

temperaturas (BUEGE; AUST, 1978; GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; LIMA; ABDALLA, 2001).

Em consequência da peroxidação lipídica, peróxidos são formados, o que permite a difusão de compostos e íons para dentro da célula, como o cálcio. Íons cálcio ativam a fosfolipase A2, que por sua vez causa a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos das membranas celulares, danificando a integridade desta(BLASZCZYK et al., 2009).

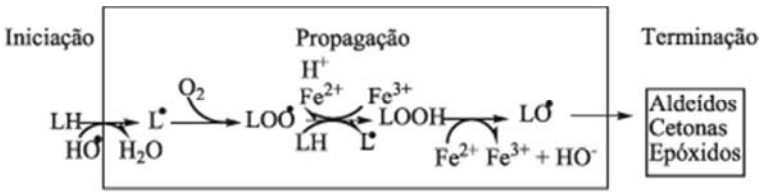

Figura 5: Fases da peroxidação lipídica

Fonte: SANTOS et al. (2007)

Um dos compostos gerados durante a peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA). O MDA é um aldeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; LIMA; ABDALLA, 2001). O MDA pode formar aductos com o DNA, mas podem ser removidos por sistemas de reparo e metabolizado por vias oxidativas (PAMPLONA; BARJA, 2007; VALKO et al., 2007). Além do MDA, outros produtos podem ser produzidos ao final da fase de terminação, como o 4-hidroxinonenal (HNE) e isoprostanos (GIUSTARINI et al., 2009; LIMA; ABDALLA, 2001).

Esse e outros compostos obtidos durante a peroxidação reagem com os grupos tiol e amina de proteínas, lipídeos e bases nitrogenadas de ácidos nucléicos. Além disso, podem reduzir a atividade de várias enzimas, inibir a replicação e transcrição do DNA, tornando-se, portanto, compostos mutagênicos, citotóxicos e carcinogênicos (BLASZCZYK et al., 2009).

1.4.2 Sistema Antioxidante

Para manter o correto funcionamento do organismo, especialmente contra os danos causados pelas EROs, existe uma necessidade em conservar um balanço oxidação-redução, por meio do sistema antioxidante, formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos. Os mecanismos de ação dos antioxidantes, portanto, variam desde a remoção do oxigênio do meio intracelular e extracelular até o sequestro de metais catalizadores da formação de radicais, podendo haver a interação de mais de um mecanismo em diferentes tecidos (GUTTERIDGE, 1995; KIRKHAM; RAHMAN, 2006).

Dentre os compostos não enzimáticos, a glutationa, sob a forma reduzida (GSH) é um dos mais conhecidos, sendo a maior responsável pela detoxificação de compostos tóxicos endógenos ou exógenos por transformá-los em compostos hidrossolúveis menos reativos e de mais fácil eliminação (HALLIWELL, 2012; STADTMAN; LEVINE, 2003; VALKO et al., 2007). A GSH é um tripeptídeo (γ-glutamil-cisteinil-glicina), sendo o mais abundante dos grupos tiol não proteicos encontrados no meio intracelular (MORAN; GUTTERIDGE; QUINLAN, 2001). A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular em duas reações, sendo que na primeira reação ocorre a ligação peptídica entre o aminoácido glutamato e cisteína, catalisada pela enzima γ-glutamilcisteína sintetase, da qual é originada a γ-L-glutamil-L-cisteína que será ligada à glicina pela ação da glutationa sintetase (GRIFFITH, 1999).

O conteúdo de GSH é mantido pela biotransformação da metionina na via de transsulfuração (Figura 2), regeneração da sua forma oxidada (GSSH) e absorção de meio extracelular, sendo que o fígado é o tecido que apresenta as maiores quantidades deste antioxidante (IWASAKI et al., 2009). Sob condições normais, mais da metade da metionina é usada para a síntese de GSH no fígado, sendo posteriormente transferida para o plasma (GARCIA; STIPANUK, 1992; GUTTERIDGE, 1995). Assim, a GSH é a forma encontrada em grande quantidade nas células sob condições normais e sua atividade antioxidante ocorre pela oxidação do grupo tiol em presença de H_2O_2 (Figura 6A), gerando a glutationa oxidada (GSSG) pela ação da glutationa peroxidase (Figura

6B) (GIUSTARINI et al., 2009; GUTTERIDGE, 1995; MORAN; GUTTERIDGE; QUINLAN, 2001).

Dessa forma, o H_2O_2 é decomposto tanto pela glutationa peroxidase quanto pela catalase, porém é neutralizado por essa última sempre que estiver em grandes quantidades, considerando o local onde essas enzimas se encontram: a catalase está presente em fígado, rins, eritrócitos e leucócitos (BŁASZCZYK et al., 2010) e a glutationa peroxidase em fígado, rins, coração, pulmões e plasma sanguíneo(BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Além da glutationa peroxidase e catalase, as outras enzimas do mecanismo antioxidante são glutationa reductase e superóxido dismutase (SOD)(HALLIWELL, 2012).

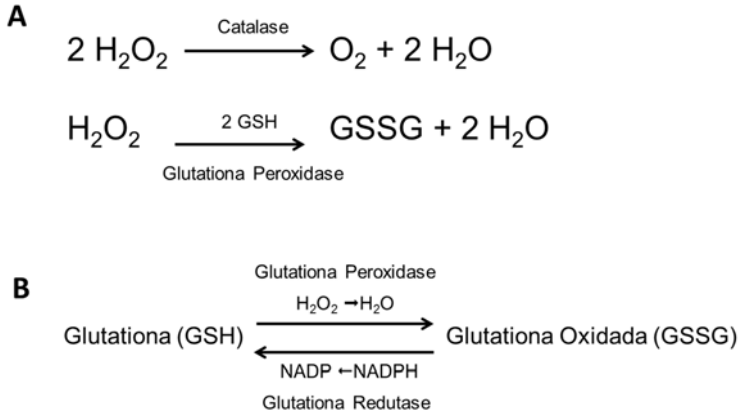

Figura 6: Ação do sistema antioxidante. A: Neutralização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo sistema antioxidante. B: Ciclo de regeneração da glutationa GSH.

Fonte:GUTTERIDGE (1995)

A quantificação da GSH baseia-se na reação de grupos sulfidrilas presentes na molécula com o ácido 5,5´-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), gerando ácido 2-nitro-5-mercapto-benzoico de coloração amarela (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A quantificação das concentrações de GSH, bem como das outras substâncias envolvidas na sua regeneração, e de atividade enzimática, como a da catalase, podem ser um indicativo do estresse oxidativo pelo qual o organismo está submetido (GIUSTARINI et al., 2009).

A redução das concentrações de GSH e o aumento da GSSH já foram associados com o desenvolvimento de algumas doenças como insuficiência hepática, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer (PASTORE et al., 2003).

A suplementação de metionina na dieta pode favorecer o direcionamento do fluxo da biotransformação para a via de transsulfuração e, consequentemente, aumentar a concentração de GSH. Com isso, a possível elevação das concentrações de EROs pode ser neutralizada pela ação antioxidante da GSH, assim como a redução do danos causados por estas espécies (BROSNAN; BROSNAN, 2006; MOSHAROV; CRANFORD; BANERJEE, 2000; NEVES; MACEDO; LOPES, 2004).

1.5 Instabilidade Genômica e Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa representa uma importante ferramenta para avaliação de danos ao DNA que podem ou não ser fixado no material genético (ROTHFUSS et al., 2011). Nessa avaliação, o material genético é submetido à eletroforese e a migração produz os cometas, cujo tamanho e distribuição do DNA são proporcionalmente correlacionados aos danos (FAIRBAIRN; OLIVE; ONEILL, 1995). Por esse ensaio, é possível detectar instabilidade genômica pela indução de quebras de dupla fita ou de fita simples, sítios álcali lábeis e danos oxidativos às bases do DNA (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). Comparado com outros ensaios de genotoxicidade, as vantagens da técnica incluem: sua sensibilidade demonstrada para detectar baixos níveis de danos ao DNA, reduzida quantidade de amostra, flexibilidade, baixo custo, fácil aplicação e curto período necessário para completar o experimento (HARTMANN et al., 2004;TICE et al., 2000).

Os cometas ou nucleoides são formados pelo relaxamento da fita de DNA supercondensada causada por alguma quebra e que, sob condições de migração em direção ao anodo em eletroforese, origina as estruturas com formato de cometa (COLLINS et al., 2008). Devido a essa migração em função das quebras, a quantidade de DNA presente na cauda, bem como seu o tamanho, são proporcionais ao dano

causado pelo composto avaliado, embora tal dano ainda possa ser corrigido por sistema de reparos (ROTHFUSS et al., 2011; SINGH et al., 1988)

Para a avaliação dos cometas, são utilizados softwares específicos, em que é possível mensurar o tamanho e a quantidade de material genético da cauda, fornecendo parâmetros mais precisos dos danos (BURLINSON et al., 2007; KUMARAVEL; JHA, 2006; KUMARAVEL et al., 2009). Diversos parâmetros são comumente utilizados no ensaio do cometa, dentre eles o comprimento da cauda ou da migração, a % de DNA na cauda e a distribuição do DNA na cauda são considerados medidas primárias obtidas da análise densiométrica primária de imagens de cometa, dos quais são derivados os outros parâmetros (COLLINS et al., 1997; KUMARAVEL; JHA, 2006; KUMARAVEL et al., 2009).

Duthie et al. (2002), James et al. (2003) e Bagnyukova et al. (2008) demonstraram que a deficiência de doadores de grupo metil pode causar erros de replicação do DNA, ocasionando quebras de fita dupla, danos cromossômicos e câncer, demonstrados pelo aumento da instabilidade do material genético. Esse aumento pode ser uma consequência da incorporação errônea de uracila na molécula de DNA em casos de deficiência de doadores de grupo metil.

As diferenças de concentrações de metionina nas dietas e da duração do tratamento podem explicar os resultados de estudos com metionina nos tecidos avaliados (MORI; HIRAYAMA, 2000). Por exemplo, a restrição de metionina por sete semanas foi responsável por reduzir danos ao DNA em função da redução na produção de EROs em fígado de ratos (GREDILLA; BARJA; LOPEZ-TORRES, 2001). Por outro lado, dietas ricas em metionina foram relacionadas com maior instabilidade cromossômica em mitocôndrias em função do aumento na produção de EROs. Nessa situação, a instabilidade do DNA mitocondrial gerada pela ação das EROs desencadeia mais produção de EROs e, consequentemente, mais danos ao material genético (GOMEZ et al., 2009; PARK et al., 2008).

1.6 Expressão Gênica por RT-qPCR

A reação da transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR, *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*) é o método utilizado recentemente para a quantificação da expressão gênica(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Nesse método, ocorre a quantificação dos produtos em tempo real durante os ciclos da PCR, ao contrário da PCR convencional, em que os produtos são quantificados após o término da reação, utilizando eletroforese em gel(VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Devido a isso, as vantagens da RT-qPCR são a sua maior sensibilidade e a possibilidade de quantificação mais precisa e confiável (BUSTIN; MUELLER, 2005;HUGGETT et al., 2005). Para a detecção, são utilizados sondas TaqMan ou corantes, como o corante intercalante SYBR Green®, específico para DNA dupla-fita. Após a amplificação da sequência-alvo mediada pelo *primer* na reação de PCR, as moléculas de SYBR Green® ligam-se ao DNA dupla-fita amplificado e emitindo fluorescência.

Previamente à quantificação, é necessário verificar a pureza do RNA pelas razões $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$, a integridade do RNA em gel de agarose e se as amplificações apresentam eficiência satisfatória. Nessa situação, a eficiência é obtida pela curva de regressão linear de diluições do *pool* de cDNA, em que valores entre 90 e 110% são considerados aceitáveis para a aplicação do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Pfaffl (2001)(NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006). Para a aplicação desse método, a eficiência da amplificação do gene alvo tem que ser semelhante à eficiência do gene de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

Para resultados confiáveis de quantificação, é necessária a utilização de um gene de referência, visando não haver interferências na análise dos dados em função de variações entre replicatas (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Assim, um gene de referência ideal deve apresentar expressão semelhante em todas as amostras estudadas, ser resistente às condições experimentais e passar por todas as etapas da reação de RT-qPCR com a mesma cinética que o gene-alvo (BUSTIN, 2000; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Um dos genes utilizados como referência em estudos de quantificação relativa é a *Actb*, uma proteína do citoesqueleto presente em quase todos os tipos celulares (GARIBALDI et al., 2012).

Não há na literatura informação sobre monitoramento de fêmeas submetidas a dietas deficiente ou suplementada em metionina, com o objetivo de avaliar a expressão dos RNAm de *Mat1a, Bhmt e Cbs* envolvidos no ciclo da metionina. Além disso, as possíveis alterações no metabolismo da metionina podem ser demonstradas pelos parâmetros de genotoxicidade e de estresse oxidativo, uma vez que estes podem indicar como o estresse oxidativo no nascimento está relacionado com a influência direta da dieta materna (LANGLEY-EVANS; SCULLEY, 2005). Assim, o estudo com duas fases de tratamento, consistindo de uma materna e outra de descendentes, pode sugerir como a dieta materna em desequilíbrio é capaz de interferir nos descendentes.

A reação da transcriptase reversa associada à reação em cadeia da polimerase quantitativa(RT-qPCR, *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*) é o método utilizado recentemente para a quantificação da expressão gênica(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).Nesse método, ocorre a quantificação dos produtos em tempo real durante os ciclos da PCR, ao contrário da PCR convencional, em que os produtos são quantificados após o término da reação, utilizando eletroforese em gel(VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). Devido a isso, as vantagens da RT-qPCR são a sua maior sensibilidade e a possibilidade de quantificação mais precisa e confiável(HUGGETT et al., 2005).

Não há na literatura informação sobre monitoramento de fêmeas submetidas a dietas deficiente ou suplementada em metionina, com o objetivo de avaliar a expressão dosRNAm de*Mat1a, Bhmt e Cbs*envolvidos no ciclo da metionina. Além disso, as possíveis alterações no metabolismo da metionina podem ser demonstradas pelos parâmetros de genotoxicidade e de estresse oxidativo, uma vez que estes podem indicar como o estresse oxidativo no nascimento está relacionado com a influência direta da dieta materna (LANGLEY-EVANS; SCULLEY, 2005). Assim, o estudo com duas fases de tratamento, consistindo de uma materna e outra de descendentes, pode sugerir como a dieta materna em desequilíbrio é capaz de interferir nos descendentes.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de dietas deficiente e suplementada em metionina sobre a instabilidade genômica e o estresse oxidativo em camundongos e suas mães tratadas durante gestação e lactação e avaliar a expressão do RNAmde *Mat1a*, *Bhmt* e *Cbs*dessas.

2.2Objetivos Específicos

- Avaliar oganho de massa corpórea e consumo de ração;
- Avaliar a relação massa do órgão (fígado e rins) e massa corpórea;
- Avaliar a taxa de sobrevivência dos filhotes;
- Avaliar a peroxidação lipídica em fígado e rins pela quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
- Avaliar a instabilidade genômica em fígado e rins pelo ensaio do cometa;
- Avaliar a atividade da enzima catalase em fígado e rins;
- Avaliar o conteúdo de glutationa reduzida em fígado e rins;
- Avaliar a expressão do RNAm de*Mat1a, Bhmt* e*Cbs*em fígado de camundongos fêmeas tratadas com dietas deficiente ou suplementada em metionina durante os períodos gestacional e lactacional.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

3.1 Animais

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), sob o número 10.1.271.53.7 (ANEXO).

Foram utilizados camundongos (*Swiss albinus*) machos e fêmeas com peso inicial entre 20 a 30g, provenientes do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* da USP de Ribeirão Preto e mantidos segundo os critérios para o cuidado e uso de animais de laboratório. Os machos adquiridos do Biotério Geral foram utilizados somente para o acasalamento, sendo posteriormente eutanasiados de acordo com os procedimentos éticos. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP em caixas de polietileno com tampa-grade, sob condições controladas de temperatura e ciclo alternado de luz/escuro de 12 h. O fornecimento de ração (de acordo com o delineamento experimental) e água foi *ad libitum*.

3.2 Delineamento Experimental

3.2.1 Estabelecimento das Dietas de Metionina

As modificações no conteúdo de metionina seguiram os critérios propostos pelo *National Research Council* (NRC, EUA) em que as dietas podem exceder o requerimento de determinado nutriente ou mesmo ser deficiente em algum específico, permitido pela manipulação dos ingredientes em uma formulação aberta(REEVES, 1997). Dessa forma, a composição da dieta foi estabelecida de acordo com dados de literatura, consistindo em uma dieta com conteúdo basal (**Controle**) e cujo o conteúdo

de 0,3% de DL-metionina representa a quantidade necessária para a manutenção adequada de aminoácidos sulfurados de acordo com o NRC(FINKELSTEIN; MARTIN, 1986; REEVES, 1997; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993); uma dieta suplementada (**Suplementada**) em 2,0% de DL-metionina, sendo esse conteúdo responsável por promover uma hiperhomocisteinemia tolerável(PARK et al., 2008; YALCINKAYA; UNLUCERCI; UYSAL, 2007); e uma dieta deficiente (**Deficiente**) em 0% de DL-metionina, baseando-se na formulação semi-purificada da AIN-93 recomendada pelo *American Institution of Nutrition* (AIN) apresentada na Tabela 1(MORI; HIRAYAMA, 2000; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). As rações dos três tipos de dietas foram adquiridas do mesmo fabricante (Rhoster, São Paulo, SP).

