UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações epigenéticas do gene *p16* em ratos tratados com altas doses de l-metionina

Rafaela de Barros e Lima Bueno

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações epigenéticas do gene *p16* em ratos tratados com altas doses de l-metionina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do título de Mestre em
Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Rafaela de Barros e Lima Bueno

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg
Antunes

Ribeirão Preto

2009

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.

Bueno, Rafaela de Barros e Lima Bueno.

Alterações epigenéticas do gene p16 em ratos tratados com altas doses de l-metionina. Ribeirão Preto, 2009.

93 f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Antunes, Lusânia Maria Gregg

1. Metilação DNA. 2. Micronúcleo. 3. Metionina. 4. Doxorubicina

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaela de Barros e Lima Bueno

Alterações epigenéticas do gene *p16* em ratos tratados com altas doses de l-metionina

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia
para obtenção do título de Mestre em
Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg
Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

É impossível chegar ao final de uma caminhada e não refletir em toda a jornada vivida, do início ao fim. Se hoje escrevo esta dissertação é porque durante toda minha trajetória pessoas imprescindíveis foram meu porto seguro. Não poderia dedicar essa minha vitória a não ser para as pessoas que mais amo, respeito e admiro. Por isso, dedico essa conquista....

A minha mãe, Elíne Roseane de Barros e Lima Bueno, mulher de garra, lutadora e determinada. Meu exemplo de mulher, mãe e esposa.

Ao meu pai, João Batista de Lima Bueno, homem carinhoso, paciente, bondoso. Sempre com uma palavra confortante e esperançosa.

Aos meus irmãos, Renan e Marcel de Barros e Lima Bueno, meus fiéis amigos e companheiros de alegrias, tristezas e artes.

Os momentos felizes e difíceis dividido com vocês, minha família, que sempre me apóia, conforta e me ama incondicionalmente. Sou muito abençoada e agradecida por tê-los em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço.....

À Professora Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes, Minha orientadora. Como diz o livro “O Pequeno Príncipe”: “Você é responsável por aquilo que cativa”. Por isso, obrigada por me proporcionar a alegria da descoberta e o aprendizado da ciência. Por me cativar com a ciência e ser uma orientadora presente, paciente e sempre empenhada em me ensinar. Sei que houve momentos difíceis no processo de desenvolvimento deste trabalho, além das alegrias, e em todos os momentos você estava junto comigo me ajudando, incentivando e orientando. O terreno foi preparado, semeado e em breve espero florir.

À Professora Dra Maria de Lourdes Pires Bianchi, pelo apoio, incentivo, e por toda estrutura disponibilizada no Laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP.

À Deus, em sua onipresença, por me permitir explorar o mundo, me acolhendo, encorajando, enchendo de esperanças, colocando pessoas excepcionais em meu caminho e guiando meus passos até aqui.

À técnica Joana D'arc Castanin Darin e à especialista Regislaine Valéria Burim pela ajuda, amizade e ensinamentos compartilhados durante desenvolvimento deste trabalho.

Ao técnico José Maria Puga, pela disponibilidade e prontidão no momento de preparar a ração dos animais.

À Rodrigo Ribeiro da Silva, mais do que meu namorado, meu amigo, por suportar ao meu lado momentos difíceis durante esses anos de vivência a dois. Por me estimular a vencer obstáculos e a ir atrás dos meus sonhos. Por me proporcionar momentos de felicidade.

À Cátia Lira do Amaral, amiga de todas as horas, sempre disponível e empenhada em discutir os entraves no decorrer da pesquisa. Fizemos uma dupla de pesquisa perfeita, sem você as dificuldades seriam maiores e as descobertas menos animadoras. Você me ensinou e incentivou a ser melhor.

À amiga Eliziani Mieko Konta, com quem sempre pude contar e desabafar nos momentos de angústia. Com quem risadas surgiam facilmente e vivi momentos hilários e inesquecíveis.

Aos meus familiares, avó Helena, tios, tias, primos, primas e cunhadas por me apoiar, incentivar durante minha vida e nos desafios que busco.

Aos meus eternos amigos de Pós-Graduação, que sempre estiveram presentes: Alexandre Ferro Aissa, Cátia Lira do Amaral, Eliziani Mieko Konta, Estela Beatriz Behling, Graciela Cristina dos Santos, Juiliana Mara Serpeloni, Juliana Carvalho Ribeiro, Leonardo Meneghin Mendonça, Livia Hernandez, Patricia Furlan, Rita de Cássia Oliveira. Pelos colóquios científicos desenvolvidos tanto no laboratório como nas mesas de bares. Por me ajudarem nos pequenos ou grandes problemas decorrentes das atividades de pesquisa, e por serem verdadeiros amigos e não apenas companheiros de laboratório.

Aos amigos distantes, mas não menos torcedores, que me animavam e se preocupavam através de e-mails, telefones e encontros escassos.

Aos amigos da Comissão Organizadora do III SINPOSPq da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP com quem desbravei desafios e conquistas.

Aos amigos mais recentes de âmbito acadêmico e esportivo, agradeço por me incluírem em seus círculos de amizades e por compartilharem comigo tão bons momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio financeiro e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

“A vida não é medida pelo número de vezes que você respirou, mas pelos momentos em que você perdeu o fôlego... de tanto rir, de surpresa, de êxtase, de felicidade, pela descoberta, por amor.”

Autor Desconhecido

Resumo

BUENO, R. B. L. **Alterações epigenéticas do gene *p16* em ratos tratados com altas doses de l-metionina**. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Várias evidências sugerem que a dieta é um fator relevante na modificação dos riscos de desenvolvimento de câncer e que a interação nutriente-genoma tem uma influência significativa para a manutenção da saúde. A nutrigênomica estabelece uma relação entre dieta e a investigação das alterações epigenéticas do DNA, que podem ter um papel importante na etiologia de várias doenças degenerativas. A metilação do DNA é um evento epigenético importante na modificação da expressão gênica e já existem relatos de cânceres associados com a metilação da região promotora de genes supressores tumorais, como o gene *p16*. A metionina (Met) é um aminoácido essencial e necessário para a manutenção do ciclo de metionina, um importante mecanismo nas reações de metilação. Outro fator que pode alterar o padrão de metilação do DNA são os quimioterápicos. A alteração da metilação do DNA, também pode modificar a estrutura dos cromossomos e levar a instabilidade genômica, relacionada com o desenvolvimento de neoplasia. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de metionina sobre as alterações no padrão de metilação da região promotora do gene *p16* no fígado e rins de ratos e as possíveis modificações induzidas pela interação com o antitumoral doxorrubicina (DXR), além da possível instabilidade genômica em células da medula óssea. Para isso, seis grupos de ratos Wistar machos (n=60) foram tratados durante seis semanas com ração comercial normal ou suplementada com 2% de Met, sendo que na 3ª semana e 24 horas antes da eutanásia administrou-se salina ou DXR (1 ou 10 mg/Kg p.c.), intraperitonealmente. Os rins e o fígado foram utilizados para extração do DNA e para o estudo do padrão de metilação pelo método COBRA, após a modificação do DNA com bissulfito de sódio e amplificação por PCR. As enzimas *EcoRI*, *Taq^αI* e *HphI* foram utilizadas para verificar o padrão de metilação da região promotora do gene *p16* e a enzima *TasI* para avaliar a modificação do DNA pelo bissulfito. Em todos os animais houve a restrição do fragmento de estudo pelas enzimas *TasI* e *HphI*, porém nenhuma restrição com as enzimas *EcoRI* e *Taq^αI*. O padrão de metilação da região promotora do gene *p16* nos rins e no fígado não foi alterado pela suplementação de Met ou pela administração de DXR, quando se comparou os grupos controles e os tratados. A justificativa é que o gene *p16* é importante na regulação do ciclo celular, apoptose e senescência e sua regulação segue um mecanismo bem controlado. Para estudar o efeito da suplementação de Met na instabilidade genômica, realizou-se o teste do micronúcleo (MN) na medula óssea dos ratos. Pela análise do MN, a suplementação com Met não alterou a frequência de MN, mas o tratamento com a DXR (1 e 10mg/Kg) induziu a formação de MN quando comparado com o grupo Controle. A associação de Met+DXR não reduziu a frequência de MN induzida pela DXR. Conclui-se que a Met na dieta ou a administração do quimioterápico DXR não alterou o padrão de metilação da região promotora do gene *p16*. O excesso de Met não apresentou ação mutagênica no teste do MN. Não houve efeito antimutagênico da Met quando associada com a DXR.

