

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em  
ratos expostos a metionina e doxorrubicina**

Cátia Lira do Amaral

Ribeirão Preto  
2009

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em  
ratos expostos a metionina e doxorrubicina**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Toxicologia para obtenção do Título de  
Doutor em **Ciências**.

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientado(a):** Cátia Lira do Amaral

**Orientador(a):** Profa. Dra. Lusânia  
Maria Greggi 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.

Amaral, Cátia Lira do

Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos a metionina e doxorubicina. Ribeirão Preto, 2009.

78p. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Antunes, Lusânia Maria Greggi.

1. Metilação do DNA. 2. Metionina. 3. Doxorubicina. 4. *TP53*. 5. S-adenosilmetionina. 6. S-adenosilhomocisteína. 7. Glutaciona. 8. Ensaio do Cometa.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Cátia Lira do Amaral

Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos a metionina e doxorubicina

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico esta obra aos MEUS PAIS que transmitiram meus valores, e a DEUS que me deu força e perseverança.*

*Esta obra é fruto de trabalho, dedicação e esforço não apenas meu, mas de várias pessoas que contribuíram para que ela fosse finalizada. Reconheço que não seria possível realizá-la sozinha. Assim, agradeço a todos que, a sua maneira, colaboraram com ela.*

*Agradeço,*

*Aos meus pais, **Aparecido e Jovelina**, que me ensinaram a enfrentar os desafios da vida e nos momentos mais difíceis incentivaram a não desistir.*

*Ao meu namorado **Glauco** que, apesar da distância física que nos separa, esteve sempre presente desde o início do doutorado disposto a me escutar e apoiar.*

*Ao meu irmão **Claudio**, minha cunhada **Gislaine**, e aos meus familiares e amigos que de alguma forma prestaram importante auxílio. Às minhas “irmãs” **Ana Leonor e Juliana**, que participaram nos momentos de descontração do dia a dia.*

*Aos amigos do laboratório de Nutrigenômica e de Bromatologia e Nutrição da FCFRP/USP, **Estela Beatriz Behling, Graciela Cristina dos Santos, Leonardo Meneghin Mendonça, Alexandre Ferro Aissa, Eliziani Mieko Konta, Rafaela de Barros e Lima Bueno, Juliana Carvalho Ribeiro, Rita de Cássia Oliveira, Juliana Mara Serpeloni, Carla da Silva Machado e Mara Ribeiro de Almeida** pela ajuda e apoio que prestaram. Em especial, agradeço a **Rafaela** cuja amizade, apoio e dedicação foram essenciais para enfrentar as dificuldades durante os experimentos e superar nossos desafios.*

*À orientadora **Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes** que acreditou em mim e me incentivou a realizar esta obra.*

*À Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi pelo apoio 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 Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi pela disponibilização do microscópio de fluorescência para a realização das análises do cometa.*

*À Profa. Dra. Regina Helena Costa Queiróz por permitir o uso das dependências e equipamentos do Laboratório de Análises Toxicológicas da FCFRP – USP para realização das dosagens de SAM e SAH.*

*À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino pela disponibilização do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP-USP, discussões e supervisão na clonagem e sequenciamento das amostras.*

*À Dra. Raquel Alves dos Santos pelo treinamento e apoio nos ensaios do cometa.*

*Aos funcionários da FCFRP/USP Sônia, José Maria, Joana D'arc e Regislaine, que me ensinaram as técnicas utilizadas e cujo auxílio foi essencial para o desenvolvimento da parte experimental.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de Doutorado.*

*“O segredo é não correr atrás das borboletas. É cuidar do jardim para que elas venham até você.”*  
(Mário Quintana – Escritor)

*“A honra não consiste em nunca cair, mas em levantar cada vez que se cai.”*  
(Confúcio – Filósofo Chinês)



## Resumo

AMARAL, C. L. **Avaliação da metilação do gene *TP53* e instabilidade genômica em ratos expostos metionina e doxorrubicina.** 2009. 78f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - SP, 2009.