O estudo foi constituído por duas fases de tratamento, uma em que inicialmente as fêmeas foram submetidas às dietas de metionina durante 10 semanas (**Fase Materna**) e a outra em que os descendentes machos foram tratados durante 18 semanas (**Fase Descendente**).

Tabela 1: Composição das dietas

Nutrientes	**AIN-93**	**Suplementada**	**Controle**
Energia total (*kcal/ Kg dieta)*	3601,0	3795,0	3816
Umidade (*g/ Kg dieta)*	68,0	68,0	68,0
Caseína (*g/ Kg dieta)*	140,0	140,0	140,0
Amido de milho (*g/ Kg dieta)*	466,6	446,6	483,29
Amido de milho dextrinizado (*g/ Kg dieta)*	155,0	155,0	155,0
Sacarose (*g/ Kg dieta)*	100,0	100,0	100,0
Celulose (*g/ Kg dieta)*	50,0	50,0	50,0
Óleo de soja (*g/ Kg dieta)*	40,0	40,0	40,0
Mix de minerais (*g/ Kg dieta)*	35,0	35,0	35,0
Mix vitamínico (*g/ Kg dieta)*	10,0	10,0	10,0
Bitartrato de colina (*g/ Kg dieta)*	2,5	2,5	2,5
Tert-Butilhidroquinona (*g/ Kg dieta)*	0,008	0,008	0,008
L-Cistina (*g/ Kg dieta)*	1,8	1,8	1,8
DL-Metionina (*g/ Kg dieta)*	-	20	3,0

Fonte: (MORI;HIRAYAMA, 2000; PARK et al., 2008; YALCINKAYA; UNLUCERCI; UYSAL, 2007; REEVES, 1997; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993)(Rhoster, São Paulo, SP).

3.2.2 Fase Materna

As fêmeas foram divididas em três grupos de tratamento (n=8/grupo), em delineamento inteiramente casualizado:

- Controle **(FC)**: dieta basal (0,3% DL-metionina);
- Suplementado **(FS)**: dieta suplementada (2,0% de DL-metionina);
- Deficiente **(FD)**: dieta ausente em metionina (0% de DL-metionina).

O tratamento iniciou-se com um período de 4 semanas para aclimatação às dietas, mesmo para as fêmeas do grupo controle, objetivando manter as mesmas condições de tratamento a todos os animais. O tratamento foi mantido durante o período de gestação e de lactação com duração de três semanas em cada um, totalizando as 10 semanas de tratamento (Figura7). Somente foram utilizadas para obtenção das amostras as fêmeas que geraram descendentes, o que variou de 5 a 7 fêmeas por grupo de tratamento, exceto para o grupo deficiente. Foram utilizadas nesse grupo, todas as fêmeas, pois apresentaram baixa taxa de natalidade e alta taxa de mortalidade dos descendentes.

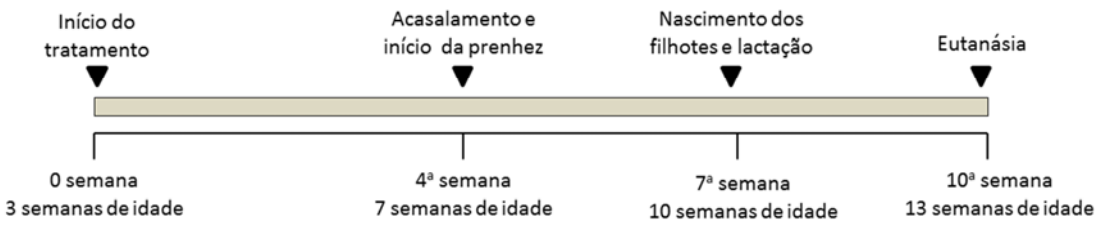

Figura7: Protocolo experimental da Fase Materna.

3.2.3 Fase Descendente

A segunda fase do experimento consistiu no tratamento dos descendentes machos durante 18 semanas (Figura 8), divididos em grupos (n=4 a 10 animais/grupo) em delineamento inteiramente casualizado, conforme os respectivos tratamentos:

Os animais descendentes do grupo Controle materno (**FC**) foram divididos em:

- Controle Controle (**MCC**): foi mantida a dieta basal (0,3% DL-metionina);
- Controle Suplementado (**MCS**): os animais receberam a dieta suplementada (2,0% de DL-metionina);
- Controle Deficiente (**MCD**): os animais receberam a dieta ausente de metionina (0% DL-metionina).

Os animais descendentes do Suplementado materno (**FS**) foram divididos em:

- Suplementado Controle (**MSC**): os animais receberam a dieta basal (0,3% DL-metionina);
- Suplementado Suplementado (**MSS**): foi mantida a dieta suplementada (2,0% de DL-metionina);
- Suplementado Deficiente (**MSD**): os animais receberam a dieta ausente de metionina (0% DL-metionina).

Em virtude da baixa taxa de natalidade e alta taxa de mortalidade dos descendentes, não foi possível realizar os experimentos com os descendentes do grupo de fêmeas que receberam a dieta deficiente em metionina. Além disso, os grupos de descendentes tratados com dieta deficiente, independente da dieta materna, apresentaram menor número de animais devido à alta taxa de mortalidade e que, portanto, justifica o número variável de animais nos grupos de descendentes tratados (4 a 10 animais).

Figura 8: Protocolo experimental da Fase Descendente.

Após cada período de tratamento, os animais foram eutanasiados (hidrato de cloral 10%, dose 0,4mL/100g, intraperitoneal) e as amostras de fígado e rins foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para realização dos ensaios subsequentes.

3.3 Metodologia

3.3.1 Consumo de Ração

O consumo de ração foi determinado pela pesagem diária, fazendo-se a diferença entre a quantidade de ração fornecida e a quantidade presente no dia seguinte. Foi realizada diariamente durante o período de aclimatação das fêmeas para observar a adaptação, sendo, posteriormente, realizado semanalmente.

3.3.2 Relação Massa do Órgão e Massa Corpórea

Para todos os grupos de tratamentos de ambas as fases foi verificadaa massa corpórea, realizada semanalmente para minimizar o estresse provocado pelo manuseio constante.

As massas dos órgãos (fígado e rins) foram expressas em termos relativos de massa corpórea no momento da eutanásia.

3.3.3 Estresse Oxidativo

3.3.3.1 Avaliação da Peroxidação Lipídica: Quantificação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Para avaliação do estresse oxidativo por meio da peroxidação lipídica em fígado e rins, a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada segundo Buege e Aust (1978). Homogenato das amostras foi obtido homogenizando-se 0,2g dos órgãos em 2mL de KCl 1,15% refrigerado e 500µL foram retirados para serem adicionados a 1mL de solução de ácido tiobarbitúrico 26mmol/L, ácido tricloroacético 15% e HCl 0,25mmol/L. Após aquecimento em banho-maria por 15 minutos, as misturas foram centrifugadas (2100 G, 20 minutos) e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Micronal B580, São Paulo, Brasil) a 535nm. Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances*) por mg de proteínas. A quebra do produto 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma-Aldrich, CAS 102-52-3) foi usado como padrão. A quantidade de proteínas totais foi determinada segundoHartree (1972) para a normalização dos resultados. Para esse ensaio, 100µL do homogenato foram diluídos em 5mL de água destilada e em uma alíquota de 0,2mL, onde foram adicionados 1mL de água destilada e 0,9mL de solução A (tartarato de Na e K 10mmol/L, Na_2CO_3 1mmol/L, NaOH 1N). Essa mistura foi incubada (50 ^oC, 10 minutos) e resfriada à temperatura ambiente (10 minutos), sendo depois adicionado 0,1mL de solução B (tartarato de Na e K 70mmol/L, $CuSO_4.5H_2O$ 40mmol/L, NaOH 1N) e posterior repouso à temperatura ambiente (10 minutos). Após esse procedimento, 3mL de Folin-Ciocalteau (Imbralab, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) foram adicionados e as misturas novamente foram incubadas (50 ^oC, 10 minutos) para posterior leitura espectrofotométrica à 650nm(Micronal B580, São Paulo, Brasil). As concentrações de proteínas foram expressas em mg/mL.

3.3.3.2 Quantificação do Conteúdo de Glutationa (GSH)

A quantificação do conteúdo de GSH em tecidos seguiu a metodologia de Sedlak e Lindsay (1968), por meio da detecção dos grupos sulfidrilas não-proteicos. Das amostras de fígado e rins, foi obtido um homogenato homogenizando-se 100mg dos órgãos em 1mL de KCl 1,15% refrigerado. Foram adicionados 100µL de ácido tricloroacético 50% a 600 µL do homogenato e centrifugado (1200 G, 10 minutos). A 500µL do sobrenadante, adicionaram-se 100 µL de solução de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, CAS 69-78-3) em metanol (0,01 mol/L) ao sobrenadante. Foi utilizada cisteína (Merck, Darmstadt, Alemanha) como padrão. Após descanso em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Micronal B580, São Paulo, Brasil) a 412 nm. Os resultados foram expressos em nmol de GSH/mg de proteínas.

As proteínas totais foram quantificadas segundo Hartree (1972), como descrito anteriormente.

3.3.3.3 Quantificaçãoda Atividade da Catalase

Para a quantificação da atividade da enzima catalase nos tecidos hepático e renal, seguiu-se a metodologia de Beers e Sizer (1952). 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato (50m mol/L) refrigerado e depois centrifugado a 4°C (18500 G, 12 minutos). Do sobrenadante, retiraram-se 250µL onde adicionaram-se 2,5µL de Tritón X-100 (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, CAS 9002-93-1) puro e sonicou-se por 1 minuto. Foi feita uma diluição do sonicado na proporção 1:200 em tampão fosfato. Imediatamente anterior a leitura, foi preparada uma solução de H_2O_2 30mM em tampão fosfato (30,5 µl de H_2O_2 em 10mL tampão fosfato). Para a leitura a 240nm (RayLeigh UV-1601, China), foram utilizados 2 mL da amostra e 1mL da solução de H_2O_2(Merck, Darmstadt, Alemanha) recém preparada. A avaliação da atividade da catalase foi expressa emµmol/min/mg de proteínas.

A determinação de proteínas totais seguiu a mesma metodologia descrita por Hartree (1972).

3.3.4Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa ou Eletroforese em Gel de Célula Única

O ensaio do cometa alcalino foi realizado no fígado e nos rins seguindo o método descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). Suspensões celulares foram preparadas com 0,2g das amostras em 1 mL de solução de Hanks em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Foi determinada a viabilidade pelo método de exclusão por azul de tripan 0,4% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), sendo as amostras analisadas somente quando a viabilidade observada foi superior a 70% (BURLINSON et al., 2007). Células, cuja membrana encontra-se comprometida, apresentam-se coradas pelo azul de tripan em seu interior, mas as células viáveis, ou seja, com a membrana normal, não permitem a entrada do corante e apresentam-se com coloração amarela-esverdeada (BURLINSON et al., 2007). Para todos os grupos avaliados em ambas fases, a viabilidade celular obtida esteve sempre acima dos 70% recomendados, validando o prosseguimento do ensaio do cometa.

À suspensão celular foi adicionada agarose em baixo ponto de fusão (0,5%) e espalhada sobre lâminas previamente revestidas em agarose com ponto de fusão normal (1,5%) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA, CAS 9012-36-6). As lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5 mol/L, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, CAS 60-00-4) 100mmol/L, DMSO 10% (Amresco, Solon, Ohio, EUA, CAS 67-68-5), Triton X-100 1%,Tris 10mmol/L (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, CAS 77-86-1, pH 10) por um período de 20 a 22 horas sob refrigeração a 4 ^{o}C. Após esse período, as lâminas foram colocadas em solução tampão de eletroforese por 20 minutos (NaOH 300mmol/L, EDTA 1,0 mmol/L, pH> 13) para desnaturação do DNA e posterior realização da eletroforese horizontal por 20 minutos em 1V/cm (25V, 300mA). As amostras foram, então, acondicionadas em solução tampão de neutralização (0,4mmol/LTris-HCl, pH 7,5) por 5 minutos e, após

secas à temperatura ambiente, foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. As lâminas foram coradas com brometo de etídeo (20µg/mL) no momento da análise, sendo contabilizados 100 nucleoides por animal em microscópio de fluorescência (Axiostar Plus, Zeiss, Alemanha) com filtro de 510–560nm e barreira de 590nm em 400x. Os nucleoides foram analisados usando-se os programas CometScore® (TriTek, EUA) nas amostras maternas e Comet Assay IV (Perceptive Instruments, RU) nas amostras dos descendentes, sendo que o parâmetro utilizado foi a percentagem de DNA na cauda (**%** DNA na cauda).

3.3.5Análise da Expressão do RNAm dos Genes *Mat1a, Bhmt*e *Cbs*em Fígado da Fase Materna

Amostras de fígado coletadas após a eutanásia em criotubos contendo RNAlaterTM (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) foram armazenadas em freezer (-80ºC) para posterior procedimento de extração do material genético e análise do RNAm.

3.3.5.1Extração de RNA

O RNA total foi extraído de fígado pelo método do reagente Trizol LS® (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos, CAS 10296-010), de acordo com o protocolo do fabricante e seguido por purificação por mini-colunas com o kit *SV Total RNA Isolation System*® (Promega, Madison, WI, Estados Unidos).

3.3.5.2 Avaliação Quantitativa e Qualitativa do RNA Total por Espectrofotometria

A quantificação do RNA total foi realizada por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda UV 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Alemanha). A

pureza das amostras foi verificada pelas razões A_{260}/A_{280}, que mostra possíveis contaminações por proteínas e DNA; e pela razão A_{260}/A_{230} que mostra contaminação por sais e compostos orgânicos, como guanidina ou fenol. Amostras de RNA total com grau de pureza aceitável apresentam razões A_{260}/A_{230} entre 1,7 e 2,2 e A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0.

3.3.5.3 Avaliação da Integridade do RNA Total

A integridade do RNA extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. 500 mg de agarose foram fundidos em 50 mL de tampão TAE (Tris-acetato 40 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,0), sendo adicionados 5 µL de corante GelRed® (Biotium, Hayward, California, Estados Unidos, CAS 67-68-5). Cada amostra aplicada no gel foi preparada com 1 µg de RNA e 20% v/v de tampão de aplicação *dye loading solution*(30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xileno cianol) e, posteriormente, submetida à eletroforese no mesmo tampão TAE (90 minutos, 80V, 30 mA). Em seguida, o gel foi fotografado em foto-documentador UV (Molecular Imager® Gel Doc® XR, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos).

3.3.5.4 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA a ser utilizado na reação da RT-qPCR foirealizadaa partir de 1 µg de RNA total por meio do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biossystem, Foster, Estados Unidos), seguindo as orientações do fabricante. Imediatamente antes desse processo, todas as amostras foram tratadas com o *kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade* (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para a eliminação de qualquer DNA genômico.

3.3.5.5 Escolha dos Primers

Todos os *primers* foram selecionados com o auxílio do *softwarePrimer-BLAST* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) e sintetizados pela Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos) (Tabela 2). As sequências amplificadas pelos *primers* foram preferencialmente escolhidas compreendendo uma região entre *exons*, dificultando a amplificação de DNA genômico na RT-PCR quantitativa (RT-qPCR). Todos os *primers* foram testados *in silico* para a possível formação de dímeros,heterodímeros e grampos. Os *primers* referentes ao gene *β-Actina*(*Actb)* foram selecionados a partir de um estudo que utilizou este gene como controle endógeno (GARIBALDI et al., 2012). Além disso, foi verificado a especificidade de cada par de *primer* por meio da curva de dissociação, em que o pico único indica a especificidade dos *primers.*

Tabela 2:*Primers* selecionados para as reações de RT-qPCR

Gene	Forward (5´-3´)	Reverse (5´-3´)	Produto PCR (pb)
Mat1a	TGTGACCAGATTAGTGATGC	CAGTAGCACCATACCTGTCT	102
Bhmt	GGAACAGCTACCCTCCAATC	ATCCTCCATCTCCAATCACA	142
Cbs	GATCCAATCACGAGACCAGG	AAGTTTAGCAGGTCAATGGC	123

3.3.5.6 RT-qPCR

Os níveis de expressão relativa dos transcritosdos genes*Mat1a*, *Bhmt*e *Cbs*foram avaliados por ensaios de RT-qPCR, comparando os níveis de expressão entre os grupos tratados com as dietas suplementada ou deficiente em metionina e o grupo tratado com a dieta controle. As reações foram preparadas com o reagente Platinum® SYBR® GreenqPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos) e realizadas no termociclador CFX96 (BioRad, Hercules, Estados Unidos) no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa. Para a amplificação do cDNA, as reações apresentaram volume final de 13 µL por poço, constituído por 7 µL de SYBR® Green, 5 µL de

amostra diluída de cDNA (100 ng de cDNA/poço) e 0,5 µL de *primersreversee forward* na concentração final de 0,38 µmol/L de cada *primer* em ciclos inicial de desnaturação a 95ºC por 10 minutos, seguido de 35 ciclos constituídos de desnaturação a 95ºC por 15 segundos e anelamento e extensão a 60ºC por 1 minuto.

Os níveis de expressão relativa foram calculados segundo o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto porPfaffl (2001), utilizando o *Actb*como gene de referência.

3.3.5.7 Eficiências da RT-qPCR

Para atestar a qualidade dos resultados do ensaio de RT—qPCR, foi obtida uma curva de regressão linear derivada dos valores de Cq (*quantification cycle*) de diluições seriadas do *pool* de cDNA de todos os animais. Os valores de *slope* entre 3,10 a 3,59 correspondem a uma variação entre 90 e 110%, sendo valoresaceitáveis (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006).