Palavras-chaves: metilação DNA, micronúcleo, gene *p16*, metionina, doxorrubicina

Abstract

BUENO, R. B. L. **Epigenetics changes of the *p16* gene in rats treated with high doses of l-methionine.** 2009. 93f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Several evidences suggest that to diet is a relevant factor in modifying the risks of developing cancer and the nutrient-genome interaction has a significant influence for the maintenance of a good health condition. Nutrigenomic establishes a relation between to diet and the investigation of epigenetic DNA modifications, which may play an important role in the etiology of various degenerative diseases. DNA methylation is an important epigenetic event modification of gene expression and there been reports of cancers associated with promoter methylation region of tumor suppressor genes such as *p16* gene. Methionine (Met) is an essential aminoacid to maintain methionine cycle, very important mechanism in methylation reactions. Another factor that can change the methylation pattern is the chemotherapeutic drugs. DNA methylation alteration can also modify chromosome structure and lead to a genomic instability related to the development of neoplasia. The aim of this study was to analyze the effect of methionine supplementation on changes in the methylation pattern of the promoter region of the *p16* gene in the liver and kidneys of rats and the possible changes induced by interaction with the antitumoral doxorubicin (DXR), besides the possible genomic instability in bone marrow cells. Six Wistar rats groups (n=60) received commercial diet or commercial diet plus Met 2% for six weeks. At third week and 24 hours before euthanasia they received saline or DXR (1 or 10 mg/Kg) intraperitoneally. DNA extraction of the kidneys and liver was used for the study of the methylation pattern of promoter region on the *p16* gene by COBRA method, after DNA sodium bisulphite modification and PCR amplification. *EcoRI*, *Taq^qI* and *HphI* enzymes were used to determine the methylation pattern of promoter region of the *p16* gene and *TasI* enzyme was used to validate bisulphite conversion. All animals had digestion with *TasI* and *HphI* enzymes, however no restriction with *EcoRI* and *Taq^qI* enzymes. Kidneys and liver DNA methylation pattern promoter region of *p16* gene did not change by Met supplementation or DXR administration, when comparing the controled and the treated groups. The justification is that the *p16* gene is very important in cycle cellular regulation, apoptosis and senescence and its regulation follows a well controlled mechanism. To study Met supplementation in genomic instability the micronucleus (MN) test was realized in the rat bone marrow. By Micronuclei analysis, met supplementation did not alter MN frequency, but DXR treatment (1 or 10 mg/Kg) induced MN formation when compared to Control group. The association of Met+DXR did not decrease MN frequency by induced DXR. In conclusion, Met on the diet or DXR administration did not change methylation pattern of promoter region of the *p16* gene. The supplemented Met did not show mutagenic effect in MN test. There was no antimutagenic effect of Met when associated to DXR.

Keywords: DNA methylation, micronucleus, gene *p16*, methionine, doxorubicin

Lista de Abreviaturas e Siglas

A.....	Adenina
C.....	Citosina
CDK.....	Ciclina dependente de quinase
CEUA.....	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBRA.....	Análise de Restrição Combinado com Bissulfito
DNA.....	Ácido desoxirribonucléico
DNMT.....	DNA metiltransferase
dNTP.....	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DXR.....	Doxorrubicina
EGCG.....	Epigallocatequina galato
G.....	Guanina
h.....	Hora/horas
Hcy.....	Homocisteína
i.p.....	Intraperitoneal
Met.....	Metionina
MG.....	Minas Gerais
MGTM.....	O-metilguanina metiltransferase
MN.....	Micronúcleo
MNPCE.....	Eritrócitos policromáticos micronucleados
n.....	Número amostral
NCE.....	Eritrócitos normocromáticos
p.c.....	Peso corpóreo
pb.....	Pares de bases
PCE.....	Eritrócitos policromáticos
PCR.....	Reação em Cadeia da Polimerase
RARb.....	β receptor do ácido retinóico
RDAs.....	Referências dietéticas recomendadas

RNA.....	Ácido ribonucleotídeo
SAH.....	S-adenosilhomocisteína
SAM.....	S-adenosilmetionina
SNP.....	Polimorfismo de um único nucleotídeo
SP.....	São Paulo
T.....	Timina
USP.....	Universidade de São Paulo
UV.....	Ultravioleta

Lista de Símbolos

#.....	Número
%.....	Porcentagem
μM	Micromolar
®.....	Marca Registrada
°C.....	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
g.....	Gramma
Kg.....	Kilograma
M.....	Molar
MgCl_2	Cloreto de Magnésio
mL.....	Mililitro
mM.....	Milimolar
NaOH.....	Hidróxido de Sódio
pmol.....	Picomol
>.....	Maior
<.....	Menor

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A estreita relação entre nutrição e medicina tem uma origem antiga no século IV antes de Cristo, quando Hipócrates sugeriu que o balanço nutricional poderia ser uma alternativa válida na manutenção de uma boa saúde. Desta maneira, o conhecimento da antiguidade está se refletindo no crescimento dos mecanismos básicos de promoção da saúde. Após décadas de pesquisas, descobriu-se o papel dos nutrientes e componentes bioativos dos alimentos no controle da expressão gênica. Nutrição não é mais “somente como abastecer a maquinaria”, mas algo muito mais complexo e profundamente relacionado com as características genéticas dos organismos vivos (VIRGILI; PEROZZI, 2008).

Com a aplicação das tecnologias moleculares nas ciências nutricionais nos últimos 30 anos, houve o reconhecimento de que alguns nutrientes e compostos bioativos dos alimentos podem regular a expressão de genes específicos, tanto nos níveis de transcrição quanto pós-transcrição (VIRGILI; PEROZZI, 2008). A área de interação entre ambiente nutricional e genoma é conhecida como a ciência da nutrigenômica, que proporciona o entendimento genético e molecular de como a dieta altera a expressão gênica e, consequentemente, afeta a saúde. O conceito fundamental do campo da nutrigenômica é que a progressão do fenótipo saudável para o fenótipo de doença crônica deve ocorrer pela alteração na expressão gênica ou pela ativação de proteínas e enzimas, e que a dieta direta ou indiretamente regula a expressão informação gênica (KAPUT, 2004; 2007).

Os hábitos dietéticos são reconhecidos como importantes modificadores de fatores ambientais influenciando o risco de câncer e o comportamento tumoral. Enquanto alguns estimaram que 30-40% de todos os casos de cânceres são relacionados com a dieta, a porcentagem real é altamente dependente dos componentes da dieta e do tipo específico de câncer (World Cancer Research Fund, American Institute For Cancer Research, 2007; DAVIS, 2007).

Nossa dieta é uma mistura complexa de nutrientes com conhecidas funções, com bioativos não nutritivos ou componentes alimentares, nem todos conhecidos, com diferentes níveis de bioatividade e biodisponibilidade, podendo proteger ou não contra o risco de desenvolver uma doença (COBIAC, 2007).

Os estudos epidemiológicos em seres humanos e intervenções dietéticas em modelos animais têm revelado que vários genes que controlam os processos de absorção, metabolismo e transporte podem interferir com os sítios de ação dos compostos bioativos. Estes compostos bioativos presentes nos alimentos também podem alterar a expressão gênica, os eventos celulares e os processos reguladores que mantêm a homeostase celular e a saúde do indivíduo (JUNIEN, 2006).

Hoje em dia, admite-se que entender o efeito da dieta sobre a saúde requer estudos dos mecanismos dos nutrientes e constituintes bioativos dos alimentos em nível molecular (GARCÍA-CAÑAS et al., 2009). Sem dúvida, variações na sequência linear do código genético, como o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), têm um papel importante em explicar diferenças na estrutura e funções inter-individuais, como na compreensão da susceptibilidade de doenças e resistência ao câncer (BARROS; OFFENBACHER, 2009).

Um objetivo importante na pesquisa da nutrigenômica é estudar a influência da nutrição no genoma (AFMAN; MÜLLER, 2006). Do ponto de vista molecular, os nutrientes são “moléculas sinalizadoras”, que por meio de mecanismos celulares adequados, modulando a tradução dos sinais da dieta, com possíveis modificações da expressão gênica, protéica e de metabólitos (MÜLLER; KERSTEN, 2003).

A nutrição durante vários estágios da vida pode influenciar a regulação epigenética do gene. Os mecanismos da regulação epigenética dos genes são responsáveis pela estabilização e manutenção de diversos padrões de expressão gênica que caracterizam diferentes tipos de células e de tecidos (WATERLAND, 2006).

O termo epigenética refere-se a alterações no padrão de expressão gênica, que não podem ser explicadas por modificações nas seqüências de bases do DNA. Estas modificações da função são em geral, reversíveis, estáveis, e encontram-se presentes em diversas espécies (WATERLAND, 2006). Enfim, epigenômica ou epigenética refere-se à modificação do DNA que pode influenciar o fenótipo pela mudança na expressão gênica, sem alterar a seqüência nucleotídica do DNA.