O estado de metilação é suscetível a mudanças quando os organismos são expostos a agentes ambientais tais como componentes dos alimentos e medicamentos. Uma dieta rica em metionina (Met) poderia modular a concentração de *S*-adenosilmetionina (SAM) e *S*-adenosilhomocisteína (SAH) e alterar o estado de metilação da região promotora de genes supressores de tumores. Tanto a hipometilação global quanto a hipermetilação de genes específicos estão envolvidas na instabilidade genômica e poderiam resultar em dano ao DNA. Este estudo avalia se a dieta suplementada com Met associada a doxorrubicina (DXR), um fármaco antitumoral que induz espécies reativas, resulta em alterações no estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, na razão SAM/SAH, na concentração de glutatona (GSH) e em dano ao DNA. Quarenta ratos machos Wistar foram separados em dois grupos: dieta suplementada com Met (ração comercial acrescida de 2% Met) e dieta controle (ração comercial) por seis semanas. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos que receberam DXR (1mg/Kg) ou solução salina intraperitoneal na terceira e sexta semanas de tratamento. Os rins e fígado foram utilizados para isolamento do DNA, determinação da concentração de SAM, SAH e GSH, e análise da instabilidade genômica. Todos os grupos apresentaram o mesmo estado de metilação da região promotora do gene *TP53*, determinado pelo método de análise de restrição combinada com bissulfito (COBRA). Este fato poderia ser explicado pelo índice de metilação (razão SAM/SAH) que permaneceu inalterado, possivelmente devido a uma adaptação do ciclo da Met que manteve a concentração de SAM. A depleção de GSH não ocorreu quando DXR foi associada a dieta suplementada com Met. Portanto, a suplementação com Met manteve a concentração de GSH em ratos tratados com DXR. A dieta suplementada com Met não induziu instabilidade genômica e não alterou o dano ao DNA induzido pela DXR. Em conclusão, DXR induz depleção de GSH que é inibida pela suplementação com Met. Entretanto, a mesma suplementação não previne a instabilidade genômica induzida pela DXR. A dieta suplementada com Met aumenta a concentração de SAH renal sem alterar a concentração de SAM e GSH. Tanto a dieta suplementada quanto a DXR não induzem hipermetilação na região promotora do gene *TP53*.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Metionina. Doxorrubicina. *TP53*. *S*-adenosilmetionina. *S*-adenosilhomocisteína. Glutatona. Ensaio do cometa.

## Abstract

AMARAL, C. L. ***TP53* gene methylation and genomic instability in methionine and doxorubicin exposed rats.** 2009. 78f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto - SP, 2009.

The DNA methylation status is susceptible to changes when organisms are exposed to environmental agents such as food components and drugs. A methionine-rich (Met) diet may modulate *S*-adenosylmethionine (SAM) and *S*-adenosylhomocysteine (SAH) concentrations, which could change the DNA methylation status in the promoter region of tumor suppressor genes. Global hypomethylation and gene-specific hypermethylation are involved in genomic instability and it could result in DNA damage. This study intends to evaluate if a Met-rich diet associated with doxorubicin (DXR), an antitumoral drug that induces reactive species, result in changes in the methylation status of the *TP53* gene promoter, in the SAM/SAH ratio, in glutathione levels (GSH) and in DNA damage. Forty male Wistar rats were separated into two groups: Met-rich diet (standard chow plus 2% Met), and control diet (standard chow) for six weeks. Each group was subdivided into another two groups that received DXR (1mg/kg) or saline intraperitoneally in the third and sixth weeks of the experiment. The kidneys and the liver were removed for DNA isolation, SAM, SAH and GSH determination, and genomic instability assay. All groups showed the same unmethylated status in the *TP53* promoter according to the Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA). This could be explained by the fact that the methylation index (SAM/SAH ratio) remained unchanged, possibly because of an adaptive Met pathway that maintains SAM levels. GSH depletion did not occur when DXR was associated with the Met-rich diet. As a matter of fact, the Met-rich diet improved GSH concentration in DXR-treated rats. Met-rich diet did not induce genomic instability, and it did not alter DNA damage induced by DXR. In conclusion, DXR induces GSH depletion which is inhibited by Met supplementation. However, Met-rich diet may not prevent genomic instability induced by DXR. A Met-rich diet increases SAH levels; however, it does not change GSH and SAM levels. Neither Met supplementation nor DXR induced DNA hypermethylation in the *TP53* gene promoter.

Keywords: DNA methylation. Methionine. Doxorubicin. *TP53*. *S*-adenosylmethionine. *S*-adenosylhomocysteine. Glutathione. Comet assay.