Antes das análises de expressão, todos os genes foram analisados quanto à eficiência de amplificação. A Tabela 3 mostra que todas as amplificações apresentaram uma eficiência entre 90 e 110%, consideradas ideais para a aplicação do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ proposto por Pfaffl (2001).

Tabela 3. Eficiências das amplificações dos transcritos de fígado da Fase Materna na reação de RT-qPCR

Genes	**Eficiência (%)**
Mat1a	92,88
Bhmt	99,82
Cbs	99,08
Actb	99,52

3.3.6Análise Estatística

Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov).

Os resultados foram expresssos como média ± erro padrão e foram analisados usando GraphPad Prism 5 (GraphPad, EUA). As comparações entre os grupos de tratamento foram analisadas usando-se ANOVA one-way com pós-teste Tukey, com nível de significância $P<0,05$.

Resultados

4 Resultados

4.1 Fase Materna

Os tratamentos durante 10 semanas com as diferentes dietas de metionina não provocaram mortes das fêmeas. Entretanto, somente foram consideradas as que geraram descendentes, explicando o fato de haver número entre 5 a 7 animais por grupo.

4.1.1 Consumo de Ração

O consumo de ração semanal das diferentes dietas de metionina está mostrado na Figura 9. O grupo FD apresentou um menor consumo médio semanal de ração ao longo do experimento. Não houve diferenças significativas de consumo semanal entre os grupos controle (FC) e suplementado (FS).

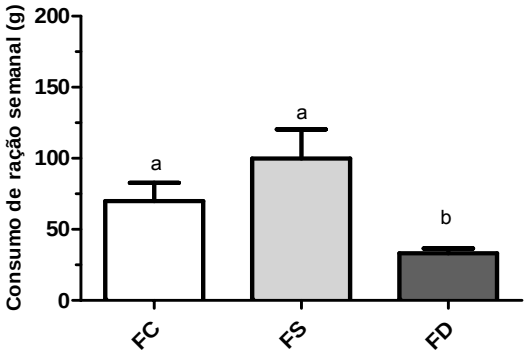

Figura 9:Consumo médio de raçãosemanal das fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentesindicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.2 Massa Corpórea

A Figura 10mostra a massa corpórea das fêmeas durante as 10 semanas de tratamento com as diferentes dietas de metionina. Durante os períodos de adaptação e prenhez, não foram observadas diferenças (P>0,05) de massas corpóreas entre as fêmeas dos três grupos de tratamento. Somente após sete semanas de tratamento, o grupo deficiente apresentou diferença de massa (P<0,05) em relação aos outros grupos, provavelmente em função da baixa taxa de natalidade destas fêmeas. Não houve diferença (P>0,05) entre os grupos controle e suplementado.

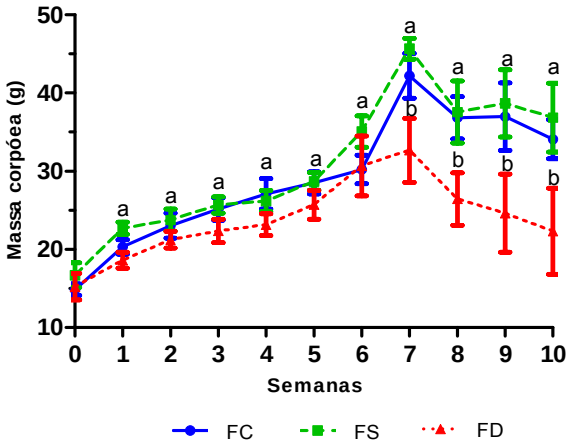

Figura 10: Massa corpórea de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas de tratamento.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.3 Relação Massa Órgão e Massa Corpórea

As massas absolutas de fígado e rins, a massa corpórea no momento da eutanásia e a relação entre as massas desses órgãos e a massa corpórea estão mostradas na Tabela 4. É possível observar que o grupo FD apresentou menores valores para as massas absolutas dos órgãos e para a massa corpórea quando comparado aos outros grupos (P<0,05). Não houve diferença entre as massas relativas dos órgãos entre os grupos (P>0,05), indicando a proporcionalidade das massas dos órgãos e a massa corpórea dos animais. Os grupos FC e FS não diferiram entre si nos parâmetros avaliados (P>0,05).

Tabela 4:Massas absolutas de fígado e rim, massa corpórea e relação entre massa do órgão e massa corpórea em fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas

Grupos de Tratamento	Fígado(g)	Rim(g)	Massa Corpórea (g)	Fígado/Massa corpórea (%)	Rim/Massa corpórea (%)
FC	2,01 ± 0,46 a	0,43 ± 0,04 a	33,14 ± 2,90 a	6,03 ± 0,011 a	1,29 ± 0,01 a
FS	2,18 ± 0,72 a	0,46 ± 0,09 a	33,95 ± 3,66 a	6,33 ± 0,014 a	1,33 ± 0,02 a
FD	1,45 ± 0,35 b	0,31 ± 0,06 b	23,32 ± 4,96 b	6,25 ± 0,008 a	1,35 ± 0,02 a

n= 5 a 7 animais/grupo

ANOVA, Tukey Média ± erro padrão dentro da mesma coluna e com a mesma letranão diferem estatísticamente(P>0,05).Média ± erro padrão com letras diferentes na mesma colunaindicam diferença estatística (P<0,05).

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.4Estresse Oxidativo

4.1.4.1 Peroxidação Lipídica: Quantificação de TBARS

A peroxidação lipídica avaliada pelas concentrações deTBARS em fígado e rins das fêmeas é mostrada naFigura 11. Em fígado (Figura 11A), o grupo suplementado apresentou redução na concentração de TBARS (P<0,05), quando comparado ao grupo controle e ao deficiente, que não diferiram entre si (P>0,05). Em rins (Figura 11B), não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) entre as dietas suplementada e deficiente, quando comparadas ao grupo controle. As concentrações de TBARS foram semelhantes entre os dois tecidos analisados.

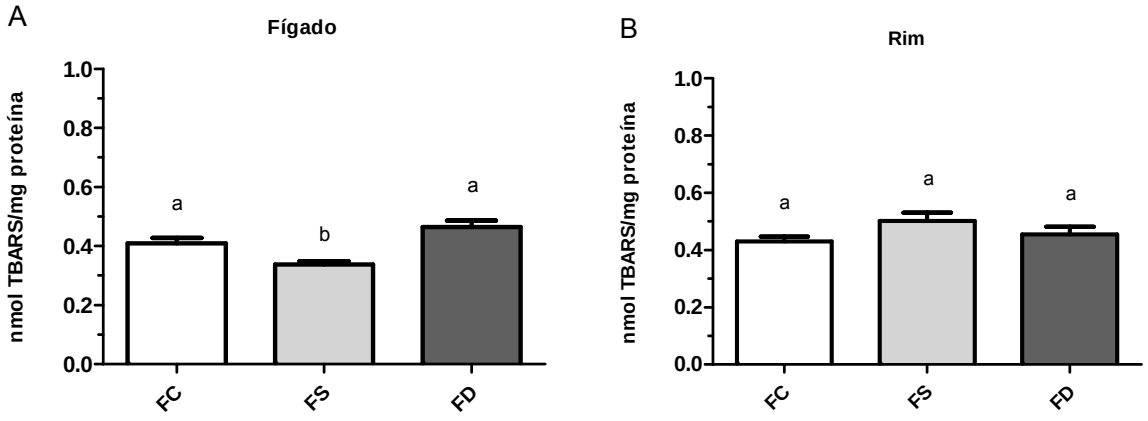

Figura 11: Peroxidação lipídica obtida em tecidos hepático e renal de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. **A**: Fígado. **B**: Rins.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.4.2 Quantificação de GSH

Os resultados da concentração de GSH das fêmeas tratadas com as dietas de metionina estão apresentados na Figura 12. Observa-se que houve um aumento significativo (P<0,05) na concentração de GSH em fígado de fêmeas tratadas com dieta suplementada em metionina (Figura 12A). A concentração de GSH em rins está apresentada naFigura 12B, onde é possível observar um aumento estatístico (P<0,05) no grupo deficiente em comparação aos grupos controle e suplementado, que não diferiram entre si (P>0,05). Além disso, a concentração de GSH obtida em rins foi menor do que a obtida em fígado.

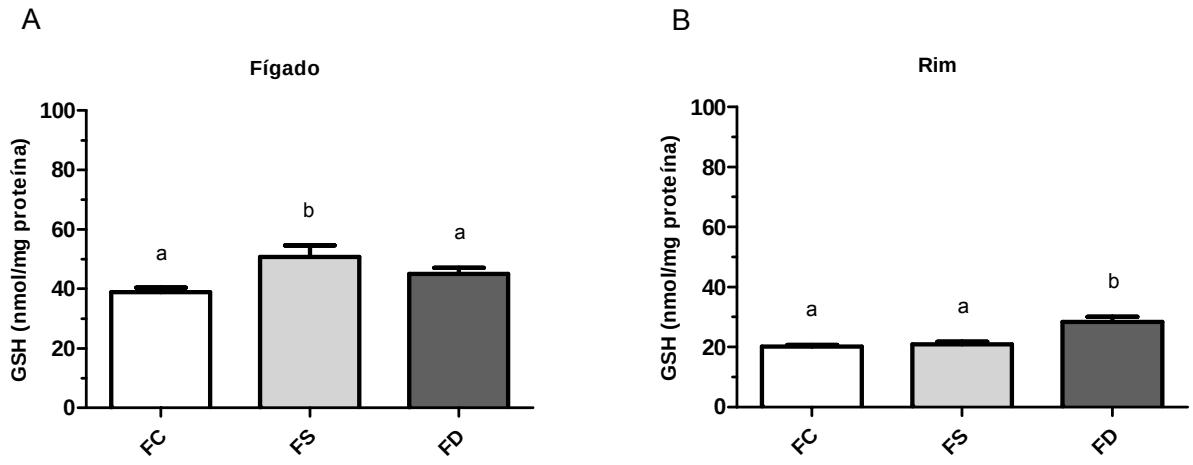

Figura 12: Quantificação de GSH (glutationa reduzida) nos tecidos hepático e renal em fêmeas de camundongos tratadas com dieta suplementada em metionina durante 10 semanas. **A:** Fígado**. B:** Rim**.**

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.4.3 Quantificação da Atividade da Catalase

Analisando-se a atividade da catalase (Figura 13), verifica-se que não houve alteração (P>0,05) da atividade dessa enzima em ambos os tecidos analisados, tanto no grupo suplementado quanto no deficiente quando comparados ao grupo controle. O tecido hepático (Figura 13A) apresentou valores maiores que o renal (Figura 13B).

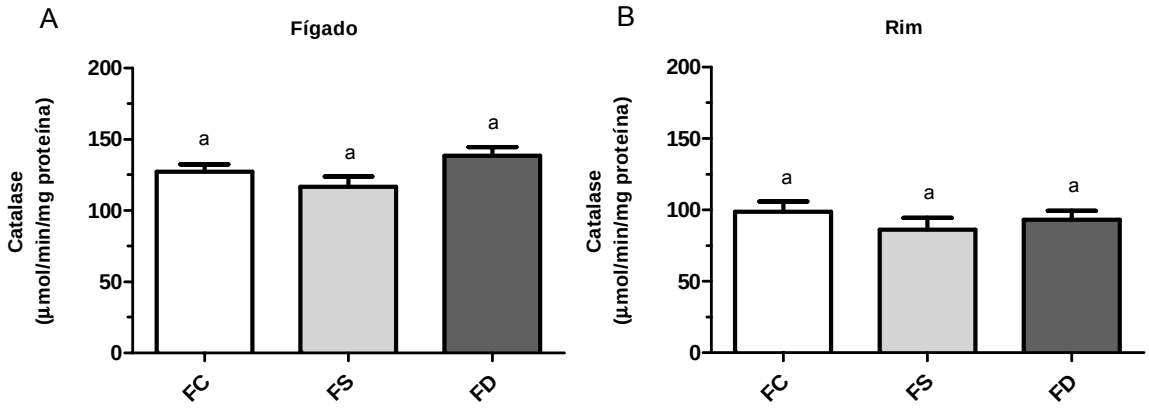

Figura 13: Atividade da catalase em tecidos hepático e renal de fêmeas de camundongos tratadas com dieta suplementada em metionina durante 10 semanas. **A**: Fígado. **B**: Rim.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.5 Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa

A instabilidade genômica que foi avaliada pelo ensaio do cometa, considerando o parâmetro porcentagem de DNA presente na cauda está representada na Figura 14.Em células hepáticas, o tratamento com ambas dietas de metioninaresultou em redução significativa (P<0,05) nos danos ao DNA quando comparado ao grupo tratado com a

dieta controle (Figura 14A). Nos rins (Figura 14B), a dieta suplementada induziu um aumento (P<0,05) de danos ao DNA, enquanto a dieta deficiente em metionina reduziu (P<0,05) os danos ao DNA, quando comparado ao controle (P<0,05).

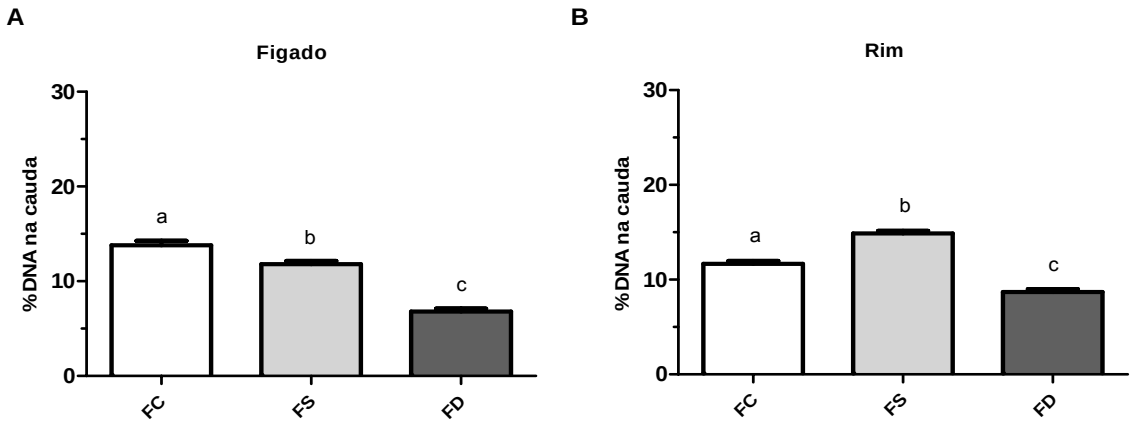

Figura 14: Instabilidade genômica obtida pelo ensaio do cometa em células hepáticas e renais de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas.**A:**% de DNA na cauda em células hepáticas. **B:** % de DNA na cauda em células renais.

ANOVA, Tukey.Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo.

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.6Expressão dos RNAm de *Mat1a, Bhmt e Cbs* por RT-qPCR

4.1.6.1 Avaliação Quantitativa do RNA Total

Na Tabela 5, é apresentado o resultado da quantificação do RNA totaldas amostras de fígado após a extração, demonstrando bom rendimento e qualidade suficiente para os ensaios de RT-qPCR.

Tabela 5: Quantidade de RNA total e as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}indicadoras da purezaem amostras de fígado de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas.

Grupos de Tratamento	Quantidade de RNA (µg/mL)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
FC	3250,18 ± 879,31	2,10 ± 0,05	1,63 ± 0,21
FS	1164,26 ± 893,42	2,08 ± 0,04	2,21 ± 0,03
FD	642,10 ± 586,61	2,05 ± 0,07	2,01 ± 0,37

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.1.6.2Avaliação Qualitativa: Integridade do RNA Total

As amostras de RNA total foram submetidas à avaliação em gel de agarose 1%. A avaliação da integridade do RNA total extraído foi determinada com base na presença de bandas de RNA ribossômicos (RNAr) 18S e 28S. A observação do gel de agarose demonstrou ausência de rastros, indicando que o RNA não estava degradado e que não houve contaminação por DNA genômico, ou seja, demonstrando que as amostras apresentaram integridade satisfatória para a realização dos experimentos.

4.1.6.3 Expressão Relativa do RNAm

A expressão relativa do RNAm dos genes *Mat1a, Bhmt e Cbs* estáapresentada na Figura 15. Observa-se que não houve diferenças (P>0.05) na expressão do RNAm de *Mat1a*dos grupos que receberam as dietas suplementada e deficiente em metionina em comparação com o grupo controle (Figura 15A). A expressão do RNAm do gene *Bhmt*não foi alterada significativamente (P>0,05) pelos tratamentos com as diferentes dietas de metionina (Figura 15B).No entanto, a deficiência de metionina reduziu

estatisticamente (P<0,05) a expressão relativa do RNAm do gene *Cbs*quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença de expressão do RNAm do gene *Cbs*no grupo suplementado,em comparação ao grupo controle (Figura 15C).