As modificações epigenéticas são mecanismos reguladores de importantes eventos no desenvolvimento, incluindo inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, regulação dos genes *Hox*, subgrupos de genes *homeobox*, que são genes envolvidos no desenvolvimento de animais, fungos e plantas (KIEFER, 2007).

Processos epigenéticos estão envolvidos em doenças complexas incluindo diabetes, obesidade, desordens cardiovasculares, doenças autoimune e doenças neurológicas (JAENISCH; BIRD, 2003; CSOKA; SZYF, 2009) e também desempenham um importante papel na carcinogênese humana (FEINBERG, 2007). Componentes dietéticos, nutrientes ou não, podem vir a influenciar estes eventos epigenéticos, alterando a expressão gênica e o risco da doença (COBIAC, 2007).

Existem evidências de que as alterações epigenéticas têm um papel causal direto em virtualmente todos os passos da carcinogênese, da iniciação a progressão. Ainda mais, as alterações epigenéticas podem ocorrer nos estágios iniciais do desenvolvimento do tumor e podem disparar um espectro de alterações genéticas, tais como as mutações e instabilidade cromossômica. Isto inclui o silenciamento epigenético de genes supressores de tumores, genes de reparo do DNA, genes que detoxificam carcinógenos e múltiplos mecanismos de controle do ciclo celular (SAWAN et al., 2008). O crescente aumento no interesse pela epigenética é ainda incentivado pela percepção recente de que as alterações epigenéticas podem ser exploradas como um alvo terapêutico na clínica (EGGER et al., 2004).

Os dois maiores mecanismos que promovem modificações epigenéticas são metilação do DNA e desacetilação de histonas (HERMAN; BAYLIN, 2003; PAZ et al., 2003). Outro meio de regulação epigenética é por pequenos RNAs não codificadores, denominados de microRNAs (BERGMANN; LANE, 2003). Um grande número de *loci* codificam microRNAs envolvidos no silenciamento de genes específicos. MicroRNAs regulam a expressão em diferentes níveis: silenciamento da cromatina, degradação do RNA mensageiro e bloqueio da tradução. Estes microRNAs têm papel importante no desenvolvimento do câncer (ZHANG et al., 2007), assim como na modulação de resposta a fármacos (VO et al., 2005).

Em muitos tipos de cânceres, as alterações epigenéticas ocorrem inicialmente e precedem as mudanças genéticas encontradas no curso de crescimento do tumor. Entretanto, como na maioria dos casos as alterações epigenéticas e genéticas co-existem no mesmo tumor, ainda não foi completamente esclarecido quais são os eventos primários ou secundários relevantes no processo de carcinogênese (FEINBERG; OHLSSON; HENIKOFF, 2006). Portanto, o padrão aberrante de metilação do DNA e acetilação das histonas pode ser um alvo atrativo para a terapia com o objetivo de reativar os genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA que estão silenciados. A avaliação dos mecanismos epigenéticos poderia ser útil como ferramenta no diagnóstico, prognóstico e prevenção do câncer (HERCEG, 2007).

Tais modificações epigenéticas podem ter impacto significativo na estrutura da cromatina e na atividade de transcrição e, ao contrário de mutações genéticas, são um fenômeno reversível (HERMAN; BAYLIN, 2003; PAZ et al., 2003). O mecanismo epigenético mais amplamente estudado é a metilação da citosina do DNA nos dinucleotídeos CpG (JONES; BAYLIN, 2007).

1.1. Alterações Epigenéticas: Metilação

A metilação do DNA (Figura 1) é uma ocorrência comum na modificação do DNA humano, que ocorre após a duplicação do DNA, e resulta da atividade da família de enzimas DNA metiltransferases (DNMT) que catalizam a adição do grupo metil na posição 5' do anel da citosina em dinucleotídeos CpG, formando a 5-metilcitosina (BIRD, 1996; POIRIER, 2002).

Figura 1. Mecanismo de metilação do DNA. DNMT= DNA metiltransferases, SAM=S-adenosilmetionina (Modificada de Strathdee; Brown, 2002).

A frequência de dinucleotídeos CpG no genoma humano é menor do que o esperado, aproximadamente de 2 a 5%. Os dinucleotídeos CpG não são uniformemente distribuídos pelo genoma, ocorrem em agrupamentos (*clusters*) de sequências repetitivas, como rDNA, sequências satélites, repetições centroméricas ou em pequenas extensões do DNA ricas em citosinas e guaninas, conhecidas como “ilhas CpG” (LOPEZ et al., 2009). O genoma contém aproximadamente 30.000 ilhas CpG (COSTELLO; PLASS, 2001). Estas ilhas são preferencialmente encontradas na região promotora dos genes (LOPEZ et al., 2009).

Citosinas das ilhas CpG, especialmente aquelas associadas com regiões promotoras, são menos metiladas em células normais. Esta falta de metilação no promotor associado com

as ilhas CpG permite que a transcrição ocorra, devido à presença de fatores de transcrição apropriados e a estrutura da cromatina aberta (JONES; BAYLIN, 2002).

Metilação de ilhas CpG promotoras está associada com condensação da cromatina e silenciamento da transcrição do gene correspondente (LOPEZ et al., 2009). A metilação aberrante de áreas promotoras ricas em CpG, normalmente não metiladas, é comumente o mecanismo epigenético mais estudado associado com silenciamento da transcrição de genes conhecidos e de genes candidatos com atividade de supressores tumorais (ESTELLER; HERMAN, 2002; JONES; BAYLIN, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003).

Muitos tipos de cânceres humanos parecem mostrar uma perda do controle da metilação do DNA (STRATHDEE; BROWN, 2002). Estudos têm demonstrado uma correlação inversa entre metilação das ilhas CpG e expressão gênica em células tumorais (POGRIBNY; JAMES, 2002). A metilação do DNA e modificações em histonas são notadamente alteradas em regiões promotoras de genes supressores tumorais e oncogenes em cânceres humanos (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Dois tipos de alterações no padrão de metilação do DNA, hipermetilação e hipometilação, têm sido observados em doenças relacionadas com o envelhecimento, doenças auto-imunes e o câncer. Hipermetilação significa o aumento da metilação das ilhas CpG (LAIRD, 2003). A hipermetilação na sequência promotora dos genes reprime a transcrição gênica, incluindo a transcrição de genes supressores tumorais (JOHANNING; HEIMBURGER; PIYATHILAKE, 2002). O decréscimo do conteúdo de 5-metilcitosinas, isto é, a hipometilação do DNA, é um evento inicial na maioria dos cânceres em animais e seres humanos. Os mecanismos envolvidos na redução do padrão de metilação do DNA podem resultar de: menor atividade das enzimas DNMTs; menor disponibilidade de doadores do grupo metil (S-adenosilmetionina); aumento da concentração de S-adenosilhomocisteína

(SAH), que é um inibidor da atividade das enzimas DNMTs e do bloqueio do acesso das DNMTs aos sítios sensíveis a metilação do DNA (PEREIRA et al., 2001).

Células cancerosas são associadas com hipometilação global do DNA, mas com hipermetilação das ilhas CpG na região promotora dos genes (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1983; GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006). O aumento da metilação na região promotora de genes pode levar a redução progressiva da expressão do gene supressor tumoral resultando na seleção de células com vantagem proliferativa (JONES; LAIRD, 1999; ROBERTSON; JONES, 2000).

O ambiente ou estado nutricional possuem um papel importante na hipermetilação “local” de um gene supressor tumoral (LOPEZ et al., 2009). Estudos demonstram que os padrões de metilação do DNA são susceptíveis ao excesso ou deficiência de uma variedade de compostos da dieta. O grupo metil da 5' metilcitosina é tanto sintetizado *de novo*, pelo processo conhecido como metabolismo de um carbono, ou é fornecido pela dieta. Alguns micronutrientes encontrados em frutas e vegetais estão associados a eficiência do processo de metilação (KIM, 2007).

O excesso ou a deficiência endógena ou exógena de colina, metionina, ácido fólico, vitaminas B₆, B₁₂ e zinco, podem alterar o fornecimento de grupos metil (ZIJNO et al., 2003). Um dos processos bioquímicos fundamentais para a manutenção das reações de metilação é o ciclo da metionina. Na sua forma ativa, como S-adenosilmetionina (SAM), os grupos metil atuam como substratos na transmetilação de proteínas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos (ROWLING; McMULLEN; SCHALINSKE, 2002). A ingestão adequada de ácido fólico e de metionina é um evento crucial para a síntese e regeneração da SAM, a qual funciona como o principal doador de grupos metil para a metilação do DNA (KIM, 2007). Por isso, a escolha correta dos alimentos pode ter um relevante impacto no consumo de micronutrientes, como o

folato, vitamina B₁₂, colina e metionina, que são as principais fontes dietéticas necessárias para manter a metilação genômica do DNA (FENECH, 2005).