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Modificação do nucleotídeo citosina pelo mecanismo de metilação do DNA.....	5
<b>Figura 2.</b> Tratamento do DNA para identificar a 5-metilcitosina (C <sup>m</sup> ) no DNA. ....	7
<b>Figura 3.</b> Metabolismo da metionina. ....	14
<b>Figura 4.</b> Composição da ração comercial utilizada no tratamento dos animais e no preparo da ração suplementada com metionina a 2%.....	20
<b>Figura 5.</b> Protocolo experimental. ....	22
<b>Figura 6.</b> Sequência M26863 com 527 bases do gene <i>TP53</i> indicando o fragmento amplificado estudado e o início da região transcrita do RNAm.....	24
<b>Figura 7.</b> Representação da análise do padrão de metilação da região promotora do gene <i>TP53</i> pelo método COBRA.....	26
<b>Figura 8.</b> Mapa do vetor pTZ57R/T. Região de resistência à ampicilina indicada por bla (Ap <sup>R</sup> ). ....	29
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas obtidos por HPLC-UV.....	32
<b>Figura 10.</b> Fotomicrografia obtida de células de fígado de rato tratado com doxorubicina (1mg/Kg p.c. em duas doses) pela análise do cometa em microscópio de fluorescência. ....	36
<b>Figura 11.</b> Peso corpóreo médio (A) e consumo de ração médio (B) ao final do período experimental. ....	38
<b>Figura 12.</b> Evolução do peso corpóreo dos animais (A) e do consumo de ração (B) durante o período experimental.....	39
<b>Figura 13.</b> Peso relativo do fígado (A) e rins (B) ao final do período experimental. ....	40
<b>Figura 14.</b> Sítios de restrição avaliados pelo método COBRA obtidos por sequenciamento pós modificação com bissulfito da região promotora do gene <i>TP53</i> em fígado de ratos Wistar. ....	44
<b>Figura 15.</b> Perfil de metilação do gene <i>TP53</i> de ratos Wistar.....	44
<b>Figura 16.</b> Concentrações renais dos metabólitos SAM (A), SAH (B) e da razão SAM/SAH (C) ao final do período experimental. ....	45
<b>Figura 17.</b> Concentração de glutatona (GSH) hepática (A) e renal (B) ao final do período experimental. ....	46
<b>Figura 18.</b> Ensaio do cometa em células obtidas de fígado (A – D) e rins (E – H) ao final do período experimental.....	48

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Esquema resumido sobre a interpretação do padrão de metilação no gene <i>TP53</i> utilizando a enzima de restrição <i>HpyCH4 IV</i> .....	42
<b>Tabela 2</b> - Padrão de restrição obtido pelo método COBRA na região promotora do gene <i>TP53</i> de fígado e rim de ratos tratados por seis semanas com dieta comercial ou suplementada com metionina (Met, 2% p/p) e que receberam doxorubicina (DXR, 1mg/Kg p.c., ip) na terceira e sexta semana.....	43
<b>Tabela 3</b> - Sumário dos resultados .....	49

## Lista de abreviaturas e siglas

BHMT	Betaína homocisteína metiltransferase
CBS	Cistationina $\beta$ -sintetase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COBRA	Análise dos Fragmentos de Restrição Combinada com Bissulfito
Dnmt	DNA metiltransferase
DP	Desvio Padrão
DXR	Doxorrubicina
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GNMT	glicina- <i>N</i> -metiltransferase
GSH	Glutathiona
MAT	Metionina adenosiltransferase
Met	Metionina
MS	Metionina sintetase
MSP	PCR específica para metilação
MTHFR	5,10-metilenotetrahidrofolato redutase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAH	<i>S</i> -adenosilhomocisteína
SAM	<i>S</i> -adenosilmetionina
SNPs	Polimorfismos de um único nucleotídeo
THF	Tetrahidrofolato
ip	intraperitoneal
p.c.	peso corpóreo
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto

## Lista de símbolos

$\beta$	beta
$\eta\text{mol}$	nanomol
$\pm$	mais ou menos
®	marca registrada
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{mol}$	micromol
cm	centímetro
g	grama
$g$	gravidade
h	hora
kb	quilo pares de base
Kg	quilograma
M	Molar
mA	miliamper
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmol	milimol
ng	nanograma
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
pb	pares de base
pmol	picomol
seg	segundo
V	volts
$\gamma$	gama