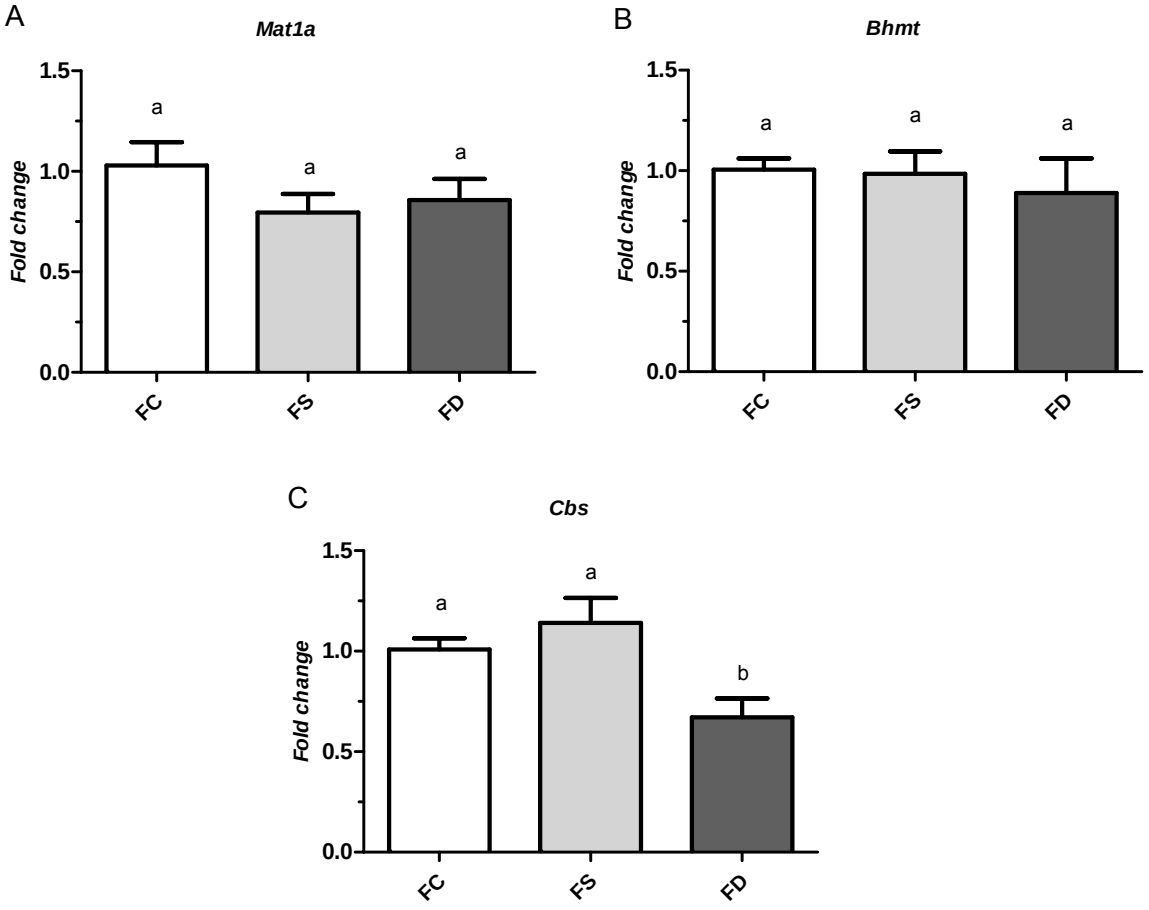

Figura 15: Expressão relativa dos RNAm de genes envolvidos na biotransformação da metionina em amostras de fígado de fêmeas de camundongos tratadas com diferentes dietas de metionina durante 10 semanas. **A***: Mat1a*. **B**: *Bhmt*. **C**: *Cbs*.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n= 5 a 7 animais/grupo. Gene de referência: *Actb.*

***FC**: controle (0,3% DL-metionina); **FS**: suplementado (2,0% DL-metionina); **FD**: deficiente (0% DL-metionina).*

4.2 FaseDescendente

4.2.1 Taxa de Sobrevivência

A taxa de mortalidade dos filhotes durante o período de tratamento é apresentada na Figura 16. Observa-se que após a sexta semana de tratamento, os grupos de filhotes que receberam a dieta deficiente, independentemente das dietas maternas (MCD e MSD), apresentaram redução no número de animais. Os outros grupos (MCC, MCS, MSC, MSS) não reduziram redução durante todo o período experimental.

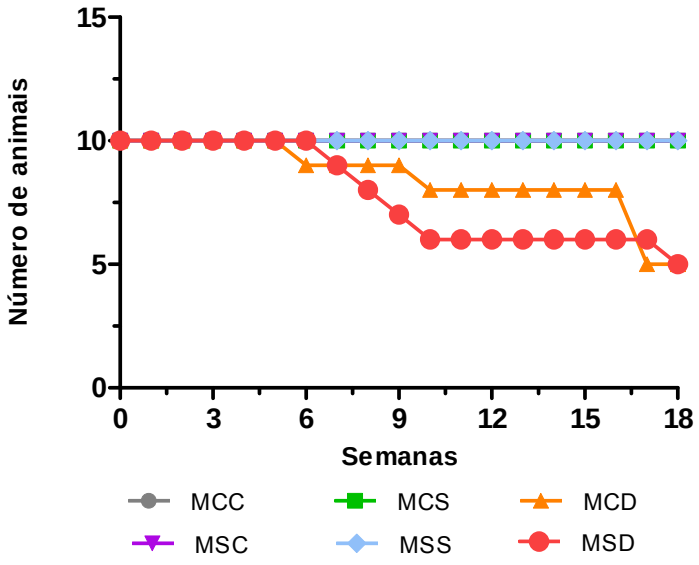

Figura 16: Taxa de sobrevivência dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.2 Consumo de Ração

O consumo de ração semanal dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina é mostrado na Figura 17. Os grupos de filhotes que receberam a dieta suplementada (MCS e MSS), independentemente da dieta que as mães receberam, apresentaram redução no consumo de ração semanal, quando comparado com o grupo MCC. Da mesma maneira, independentemente da dieta materna, os grupos de filhotes que foram tratados com dieta deficiente (MCD e MSD) apresentaram redução no consumo de ração quando comparado com os outros grupos de tratamentos. Não houve diferença no consumo semanal de ração entre o grupo MSC e o grupo MCC.

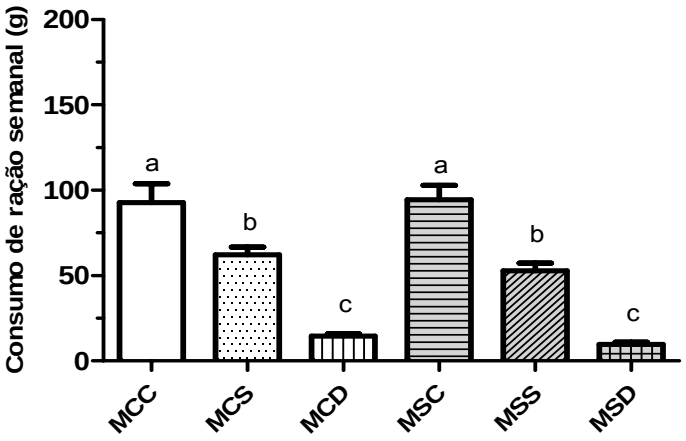

Figura 17: Consumo semanalde ração dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras indicam ausência de diferença estatística (*P*>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes indicam diferença estatística (*P*<0,05). n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.3 Massa Corpórea

A metionina presente em diferentes concentrações na dieta sobre a massa corpórea dos filhotes demonstrou acentuada diferença (P<0,05) nos grupos tratados com dieta deficiente, independente das dietas maternas (MCD, MSD), quando comparados ao grupo cujo tratamento manteve a dieta controle (MCC) (Figura 18). Por outro lado, não houve diferença (P>0,05) entre os grupos tratados ou com dieta controle ou com dieta suplementada, independente do tratamento materno (MCS, MSC e MSS), quando comparados ao grupo MCC.

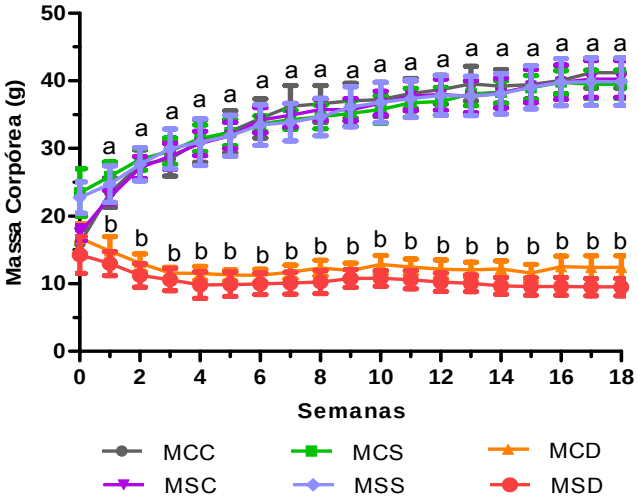

Figura 18: Massas corpóreasdos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras indicam ausência de diferença estatística (*P*>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes indicam diferença estatística (*P*<0,05). n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.4 Relação Massa Órgão e Massa Corpórea

Na Tabela 6 estão representadas as massas absolutas de fígado e rins, a massa corpórea no momento da eutanásia e as relações entre as massas desses órgãos com a massa corpórea dos filhotes de camundongos tratados com as diferentes dietas de metionina. Observa-se que houve uma redução significativa (P<0,05) nas massas absolutas de ambosórgãos nos grupos MCD e MSD, bem como na massa corpórea. As massas relativas dos órgãos não diferiram entre os grupos, indicando que a redução das massas dos órgãos observadas em MCD e MSD foi proporcional à redução da massa corpórea desses animais. Os outros grupos (MCC, MCS, MSC e MSS) não diferiram entre si nesses parâmetros avaliados.

Tabela 6: Massas absolutas de fígado e rim, massa corpórea e relação entre massa do órgão e massa corpórea em filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas

Grupos de Tratamento	Fígado (g)	Rim (g)	Massa Corpórea (g)	Fígado/Massa Corpórea (%)	Rim/Massa Corpórea (%)
MCC	1,87 ± 0,25 a	0,65 ± 0,09 a	41,50 ± 2,36 a	4,50 ± 0,47 a	1,56 ± 0,15 a
MCS	1,80 ± 0,20 a	0,58 ± 0,04 a	39,53 ± 2,08 a	4,56 ± 0,49 a	1,49 ± 0,10 a
MCD	0,63 ± 0,17 b	0,20 ± 0,06 b	11,95 ± 1,35 b	5,23 ± 0,91a	1,73 ± 0,33 a
MSC	1,79 ± 0,21 a	0,61 ± 0,07 a	40,69 ± 2,60 a	4,39 ± 0,38 a	1,50 ± 0,14 a
MSS	1,89 ± 0,34 a	0,65 ± 0,07 a	39,90 ± 3,51 a	4,75 ± 0,71 a	1,63 ± 1,52 a
MSD	0,53 ± 0,08 b	0,15 ± 0,02 b	9,52 ± 1,23 b	5,63 ± 0,85 a	1,65 ± 0,29 a

Média ± erro padrão com mesmas letras na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes na mesma colunaindicam diferença estatística (P<0,05).ANOVA, Tukey. n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.5Estresse Oxidativo

4.2.5.1 Peroxidação Lipídica: Quantificação de TBARS

Observou-se uma redução da peroxidação lipídica (P<0,05) nos grupos MSC e MSS em ambos tecidos (Figura 19). O grupo MSD apresentou aumento (P<0,05) na peroxidação somente no tecido hepático (Figura 19A), quando comparados ao grupo MCC. Os grupos MCS e MCD não diferiram (P>0,05) do grupo MCC em ambos os tecidos.

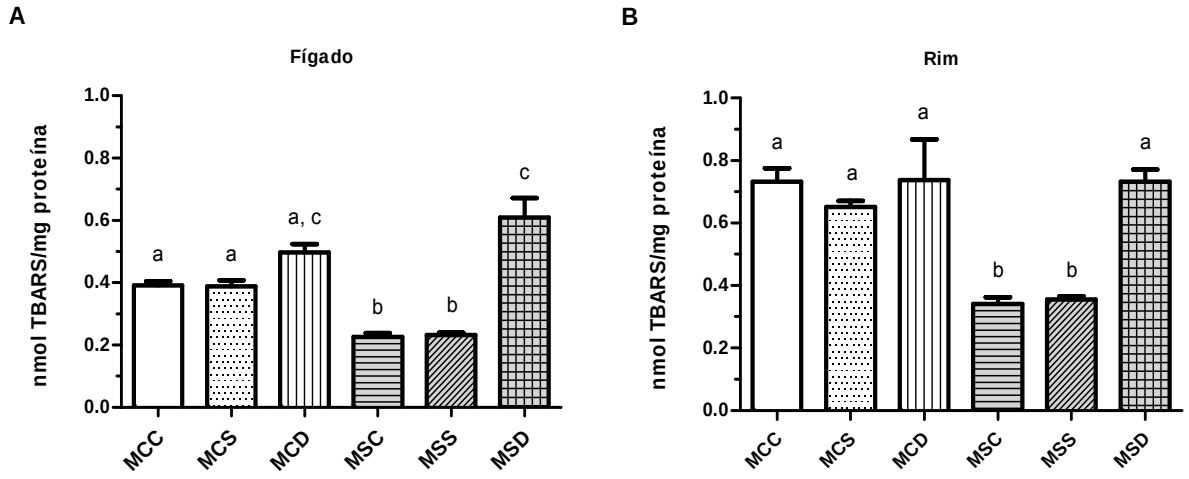

Figura 19: Peroxidaçãolipídica nos tecidos hepático e renaldos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas.**A**: Fígado. **B**: Rim.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05).n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.5.2 Quantificação de GSH

A quantificação de GSH dos filhotes está apresentada na Figura 20. No tecido hepático (Figura 20A), os grupos tratados com dieta suplementada (MCS e MSS) ou deficiente (MCD) apresentaram uma menor quantidade (P<0,05) de GSH quando comparados ao MCC. O grupo MSD apresentou uma quantidade de GSH semelhante ao grupo MCC (P>0,05). Nesse tecido, o grupo MSC apresentou uma maior quantidade de GSH (P<0,05) quando comparado a MCC.No tecido renal (Figura 20B), os grupos tratados com suplementação de metionina (MCS e MSS) ou deficiência (MCD e MSD) apresentaram menor quantidade de GSH quando comparados ao grupo MCC (P<0,05). Assim como no tecido hepático, o grupo MSC apresentou um aumento na quantidade de GSH em relação do grupo MCC (P<0,05).

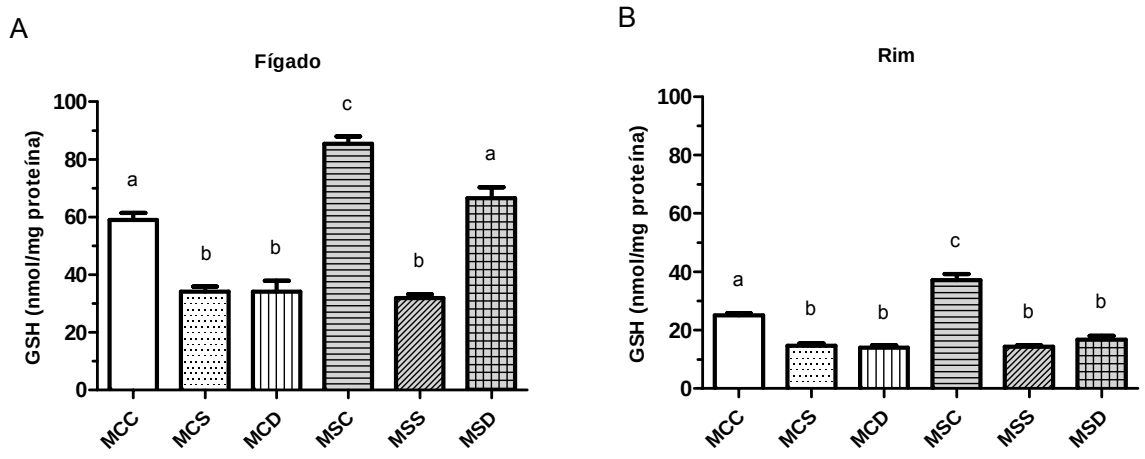

Figura 20: Quantificação de GSH (glutationa reduzida) em tecidos hepático e renal defilhotes de camundongos tratados com difererentes dietas de metioninadurante 18 semanas. A: Fígado. B: Rim.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.5.3 Quantificação da Atividade da Catalase

Os resultados obtidos na quantificação da atividade da catalase estão representados na

Figura 21.Os grupos MCS e MCD apresentaram menor atividade da catalase (P<0,05) quando comparado ao grupo MCC em fígado (

Figura 21A). Os grupos cujas mães receberam dieta suplementada (MSC, MSS e MSD) não diferiram do grupo MCC (P>0,05).

Em rins (

Figura 21B), os grupos MCS, MCD, MSS e MSD não diferiram (P>0,05) entre si e apresentaram atividade da catalase estatisticamente (P<0,05) menor em relação ao grupo MCC. O grupo MSC apresentou atividade da catalase semelhante (P>0,05) ao grupo MCC em ambos os tecidos.