1.2. Gene *p16* e Metilação

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que a dieta deficiente em ácido fólico ou metionina pode causar uma ampla hipometilação do genoma. Interessante e intrigante, é que esta dieta também pode levar à hipermetilação regional e localizada do DNA com a inativação dos genes supressores tumorais (GHOSHAL et al., 2006). Estudos evidenciam que a expressão do gene *p16* é altamente reduzida em vários tipos de cânceres humanos devido a hipermetilação do promotor do gene *p16* (MERLO et al., 1995), especificamente no fígado e rim, que são órgãos alvos susceptíveis à transformação neoplásica (RAMÍREZ et al., 2003).

O mecanismo molecular que controla a proliferação e o ciclo celular não está completamente esclarecido, mas entre os vários genes que controlam o ciclo celular, foi constatado que o gene *p16* é um dos alvos da hipermetilação no carcinoma hepatocelular humano. A hipermetilação e o silenciamento deste gene estão relacionados com os estágios pré-malignos da progressão tumoral experimental (BELINSKY et al., 1998; LIGGETT; SIDRANSKY, 1998; WONG, 1999; PARK; YU; SHIM, 2006; ARAI et al., 2006).

A hepatocarcinogênese é um processo de várias etapas envolvendo alterações genéticas e epigenéticas de vários oncogenes e fatores de crescimento como *c-myc* e ciclina D1. A inativação de genes supressores tumorais tais como *p53*, *p16* e *Rb* é encontrada em carcinomas hepatocelulares humanos (PARK et al., 2001; PULLING; KLINGE; BELINSKY, 2001). O gene *p16* é um supressor tumoral e seu produto é um inibidor de ciclinas dependente de cinases 4 e 6 (CDK – “cyclin-dependent kinase”). A ligação da proteína *p16*^{INK4A} a CDK4 e CDK6, que são as chaves regulatórias de ciclo celular, induz um bloqueio na fase G1 do ciclo celular (POGRIBNY; JAMES, 2002).

Estudos demonstram o papel do *p16* na senescência, na propagação celular e angiogênese (ROCCO; SIDRANSKY, 2001). A perda da expressão da proteína *p16^{INK4A}* é uma das mais comumente observações no câncer humano e tem sido frequentemente relacionada à metilação *de novo* da ilha CpG na região promotora (GONZALEZ-ZULUETA et al., 1995; MERLO et al., 1995, LIEW et al., 1999). Apesar da hipermetilação do promotor do *p16^{INK4A}* ser observada em mais de 50% dos hepatocarcinomas humanos (LIEW et al., 1999), a evolução e progressão sítio-específica da metilação *de novo* do gene *p16*, durante o início dos estágios pré-neoplásicos da hepatocarcinogênese *in vivo*, ainda não foram completamente investigadas (POGRIBNY, JAMES, 2002).

A presença da hipermetilação na região promotora do gene *p16* pode ser confirmada pela alta frequência de metilação em linhagens de carcinoma hepatocelular e renal humano, quando comparadas com os tecidos não-tumorais (YU et al., 2002; DULAIMI et al., 2004). Alterações dos padrões de metilação do DNA no câncer humano são importantes para nosso entendimento da patogênese molecular desta doença (JONES; BAYLIN, 2002; GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006).

1.3. Doxorrubicina e Alterações Epigenéticas

Há evidências de três causas principais responsáveis pelas doenças que surgem devido aos padrões alterados de metilação do DNA: deficiências dietéticas, exposição aos agentes químicos encontrados em fármacos, pesticidas e corantes, por exemplo, e os fatores genéticos (JOHANNING; HEIMBURGER; PIYATHILAKE, 2002). A modificação química da citosina, levando a sua metilação, pode ser afetada pela exposição aos agentes químicos e ambientais (NYCE, 1997). Algumas substâncias poderão tornar a sequência de DNA hipermetilada, enquanto outras terão o resultado oposto, com conseqüente hipometilação. O quimioterápico cisplatina e a budesonida, usada no tratamento da asma, são capazes de

aumentar os níveis de metilação do DNA, enquanto a 5-azacitidina leva à hipometilação (SINGH; MURPHY; O'REILLY, 2003).

Experimentos mostraram que a hipometilação do DNA, que pode ser induzida pela depleção de metionina na dieta, potencializou os efeitos citotóxicos dos antitumorais doxorrubicina, vincristina e 5-fluoruracil em ratos (GOSEKI et al., 1992; GOSEKI et al., 1996; NAGAHAMA; GOSEKI; ENDO, 1998). Poirson-Bichat et al. (2000), também observaram que o déficit de metionina aumentou os efeitos antitumorais dos fármacos quimioterápicos doxorrubicina e cisplatina em tumores refratários, pela diminuição de resistência adquirida, em camundongos injetados com células tumorais humanas.

Estudos em animais revelaram o padrão alterado da metilação do DNA e modificações das histonas após a exposição aos genotóxicos ambientais, tais como os fármacos doxorrubicina e fenobarbital e metais carcinógenos como o arsênico e o níquel (BOMBAIL; MOGGS; ORPHANIDES, 2004; YOKOCHI; ROBERTSON, 2004).

A quimioterapia para câncer é baseada no uso de agentes citostático e/ou citotóxico agindo nos compostos e funções celulares que controlam o crescimento e divisão celular (POIRSON-BICHAT et al., 2000). Agentes intercalantes de DNA, como amsacarina, actinomicina, mitoxantrona e doxorrubicina, são empregados como antitumorais e são, na rotina clínica, usados como agentes na quimioterapia (BRANA et al., 2001). O uso clínico da doxorrubicina, assim como ocorre com outros agentes antitumorais, é limitado pelo aparecimento de graves eventos adversos, tais como a resistência adquirida pelas células cancerosas e a sua toxicidade nos tecidos normais (WEISS, 1992).

O medicamento doxorrubicina é o quimioterápico mais usado na rede pública de saúde, no Sistema Único de Saúde do Brasil, contra o câncer de mama (ZORZETTO, 2005). Cânceres de mama e esôfago, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi e tumores de tecidos moles têm boa resposta ao fármaco (GÜLKAÇ et al., 2004).

Apesar da ampla utilização clínica, os mecanismos de ação das antraciclinas nas células cancerosas ainda não foram completamente esclarecidos. Os seguintes mecanismos podem ser considerados: a) intercalação na molécula de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; b) geração de radicais livres, levando a danos no DNA e peroxidação lipídica; c) formação de ligações cruzadas com a molécula de DNA; d) indução de danos na molécula de DNA, pela inibição da enzima DNA topoisomerase II e e) a indução de apoptose (PENAUULT-LLORCA et al., 2003). Assim como as demais antraciclinas, além das suas propriedades intercalantes na molécula de DNA, a doxorrubicina induz a peroxidação lipídica, geração de espécies reativas de oxigênio e é um inibidor direto da enzima DNA topoisomerase II (FERRARO et al., 2000).

Trabalhos anteriores sugerem que a atividade da DNA metiltransferase (DNMT) nas células poderia ser inibida por agentes intercalantes de DNA (ADAMS; RINALDI, 1987; TAN; PORTER, 2009). Três membros da família das DNMT foram descritos em células de mamíferos. A primeira enzima a ser identificada foi a DNMT1 (BESTOR et al., 1988). Acredita-se que a função desta enzima é, principalmente, manter o padrão de metilação após a síntese de uma nova molécula de DNA durante a divisão celular (BESTOR, 1992). Subseqüente, mais duas enzimas foram clonadas: DNMT3a e 3b (OKANO; XIE; LI, 1998). Diferentemente da DNMT1, que mostra preferência por DNA hemimetilado, e, baseado na inativação dos genes DNMT3a e 3b em camundongos, acredita-se que funcionem principalmente como metiltransferases *de novo* (OKANO et al., 1999).

A DNMT1 é a enzima responsável por manter a metilação genômica do DNA (YODER et al., 1996; PRADHAN et al., 1999; YOKOCHI; ROBERTSON, 2002). Interrupção da função da DNMT1 leva a instabilidade cromossômica e interrupção da transcrição, e por fim a morte celular por apoptose (ROBERTSON, 2001; EHRLICH, 2002; JONES; BAYLIN, 2002).

Estudos enzimáticos demonstram que a doxorrubicina é um potente inibidor da atividade da DNMT1 (YOKOCHI; ROBERTSON, 2004). Além dos fármacos, outros compostos podem interagir com as DNMT, como os fatores da dieta. Certos polifenóis, como (-) epigallocatequina-3-galato (EGCG) encontrada no chá verde e a genisteína encontrada na soja têm demonstrado inibição das DNMTs *in vitro* (FANG; CHEN; YANG, 2007). O tratamento das linhagens celulares cancerosas, que apresentavam uma hipermetilação da região promotora dos genes *p16^{INK4a}*, *RARb* (β receptor do ácido retinóico) e *MGMT* (O⁶-metilguanina metiltransferase), com EGCG ou genisteína resultou na reversão da hipermetilação do DNA e reativação destes genes (FANG et al., 2005).