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas .....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de símbolos .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Epigenética .....	3
1.2. Metilação do DNA .....	5
1.3. Metilação e câncer .....	8
1.4. Metilação e instabilidade genômica .....	10
1.5. Metilação e medicamentos .....	11
1.6. Metilação e nutrientes .....	13
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Fármacos e reagentes .....	20
3.2. Animais .....	21
3.3. Protocolo experimental .....	21
3.4. Evolução do peso, consumo da ração e peso dos órgãos .....	22
3.5. Análise do padrão de metilação do DNA .....	23
3.5.1. Extração de DNA .....	23
3.5.2. Modificação do DNA por bissulfito .....	23
3.5.3. Construção dos <i>primers</i> .....	24
3.5.4. Amplificação dos fragmentos por PCR .....	25
3.5.5. Análise dos fragmentos de restrição: validação da modificação pelo bissulfito .....	26
3.5.6. Análise dos fragmentos de restrição: detecção do padrão de metilação .....	27
3.6. Análise de metilação por sequenciamento pós bissulfito .....	26
3.6.1. Reação de adenilação .....	28
3.6.2. Reação de ligação inserto e vetor pTZ57R/T .....	28
3.6.3. Transformação .....	29
3.6.4. Seleção dos clones .....	29
3.6.5. Preparo e sequenciamento das amostras selecionadas .....	30
3.6.6. Análise dos resultados de sequenciamento .....	30
3.7. Análise de SAM e SAH em tecido renal de ratos .....	31
3.7.1. Preparo da amostra .....	31
3.7.2. Análise cromatográfica .....	31
3.7.3. Curva de calibração, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e recuperação .....	33
3.8. Glutathiona tecidual .....	33

3.9.	Ensaio do cometa .....	34
3.9.1.	Isolamento e viabilidade celular .....	34
3.9.2.	Preparo das lâminas .....	34
3.9.3.	Análise das lâminas do ensaio do cometa.....	35
3.10.	Análise dos resultados .....	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1.	Evolução do peso, consumo de ração e peso relativo dos rins e fígado .....	38
4.2.	Análise do padrão de metilação do DNA .....	41
4.3.	Metabólitos SAM e SAH.....	45
4.4.	Glutathiona tecidual .....	46
4.5.	Ensaio do cometa .....	47
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo</b>	<b>.....</b>	<b>77</b>



# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

Após o sequenciamento do genoma, descobriu-se que os humanos são idênticos em 99,9% da sequência dos genes. Entretanto, a variação de 0,1% é responsável não só pelas diferenças nos fenótipos, tais como cor do cabelo, cor da pele, altura, peso entre outros, como também pela suscetibilidade individual a doenças e saúde (KAPUT, RODRIGUEZ, 2004). Portanto, uma nova área de estudo surgiu para investigar a interação entre genes e nutrientes. A nutrigenômica estuda como os fatores da dieta contribuem para estabelecer um fenótipo por meio da genética nutricional, epigenética nutricional, transcriptoma, proteoma e metaboloma (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006).

A genômica nutricional nos desafia a entender as interações recíprocas e complexas entre o genoma humano e os componentes da dieta na fisiologia normal e patofisiológica (STOVER, 2004). A genômica nutricional é composta tanto pela nutrigenética, que avalia a influência da variação genética na utilização e metabolismo dos nutrientes, tolerância a alimentos e requerimentos nutricionais, como pela nutrigenômica, que avalia o efeito modulador dos nutrientes na evolução do genoma, taxa de mutação, viabilidade *in-utero*, programação genômica e expressão de genes (STOVER; CAUDILL, 2008).

A nutrigenômica é responsável por identificar alvos moleculares essenciais e desenvolver métodos para distinguir entre os indivíduos que respondem e os que não respondem a determinados componentes da dieta (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006). Portanto, o principal objetivo da nutrigenômica é o uso da dieta personalizada para inibir o risco de doença e otimizar a manutenção da saúde humana (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). A maioria dos casos de obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e outras doenças crônicas são devido a interações complexas entre vários genes e os fatores ambientais (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). Embora os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) sejam relacionados com algumas doenças, o fenótipo predominante depende da combinação dos genes, de fatores ambientais e comportamentais (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006).

As variações genéticas individuais, entre elas os SNPs, afetam a eficiência de ação da proteína assim como sua interação com outras proteínas e substratos (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006), podendo influenciar na absorção, metabolização, armazenamento e excreção dos nutrientes (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). Entretanto, nem todos os SNPs interferem na qualidade ou quantidade do produto do gene. Quanto maior a informação sobre a interligação

entre SNPs, componentes da dieta e fenótipo, mais fácil será predizer os benefícios de uma intervenção na dieta (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006).

Estudos epidemiológicos mostram a associação entre dieta e doenças poligênicas crônicas como, por exemplo, a quantidade de calorias na dieta e o desenvolvimento de arteriosclerose, diabetes, obesidade, câncer e outras doenças. Entretanto, raramente se analisa o genótipo individual nestes estudos (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). Já para doenças monogênicas, como a galactosemia ou a fenilcetonúria é mais fácil identificar a dieta como fator de risco. Estas doenças podem ser manipuladas pela dieta e impedir que o fenótipo indesejado seja manifestado (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004).