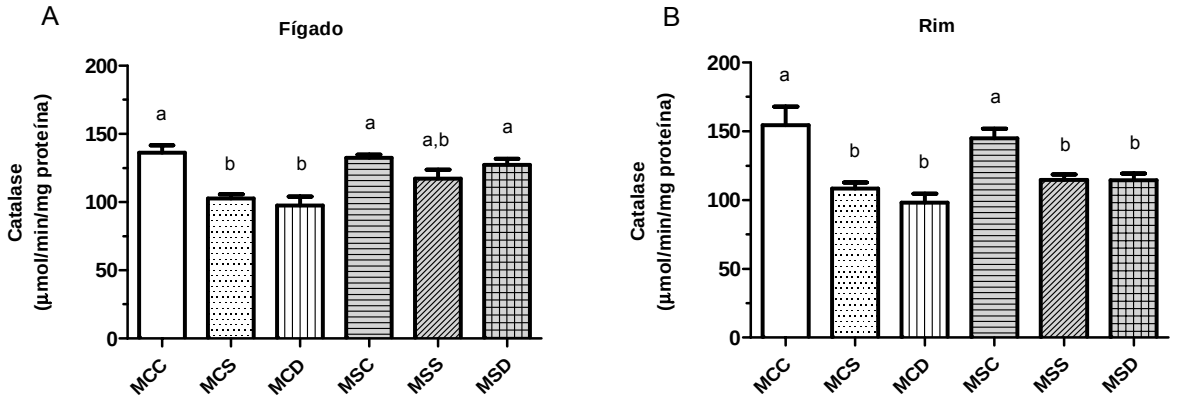

Figura 21: Quantificação da atividade da catalase em tecidos hepático e renal de filhotes de camundongos tratados com difererentes dietas de metioninadurante 18 semanas. **A**: Fígado. **B**: Rim.

ANOVA, Tukey. Média ± erro padrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05). n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

4.2.6 Instabilidade Genômica: Ensaio do Cometa

Em fígado (Figura 22A), houve aumento (P<0,05) na instabilidade genômica nos grupos MCS, MSS e MSD quando comparado ao MCC. Os grupos MSS e MSD não diferiram entre si (P>0,05). Não houve diferença entre os grupos MCD e MSC entre si e quando comparados ao grupo MCC (P>0,05).Em rins (Figura 22B), a instabilidade genômica apresentou maiores valores nos grupos MCS, MCD, MSS e MSD quando comparados ao grupo MCC (P<0,05). Somente o grupo MSC não diferiu do MCC (P>0,05).

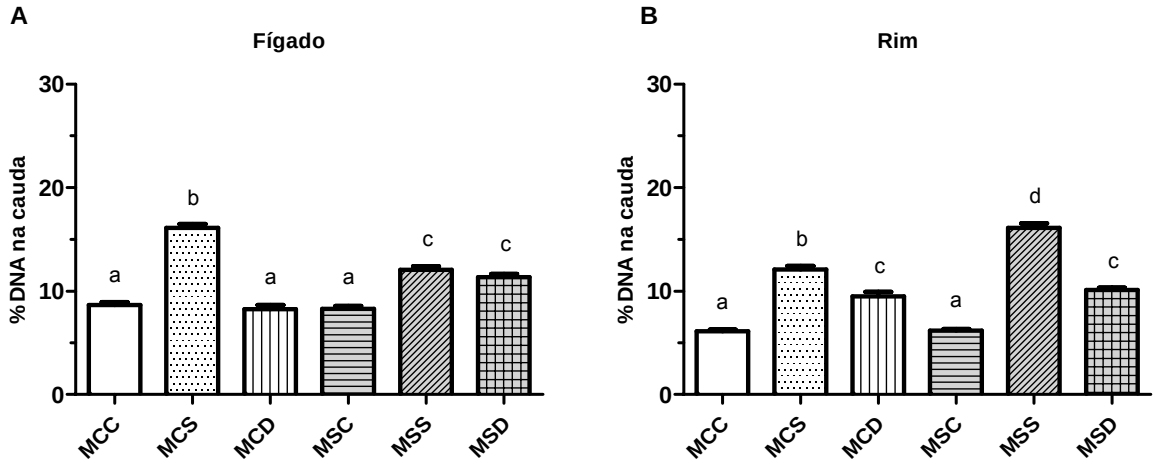

Figura 22: Instabilidade genômica obtida pelo ensaio do cometa de células hepáticas e renais dos filhotes de camundongos tratados com diferentes dietas de metionina durante 18 semanas. **A**: % de DNA na cauda em células hepáticas. **B**: % de DNA na cauda em células renais.

ANOVA, Tukey. Média ± erropadrão com mesmas letras no mesmo gráfico indicam ausência de diferença estatística (P>0,05). Média ± erro padrão com letras diferentes no mesmo gráfico indicam diferença estatística (P<0,05).n=4 a 10 animais/grupo.

***MCC**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta controle (0,3% DL-metionina); **MCS**: descendentes do grupo controlee tratados com dieta suplementada (2,0% DL-metionina); **MCD**: descendentes do grupo controle e tratados com dieta deficiente (0% DL-metionina); **MSC**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta controle; **MSS**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta suplementada; **MSD**: descendentes do grupo suplementado e tratados com dieta deficiente.*

Discussão

5 Discussão

A metionina é um aminoácido sulfurado, essencial para os mamíferos, atuando como doador de grupos metil para reações de metilação e precursor da cisteína, da glutationa e constituinte de proteínas. Devido às suas funções, torna-se relevante investigar como a suplementação ou deficiência desse aminoácido pode causar alterações relacionadas aos tecidos hepático e renal. É importante também verificar como a variação de metionina na dieta pode afetar o estresse oxidativo, analisando-se a peroxidação lipídica e o sistema antioxidante, tanto o enzimático, representado pela catalase, quanto onão-enzimático, representado pela GSH. Além disso, investigar a possível influência de diferentes dietas de metionina na fase materna sobre o desenvolvimento dos descendentes pode fornecer informações dos possíveis mecanismos de toxicidade envolvidos em ambas as fases.

Há evidências de que doadores de grupo metil envolvidos na biotransformação da metionina são importantes durante a gravidez e o consumo deficiente ou excessivo pode ter impacto na programação epigenética de humanos e animais(ZEISEL, 2009). A metionina é um desses nutrientes indispensáveis, requerida para síntese de proteínas e produção de SAM(REES; WILSON; MALONEY, 2006). SAM é um intermediário chave no metabolismo da metionina, conhecido também como “metionina ativa”, requerido para a síntese de creatina pela metilação de guanidinoacetato e a doação de grupo metil para outras reações. Adicionalmente, atua como fonte de grupos metileno para a síntese de ácidos graxos ciclopropil, amino grupos para a síntese de biotina, grupos aminoisopropil para a síntese de poliaminas e radicais 5’-deoxiadenosil, iniciando muitas reações metabólicas e vias biossintéticas de assimilação de hidrogênio. Também atua como fonte de átomos de enxofre na síntese de biotina e ácido lipoico(BROSNAN; BROSNAN, 2006; FONTECAVE; ATTA; MULLIEZ, 2004).

A suplementação da dieta materna com doadores de grupo metil induz o aumento na metilação do DNA nos descendentes, levando a permanentes alterações na regulação de genes e na modulação fenotípica(COONEY; DAVE; WOLFF, 2002; JIMENÉZ-CHILLARÓN et al., 2012; SANTOS et al., 2005; WATERLAND, 2006; WOLFF

et al., 1998). Foi demonstrado que quantidades excessivas de metionina na dieta durante a gravidez podem levar ao aumento nas concentrações de homocisteína plasmática, que em humanos é associado a complicações, como pré-eclampsia, aborto espontâneo, doenças na placenta e defeitos de tubo neural nos fetos, além de causar o desequilíbrio no estado redox pela formação de EROs(GU et al., 2012; KHOSROWBEYGI; AHMADVAND, 2013; KOZ et al., 2010).

Dietas semissintéticas são uma ferramenta útil na pesquisa que requer o controle de algum nutriente. Entretanto, devido ao fato de ser fornecida aos animais uma mistura fixa de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, pode haver um comprometimento no metabolismo quando se compara com animais consumindo uma mistura de diferentes proteínas, carboidratos elipídeos(REES; HAY; CRUICKSHANK, 2006). A caseína presente nas formulações para animais e fonte de proteínas apresenta baixo conteúdo de cisteína e, por isso, é insuficiente em fornecer o requerimento de enxofre para o crescimento do organismo. Essa deficiência é corrigida pela suplementação da dieta com metionina, permitindo que o animal sintetize cisteína adicional pela via de transsulfuração (REES; WILSON; MALONEY, 2006; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993).

A administração da dieta deficiente em metionina nas fêmeas com três semanas de vida previamente ao acasalamento impediu a prenhez. Quando há um intenso desequilíbrio de nutriente na dieta, como a restrição de metionina, mecanismos endócrinos envolvendo estrogênio e progesterona podem bloquear a reprodução(MATSUEDA; NIIYAMA, 1982; REES; WILSON; MALONEY, 2006).Rees et al. (1999) obtiveram que a restrição proteica a 60% durante a prenhez de ratas causou a redução tanto no número de fetos quanto na massa que estes apresentaram no momento do nascimento. Dessa forma, a ausência de descendentes do grupo deficiente em metionina do presente trabalho reforça os resultados desses autores, sugerindo que não somente o conteúdo proteico, mas também de metionina na dieta é importante durante a gravidez.Doadores de grupo metil são todos derivados da dieta, sendo que para humanos, a maior fonte de grupos metil em alimentos provém da metionina (10 mmol de metil/dia) que, juntamente com a cisteína, é considerada o

principal aminoácido sulfuroso incorporado em proteínas (BROSNAN; BROSNAN, 2006; NICULESCU; ZEISEL, 2002).

O consumo de ração na fase materna refletiu na massa corpórea observada durante o experimento. Ou seja, as fêmeas dos grupos controle (FC) e suplementado (FS) não apresentaram diferença no consumo de ração, assim como na massa corpórea. Por sua vez, as fêmeas do grupo deficiente (FD) consumiram significativamente menos ração e também mostraram-se com menor massa corpórea, sobretudo ao final do experimento. Resultado semelhante foi encontrado com os filhotes, em que os grupos que foram tratados com dieta deficiente (MCD e MSD) apresentaram menor consumo de ração e menor massa corpórea ao longo do experimento, independentemente da dieta materna. Os grupos que foram tratados com dieta suplementada (MCS e MSS) apresentaram massa corpórea semelhante aos que receberam dieta controle (MCC e MSC), apesar de consumirem menos ração. Ou seja, o menor consumo da dieta suplementada não refletiu em menor massa corpórea dos animais dos grupos MCS e MSS. Os resultados apresentados pelo presente estudo demonstram a importância do conteúdo de metionina para a manutenção da massa corpórea durante o desenvolvimento do organismo, ou seja, a retirada de metionina da dieta prejudicou o ganho de massa dos animais.

Estudos na literatura têm demonstrado que um desequilíbrio de metionina em relação a outros aminoácidos na dieta pode retardar o crescimento de ratos (REES; HAY; CRUICKSHANK, 2006; ROWLING et al., 2002). Esses estudos mostram que dietas baseadas em caseína apresentam um equilíbrio de metionina que pode influenciar o crescimento fetal. Observou-se que a redução do crescimento pode afetar tanto a massa corpórea no momento do nascimento, quanto no organismo adulto.

Variações na massa corpórea ou do órgão podem ser indicativas de alterações fisiológicas, induzidas pela substância estudada(WOLFSEGGER et al., 2009). O tratamento com dieta suplementada de metionina não demonstrou diferenças entre as massas dos órgãos e corpóreas dos grupos, incluindo o da fase materna (FS) e os da fase descendente (MCS e MSS), independentemente do tratamento que suas respectivas mães tiveram. Por sua vez, o tratamento com a dieta deficiente em

metionina resultou em menores massas absolutas dos órgãos e massa corpórea dos animais (FD, MCD e MSD) durante os experimentos. Apesar das menores massas absolutas dos órgãos, a análise das massas relativas não diferiu entre os grupos de fêmeas entre si e os grupos de filhotes, indicando que as menores massas dos órgãos foram proporcionais às menores massas dos animais.

Richie et al. (1994) observaram a redução de massa corpórea de ratos tratados com dieta restrita em metionina (0,17%) durante todo o tratamento de 150 semanas, demonstrando que a restrição de metionina na dieta inibe o crescimento. Da mesma forma, esses autores obtiveram a redução da massa de fígado e rins, quando comparados aos animais do grupo controle (0,86% de metionina). Em um tratamento reduzido de 12 semanas, Richie et al. (2004) também observaram que ratos tratados com metionina nas mesmas condições apresentaram pouco crescimento, ganhando pouca massa ao longo do experimento. Rees, Hay e Cruickshank (2006) obtiveram redução de massa de rins e fígado de fetos, cujas mães foram tratadas com dieta deficiente de proteínas e suplementada com 0,3% de metionina durante a prenhez. Essa redução foi proporcional à mudança da massa corpórea total, persistindo na vida adulta dos descendentes.

Alguns órgãos de fetos podem ser mais sensíveis que outros quando dietas com conteúdo de proteína balanceado com metionina é administrada a fêmeas durante a gravidez(MALONEY et al., 2005). Maloney et al. (2005) obtiveram que uma dieta de 9% de proteína suplementada com 0,5% de metionina reduziu a razão da massa de rins e massa corpórea de fetos, mas em fígado não houve alteração da razão. Esses resultados sugerem uma alteração da expressão de genes envolvidos na parada de crescimento e proliferação celular.Dessa maneira, o crescimento e o desenvolvimento de tecidos dependem de divisões celulares e isso pode ser limitado pela disponibilidade de nucleotídeos ou replicação de DNA(ENGEHAM; HAASE; LANGLEY-EVANS, 2010).

A suplementação de metionina a 2,0% na dieta materna reduziu a concentração de TBARS no tecido hepático. Blaszcyk et al. (2009) obtiveram redução na concentração de MDA em fígado de fêmeas de ratos Wistar tratadas com 10 mg de metionina/Kg de massa corpórea/dia por 5 semanas para amenizar os efeitos do

fluoreto de sódio. Provavelmente, esse resultado está associado ao fato de o fígado ser o local principal para a biotransformação da metionina, com uma maior taxa de absorção desse aminoácido em comparação com rins e sangue(STEAD; BROSNAN; BROSNAN, 2000). A redução de TBARS, sobretudo no fígado, pode se relacionar ao conteúdo de GSH, uma vez que essa substância, produzida principalmente neste órgão, atua nos processos antioxidantes, reduzindo os efeitos nocivos causados, por exemplo, pelas TBARS.

Com relação aos filhotes, o tratamento com suplementação de metionina (2,0%) na dieta ou não diferiu (MCS) ou reduziu (MSS) as concentrações de TBARS quando comparado ao grupo controle MCC. Toborek et al. (1996) não observaramaumentona concentração de TBARS em fígado de coelhos tratados com suplementação de metionina durante 24 semanas. Entretanto, quando o tratamento foi durante 36 semanas, houve aumento concentração de TBARS.Assim, o tratamento inferior a 24 semanas como o presente estudo (18 semanas) não é responsável por aumentar a concentração de TBARS em fígado e rins.

A deficiência de metionina (0%) na dieta das fêmeas não elevou a concentração de TBARS. Jordão et al. (2009) observaram aumento no tecido hepático de ratos tratados com dieta deficiente em metionina e colina por 4 ou 8 semanas. Esse resultado pode ser atribuído ao acúmulo de lipídeos, e consequente peroxidação, causado por esse tipo de dieta deficiente em colina, um modelo de esteatose hepática não-alcoólica.

Da mesma maneira, o grupo de filhotes que recebeu a dieta deficiente de metionina (MSD) apresentaram aumento de TBARS no fígado somente. Pelo fato de as dietas controle e suplementada ter reduzido TBARS, pode-se sugerir que o tratamento pós-natal com a dieta deficiente foi determinante para a concentração de TBARS em fígado. Entretanto, esse resultado não foi observado nos rins, em que não houve diferenças significativas em relação ao grupo MCC.

O conteúdo de GSH é mantido pela biotransformação da metionina na via de transsulfuração, regeneração da sua forma oxidada (GSSH) e absorção de meio extracelular, sendo que o fígado é o tecido que apresenta as maiores quantidades deste antioxidante(IWASAKI et al., 2009). Assim, a GSH é a forma encontrada em grande quantidade nas células sob condições normais e sua atividade antioxidante

ocorre pela oxidação do grupo tiol em presença de H_2O_2 gerando a glutationa oxidada (GSSG) pela ação da glutationa peroxidase (GIUSTARINI et al., 2009; GRIFFITH, 1999; GUTTERIDGE, 1995; MORAN; GUTTERIDGE; QUINLAN, 2001). A atividade antioxidante é caracterizada pela detoxificação de tóxicos endógenos ou exógenos por transformá-los em compostos hidrossolúveis menos reativos e de mais fácil eliminação (HALLIWELL, 2012; STADTMAN et al., 2003; VALKO et al., 2007).

A concentração de GSH foi elevada em fígado das fêmeas do grupo suplementado quando comparada aos grupos controle e deficiente, que não diferiram entre si. Além disso, o fígado apresentou maior concentração de GSH do que rins, uma vez que o fígado é o principal órgão onde ocorre a produção desse composto. Apesar do aumento de GSH em fígado, a análise da expressão do RNAm de *Cbs*,cuja enzima é a primeira da via de transsulfuração que origina GSH, não demonstrou aumento significativo na expressão do RNAm. Esse resultado pode ser devido ao fato de metade da GSH ser derivada da biotransformação da metionina pela via de transsulfuração, enquanto que a outra parte é derivada da liberação da cisteína durante o catabolismo de proteínas ou importada do meio extracelular (MOSHAROV; CRANFORD; BANERJEE, 2000).Além disso, é sugerida a participação de outros mecanismos regulatórios alternativos para a manutenção da concentração de GSH, como a troca desse composto entre os órgãos e o transporte (RICHIE et al., 2004).

