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 DaysyUrsulaHermogenes 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 DaysyUrsulaHermogenes 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

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 rins e 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.

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).

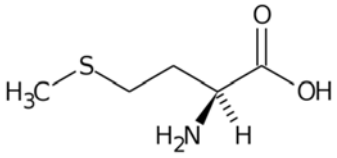

Figura 1: Metionina

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 dinucleotídeoCpG). 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 cistationinaβ-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 betaínahomocisteínametiltransferase (BHMT) ou pela enzima metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR) na via de remetilação(DAVIS; UTHUS, 2004;

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

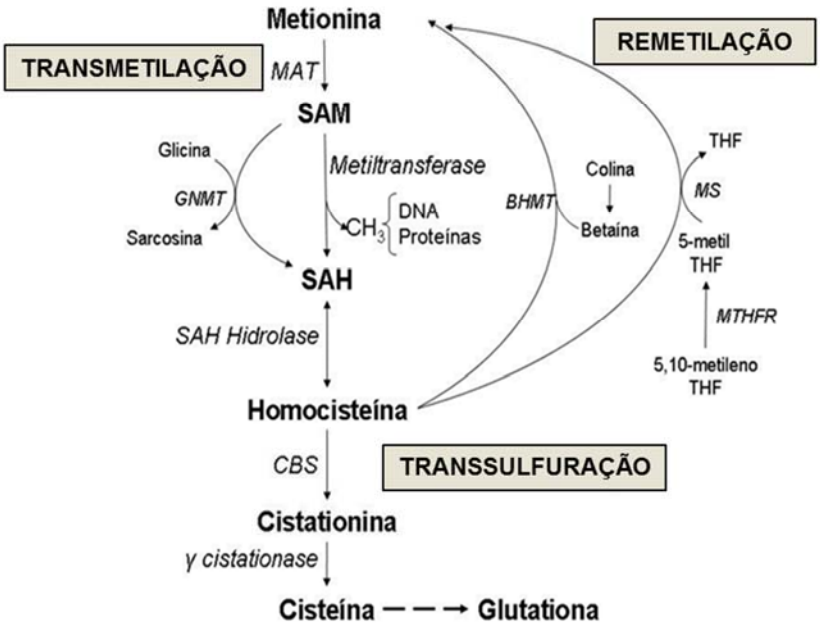

Figura 2: Biotransformação da metionina.

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

MAT= metionina adenosiltransferase; SAM = S-adenosilmetionina; SAH = S-adenosilhomocisteína; CBS = cistationinaβ-sintetase; BHMT = betaínahomocisteínametiltransferase; MS = metionina sintetase; THF = tetrahidrofolato)

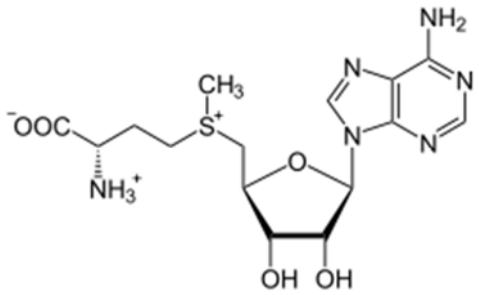

Figura 3: S-adenosilmetionina (SAM)

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 reaçãocatalizada pela glutationasintase (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 EstresseOxidativo 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).

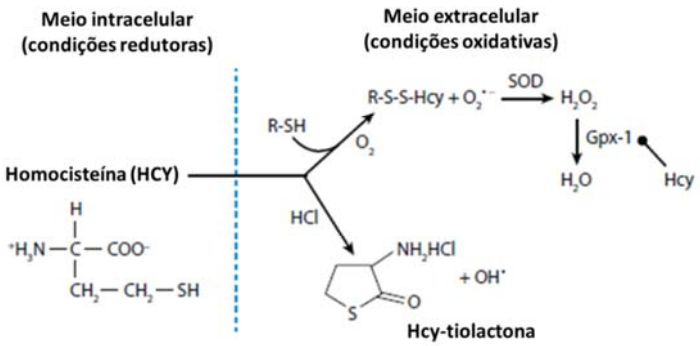

Figura 4: Autoxidação da homocisteína.

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, *thiobarbituricacidreactivesubstances*), 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).

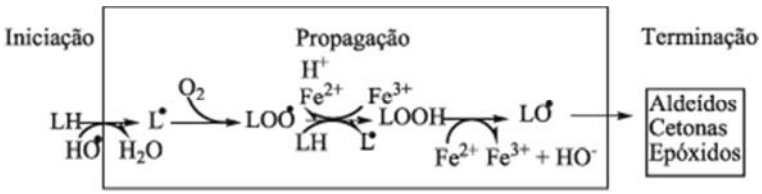

Figura 5: Fases da peroxidação lipídica

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-glutamilcisteínasintetase, da qual é originada a γ-L-glutamil-L-cisteína que será ligada à glicina pela ação da glutationasintetase(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 glutationaperoxidase (Figura

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

Dessa forma, o H_2O_2 é decomposto tanto pela glutationaperoxidase 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 glutationaperoxidase em fígado, rins, coração, pulmões e plasma sanguíneo(BRIGELIUS-FLOHÉ, 1999). Além da glutationaperoxidase e catalase, as outras enzimas do mecanismo antioxidante são glutationareductase e superóxido dismutase (SOD)(HALLIWELL, 2012).

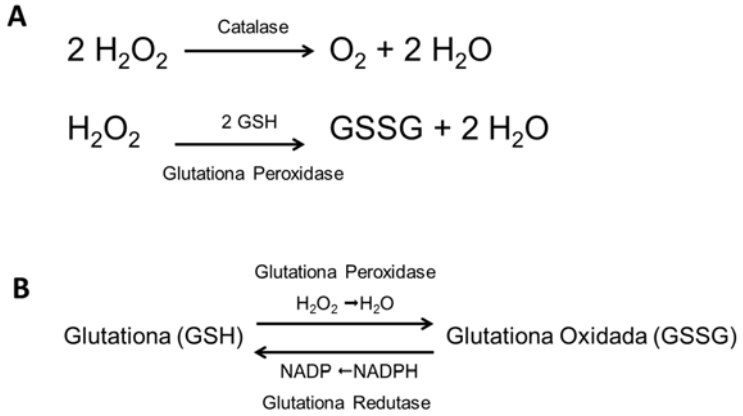

Figura 6: Ação do sistema antioxidante. A: Neutralização do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo sistema antioxidante. B: Ciclo de regeneração da glutationa GSH.

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).

Duthieet 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.

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 deficiênciaresultouemmenorinstabilidadenosdoistecidos;
- 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 ofAmercan 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