Os compostos bioativos dos alimentos modificam simultaneamente vários processos e o desafio é identificar quais dos processos isolados ou em combinação são mais importantes para a mudança fenotípica na resposta inflamatória, metabolismo de carcinógenos, regulação hormonal, crescimento e diferenciação celular, reparo de DNA e apoptose (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006). Componentes dietéticos individuais afetam as taxas de mutação e os nutrientes estão entre os vários fatores que afetam a viabilidade fetal e modificam a penetrância de lesões genéticas deletérias. Sugere-se que o efeito de minerais e vitaminas na taxa de mutação deve ser considerado ao estabelecer recomendações dietéticas permitidas, visto que a mutação antecede o desenvolvimento de certas anomalias, doenças degenerativas e câncer (STOVER, 2004).

Dietas desbalanceadas, desde deficiências de micronutrientes ao excesso de consumo de macronutrientes ou suplementos dietéticos, são modificadores do metabolismo e potencializam o desenvolvimento de doenças crônicas (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). Ao observar a curva de dose resposta de nutrientes essenciais, é possível identificar duas regiões importantes: a região de deficiência e a região de toxicidade. A curva apresenta um formato de “U”. Em doses muito baixas, existe maior probabilidade de resposta adversa, que é reduzida com o aumento da dose. Esta região é reconhecida como deficiência. Conforme a dose aumenta, a ponto de não ter mais deficiência, o organismo permanece no estado de homeostase onde não se observa resposta adversa. Entretanto, o aumento da dose resulta em resposta adversa que cresce em magnitude de maneira semelhante a outras substâncias tóxicas. Assim, sabe-se que doses altas de vitamina A podem causar toxicidade hepática e defeitos no nascimento, doses altas de selênio podem afetar o cérebro, doses altas de estrógeno podem aumentar o risco de câncer de mama, apesar de doses baixas destes micronutrientes serem essenciais para a vida (EATON; GILBERT, 2008). Recomendações que encorajam elevar a ingestão de nutrientes individuais a concentrações não alcançadas

normalmente na dieta com alimentos saudáveis, como a ingestão de suplementos dietéticos e nutracêuticos, podem ser justificadas, porém requerem validação rigorosa para que a segurança seja estabelecida (STOVER, 2004).

A nutrição é a exposição ambiental mais persistente e variável que provavelmente contribuiu para a variação do genoma humano (STOVER, 2004). Assim a dieta é uma variável importante na expressão da informação genética que colabora para o desenvolvimento das doenças (KAPUT; RODRIGUEZ, 2004). Vários componentes da dieta podem influenciar na expressão de genes devido a variações no padrão de metilação e de outros eventos epigenéticos (MILNER, 2004). Devido ao fato dos eventos epigenéticos poderem ser reversíveis, eles oferecem outra explicação de como fatores ambientais, tais como a dieta, podem influenciar nos processos biológicos e no fenótipo (TRUJILLO; DAVIS; MILNER, 2006).

### **1.1. Epigenética**

O termo epigenética refere-se a mudanças na expressão gênica herdadas, mitótica ou meioticamente, que não envolvem mudanças na sequência de DNA (JIRTLE; SKINNER, 2007). Na década de 90 poucos sabiam o significado da palavra epigenética e a maioria dos cientistas acreditava que a essência de todas as doenças humanas estava relacionada a variação da sequência de DNA. Entretanto, esta variação é apenas parte da história. Doenças complexas como a esclerose múltipla são melhor explicadas nos termos de mudanças epigenéticas do que por meio da genética clássica (DENNIS, 2003). Os mecanismos epigenéticos regulam muitos processos celulares direta ou indiretamente e são um processo crítico na resposta celular ao ambiente e estímulos endógenos (SAWAN et al., 2008). Dependendo da área que o estudo é realizado, o fator ambiental pode ter diferentes significados. Para psicólogos e sociólogos, é a conjunção da interação entre grupos sociais, dinâmica familiar e cuidados maternos. Nutricionistas têm em mente a pirâmide alimentar e suplementos dietéticos, enquanto que toxicologistas poderiam pensar nos poluentes do ar, solo e água. Assim, o ambiente como um todo é capaz de alterar a expressão de genes e mudar o fenótipo, em parte por mudanças no epigenoma, que é composto pelos padrões globais epigenéticos, tais como metilação do DNA, modificações em histonas e cromatinas, além de RNAs não codificantes (JIRTLE; SKINNER, 2007).