A circulação de GSH no organismo ocorre inicialmente pela captação, envolvendo a quebra da molécula e transporte de precursores contendo cisteína por meio das γ-glutamiltranspeptidades, seguido pela ressíntese de GSH. Os rins, que possuem alta concentração de γ-glutamiltranspeptidades, reciclam GSH em seus componentes aminoácidos para o transporte até o fígado, onde acontece a regeneração de GSH (LU, 2009). Esse ciclo é importante para a manutenção da concentração de GSH em sitações em que o substrato é limitante, o que pode explicar o resultado de maiores concentrações de GSH em rins das fêmeas do grupo deficiente e a ausência de diferença no tecido hepático nesse grupo quando comparado ao controle (RICHIE et al., 2004).

Diferentemente, a concentração de GSH nos grupos de filhotes que receberam a dieta suplementada a 2,0% de metionina (MCS e MSS) apresentaram redução significativa em ambos tecidos analisados.

Yalçinkaya et al. (2009) demonstraram que uma dieta de metionina a 1g/Kg de dieta durante 24 semanas foi responsável por diversas alterações em fígados de ratos, tais quais aumento na concentração de MDA e redução de GSH, inflamação e apoptose indicadas por análises histopatológicas e histoquímicas. Mori e Hirayama (2000), no entanto, observaram um aumento na concentração de GSH em ratos tratados com suplementação de metionina a 2,0% durante quatro e 12 semanas e que não foi mantido quando o tratamento foi de 24 e 36 semanas, assim como Richie et al. (1994) que obtiveram uma redução do nível de GSH em fígado e rins em 51% e 70%, respectivamente, em ratos tratados durante 150 semanas com metionina a 0,17%. Mori e Hirayama (2000) e Yalçinkaya et al. (2009) atribuem as diferenças de resultados às variações no conteúdo de metionina, à duração do tratamento, à idade dos animais, bem como ao conteúdo proteico e às linhagens de animais empregadas nos estudos que utilizaram ratos ou camundongos. Por exemplo, uma concentração de metionina a 8 g/Kg de dieta em ratos normotensos Wistar-Kyoto causou redução na atividade da catalase e no conteúdo de GSH e aumento de TBARS em fígado após nove semanas de tratamento (ROBIN et al., 2004). Songet al. (2009), ao tratarem camundongos ApoE *knockout* com 32 semanas de idade durante 20 semanas com dieta suplementada em metionina 2,0%, não obtiveram diferença entre as concentrações de GSH, todavia o grupo suplementado apresentou um aumento na concentração de TBARS.

Portanto, o tratamento prolongado parece ser determinante na resposta do organismo com relação à concentração de GSH, reduzinda-o significativamente. Além da duração de tratamento ser distinto entre a fase materna e a fase descendente, os resultados obtidos podem ser atribuídos às alterações que ocorrem no organismo das fêmeas durante a gravidez e lactação, como forma de auto-proteção e proteção dos fetos gerados. Também pode haver influência da dieta materna na resposta dos filhotes, como no grupo MSC, que apresentou valores significativamente diferentes do grupo MCC. Da mesma forma, a dieta materna ter sido controle ou suplementada pode

ter influenciado nas diferenças de respostas dos filhotes dos grupos MCS e MSS, e MCD e MSD.

A ausência de diferenças na atividade da catalase entre os grupos tratados com diferentes dietas de metionina na fase materna, bem como a redução nos grupos de filhotes tratados com dieta suplementada (MCS e MSS) ou deficiente (MCD e MSD) do presente estudo sugere que a atividade dessa enzima não aumenta em função do conteúdo de metionina/homocisteína da dieta durante o tempo de tratamento. Chanson et al. (2007) encontraram que a hiperhomocisteinemia induzida pela deficiência de ácido fólico na dieta de ratos por quatro semanas não aumentou a atividade da catalase em fígado, assim como de SOD. Esses autores obtiveram que o conteúdo de GSH total, isto é, a quantidade da forma reduzida mais a quantidade da forma oxidada GSSG em fígado, não diferiu entre os grupos tratados. Esses resultados foram atribuídos às atividades das enzimas antioxidantes dependentes de GSH, como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo induzido pela deficiência de ácido fólico e indução de hiperhomocisteinemia. Esses autores estabeleceram, portanto, uma correlação positiva entre a homocisteína plasmática com enzimas antioxidantes dependentes de GSH, mas que não houve com SOD e catalase.

Langley-Evans, Lilley, McMullen (2006) não encontraram diferenças na atividade da catalase em fígado de ratas com dieta deficiente em proteína durante a prenhez.Matte et al. (2009a; 2009b) obtiveram redução na atividade da catalase em cérebro e fígado de ratos tratados com homocisteína para induzir hiperhomocisteinemia. Além disso, o tratamento com homocisteína levou ao aumento dos níveis de TBARS em fígado e de danos ao DNA no córtex cerebral dos ratos tratados durante duas semanas (MATTE et al., 2009a; 2009b). Em camundongos ApoE*knockout* com hiperhomocisteinemia induzida pela suplementação com metionina 2,0% durante 20 semanas não houve diferença na expressão do RNAm da catalase em fígado (SONG et al., 2009). Huang et al. (2001) não observaram diferença na atividade da catalase em fígado de ratos Wistar com hiperhomocisteinemia induzida pela deficiência de ácido fólico por quatro semanas. Toborek et al. (1996) também não observaram diferença na atividade da catalase em fígado de coelhos tratados com

suplementação de metionina durante 24 semanas. Porém, quando o tratamento aumentou para 36 semanas, houve um aumento significativo na atividade da catalase (TOBOREK et al., 1996). Não há na literatura uma explicação sobre a relação do conteúdo de metionina com a atividade da catalase, esclarecendo por que a suplementação com metionina somente aumenta a atividade quando o período de tratamento é maior que o desenvolvido no presente estudo.

A suplementação de metionina na dieta materna apresentou respostas diferentes nos tecidos avaliados no parâmetro de instabilidade genômica, que avalia os danos ao DNA pelo ensaio do cometa. Em fígado, houve uma redução significativa na instabilidade do grupo suplementado quando comparado ao grupo controle. Entretanto, foi obtido um aumento da instabilidade em rins, sugerindo a existência de uma resposta tecido-específica (POGRIBNY et al., 2004). Até o momento, não há trabalhos na literatura que tenham avaliado a instabilidade genômica por meio do ensaio do cometa em fêmeas grávidas tratadas com diferentes dietas de metionina, ou mesmo outros tipos de doadores de grupo metil.

Esse aumento de danos ao DNA em rins induzidos pela suplementação de metionina pode ser causado pelo fato dos rins serem um dos locais de maior produção de homocisteína, principalmente em humanos(DO AMARAL et al., 2011; GARIBOTTO et al., 2009). Além disso, em tentativa de reduzir a provável altaconcentração de homocisteína, é possível que essa substância tenha sido direcionada para o plasma e tenha seguido para excreção renal. Essa possibilidade é corroborada pela análise da expressão do RNAm de *Cbs*, cuja enzima é a primeira na via de transsulfuração responsável, dentre outros objetivos, por metabolizar o excesso de homocisteína presente no organismo. Por meio dessa análise, verificou-se que não houve aumento na expressão do RNAm de *Cbs*, indicando que o possível excesso de homocisteína induzido pela dieta suplementada não foi direcionado para essa via, sendo provavelmente transferida para os rins, elevando possivelmente os danos ao material genético nesse órgão. Por outro lado, a deficiência de metionina em ambos tecidos das fêmeas causou a redução significativa na instabilidade genômica. Esse fato pode ser resultado da baixa concentração de homocisteína, um subproduto do metabolismo da

metionina e consequente baixa produção de EROs (LÓPEZ-TORRES; BARJA, 2008; MARON; LOSCALZO, 2009; MATTÉ et al., 2009; NEVES; MACEDO; LOPES, 2004).

Além da função de antioxidante, atuando principalmente no balanço redox, a GSH também participa em outros aspectos da fisiologia celular, incluindo a redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos. Consequentemente, as concentrações de GSH podem indiretamente afetar os processos que requerem desoxirribonucleotídeos (JORDAN; REICHARD, 1998). Rojas et al. (2000) demonstraram a relação da concentração de GSH e cisteína em fígado, rins e pulmões como importantes determinantes da instabilidade do DNA pelo ensaio do cometa, ou seja, as concentrações dessas duas substâncias foi inversamente proporcional aos danos ao material genético. Essa relação pode explicar, em parte, os resultados encontrados no presente estudo, uma vez que os grupos que apresentaram aumento na concentração de GSH (FS, MSC), ou que não demonstraram diferença em relação ao grupo controle (FD), exibiram redução da instabilidade genômica (FS, FD) ou não diferiram do controle (MSC) em fígado, por exemplo. E os grupos que apresentaram redução na concentração de GSH (MCS e MSS) desenvolveram maior instabilidade genômica em fígado. Essa relação inversa entre concentração de GSH e instabilidade genômica também é observada em rins.

Os grupos de filhotes que foram tratados com dieta suplementada (MCS e MSS), independentemente da dieta materna, apresentaram aumento da instabilidade genômica, tanto em fígado quanto em rins. Assim como nas fêmeas, é possível haver alguma relação entre a instabilidade genômica com a concentração de GSH, pois estes mesmos grupos apresentaram redução de GSH e aumento da instabilidade. Wu et al. (2004) citam, dentre várias funções, que a GSH participa na regulação dos danos ao DNA, expressão gênica e apoptose, uma vez que a deficiência de GSH contribui para o estresse oxidativo e mais danos ao DNA. Faletti e Douki (2008) demonstraram que a redução no conteúdo de GSH correlacionou-se com maiores danos encontrados no DNA, induzidos pela formação de aductos com 4-hidroxi-2(E)-nonenal (HNE),um tipo de aldeído insaturado produzido pela peroxidação lipídica, em cultura celular de monócitos humanosTHP1.

Além disso, a GSH atua em outras funções celulares, tais como replicação do DNA e regulação do ciclo celular e regulação epigenética envolvidas na expressão gênica (CHATTERJEE, 2013; LU, 2009). Por exemplo, o núcleo precisa estar em um estado reduzido para manter os padrões de expressão gênica (SCHAFER; BUETTNER, 2001). Em situações de estresse oxidativo, as modificações no DNA são inversamente proporcionais ao conteúdo de GSH (GREEN et al., 2006). Outro exemplo é a regulação epigenética, onde o desequilíbrio no estado redox pode afetar a ação de histonas acetilases e deacetilases, importantes enzimas envolvidas na remodelação e compactação da cromatina por meio da acetilação e deacetilação de histonas (TORRES et al., 2009). Para a replicação do DNA, a matriz nuclear é preservada pela formação de pontes dissulfeto mantidas por grupos tiol, como a GSH, para garantir que a arquitetura nuclear seja mantida e permita a correta replicação do DNA (GREEN et al., 2006; LEONHARDT et al., 2000). Outro fator em que a GSH está envolvida é a associação dos cromossomos com proteínas da matriz nuclear, estabelecida por meio da glutationilação de proteínas nucleares por pontes dissulfeto, uma modificação importante como mecanismo regulatório na proliferação celular (COTGREAVE; GERDES, 1998).

Portanto, os resultados da instabilidade genômica em fígado e rins podem ter alguma associação com a concentração de homocisteína, a concentração de GSH, a interrelação entre os tecidos onde ocorre a biotransformação da metionina, bem como as vias e seus diversos mecanismos de regulação. Assim, a suplementação de metionina que possivelmente elevou o nível de homocisteína pode não ter direcionado o fluxo para a via de transsulfuração no tecido hepático, haja vista que não houve aumento na expressão do RNAm do gene *Cbs*. Para evitar os danos causados por esse subproduto potencialmente tóxico a estruturas biológicas em fígado, o provável excesso de homocisteína foi direcionado via plasma para excreção renal, onde houve maiores valores de instabilidade genômica em rins.

A deficiência, por sua vez, reduziu a instabilidade no material genético de ambos tecidos na fase materna. De modo semelhante à suplementação, é possível que esse resultado seja uma associação da concentração de homocisteína, da concentração de

GSH, da interrelação entre os tecidos e das vias de biotransformação da metionina. Assim, a homocisteína originada foi usada para manter os níveis de metionina, por meio da via de remetilação ao invés de ser transportada para o plasma e ser excretada pelos rins. Devido à baixa concentração de homocisteína nos rins, é possível que a redução na instabilidade genômica esteja relacionada a este fato.

Os grupos de filhotes que foram tratados com dieta deficiente (MCD e MSD), independentemente da dieta materna, apresentaram aumento na instabilidade genômica em rins, porém somente o grupo MSD apresentou em fígado. Esse resultado pode ser relacionado à deficiência de metionina na dieta por um período prolongado. Isso porque o folato, sob a forma de 5,10-metiltetrahidrofolato, é utilizado para a metilação da homocisteína, ressintetizando metionina na via de remetilação (DUTHIE; GRANT; NARAYANAN, 2000). Adicionalmente, o folato é conhecido por participar da biossíntese de purinas (adenina e guanina) e pirimidina (timina e citosina). Timina, que é essencial para a síntese de reparo do DNA, é um análogo metilado da uracila. Essa reação de metilação, que é catalizada pela timidalato sintetase, especificamente requer 5,10-metiltetrahidrofolato como doador de grupo metil. Sob condições normais, o conteúdo de folato fornece a quantidade de grupos metil para a ressíntese de metionina pela via de remetilação e para a formação de timina. Entretanto, a concentração de metionina tem um papel importante na determinação da prioridade metabólica de folato. Quando o conteúdo de metionina é baixo, o folato é utilizado preferencialmente para a ressíntese de metionina, em detrimento da síntese de DNA. Como resultado, nucleotídeos de uracila permanecem na molécula de DNA erroneamente, promovendo quebras de fitas, redução do reparo do DNA e apoptose, assim como o obtido pelo ensaio do cometa com os grupos de filhotes tratados com dieta deficiente em metionina (BAGNYUKOVA et al., 2008; DUTHIE; HAWDON, 1998; JAMES et al., 2003; LERTRATANANGKOON et al., 1997).

Ambos o excesso e a deficiência de SAM podem desencadear um descontrole do metabolismo hepático, causando acúmulo de gordura, estresse oxidativo, divisão celular, apoptose, instabilidade genômica, desenvolvimento de hepatocarcinoma (LU; MATO, 2012; MARTINEZ-LOPEZ et al., 2008). Assim, o comprometimento na síntese

de SAM pode causar o desenvolvimento de danos ao tecido hepático, uma vez que esta atua não somente como doador de grupo metil, mas também como reguladora de funções hepáticas essenciais, tais como regeneração e diferenciação (AVILA et al., 2002; CHEN et al., 2004; CORRALES et al., 2002).

A análise da expressão gênica relativa de RNAm de *Mat1a* em células hepáticas das fêmeas demonstrou não haver diferenças entre os grupos suplementado e controle. Apesar de haver uma suplementação de metionina a 2,0%, esse resultado pode ser devido à suplementação nessa concentração ser indicativa de causar uma hiperhomocisteinemia tolerável (PARK et al., 2008), sendo possível que não eleve significativamente os níveis de expressão do RNAm de *Mat1a* e consequente produção de SAM. Além disso, durante o período gestacional, bem como lactacional, há um intenso catabolismo de proteínas, que juntamente com os nutrientes presentes na dieta materna, fornecem os compostos para o desenvolvimento do feto e dos recém-nascidos. Portanto, o desenvolvimento fetal e dos recém-nascidos é dependente do organismo materno para a obtenção de nutrientes para sustentar as altas taxas de divisão celular que acontecem nos primeiros estágios da vida.Assim, a composição do corpo materno e a taxa de metabolização de proteínas podem exercer influência no suprimento de aminoácidos para os fetos(DUGGLEBY; JACKSON, 2001).A deficiência de metionina na dieta das fêmeas não reduziu significativamente a expressão do RNAm de *Mat1a* em células hepáticas. Como a dieta desse grupo foi baseada na formulação AIN93, o conteúdo de caseína fornece aproximadamente 17% de proteínas, sendo que o conteúdo de aminoácidos sulfurados é encontrado somente sob a forma de cisteína/cistina (3,7 g/Kg dieta), já que a metionina foi excluída dessa dieta (REEVES et al., 1993). Assim, a semelhança na expressão para esse RNAm comparado ao grupo controle pode ser uma consequência do baixo conteúdo de cisteína/cistina presente na formulação, responsável por se converter em metionina, e alimentação normal prévia ao início do tratamento, uma vez que foram utilizadas fêmeas com três semanas de vida. Adicionalmente, há a ressíntese da metionina obtida pela via remetilação, por meio da atividade enzimática da metionina sintase e BHMT.

A análise da expressão de RNAm de *Bhmt* em fígado demonstrou ausência de diferença estatística entre os três grupos de tratamento de metionina. Este resultado pode ser devido ao também semelhante nível de *Mat1a* entre os grupos de tratamento. Como o suprimento de metionina na dieta dos grupos controle e suplementado provavelmente forneceu grupamento metil e SAM adequado às necessidades das fêmeas, não houve direcionamento do fluxo para a via de remetilação da metionina através da BHMT, uma das vias de remetilação que utiliza homocisteína e betaína como substratos e geralmente acionada quando há maior demanda por metionina e SAM.

A deficiência de metionina na dieta resultou em semelhança na expressão do RNAm de *Bhmt*. Isso é uma consequência da também expressão semelhante de *Mat1a* e consequente nível de SAM. Desse modo, apesar da deficiência de metionina na dieta e, provavelmente, baixos níveis de homocisteína, o grupo deficiente não diferiu do grupo controle na expressão tanto de *Bhmt* quanto de *Mat1a*. Finkelstein et al. (1982) também demonstrou que deficiência de metionina aumentou a atividade enzimática de BHMT, assim como a suplementação, resultado posteriormente obtido por Park, Renduchintala e Garrow (1997) e Park et al. (1999).