1.4. Ensaio do Micronúcleo e Instabilidade Genômica

Vários estudos mostraram que as alterações na metilação do DNA podem resultar em alterações nas estruturas dos cromossomos (KATOH et al., 2006). A deficiência de ácido fólico afeta diretamente a estabilidade do DNA. A enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato faz a transferência do grupo metil para a uracila, convertendo esta base em timina, a qual é usada para a síntese e reparo da molécula de DNA. Quando a quantidade de ácido fólico não é suficiente, ocorre um desequilíbrio na produção de purinas e pirimidinas e a uracila pode ser incorporada no DNA. Posteriormente, durante o reparo desta base incorporada incorretamente, podem surgir aumento de quebras de fita dupla no DNA, aberrações cromossômicas, instabilidade de microsátélites e transformação neoplásica (DUTHIE et al., 2000; HUSSIEN et al., 2005).

A perda da metilação pode comprometer a integridade genômica por meio da condensação da cromatina, indução de anormalidades nos centrômeros e telômeros e segregação aberrante dos cromossomos. Isto poderia resultar em uma variedade de eventos de instabilidade cromossômica, incluindo genotoxicidade, recombinação homóloga anormal e

rearranjos que levariam a formação de deleções e duplicações gênicas (POGRIBNY et al., 2008).

A instabilidade cromossômica pode ser verificada pelo aumento na frequência de micronúcleos provocado pela incorporação excessiva de uracila no DNA, ou pela hipometilação das regiões do centrômero, as quais levam às quebras e erros na segregação dos cromossomos (FENECH, 2001; FENECH et al., 2005).

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que ficam para trás durante a divisão nuclear. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro*. Os micronúcleos podem ser facilmente analisados em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para a estimativa do dano genético induzido *in vivo* ou *in vitro* (FENECH et al., 2003).

Várias evidências demonstram que os micronutrientes são necessários como co-fatores para reações enzimáticas ou parte da estrutura de proteínas envolvidas na síntese e reparo do DNA, prevenção dos danos oxidativos, assim como na manutenção da metilação do DNA. De acordo com FENECH (2005), a contribuição da deficiência de micronutrientes para a indução de lesões no genoma é da mesma ordem de magnitude que aquela dos mutágenos ambientais, tais como os agentes químicos e as radiações ionizantes. Portanto, a determinação dos níveis de ingestão destes micronutrientes necessários para a manutenção da estabilidade do genoma é um passo fundamental na prevenção do câncer e de outras doenças.

Em seres humanos, os baixos níveis plasmáticos de ácido fólico foram associados com o aumento da incorporação incorreta de uracila na molécula de DNA, assim como o aumento da incidência de micronúcleos nos linfócitos do sangue periférico. Os micronúcleos também

foram positivamente correlacionados com os níveis plasmáticos de homocisteína, um marcador da deficiência de ácido fólico (FENECH; AITKEN; RINALDI, 1998).

Estudos têm revelado que certos micronutrientes, tais como o ácido fólico e a vitamina B₁₂ podem ter um impacto significativo sobre a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos (ZIJNO et al., 2003). Estudos *in vitro* e *in vivo* com células humanas mostraram que a deficiência de ácido fólico e vitamina B₁₂ estão associadas com a expressão de sítios frágeis nos cromossomos, indução de micronúcleos, além da hipometilação do DNA. Porém, existe a preocupação de que o excesso de ácido fólico e de metionina pode, de fato, causar hipermetilação das ilhas CpG e silenciar genes específicos (FENECH, 2005). Mas, a associação entre alta ingestão de micronutrientes doadores de grupo metil e a frequência de micronúcleo ainda não foi bem estabelecida.

Assim, os indivíduos com excesso ou deficiência de metionina tornam-se candidatos aos protocolos terapêuticos de intervenção dietética, para a restauração dos padrões específicos de metilação do DNA (WATERLAND, 2006). Os esforços das pesquisas futuras deveriam se concentrar na identificação de biomarcadores para os processos de desenvolvimento de doenças que podem ser modulados pelos nutrientes e quimioterápicos. A investigação da relação entre os compostos bioativos da dieta e a prevenção do câncer deveria considerar as possíveis respostas específicas de certos micronutrientes sobre o genoma, instabilidade cromossômica e a elucidação dos seus mecanismos de ação (GO; BUTRUM; WONG, 2003).

Com isso, a hipótese deste trabalho é verificar se o excesso de metionina na dieta associado ou não ao antitumoral doxorrubicina poderia afetar o padrão de metilação do gene supressor tumoral *p16* e a instabilidade genômica em células normais de ratos Wistar.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação de metionina, isolada ou em combinação com o antitumoral doxorrubicina, sobre o padrão de metilação da região promotora do gene supressor tumoral *p16* no fígado e rim de ratos e sobre a instabilidade genômica pela análise de micronúcleo.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da suplementação de metionina, isolada ou em combinação com o antitumoral doxorrubicina, sobre o padrão de metilação da região promotora do gene supressor tumoral *p16* com a modificação do DNA pelo bissulfito de sódio e pelo método COBRA, no fígado e rim de ratos.
- Investigar se o excesso de metionina da dieta pode levar à instabilidade genômica, por meio da análise da frequência de micronúcleos em células da medula óssea de ratos.
- Verificar a influência da suplementação de metionina sobre a frequência de micronúcleos induzidos pelo antitumoral doxorrubicina em células da medula óssea de ratos.

6. Conclusões

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi investigado o efeito da suplementação de metionina, isolada ou em combinação com duas doses do antitumoral doxorubicina, sobre o padrão de metilação da região promotora do gene supressor tumoral *p16* no fígado e rim de ratos, e sua possível ação na instabilidade genômica. Conforme os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Nos animais que receberam a dieta controle suplementada com metionina, ou tratamento com o quimioterápico DXR, ou a associação de metionina e DXR, não foram encontradas alterações no padrão de metilação do DNA da região promotora do gene supressor tumoral *p16* nas células hepáticas e renais de ratos Wistar, pela análise do método COBRA.
- Na avaliação da instabilidade genômica pelo teste do micronúcleo, a suplementação de metionina da dieta não foi mutagênica ou citotóxica nas células da medula óssea dos ratos Wistar.
- A suplementação de metionina não reduziu a frequência de micronúcleos induzidos pelo antitumoral DXR, portanto não apresentou efeitos antimutagênicos.

Portanto, de acordo com os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo, conclui-se que a suplementação na ração com 2% de metionina em ratos Wistar por seis semanas, isolada ou em associação com a DXR, não foi mutagênica nem antimutagênica e não alterou o padrão de metilação da região promotora do gene *p16* nas células renais e hepáticas dos ratos.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

ADAMS, R. L.; RINALDI, A. Effect of echinomycin on DNA methylation. **FEBS Lett.**, v. 215, p. 266-268, 1987.

AFMAN; L.; MÜLLER, M. Nutrigenomics: from molecular nutrition to prevention of disease. **J Am Diet Assoc.**, v. 4, p. 569-576, 2006.

ANTUNES, L.M.; BUENO, R.B.L.; DIAS, F.L.; , BIANCHI, M.L.P. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutat Res.**, v.626, p.155-61, 2007.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P.; DIAS, F.L.; TAKAHASHI, C.S. Modulatory effects of curcumin on the chromosomal damage induced by doxorubicin in Chinese hamster ovary cells. **Teratog Carcinog Mutag.**, v.19, p.1-8, 1999a.

ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Effects of high doses of vitamins C e E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutat Res.**, v.419, p.137-43, 1998.

ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Olive oil protects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in Wistar rat bone marrow cells. **Gen Mol Biol.**, v.22, p.225-7, 1999b

ARAI, E.; KANAI, Y.; USHIJIMA, S.; FUJIMOTO, H.; MUKAI, K.; HIROHASHI S. Regional DNA hypermethylation and DNA metyltransferase (DNMT) 1 protein overexphression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. **Int J Cancer**, v. 119, p. 288-96, 2006.

BARROS, S.P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. **J Dent Res.**, v. 88, p. 400-408, 2009.

BELINSKY, S.A.; NIKULA, K.J.; PALMISANO, W.A.; MICHELS, R.; SACCOMANO, G.; GABRIELSON, E. Aberrant methylation of *p16^{INK4a}* is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. **Proc Natl Acad Sci. USA**, v. 95, p. 11891-11896, 1998.