Existe uma interação entre os diferentes tipos de informação epigenética. Este processo é proposto como o “código epigenético” que modula o “código genético” em resposta a estímulos endógenos e ambientais. O código epigenético é importante para manter o perfil da expressão gênica durante muitas gerações e pode ordenar resultados celulares por meio de regulação de processos celulares como transcrição gênica, proliferação e reparo do DNA. O desequilíbrio dos mecanismos epigenéticos promove o desenvolvimento de fenótipo anormal e o aparecimento de eventos genéticos tais como quebras do DNA, mutação e instabilidade do cromossomo que contribuem para o desenvolvimento de doenças como o câncer (SAWAN et al., 2008).

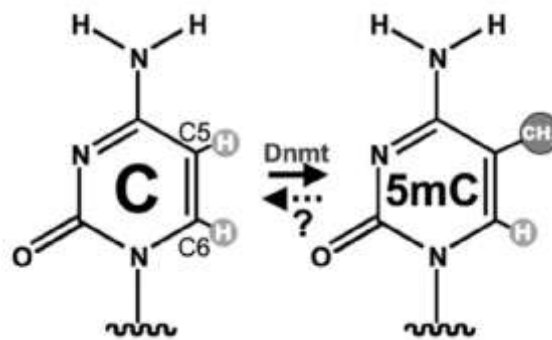
Em mamíferos, a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico são os principais processos conhecidos regulados pela epigenética. Esta regulação também ocorre na expressão de genes tecido específico, ao silenciar elementos repetitivos, inibindo sua replicação e transposição e, portanto prevenindo a mutagênese por inserção (JIRTLE; SKINNER, 2007). A herança epigenética é essencial para o desenvolvimento e para processos celulares como transcrição gênica, diferenciação e proteção contra genoma viral. Os mecanismos epigenéticos atuam durante o desenvolvimento e na manutenção de funções celulares específicas durante a vida (SAWAN et al., 2008). Entre os mecanismos epigenéticos, destacam-se as modificações de cromatina, os micro RNAs e a metilação do DNA (TOST, 2009).

As modificações de cromatina são alterações covalentes que ocorrem após a tradução das proteínas histonas. A unidade fundamental da cromatina é o nucleossomo, que consiste de 146 pares de bases (pb) do DNA genômico enrolado num octâmero de quatro core de histonas (H3, H4, H2A e H2B). As caudas N-terminais do nucleossomo de histonas estão sujeitas a diferentes modificações incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (SAWAN et al., 2008). Em uma célula normal, um balanço preciso mantém o DNA nucleossomal na forma ativa (acetilada) ou na forma inativa (deacetilada). Este balanço adequado é controlado por enzimas que promovem a acetilação (histonas acetiltransferases) ou a deacetilação (histonas deacetilases). Outras modificações incluem a metilação de resíduos de arginina e lisina das histonas. Esta metilação é catalisada por histonas metiltransferases e o processo está envolvido na regulação da atividade de vários genes e na estrutura da cromatina. Em geral a metilação da lisina H3K9, H3K27 e H4K20 é responsável por silenciar genes, ao passo que a metilação da H3K4, H3K36 e H3K79 é associada com a ativação de genes (MULERO-NAVARRO; ESTELLER, 2008). As modificações de histonas

podem ser mantidas por meio da divisão celular e, portanto elas são consideradas como verdadeiros mecanismos epigenéticos herdáveis (SAWAN et al., 2008).

Outro mecanismo epigenético de controle da expressão de genes envolve RNAs não codificantes, que são pequenos RNAs ou microRNAs (JIRTLE; SKINNER, 2007). Eles regulam a expressão de RNA mensageiro (RNAm) complementar. São moléculas diversas com função estrutural, enzimática e regulatória sendo compostas por aproximadamente 22 nucleotídeos no comprimento. Os microRNAs inibem a síntese de proteína por meio de mecanismos desconhecidos que preservam a estabilidade do RNAm alvo (AMBROS, 2004).

A metilação do DNA refere-se a modificação covalente da base citosina que está localizada a 5' de uma base guanina no dinucleotídeo CpG por meio de transferência enzimática pelas DNA metiltransferases (Dnmt) que utilizam como substrato o *S*-adenosilmetionina (SAM) (SAWAN et al., 2008) (Figura 1). A metilação ocorre predominantemente em regiões repetitivas do genoma que contêm resíduos CpG (JIRTLE; SKINNER, 2007) apesar da metilação em sítios não CpG ocorrer em células tronco embrionárias (LISTER et al., 2009).