Pela análise da expressão do RNAm de *Cbs* não houve diferença estatística entre o grupo suplementado quando comparado ao grupo controle. Mesmo havendo suplementação a 2,0%, a ausência de aumento na expressão desse gene pode ser em função da expressão do RNAm de *Mat1a* também não ter sido diferente do grupo controle. Infere-se que os níveis de homocisteína provavelmente obtidos dessa dieta não tenham direcionado o fluxo da biotransformação da metionina para a via de transsulfuração, iniciada pela enzima CBS e responsável por reduzir os níveis de homocisteína (FINKELSTEIN et al., 1982; SELHUB, 1999; UELAND et al., 1993).

A expressão do RNAm de *Cbs* não aumentou em resposta a suplementação de metionina quando ratos foram tratados durante 2 semanas com dietas com baixo ou alto conteúdo de caseína adicionadas com metionina a 0,5% e 1,0% (OHUCHI et al., 2009), assim como o reportado no presente estudo. Esses autores atribuem tal resultado ao fato da CBS hepáticaresponder a dietas com alto conteúdo de caseína,

mas não à suplementação de metionina, o que pode estar relacionado ao equilíbrio entre a metionina e os outros aminoácidos presentes na dieta (REES; HAY; CRUICKSHANK, 2006; REEVES et al., 1997).

O grupo deficiente apresentou redução significativa da expressão de RNAm de *Cbs*. Uma vez que SAM atua como regulador do equilíbrio entre as vias de biotransformação da metionina, sendo ativador alostérico de CBS e inibidor de BHMT quando em elevadas concentrações, a análise da expressão dos três genes apresentados sugere que parte do conteúdo de SAM biotransformado em homocisteína foi usada para ressintetizar a metionina na via de remetilação, reduzindo, portanto a demanda por CBS. Assim, houve semelhança na expressão do RNAm de *Mat1a* e *Bhmt* entre os grupos FD e FC, mantendo a concentração de SAM adequada ao funcionamento do organismo durante o período de tratamento proposto,

Devido à ausência de dados referentes à expressão gênica em filhotes, não é possível saber se as diferentes dietas de metionina influenciaram a expressão dos RNAm das enzimas envolvidas em cada uma das vias de biotransformação, buscando esclarecer a relação de conteúdo de metionina e direcionamento do fluxo.

Baseado nos resultados apresentados pelo presente estudo e em trabalhos na literatura, a suplementação ou deficiência de metionina apresenta diferentes efeitos em tecidos distintos, devido ao local preferencial de biotransformação desse aminoácido, ou mesmo entre o equilíbrio nas vias envolvidas nesse processo. As fases de desenvolvimento do organismo influenciam a maior necessidade desse aminoácido em determinados tecidos, interferindo também na disponibilidade e no transporte entre os diferentes órgãos. Além disso, variações na composição da dieta, como a quantidade de metionina empregada, bem como na duração dos tratamentos e linhagens de animais podem gerar diferentes respostas entre os estudos sem, contudo, invalidar os resultados.

De acordo com os parâmetros avaliados e as condições experimentais estabelecidas, pode-se concluir que a deficiência de metionina causou efeitos prejudiciais nos animais das fases materna e deficiente. Isso porque a ausência de

metionina na dieta pode ter causado alterações no seu próprio ciclo de biotransformação, ciclo esse importante por fornecer compostos essenciais para a manutenção adequada do organismo. Houve ausência de ganho de massa corpórea e de diferença na peroxidação lipídica e houve respostas variadas de danos ao DNA, dependendo do tecido avaliado.A concentração de GSH ou não foi alterada ou reduziu dependendo do tecido, provavelmente e diretamente pelas alterações no ciclo de biotransformações da metionina, já que é uma das substâncias derivadas desse. Mesmo em concentrações ideal ou suplementada de metionina durante o período pré-natal, a dieta deficiente quando administrada após a lactação determinou alterações importantes nos parâmetros avaliados.

A suplementação de metionina, apesar de ser uma concentração capaz de resultar hiperhomocisteinemia de acordo com a literatura, não aumentou a massa corpórea, a peroxidação lipídica e os danos ao DNA, sobretudo em fígado dos animais. Isso se deve ao fato desse ser o órgão principal pela biotransformação da metionina e local preferencial para a produção de GSH, onde apresentou maior concentração.

O estudo nas duas fases propostas, isto é, na fase materna durante gestação/lactação e na fase descendente após desmame até a vida adulta, demonstrou haver possivelmente algum mecanismo que proteja tanto o organismo materno quanto o fetal, como sugerido pela literatura. É possível que os tratamentos das dietas no período pós-natal possa alterar efeitos da dieta materna durante a gravidez, demonstrando as modificações e adaptações a que os organismos são submetidos durante o desenvolvimento.

O ciclo de biotransformação da metionina envolve mecanismos complexos de regulação e ocorre em vários órgãos, integral ou parcialmente. Pode ser modulado de acordo com as variações dos componentes da dieta, que doam micro e macronutrientes diretamente para o ciclo e cofatores para enzimas. Por ocorrer integral ou parcialmente entre os órgãos, é possível haver mecanismos de transporte das substâncias originadas no ciclo da metionina, de modo a direcioná-las de acordo com as necessidades do organismo, como demonstrado por outros estudos. Além disso, cada tecido pode responder diferentemente aos efeitos da suplementação ou da deficiência

de metionina, como o fígado. Por ser o local preferencial para a biotransformação da metionina e de GSH, o fígado apresentou resultados que foram modulados pela variação do conteúdo de metionina da dieta.

Conclusões

6 Conclusões

Nas condições experimentais propostas, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de dietas deficiente e suplementada em metionina sobre a instabilidade genômica e oestresse oxidativo em camundongos e suas mães tratadas durante gestação e lactação, das quais também foi realizada a expressão do RNAm de *Mat1a, Bhmt* e *Cbs* em fígado. Foram obtidos que:

- A dieta deficiente resultou em menor consumo de ração e massa corpórea em ambas fases;
- Na fase materna, a suplementação ou a deficiência de metionina não resultou em estresse oxidativo;
- Na fase descendente, a suplementação e a deficiência de metionina apresentaram variação de estresse oxidativo em ambos tecidos;
- Na fase materna, a suplementação reduziu a instabilidade genômica no fígado, mas aumentou no rim. A deficiência resultou em menor instabilidade nos dois tecidos;
- Na fase descendente, a suplementação ou a deficiência de metionina resultou em maior instabilidade genômica;
- Na fase materna, a deficiência de metionina reduziu a expressão do RNAm de *Cbs* em fígado.

Referências

7Referências

AFMAN, L.; MÜLLER, M. Nutrigenomics: from molecular nutrition toprevention of disease. **Journal of Amercan Dietetic Association**, v.106, p. 569-576, 2006.

AMES, B. N. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 7-20, 2001.

AVILA, M. A., et al. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. **Alcohol**,New York, v. 27, n. 3, p. 163-167, 2002.

BAGNYUKOVA, T. V., et al. Induction of oxidative stress and DNA damage in rat brain by a folate/methyl-deficient diet. **Brain Research**,Amsterdam v. 1237, p. 44-51, 2008.

BAYDAS, G., et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 133-139, 2007.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A Spectrophotometric Method for Measuring the Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. **Journal of Biological Chemistry**,Baltimore, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.

BLASZCZYK, I., et al. Influence of Methionine upon the Concentration of Malondialdehyde in the Tissues and Blood of Rats Exposed to Sodium Fluoride. **Biological trace element research**,London, v. 129, n. 1-3, p. 229-238, 2009.

BLASZCZYK, I., et al. Influence of Methionine upon the Activity of Antioxidative Enzymes in The Kidney of Rats Exposed to Sodium Fluoride. **Biological trace element research**,London, v. 133, n. 1, p. 60-70, 2010.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radical Biology & Medicine**,Terrytown, v. 27, p. 951-965, 1999.

BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: An overview. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1636s-1640s, 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

BULL, C.; FENECH, M. Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. **Proceedings of the Nutrition Society**,London, v. 67, n. 2, p. 146-156, 2008.

BURLINSON, B., et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**,Bristol, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**,London, v. 109, n. 4, p. 365-379, 2005.

CARO, P., et al. La restricción de metionina en la dieta disminuye el estrés oxidativo en mitocondrias de corazón. **Revista Española de Geriatría y Gerontología**,Madrid, v. 41, p. 334-339, 2006.

CHANSON, A., et al. Preferential response of glutathione-related enzymes to folate-dependent changes in the redox state of rat liver. **European Journal of Nutrition**,Darmstadt, v. 46, n. 4, p. 204-212, 2007.

CHATTERJEE, A. Reduced Glutathione: A Radioprotector or a Modulator of DNA-Repair Activity? **Nutrients**,Basel, v. 5, n. 2, p. 525-542, 2013.

CHEN, L. X., et al. Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. **Faseb Journal**,Bethesda, v. 18, n. 3, p. 914-+, 2004.

CHMURZYNSKA, A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. **Nutrition Reviews**,Washington, v. 68, n. 2, p. 87-98, 2010.

COLLINS, A. R., et al. The comet assay: What can it really tell us? **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,Amsterdam, v. 375, n. 2, p. 183-193, 1997.

COLLINS, A. R., et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**,Oxford, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

COONEY, C. A.; DAVE, A. A.; WOLFF, G. L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 8, p. 2393s-2400s, 2002.

CORRALES, F. J., et al. Regulation of mammalian liver methionine adenosyltransferase. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 8, p. 2377s-2381s, 2002.

COTGREAVE, I. A.; GERDES, R. G. Recent trends in glutathione biochemistry - Glutathione-protein interactions: A molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochemical and Biophysical Research Communications**,San Diego, v. 242, n. 1, p. 1-9, 1998.

DASARATHY, J., et al. Methionine metabolism in human pregnancy. **American Journal of Clinical Nutrition**,Bethesda, v. 91, n. 2, p. 357-365, 2010.

DAVIS, C. D.; UTHUS, E. O. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. **Experimental Biology and Medicine**,London, v. 229, n. 10, p. 988-995, 2004.

DO AMARAL, C. L., et al. The effects of dietary supplementation of methionine on genomic stability and p53 gene promoter methylation in rats. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,Amsterdam, v. 722, n. 1, p. 78-83, 2011.

DOLINOY, D. C., et al. Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. **Pediatric Research**,New York, v. 61, n. 5, p. 30r-37r, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**,Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUGGLEBY, S. L.; JACKSON, A. A. Relationship of maternal protein turnover and lean body mass during pregnancy and birth length. **Clinical Science**,London v. 101, n. 1, p. 65-72, 2001.

DUTHIE, S. J.; GRANT, G.; NARAYANAN, S. Increased uracil misincorporation in lymphocytes from folate-deficient rats. **British Journal of Cancer**,London v. 83, n. 11, p. 1532-1537, 2000.

DUTHIE, S. J.; HAWDON, A. DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro. **Faseb Journal**,Bethesda, v. 12, n. 14, p. 1491-1497, 1998.

DUTHIE, S. J., et al. Impact of folate deficiency on DNA stability. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 8, p. 2444s-2449s, 2002.

ENGEHAM, S. F.; HAASE, A.; LANGLEY-EVANS, S. C. Supplementation of a maternal low-protein diet in rat pregnancy with folic acid ameliorates programming effects upon feeding behaviour in the absence of disturbances to the methionine-homocysteine cycle. **British Journal of Nutrition**,Cambridge, v. 103, n. 7, p. 996-1007, 2010.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; ONEILL, K. L. The Comet Assay - a Comprehensive Review. **Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology**,Amsterdan, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FALLETTI, O.; DOUKI, T. Low Glutathione Level Favors Formation of DNA Adducts to 4-Hydroxy-2(E)-nonenal, a Major Lipid Peroxidation Product. **Chemical Research in Toxicology**,Washington, v. 21, n. 11, p. 2097-2105, 2008.

FEINBERG, A. P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nature Reviews Genetics**,London, v. 7, n. 1, p. 21-33, 2006.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food and Chemical Toxicology**,New York, v. 40, n. 8, p. 1113-1117, 2002.

FENECH, M. Nutritional treatment of genome instability: a paradigm shift in disease prevention and in the setting of recommended dietary allowances. **Nutrition Research Reviews**,Cambridge, v. 16, n. 1, p. 109-122, 2003.

FENECH, M. Folate, DNA damage and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**,Limerick v. 131, n. 4, p. 236-241, 2010.

FENECH, M.; FERGUSON, L. R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,Amsterdam, v. 475, n. 1-2, p. 1-6, 2001.

FIALHO, E.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Nutrição no pós-genoma: fundamentos e aplicações de ferramentas ômicas. **Revista de Nutrição**,Campinas, v. 21, n. 6, p. 757-766, 2008.

FINKELSTEIN, J. D., et al. Methionine Metabolism in Mammals - Concentration of Metabolites in Rat-Tissues. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 112, n. 5, p. 1011-1018, 1982.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine Metabolism in Mammals - Distribution of Homocysteine between Competing Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 15, p. 9508-9513, 1984.

FINKELSTEIN, J. D.; MARTIN, J. J. Methionine Metabolism in Mammals - Adaptation to Methionine Excess. **Journal of Biological Chemistry**,Baltimore, v. 261, n. 4, p. 1582-1587, 1986.

FONTECAVE, M.; ATTA, M.; MULLIEZ, E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. **Trends in Biochemical Sciences**,Cambridge v. 29, n. 5, p. 243-249, 2004.

FRANKLIN, T. B.; MANSUY, I. M. Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects. **Neurobiology of Disease**,San Diego, v. 39, n. 1, p. 61-65, 2010.

GARCIA, R. A. G.; STIPANUK, M. H. The Splanchnic Organs, Liver and Kidney Have Unique Roles in the Metabolism of Sulfur Amino-Acids and Their Metabolites in Rats. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 122, n. 8, p. 1693-1701, 1992.

GARIBALDI, F., et al. An epistatic mini-circuitry between the transcription factors Snail and HNF4 alpha controls liver stem cell and hepatocyte features exhorting opposite regulation on stemness-inhibiting microRNAs. **Cell Death and Differentiation**,London, v. 19, n. 6, p. 937-946, 2012.

GARIBOTTO, G., et al. The kidney is the major site of S-adenosylhomocysteine disposal in humans. **Kidney International**,New York, v. 76, n. 3, p. 293-296, 2009.

GIUSTARINI, D., et al. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 46, n. 5-6, p. 241-281, 2009.

GOMEZ, J., et al. Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**,New York, v. 41, n. 3, p. 309-321, 2009.

GREDILLA, R.; BARJA, G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. **Endocrinology**,Chevy Chase, v. 146, n. 9, p. 3713-3717, 2005.

GREDILLA, R.; BARJA, G.; LOPEZ-TORRES, M. Effect of short-term caloric restriction on H2O2 production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**,New York, v. 33, n. 4, p. 279-287, 2001.

GREEN, R. M., et al. Subcellular compartmentalization of glutathione: Correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. **Mutagenesis**,Oxford, v. 21, n. 6, p. 383-390, 2006.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**,Tarrytown, v. 27, n. 9-10, p. 922-935, 1999.

GU, Q., et al. Homocysteine, folate, vitamin B12 and B6 in mothers of children with neural tube defects in Xinjiang, China. **Acta Paediatrica**,Oslo, v. 101, n. 11, p. e486-e490, 2012.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid-Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue-Damage. **Clinical Chemistry**,Washington , v. 41, n. 12B, p. 1819-1828, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**,Washington, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

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**,London, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARTMANN, A., et al. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. **Mutagenesis**,Oxford v. 19, n. 1, p. 51-59, 2004.

HARTREE, E. F. Determination of Protein - Modification of Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. **Analytical Biochemistry**,Orlando, v. 48, n. 2, p. 422-&, 1972.

HEIL, S. G., et al. DNA methylation status is not impaired in treated cystathionine beta-synthase (CBS) deficient patients. **Molecular Genetics and Metabolism**,Orlando, v. 91, n. 1, p. 55-60, 2007.

HERRERA, B. M.; KEILDSON, S.; LINDGREN, C. M. Genetics and epigenetics of obesity. **Maturitas**,Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 41-49, 2011.

HO, S. M.; TANG, W. Y. Techniques used in studies of epigenome dysregulation due to aberrant DNA methylation: An emphasis on fetal-based adult diseases. **Reproductive Toxicology,** v. 23, n. 3, p. 267-282, 2007.

HOFFMAN, D. J. Early nutrition and adult health: Perspectives for international and community nutrition programs and policies. **Nutrition Research and Practice**,Seoul, v. 4, n. 6, p. 449-454, 2010.

HUANG, R. F. S., et al. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. **Life Sciences** v. 68, n. 25, p. 2799-2811, 2001.

HUANG, Z. Z., et al. Changes in methionine adenosyltransferase during liver regeneration in the rat. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**,Bethesda, v. 275, n. 1, p. G14-G21, 1998.

HUGGETT, J., et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**,Houndmills, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.

IWASAKI, Y., et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**,Amsterdam, v. 877, n. 28, p. 3309-3317, 2009.

JACKSON, A. A.; BURDGE, G. C.; LILLYCROP, K. A. Diet, Nutrition and Modulation of Genomic Expression in Fetal Origins of Adult Disease. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**,Basel, v. 3, n. 4-6, p. 192-208, 2010.

JAKUBOWSKI, H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1741s-1749s, 2006.