BERGMANN, A.; LANE, M.E. Hiden targets of microRNAs for growth control. **Trends Biochem Sci.**, v. 28, p. 461-463, 2003

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BESTOR, T.; LAUDANO, A.; MATTALIANO, R.; INGRAM, V. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **J Mol Biol.**, v. 203, p. 971-983, 1988.

BESTOR, T.H. Activation of mammalian DNA metiltransferase by cleavage of Zn binding regulatory domain. **Embo. J.**, v. 11, p. 2611-2617, 1992.

BIRD, A.P. The relationship of DNA methylation to cancer. **Cancer Surv.**, v. 28, p. 87-101, 1996.

BOMBAIL, V.; MOGGS, J.G.; ORPHANIDES, G. Perturbation of epigenetic status by toxicants. **Toxicol Lett.**, v.149, p.51-58, 2004.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M.P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, v. 28, p. 625-631, 2007.

BOYD, V.L.; MOODY, K.I.; KARGER, A.E.; LIVAK, K.J.; ZON, G.; BURNS, J.W. Methylation-dependent fragment separation: direct detection of DNA methylation by capillary electrophoresis of PCR products from bisulphite-converted genomic DNA. **Anal Biochem.**, v. 354, p. 266-273, 2006.

BRAMWELL, V.H.; ANDERSON, D.; CHARETTE, M.L. Doxorubicin-based chemotherapy for the palliative treatment of adult patients with locally advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a meta-analysis and clinical practice guideline. **Sarcoma**, v.4, p.103-112, 2000.

BRANA, M.F.; CACHO, M.; GRADILLAS, A.; PASCUAL-TERESA, B.; RAMOS, A. Intercalators as anticancer drugs. **Curr Pharm Des.**, v. 7, p. 1745-1780, 2001.

CLARK, S.J.; HARRISON, J.; PAUL, C.L.; FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 2990-2997, 1994.

COBIAC, L. Epigenomics and nutrition. **Forum Nutr.**, v. 60, p. 31-41, 2007.

COSTELLO, J.F.; PLASS, C. Methylation matters. **J Med Genet.**, v. 5, p. 285-303, 2001.

CSOKA, A.B.; SZYF, M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. **Med Hypotheses**, 2009. doi:10.1016/j.mehy.2008.10.039. *In press*

DAVIS, C.D. Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention. **Exp Bio Med.**, v. 232, p.176-183, 2007.

DULAIMI, E.; IBANEZ DE CACERES, I.; UZZO, R.G.; AL-SALEEM, T.; GREENBERG, R.E.; POLASCIK, T.J.; BABB, J.S.; GRIZZLE, W.E.; CAIRNS, P. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 10, p. 3972-3979, 2004.

DUTHIE, S.J.; NARAYANAN, S.; BRAND, G.M.; GRANT, G. DNA stability and genomic methylation status in colonocytes isolated from methyl-donor-deficient rats. **Eur J Nutr.**, v.39, p.106-111, 2000.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 457-463, 2004.

EHRLICH, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, v. 21, p. 5400-5413, 2002.

ESTELLER, M.; CORN, P.G.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3225-3229, 2001.

ESTELLER, M.; HERMAN, J.G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **J Pathol.**, v. 196, p. 1-7, 2002.

FANG, M.; CHEN, D.; YANG, C.S. Dietary polyphenols may affect DNA methylation. **J Nutr.**, v. 137, p. 223S-228S, 2007.

FANG, M.Z.; CHEN, D.; SUN, Y.; JIN, Z.; CHRISTMAN, J.K.; YANG, C.S. Reversal of hypermethylation and reactivation of *p16^{INK4a}*, *RARB*, and *MGMT* genes by genistein and other isoflavones from soy. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 7033-7041, 2005.

FEINBERG, A.P. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. **Nature**, v. 447, p. 433-440, 2007.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet.**, v.7, p.21-33, 2006.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, p. 89-92, 1983.

FENECH, M. Liver or broccoli? Food's lasting effect on genome methylation. In Beck, S. and Olek, S. (eds), *The Epigenome. Molecular Hide and Seek*. Wiley-VCH GmbH & Co, KG Grunstadt, p.119–138, 2003.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food Chem Toxicol.**, v. 40, p. 1113-1117, 2002.

FENECH, M. The genome health clinic and genome health nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. **Mutagenesis**, v. 20, p. 255-269, 2005.

FENECH, M. The role of folic and vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat Res.**, v. 475, p. 56-67, 2001.

FENECH, M.; AITKEN, C.; RINALDI, J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 1163-71, 1998.

FENECH, M.; BAGHURST, P.; LUDERER, W.; TURNER, J.; RECORD, S.; CEPPI, M.; BONASSI, S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, β -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability – results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis**, v.26, p.991-999, 2005.

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocytes cultures. **Mutat. Res.**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FENECH, M.; FERGUSON, L.R. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. **Mutat Res.**, v. 475, p. 1-6, 2001.

FERRARO, C.; QUEMENCUR, L.; PRIGENT, A.F.; TAVERNE, C.; REVILLARD, J.P.; BERARD, N.B. Anthracyclines trigger apoptosis of both G0-G1 and cycling peripheral blood lymphocytes and induce massive deletion of mature T and B cells. **Cancer Res.**, v. 60, p.1901-1907, 2000.

FILACI, G.; PELLI, N.; SACCO, T.; CONTINI, P.; LANZA, L.; PICCIOTTO, A.; SCUDELETTI, M.S.; PUPPO, F.; CASTIGLIONI, G.; INDIVERI, F. S-adenosil-l-methionine is able to reverse the immunosuppressive effects of chenodeoxycholic acid *in vitro*. **Int J Immunopharmac.**, v. 19, p. 157-165, 1997.

FINKELSTEIN, J.D. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. **Eur. J. Pediatr.**, v. 157, p. S40-S44, 1998.

FINKELSTEIN, J.D.; MARTIN, J.J. Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. **J Biol Chem.**, v.261, p.1582-1587, 1986.

GALM, O.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood Rev.**, v. 20, p. 1-13, 2006.

GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LEÓN, C., CIFUENTES, A. Advances in nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **J Pharm Biomed Anal.**, 2009. doi:10.1016/j.jpba.2009.04.019. *In press*

GARIBOTTO, G.; VALLI, A.; ANDERSTAM, B.; ERIKSSON, M.; SULIMAN, M.E.; BALBI, M.; ROLLANDO, D.; VIGO, E.; LINDHOLM, B. The kidney is the major site of S-adenosylhomocysteine disposal in humans. **Kidney Int.**, 2009, doi:10.1038/ki.2009.117.

GHOSHAL, K.; LI, X.; DATTA, J.; BAI, S.; POGRIBNY, I.; POGRIBNY, M.; HUANG, Y.; YOUNG, D.; JACOB, S.T. A folate- and methyl-deficient diet alters the expression of DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins involved in epigenetic gene silencing in livers of F344 rats. **J Nutr.**, v. 136, p. 1522-1527, 2006.

GO, V.L.W.; BRUTUM, R.R.; WONG, D.A. Diet, nutrition, and cancer prevention: the postgenomic era. **J Nutr.**, v.133, p.3830S-6S, 2003.

GOLLAPUDI, B., MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat Res.**, v. 347, p.97-99, 1995.

GONZALEZ-ZULUETA, M.; BENDER, C.M.; YANG, A.S.; NGUYEN, T.; BEART, R.W.; VAN TORNOUT, J.M.; JONES, P.A. Methylation of the 5'CpG island of the *p16/CDKN2* tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. **Cancer Res.**, v. 55, p. 4531-5, 1995.

GOSEKI, N.; NAGAHAMA, T.; MARUYAMA, M.; ENDO, M. Enhanced anticancer effect of vincristine with methionine infusion after methionine-depleting total parenteral nutrition in tumor-bearing rats. **Jpn J Cancer Res.**, v. 87, p. 194-199, 1996.

GOSEKI, N.; YAMASAKI, S.; ENDO, M.; ONODERA, T.; KOSAKI, G.; HIBINO, Y.; KUWAHATA, T. Antitumor effect of methionine-depleting total parenteral nutrition with doxorubicin administration on Yoshida sarcoma-bearing rats. **Cancer**, v. 69, p. 1865-1872, 1992.

GÜLKAÇ, M.D.; AKPINAR, G. ÜSTÜN, H.; KANLI, A. Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. **Mutagenesis**, v. 19, p. 231-236, 2004.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, v.22, p.91-103, 2007.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYHÄNEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. **N Engl J Med.**, v. 349, p. 2042-2054, 2003.

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. **Reprod Toxicol.**, v. 23, p. 267-282, 2007.

<http://www.urogene.org/methprimer>, consultado em abril/2006.