**Figura 1.** Modificação do nucleotídeo citosina pelo mecanismo de metilação do DNA.

(Fonte: Cheng; Blumenthal (2008). Dnmt = DNA metiltransferase; C = citosina; 5mC = 5-metilcitosina).

## 1.2. Metilação do DNA

Os dinucleotídeos CpG são relativamente raros no genoma dos mamíferos, porém eles ocorrem em regiões densas chamadas ilhas CpG, que variam entre 0,5 kb e 4 kb em comprimento e são encontradas principalmente em regiões promotoras de genes funcionais (JOHNSON; BELSHAW, 2008). Dependendo do parâmetro empregado, uma ilha CpG é

definida como tendo um conteúdo de citosina + guanina (C+G) maior que 50% (55%), uma razão de frequência esperada *versus* observada para a ocorrência de CpG maior que 0,6 (0,65) e um tamanho mínimo de 200 (500) pares de base (TOST, 2009; LAIRD, 2003). Aproximadamente 88% das regiões promotoras ativas estão associadas com sequências ricas em CpG e podem ser reguladas por metilação do DNA (TOST, 2009). Sabe-se que ilhas CpG, associadas tanto com genes de manutenção (*housekeeping*) ou genes tecido específico, não estão metiladas em qualquer estágio de desenvolvimento, exceto quando associadas a genes sujeitos a inativação do cromossomo X e certos genes de *imprinting* (SHEN et al., 2007). Por exemplo, em camundongos, o gene do fator de crescimento *Igf2* (*insulin-like growth factor 2*), o alelo paterno é expresso, enquanto o inibidor de crescimento *Igf2r* (*insulin-like growth factor 2 receptor*) o alelo materno é expresso (JIRTLE; SKINNER, 2007). Existem sequências genômicas repetitivas em células normais que são densamente metiladas para proteger a integridade do cromossomo, evitando a reativação de elementos transponíveis também chamados de transposons (MULERO-NAVARRO; ESTELLER, 2008). A maioria das citosinas das ilhas CpG não estão metiladas em tecidos normais (JOHNSON; BELSHAW, 2008).

A metilação do DNA é estabelecida por meio da Dnmt *de novo* e este padrão é mantido após a replicação pela Dnmt de manutenção (GEHRING; REIK; HENIKOFF, 2009). As Dnmt3a e Dnmt3b são essenciais para a metilação *de novo* durante o desenvolvimento e a inativação destas enzimas causa parada no desenvolvimento embrionário (JOHNSON; BELSHAW, 2008). A Dnmt3L parece ser necessária para a metilação de genes de *imprinting* em células germinativas e interage com a Dnmt3a e 3b na atividade de metiltransferase *de novo* (MULERO-NAVARRO; ESTELLER, 2008). Por outro lado, a Dnmt1 é conhecida como uma enzima de manutenção que metila citosinas no dinucleotídeo CpG durante a síntese do DNA (JOHNSON; BELSHAW, 2008) e é a principal enzima que mantém a metilação do DNA, porque apresenta preferência pelo substrato de DNA hemi-metilado (MULERO-NAVARRO; ESTELLER, 2008). A metilação pode ser perdida tanto passivamente, quando a manutenção da metilação que usualmente segue a replicação do DNA é inibida, ou por processo ativo quando a 5-metilcitosina é removida por reação enzimática, cujo mecanismo ainda não está totalmente elucidado (GEHRING; REIK; HENIKOFF, 2009).

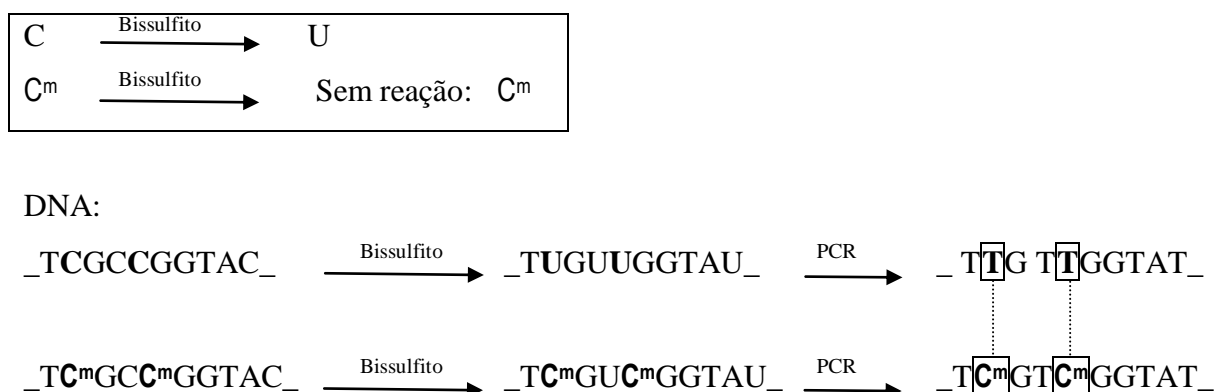
As mudanças específicas na metilação do DNA são sempre relativas a uma amostra de DNA referência, frequentemente derivada de um tecido normal. Assim, a hipermetilação do DNA é o aumento da metilação tanto de um CpG individual ou de um grupo de CpG. O