JAMES, S. J., et al. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 133, n. 11, p. 3740s-3747s, 2003.

JIMENEZ-CHILLARON, J. C., et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**, Paris, v. 94, n. 11, p. 2242-2263, 2012.

JORDAN, A.; REICHARD, P. Ribonucleotide reductases. **Annual Review of Biochemistry**,Palo Alto, v. 67, p. 71-98, 1998.

JORDAO, A. A., et al. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving ethanol. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**,Sao Paulo, v. 45, n. 4, p. 709-714, 2009.

KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol Genomics**,Bethesda, v. 16, n. 2, p. 166-177, 2004.

KHOSROWBEYGI, A.; AHMADVAND, H. Positive correlation between serum levels of adiponectin and homocysteine in pre-eclampsia. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**,Melbourne, v. 39, n. 3, p. 641-646, 2013.

KIM, Y. I. Folate and colorectal cancer: An evidence-based critical review. **Molecular Nutrition & Food Research**,Weinheim, v. 51, n. 3, p. 267-292, 2007.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**,Oxford, v. 111, n. 2, p. 476-494, 2006.

KOTB, M., et al. Consensus nomenclature for the mammalian methionine adenosyltransferase genes and gene products. **Trends in Genetics**,Cambridge v. 13, n. 2, p. 51-52, 1997.

KOZ, S. T., et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**,Oxford v. 28, n. 4, p. 325-329, 2010.

KUMARAVEL, T. S.; JHA, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,Amsterdam, v. 605, n. 1-2, p. 7-16, 2006.

KUMARAVEL, T. S., et al. Comet Assay measurements: a perspective. **Cell Biology and Toxicology**,Princeton, v. 25, n. 1, p. 53-64, 2009.

KURPAD, A. V., et al. Whole body methionine kinetics, transmethylation, transulfuration and remethylation during pregnancy. **Clinical Nutrition**,Oxford, p. 1-8, 2013.

LANGLEY-EVANS, S. C. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. **Journal of Anatomy**,London, v. 214, n. 5, p. 780-780, 2009.

LANGLEY-EVANS, S. C.; LILLEY, C.; MCMULLEN, S. Maternal protein restriction and fetal growth: lack of evidence of a role for homocysteine in fetal programming. **British Journal of Nutrition**,Cambridge, v. 96, n. 3, p. 578-586, 2006.

LANGLEY-EVANS, S. C.; SCULLEY, D. V. Programming of hepatic antioxidant capacity and oxidative injury in the ageing rat. **Mechanisms of Ageing and Development**,Limerick, v. 126, n. 6-7, p. 804-812, 2005.

LEE, D. H.; JACOBS, D. R.; PORTA, M. Hypothesis: a Unifying Mechanism for Nutrition and Chemicals as Lifelong Modulators of DNA Hypomethylation. **Environmental Health Perspectives,** v. 117, n. 12, p. 1799-1802, 2009.

LEONHARDT, H., et al. Dynamics of DNA replication factories in living cells. **Journal of Cell Biology**,New York, v. 149, n. 2, p. 271-279, 2000.

LERTRATANANGKOON, K., et al. Glutathione depletion-induced thymidylate insufficiency for DNA repair synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,San Diego, v. 234, n. 2, p. 470-475, 1997.

LILLYCROP, K. A., et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 135, n. 6, p. 1382-1386, 2005.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológcias. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**,Sao Paulo, v. 37, p. 293-303, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**,Bethesda, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPEZ-TORRES, M.; BARJA, G. Lowered methionine ingestion as responsible for the decrease in rodent mitochondrial oxidative stress in protein and dietary restriction Possible implications for humans. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**,Limerick, v. 1780, n. 11, p. 1337-1347, 2008.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**,Oxford, v. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009.

LU, S. C., et al. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,Washington, v. 98, n. 10, p. 5560-5565, 2001.

LU, S. C.; MATO, J. M. S-Adenosylmethionine in Liver Health, Injury, and Cancer. **Physiological Reviews**,Bethesda, v. 92, n. 4, p. 1515-1542, 2012.

MALONEY, C. A., et al. The expression of growth-arrest genes in the liver and kidney of the protein-restricted rat fetus. **British Journal of Nutrition**,Cambridge, v. 94, n. 1, p. 12-18, 2005.

MARON, B. A.; LOSCALZO, A. The Treatment of Hyperhomocysteinemia. **Annual Review of Medicine**,Palo Alto, v. 60, p. 39-54, 2009.

MARTINEZ-LOPEZ, N., et al. S-adenosylmethionine and proliferation: new pathways, new targets. **Biochemical Society Transactions**,London v. 36, p. 848-852, 2008.

MARTINOV, M. V., et al. A substrate switch: A new mode of regulation in the methionine metabolic pathway. **Journal of Theoretical Biology**,Amsterdam v. 204, n. 4, p. 521-532, 2000.

MATO, J. M.; MARTINEZ-CHANTAR, M. L.; LU, S. C. Methionine metabolism and liver disease. **Annual Review of Nutrition**,Palo Alto, v. 28, p. 273-293, 2008.

MATSUEDA, S.; NIIYAMA, Y. The Effects of Excess Amino-Acids on Maintenance of Pregnancy and Fetal Growth in Rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**,Tokyo, v. 28, n. 5, p. 557-573, 1982.

MATTE, C., et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: Protective effect of folic acid. **Neurochemistry International**,Oxford, v. 54, n. 1, p. 7-13, 2009a.

MATTE, C., et al. Homocysteine induces oxidative stress, inflammatory infiltration, fibrosis and reduces glycogen/glycoprotein content in liver of rats. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, New York, v. 27, n. 4, p. 337-344, 2009b.

MCGOWAN, P. O.; MEANEY, M. J.; SZYF, M. Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. **Brain Research**,Amsterdam, v. 1237, p. 12-24, 2008.

MORAN, L. K.; GUTTERIDGE, J. M. C.; QUINLAN, G. J. Thiols in cellular redox signalling and control. **Current Medicinal Chemistry**,Schiphol, v. 8, n. 7, p. 763-772, 2001.

MORI, N.; HIRAYAMA, K. Long-term consumption of a methionine-supplemented diet increases iron and lipid peroxide levels in rat liver. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 130, n. 9, p. 2349-2355, 2000.

MOSHAROV, E.; CRANFORD, M. R.; BANERJEE, R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. **Biochemistry** v. 39, n. 42, p. 13005-13011, 2000.

MÜLLER, M.; KERSTEN, S.Nutrigenomics: goals and strategies. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 315-322, 2003.

NEVES, L. B.; MACEDO, D. M.; LOPES, A. C. Homocisteína. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**,Rio de Janeiro, v. 40, p. 311-320, 2004.

NICULESCU, M. D.; ZEISEL, S. H. Diet, methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate, methionine and choline. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 8, p. 2333s-2335s, 2002.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols** v. 1, n. 3, p. 1559-1582, 2006.

OHUCHI, S., et al. Hepatic Cystathionine beta-Synthase Activity Does Not Increase in Response to Methionine Supplementation in Rats Fed a Low Casein Diet: Association with Plasma Homocysteine Concentrations. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**,Tokyo, v. 55, n. 2, p. 178-185, 2009.

PAMPLONA, R.; BARJA, G. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: Two key traits of longevity. **Ageing Research Reviews**,Oxford, v. 6, n. 3, p. 189-210, 2007.

PARK, C. M., et al. Methionine Supplementation Accelerates Oxidative Stress and Nuclear Factor kappa B Activation in Livers of C57BL/6 Mice. **Journal of Medicinal Food**,New Rochelle, v. 11, n. 4, p. 667-674, 2008.

PARK, E. I.; GARROW, T. A. Interaction between dietary methionine and methyl donor intake on rat liver betaine-homocysteine methyltransferase gene expression and organization of the human gene. **Journal of Biological Chemistry**,San Francisco, v. 274, n. 12, p. 7816-7824, 1999.

PARK, E. I.; RENDUCHINTALA, M. S.; GARROW, T. A. Diet-induced changes in hepatic betaine-homocysteine methyltransferase activity are mediated by changes in the steady-state level of its mRNA. **Journal of Nutritional Biochemistry**,New York, v. 8, n. 9, p. 541-545, 1997.

PASTORE, A., et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**,Amsterdam, v. 333, n. 1, p. 19-39, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**,Oxford, v. 29, n. 9, pe.45, 2001.

POGRIBNY, I. P., et al. Breaks in Genomic DNA and within the P53 Gene Are Associated with Hypomethylation in Livers of Folate/Methyl-Deficient Rats. **Cancer Research**,Baltimore, v. 55, n. 9, p. 1894-1901, 1995.

POGRIBNY, I. P.; BELAND, F. A. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 66, n. 14, p. 2249-2261, 2009.

POGRIBNY, I. P., et al. Genomic hypomethylation is specific for preneoplastic liver in folate/methyl deficient rats and does not occur in non-target tissues. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,Amsterdam, v. 548, n. 1-2, p. 53-59, 2004.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**,New York, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, 2010.

PRUDOVA, A., et al. S-adenosylmethionine stabilizes cystathionine beta-synthase and modulates redox capacity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,Washington, v. 103, n. 17, p. 6489-6494, 2006.

REES, W. D. Manipulating the sulfur amino acid content of the early diet and its implications for long-term health. **Proceedings of the Nutrition Society,** v. 61, n. 1, p. 71-77, 2002.

REES, W. D., et al. The effects of maternal protein restriction on the growth of the rat fetus and its amino acid supply. **British Journal of Nutrition**,Cambridge, v. 81, n. 3, p. 243-250, 1999.

REES, W. D.; HAY, S. M.; CRUICKSHANK, M. An imbalance in the methionine content of the maternal diet reduces postnatal growth in the rat. **Metabolism-Clinical and Experimental**,Philadelphia, v. 55, n. 6, p. 763-770, 2006.

REES, W. D.; WILSON, F. A.; MALONEY, C. A. Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: The impact of methionine in the maternal diet. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1701s-1705s, 2006.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 127, p. S838-S841, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. Ain-93 Purified Diets for Laboratory Rodents - Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76a Rodent Diet. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RICHIE, J. P., et al. Tissue glutathione and cysteine levels in methionine-restricted rats. **Nutrition**,Burbank, v. 20, n. 9, p. 800-805, 2004.

RICHIE, J. P., et al. Methionine Restriction Increases Blood Glutathione and Longevity in F344 Rats. **Faseb Journal**,Bethesda, v. 8, n. 15, p. 1302-1307, 1994.

ROBIN, S., et al. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and

spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**,New York, v. 15, n. 2, p. 80-89, 2004.

ROJAS, E., et al. Accumulation of DNA damage in the organs of mice deficient in gamma-glutamyltranspeptidase (vol 447, pg 305, 2000). **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**,Amsterdam, v. 454, n. 1-2, p. 111-111, 2000.

ROSEBOOM, T. J., et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology**,Limerick, v. 185, n. 1-2, p. 93-98, 2001.

ROSS, S. A. Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention. **Epigenetics in Cancer Prevention: Early Detection and Risk Assessment**,New York, v. 983, p. 197-207, 2003.

ROTHFUSS, A., et al. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,Amsterdan, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.

ROWLING, M. J., et al. Hepatic glycine N-methyltransferase is up-regulated by excess dietary methionine in rats. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 9, p. 2545-2550, 2002.

ROWLING, M. J.; MCMULLEN, M. H.; SCHALINSKE, K. L. Vitamin a and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 132, n. 3, p. 365-369, 2002.

SANTOS, F., et al. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. **Developmental Biology**,New York, v. 280, n. 1, p. 225-236, 2005.

SANTOS, M. H., et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova,** São Paulo**,** v. 30, n. 3, p., 604-610, 2007.

SANZ, A.; CARO, P.; BARJA, G. Protein restriction without strong caloric restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and oxidative DNA damage in rat liver. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**,New York, v. 36, n. 6, p. 545-552, 2004.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**,Tarrytown, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total Protein-Bound and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellmans Reagent. **Analytical Biochemistry**,New York, v. 25, n. 1-3, p. 192-&, 1968.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Annual Review of Nutrition**,Palo Alto, v. 19, p. 217-246, 1999.

SINCLAIR, K. D. Developmental Origins of Health and Disease: B Vitamins and DNA Methylation Programming in the Oocyte and Pre-Implantation Embryo. **Biology of Reproduction**,Washington, p. 49-49, 2009.

SINGH, N. P., et al. A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**,Orlando, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SONG, Y., et al. Methionine-Induced Hyperhomocysteinemia Modulates Lipoprotein Profile and Oxidative Stress but Not Progression of Atherosclerosis in Aged Apolipoprotein E Knockout Mice. **Journal of Medicinal Food**,Larchmont, v. 12, n. 1, p. 137-144, 2009.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**,New York, v. 25, n. 3-4, p. 207-218, 2003.

STEAD, L. M.; BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat liver. **Biochemical Journal**,London, v. 350, p. 685-692, 2000.

SZYF, M. The implications of DNA methylation for toxicology: toward toxicomethylomics, the toxicology of DNA methylation. **Toxicol Sci**,Orlando, v. 120, n. 2, p. 235-255, 2011.

TICE, R. R., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TOBOREK et al. Increased lipidantioxidant activityhepatitisperoxidation andin methionine-inducedin rabbits. **Nutrition,** Burbank, v.12, n. 7-8, p.534-537, 1996.

TOMASI, M. L., et al. S-Adenosylmethionine Regulates Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 Stability: Implication in Hepatocarcinogenesis. **Gastroenterology**,Glendale, v. 136, n. 3, p. 1025-1036, 2009.

TOMASI, M. L., et al. Inhibition of human methionine adenosyltransferase 1A transcription by coding region methylation. **Journal of Cellular Physiology**,New York, v. 227, n. 4, p. 1583-1591, 2012.

TORRES, L., et al. In vivo GSH depletion induces c-myc expression by modulation of chromatin protein complexes. **Free Radical Biology and Medicine**,Tarrytown, v. 46, n. 11, p. 1534-1542, 2009.

UELAND, P. M., et al. Total Homocysteine in Plasma or Serum - Methods and Clinical-Applications. **Clinical Chemistry**,Washington v. 39, n. 9, p. 1764-1779, 1993.

UTHUS, E. O.; BROWN-BORG, H. M. Altered methionine metabolism in long living Ames dwarf mice. **Experimental Gerontology**,Oxford, v. 38, n. 5, p. 491-498, 2003.

VALKO, M., et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**,Amsterdam v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**,London, v. 44, n. 5, p. 619-626, 2008.

WANG, Y. H., et al. The Great Chinese Famine Leads to Shorter and Overweight Females in Chongqing Chinese Population After 50 Years. **Obesity**,Boca Raton, v. 18, n. 3, p. 588-592, 2010.

WATERLAND, R. A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **Journal of Nutrition**,Bethesda, v. 136, n. 6, p. 1706s-1710s, 2006.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition,** Burbank, v. 20, n. 1, p. 63-68, 2004.

WATERLAND, R. A.; MICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. **Annual Review of Nutrition**,Palo Alto, v. 27, p. 363-388, 2007.

WEAVER, I. C. G.; MEANEY, M. J.; SZYF, M. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**,Washington, v. 103, n. 9, p. 3480-3485, 2006.

WHO. Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. **World Health Organization**, Genebra, n. 935, 2007.

WILSON, F. A., et al. Effects of methyl-deficient diets on methionine and homocysteine metabolism in the pregnant rat. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**,Bethesda, v. 302, n. 12, p. E1531-E1540, 2012.

WOLFSEGGER, M. J., et al. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**,New York, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

WU, G. et al. Glutathione metabolism and its implications for health. **Journal of Nutirtion**, Bethesda, v. 134, p. 489-492, 2004.

YALCINKAYA, S., et al. Oxidative and nitrosative stress and apoptosis in the liver of rats fed on high methionine diet: Protective effect of taurine. **Nutrition**,Burbank, v. 25, n. 4, p. 436-444, 2009.

YALCINKAYA, S.; UNLUCERCI, Y.; UYSAL, M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**,Jena, v. 58, n. 6, p. 455-459, 2007.

ZEISEL, S. H. Importance of methyl donors during reproduction. **American Journal of Clinical Nutritio**n,Bethesda, v. 89, n. 2, p. 673s-677s, 2009.

ZHENG, X. Y., et al. Metabolic Signature of Pregnant Women with Neural Tube Defects in Offspring. **Journal of Proteome Research**,Washington, v. 10, n. 10, p. 4845-4854, 2011.

Anexo

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE ÉTICA
CEUA
NO USO DE ANIMAIS
Campus de Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
***Campus* de Ribeirão Preto**
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.271.53.7), intitulado "Perfil de Alteração da Expressão dos Genes BHMT, MAT1A e CBS em Camundongos Tratados com Metionina na Dieta nos Períodos Pré e Pós-Natal: Avaliação de instabilidade genômica, hepatoxicidade e nefrotoxicidade", de autoria de **Tarsila Daysy Úrsula Hermogenes Gomes** e de **Lusânia Maria Greggi Antunes** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/05/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.271.53.7), entitled: "Perfil de Alteração da Expressão dos Genes BHMT, MAT1A e CBS em Camundongos Tratados com Metionina na Dieta nos Períodos Pré e Pós-Natal: Avaliação de instabilidade genômica, hepatoxicidade e nefrotoxicidade", by **Tarsila Daysy Úrsula Hermogenes Gomes** and **Lusânia Maria Greggi Antunes,** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, May 05, 2010.

Ribeirão Preto, 10 de maio de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964