HURSTING, S.D.; NUNEZ, N.P.; PATEL, A.C.; PERKINS, S.N.; LUBET, R.A.; BARRETT, J.C. The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. **Mutat Res.**, v. 576, p. 80-92, 2005.

HUSSIEN, M.M.I.; MCNULTY, H.; ARMSTRONG, N.; JOHNSTON, P.G.; SPENCE, R.A.J.; BARNETT, Y. Investigation of systemic folate status, impact of alcohol intake and levels of DNA damage in mononuclear cells of breast cancer patients. **Br J. Cancer**, v. 92, p. 1524-1530, 2005.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet.**, v. 33, p. 245-254, 2003.

JIANG, Y.; SUN, T.; XIONG, J.; CAO, J.; LI, G.; WANG, S. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. **Acta Biochim. Biophys Sin.**, v. 39, p. 657-667, 2007.

JIRTLE, R.L.; SKINNER, M.K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nat Rev Genet.**, v. 4, p. 253-262, 2007.

JOHANNING, G.L.; HEIMBURGER, D.C.; PIYATHILAKE, C.J. Diet, growth factors and cancer. **J Nutr.**, v.132, p.3814S-8S, 2002.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The epigenomics of cancer. **Cell**, v. 128, p.683-692, 2007.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet.**, v. 3, p. 415-428, 2002.

JONES, P.A.; LAIRD, P.W. Cancer epigenetic comes of age. **Nat Genet.**, v. 21, p. 163-167, 1999.

JUNIEN, C. Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. **J. Inherit Metab Dis.**, v. 29, p. 359-365, 2006.

KANAI, Y.; USHIJIMA, S.; TSUDA, H.; SAKAMOTO, M.; HIROHASHI, S. Aberrant DNA methylation precedes loss of heterozygosity on chromosome 16 in chronic hepatitis and liver cirrhosis. **Cancer Lett.**, v. 148, p. 73-80, 2000.

KANAI, Y.; USHIJIMA, S.; TSUDA, H.; SAKAMOTO, M.; SUGIMURA, T.; HIROHASHI, S. Aberrant DNA methylation on chromosome 16 is an early event in hepatocarcinogenesis. **Jpn J Cancer Res.**, v. 87, p. 1210-1217, 1996.

KAPUT, J. Diet-disease gene interactions. **Nutrition**, v. 20, p. 26-31, 2004.

KAPUT, J. Nutrigenomics-2006 update. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 45, p. 279-287, 2007.

KATOH, H.; SHIBATA, T.; KOKUBU, A.; OJIMA, H.; FUKAYAMA, M.; KANAI, Y.; HIROHASHI, S. Epigenetic instability and chromosomal instability in hepatocellular carcinoma. **Am J Pathol.**, v.168, p.1375-84, 2006.

KIEFER, J.C. Epigenetics in development. **Dev Dyn.**, v. 236, p. 1144-1156, 2007.

KIM Y-I.; CHRISTMAN, J.K.; FLEET, J. C.; CRAVO, M. L.; SALOMON, R. N.; SMITH, D.; ORDOVAS, J.; SELHUB, J.; MASON, J. B. Moderate folate deficiency does not cause global hypomethylation of hepatic and colonic DNA or *c-myc*-specific hypomethylation of colonic DNA in rats. **Am J Clin Nutr.**, v. 61, p. 1083-1090, 1995.

KIM, D.H. The interactive effect of methyl-group diet and polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase on the risk of colorectal cancer. **Mutat Res.**, v. 622, p. 14-18, 2007.

KIMURA, M.; UMEGAKI, K.; HIGUCHI, M.; THOMAS, P.; FENECH, M. Methylenetetrahydrofolate reductase c677t polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. **J Nutr.**, v. 134, p. 48-56, 2004.

KÖNIGSBERG, R.; RÖGELSPERGER, O. JÄGER, W.; THALHAMMER, T. KLIMPFINGER, SANTIS, M.M.; HUDEC, M.; DITTRICH, C. Cell cycle dysregulation influences survival in high risk breast cancer patients. **Cancer Invest.**, v.26, p.734-740, 2008.

LAIRD, P.W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p. 253-266, 2003.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, p. 1427-1431, 2002.

LIEW, C.T.; LI, H.M.; LO, K.W.; LEOW, C.K.; CHAN, J.Y.; HIN, L.Y.; LAU, W.Y.; LAI, P.B.; LIM, B.K.; HUANG, J.; LEUNG, W.T.; WU, S.; LEE, J.C. High frequency of *p16^{INK4a}* gene alterations in hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 18, p. 789-795, 1999.

LIGGETT, W.H.; SIDRNASKY, D. Role of *p16* tumor suppressor gene in cancer. **J Clin Oncol.**, v. 16, p. 1197-1206, 1998.

LINDER, C.C. The influence of genetic background on spontaneous and genetically engineered mouse models of complex diseases. **Lab Anim.**, v.30, p. 34-39, 2001.

LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H.M.; WEBB, A.; CROOK, T. The context and potential of epigenetics in oncology. **Br J Cancer**, v. 100, p. 571-577, 2009.

MAcGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of a improved micronucleus test. **Environ Mutagen.**, v. 2, p. 509-514, 1980.

MAVOURNIN; K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C.; SALAMONE, M.F.; HEDDLE, J.A. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat Res.**, v. 239, p. 29-80, 1990.

MERLO, A.; HERMAN, J.G.; MAO, L.; LEE, D.J.; GABRIELSON, E.; BURGER, P.C.; BAYLIN, S.B.; SIDRANSKY, D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers. **Nat Med.**, v. 1, p. 686-692, 1995.

MINOTTI, G.; RECALCATI, S.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CORNA, G.; CAIRO G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. **Meth Enzymol.**, v.358, p.340-361, 2004.

MITRA, M.S.; DONTAMSETTY, S.; WHITE, B.; LATENDRESSE, J.R.; MEHENDALE, H.M. Mechanism of protection of moderately diet restricted rats against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 225, p. 90-101, 2007.

MÜLLER; M.; KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nat Rev Genet.**, v. 4, p. 315-322, 2003.

NADIN, S. B.; VARGAS-ROIG, L. M.; DRAGO, G.; IBARRA, J.; CIOCCA, D. R. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. **Cancer Lett.**, v. 239, p. 84-97, 2006.

NAGAHAMA, T.; GOSEKI, N.; ENDO, M. Doxorubicin and vincristine with methionine depletion contributed to survival in the Yoshida sarcoma bearing rats. **Anticancer Res.**, v. 18, p. 25-31, 1998.

NYCE, J.W. Drug-induced DNA hypermethylation: a potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. **Mutat Res.**, v. 386, p. 153-161, 1997.

OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247-257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nat. Genet.**, v. 19, p. 219-220, 1998.

PARK, H.J.; YU, E.; SHIM, Y.H. DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 233, p.271-278, 2006.

PARK, T.J.; KIM, H.S.; BYUN, K.H.; JANG, J.J.; LEE, Y.S.I.; LIM, K. Sequential changes in hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine plus thioacetamide in Fischer 344 rats: induction of gankyrin expression in liver fibrosis, pRB degradation in cirrhosis, and methylation of p16^(INK4a) exon 1 in hepatocellular carcinoma. **Mol. Carcinog.**, v. 30, p. 138-150, 2001.

PAZ, M.F.; FRAGA, M.F.; AVILA, S.; GUO, M.; POLLAN, M.; HERMAN, J.G.; ESTELLER, M. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 63, p. 1114-1121, 2003.

PENAULT-LLORCA, F.; CAYRE, A.; BOUCHET MISHELLANY, F.; AMAT, S.; FEILLEL, V.; BOUEDEC, G.; FERRIERE, J.P.; DE LATOUR, M.; CHOLLET, P. Induction chemotherapy for breast carcinoma: predictive markers and relation with outcome. **Int J Oncol.**, v.22, p.1319-1325, 2003.

PEREIRA, M.A.; KRAMER, P.M.; CONRAN, P.B.; TAO, L. Effect of chloroform on dichloroacetic acid and trichloroacetic acid-induced hypomethylation and expression of the *c-myc* gene and on their promotion of liver and kidney tumors in mice. **Carcinogenesis**, v. 9, p. 1511-1519, 2001.

POGRIBNY, I.P.; BASNAKIAN, A.G.; MILLER, B.J. DAVIS, T.L. Breaks in genomic DNA and within the *p53* gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. **Cancer Res.**, v. 55, p. 1894-1901, 1995.

POGRIBNY, I.P.; JAMES, S.J. De novo methylation of the *p16^{INK4a}* gene in early preneoplastic liver and tumors induced by folate/methyl deficiency in rats. **Cancer Lett.**, v. 187, p. 69-75, 2002.

POGRIBNY, I.P.; PRIZIMIRSKA, T.V.; KULIK, G. I.; LUTSIUK, M.B.; PENTIUK, O.O.; POSTOVITENKO, K.P.; ARTEMCHUK, M.A.; POIRIER, L.A.; CHEKHUN, V.F. Age-related effects of methionine-enriched diet on plasma homocysteine concentration and methylation of hepatic DNA in rats. **Ukr Biokhim Zh.**, v. 77, p. 114-119, 2005.

POGRIBNY, I.P.; SHPYLEVA, S.I.; MUSKHELISHVILI, L.; BAGNYUKOVA, T.V.; JAMES, S.J.; BELAND, F.A. Role of DNA damage and alterations in cytosine DNA methylation in rat liver carcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. **Mutat. Res.: Fundam.Mol. Mech.Mutagen.** 2009, doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.05.003. *In press.*

POIRIER, L.A. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. **J Nutr.**, v. 132, p. 2336S-2339S, 2002.

POIRSON-BICHAT, F.; GONÇALVES, R.A.B.; MICCOLI, L.; DUTRILLAUX, B.; POUPON, M.F. Methionine depletion enhances the antitumoral efficacy of cytotoxic agents in drug-resistant human tumor xenografts. **Clin Cancer Res.**, v. 6, p. 643-653, 2000.

PRADHAN, S.; BACOLLA, A.; WELLS, R.D.; ROBERTS, R.J. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification and comparison of *de novo* and maintenance methylation. **J Biol Chem.**, v. 274, p. 33002-33010, 1999.

PRAHALATHAN C, SELVAKUMAR E, VARALAKSHMI P, KUMARASAMY P, SARAVANAN R. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. **Toxicology**, v. 222, p.225-232, 2006.

PRESTON, R.J. Epigenetic processes and cancer risk assessment. **Mutat Res.**, v. 616, p.7-10, 2007.

PULLING, L.C.; KLINGE, D.M.; BELINSKY, S.A. *p16^{INK4a}* and beta-catenin alterations in rat liver tumors induced by NNK. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 461-466, 2001.

RAMÍREZ, T.; GARCÍA-MONTALVO, V.; WISE, C.; CEA-OLIVARES, R.; POIRIER, L.A.; HERRERA, L.A. S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleus formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. **Mutat Res.**, v. 528, p. 61-74, 2003.

REIMAN, R.A.; MAULDIN, G.E.; NEAL MAULDIN, G. A comparison of toxicity of two dosing schemes for doxorubicin in the cat. **J Felina Med Surg.**, v. 10, p. 324-331, 2008.

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutat Res.**, v.634, p.112-118, 2007.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores *in vivo*. In: Mutagênese Ambiental. Eds. RIBEIRO; L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K., Editora Ulbras, Canoas, p. 173-198, 2003.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation, methyltransferases and cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 3139-3155, 2001.

ROBERTSON, K.D.; JONES, P.A. DNA methylation: past, present and future directions, **Carcinogenesis**, v. 21, p. 461-467, 2000.

ROCCO, J.W.; SIDRANSKY, D. *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a)* in cancer progression, **Exp. Cell Res.**, v. 264, p. 42-55, 2001.

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. **J Nutr.**, v. 132, p. 365-9, 2002.

SADRI, R.; HORNSBY, P.J. Rapid analysis of DNA methylation using new restriction enzyme sites created by bisulfite modification. **Nucleic Acids Res.**, v. 24, p. 5058-5059, 1996.

SAITO, Y.; KANAI, Y.; NAKAGAWA, T.; SAKAMOTO, M.; SAITO, H.; ISHII, H.; HIROHASHI, S. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. **Int J Cancer**, v. 105, p. 527-532, 2003.

SANTOS, R.V.; BATISTA, M.L.JR; CAPERUTO, E.C.; COSTA ROSA, L.F. Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after doxorubicin treatment in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 34, p. 1294-1299, 2007.

SAWAN, C.; VAISSIÉRE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res.**, v.642, p.1-13, 2008.

SCHMID, W. Chemical mutagens testing on in vivo somatic mammalian cells. **Agents Actions**, v.3, 77-85, 1973.

SHARIM, Z.; BAHARUDDIN, P.J.N.M.; YAHYA, A.; MUHAMMAD, H.; BAKAR, R.A.; ISMAIL, Z. The in vivo rodent micronucleus assay of kaptic Fatimah (*Labisia pumila*) extract. **Trop Biomed.**, v. 23, p. 214-219, 2006.

SINGH, S.M.; MURPHY, B.; O'REILLY, R.L. Involvement of gene-diet/drug interaction in DNA methylation and its contribution to complex diseases: from cancer to schizophrenia. **Clin Genet.**, v. 64, p. 451-460, 2003.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Rev Mol Med.**, v. 4, p. 1-17, 2002.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. **Progr Card Dis.**, v.49, p.330-352, 2007.

TAN, H.H.; PORTER, A.L. DNA methyltransferase I is a mediator of doxorubicin-induced genotoxicity in human cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 382, p. 462-467, 2009.

TAN, M.L.; CHOONG, P.F.M.; DASS, C.R. Review: doxorubicin delivery systems based on chitosan for cancer therapy. **J. Pharm Pharmacol.**, v. 61; p. 131-142, 2009.

TOMATIS, L.; HUFF, J.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; SANDLER, D.P.; BUCHER, J.; BOFFETTA, P.; AXELSON, O.; BLAIR, A.; TAYLOR, J.; STAYNER, L.; BARRETT, J.C. Avoided and avoidable risks of cancer. **Carcinogenesis**, v.18, p. 97-105, 1997.

ULREY, C.L.; LIU, L.; ANDREWS, L.G.; TOLLEFSBOL, T.O. The impact of metabolism on DNA methylation. **Hum Mol Gen.**, v.14, p.139-47, 2005.

VARNA, M.; LEHMANN-CHE, J.; TURPIN, E. MARANGONI, E.; EL-BOUCHTAOUI, M.; JEANNE, M.; GRIGORIU, C.; RATAJCZAK, P.; LEBOEUF, C.; PLASSA, L.F.; FERREIRA, I.; POUPOU, M.F.; JANIN, A.; DE THÉ, H.; BERTHEAU, P. *p53* dependent cell-cycle arrest triggered by chemotherapy in xenografted breast tumors. **Int J Cancer**, v 124, p. 991-997, 2009.

VIRGILI, F.; PEROZZI, G. How does nutrigenomics impact human health? **IUBMB Life**, v. 60, p. 341-344, 2008.

VO, N.; KLEIN, M.E.; VARLAMOVA, O.; KELLER, D.M.; YAMAMOTO, T.; GOODMAN, R.H.; IMPEY, S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 102, p. 16426-16431, 2005.

WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on dna methylation. **J Nutr.**, v. 136, p. 1706S-1710S, 2006.

WEISS, R.B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Semin Oncol.**, v.19, p.670-686, 1992.

WONG, D.J. Progressive region-specific de novo methylation of the *p16* CpG island in primary human mammary epithelial cells strains during escape from M0 growth arrest. **Mol Cell Biol.**, v. 19, p. 5642-5651, 1999.

WORLD CANCER RESEARCH FUND, AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C.: **American Institute for Cancer Research**, 1997.

XIONG, Z.; LAIRD, P.W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 2532-2534, 1997.

YALÇINKAYA, S.; ÜNLÜÇERÇİ, Y.; UYSAL, M. Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. **Toxicol Pathol.**, v. 58, p. 455-459, 2007.

YODER, J.A.; YEN, R.W.; VERTINO, P.M.; BESTOR, T.H.; BAYLIN, S.B. New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5)-methyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 31092-31097, 1996.

YOKOCHI, T.; ROBERTSON, K. D. Doxorubicin Inhibits DNMT1, Resulting in Conditional Apoptosis. **Mol Pharmacol.**, v. 66, p. 1415-1420, 2004.

YOKOCHI, T.; ROBERTSON, K.D. Preferential methylation of unmethylated DNA by mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 1735-1745, 2002.

YU, J.; NI, M.; XU, J.; ZHANG, H.; GAO, B.; GU, J.; CHEN, J.; ZHANG, L.; WU, M.; ZHEN, S.; ZHU, J. Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. **BMC Cancer**, v. 2:29, 2002.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G.P.; ANDERSON, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol.**, v. 302, p. 1-12, 2007.

ZIJNO, A.; ANDREOLI, C.; LEOPARDI, P.; MARCON, F.; ROSSI, S.; CAIOLA, S.; VERDINA, A.; GALATI, R.; CAFOLLA, A.; CREBELLI, R. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1097-1103, 2003.

ZORZETTO, R. Os primeiros sinais de alerta. **Revista de Pesquisa FAPESP**, n.115, p.46-49, 2005.