inverso ocorre na hipometilação do DNA, ou seja, um decréscimo de metilação de um CpG individual, de um grupo de CpG ou até mesmo do genoma como um todo (LAIRD, 2003).

Muitos métodos de análise de metilação são utilizados, porém nenhum é superior e apresentam variações tanto na acurácia quanto na sensibilidade (LAIRD, 2003). Em geral, os métodos empregados são baseados em duas técnicas: a conversão pelo bissulfito, ou a digestão com enzimas de restrição sensíveis a metilação (ZILBERMAN; HENIKOFF, 2007).

A digestão do DNA genômico com enzimas de restrição sensíveis a metilação são ferramentas clássicas na análise de metilação. As enzimas de restrição mais comumente utilizadas são a combinação das isoenzimas *HpaII* e *MspI*, sendo que ambas reconhecem sequências CCGG. Entretanto, em mamíferos onde a metilação ocorre, quase que exclusivamente em sítios CpG, a atividade da *HpaII* é inibida pela metilação, enquanto que a *MspI* não é inibida (ZILBERMAN; HENIKOFF, 2007).

Na conversão pelo bissulfito, o DNA é tratado com bissulfito que converte a citosina em uracila por reação de deaminação, enquanto a 5-metilcitosina permanece sem alteração, como mostrado na Figura 2 (HAYATSU, 2008). A uracila é um análogo da timina e ela é reconhecida pela DNA polimerase como timina. Assim, quando o DNA modificado pelo bissulfito é submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR), o resíduo de uracila será convertido em resíduo de timina nos produtos amplificados. Como o resíduo de 5-metilcitosina permanece sem alteração durante o tratamento com bissulfito, a amplificação produzirá polinucleotídeos nos quais os resíduos de citosina representam os resíduos de 5-metilcitosina no DNA original (HAYATSU, 2008).



**Figura 2.** Tratamento do DNA para identificar a 5-metilcitosina (C<sup>m</sup>) no DNA.

(Fonte: Hayatsu (2008) com adaptações)



Vários métodos utilizam a modificação pelo bissulfito. Técnicas baseadas em PCR específica para metilação (MSP – *Methylation Specific PCR*) podem detectar padrões específicos de metilação do DNA (LAIRD, 2003). É uma técnica largamente utilizada, embora seja sensível e qualitativa (JOHNSON; BELSHAW, 2008). Métodos baseados na clivagem seletiva da sequência metilada do produto de PCR por enzimas de restrição fornecem informações sobre o estado de metilação de citosinas individuais (JOHNSON; BELSHAW, 2008). Assim, estes métodos podem ser utilizados para construir perfis de metilação usando medidas de metilação em um CpG individual (LAIRD, 2003). Como exemplo, pode-se citar a análise dos fragmentos de restrição combinada com bissulfito (COBRA – *Combined Bisulfite Restriction Analysis*) (XIONG; LAIRD, 1997). O sequenciamento genômico pós bissulfito de produtos clonados da amplificação por PCR fornece informação detalhada do padrão de distribuição da 5-metilcitosina ao longo da cadeia de DNA (LAIRD, 2003). É, portanto algumas vezes considerado um “padrão ouro”, porém é demorado e caro para a análise de rotina (JOHNSON; BELSHAW, 2008).

Os padrões de metilação são estabelecidos no início do desenvolvimento e podem ser modulados durante a vida (STOVER, 2004). A metilação do DNA reprime a transcrição diretamente pela inibição da ligação de fatores de transcrição, e indiretamente pelo recrutamento de proteínas que se ligam ao CpG metilado (JIRTLE; SKINNER, 2007). Em tecido de mamíferos, o estado não metilado está associado com uma estrutura de cromatina aberta e com transcrição ativa, enquanto que o DNA metilado recruta complexos de proteínas que promovem a deacetilação das histonas que leva a compactação da cromatina silenciando genes (JOHNSON; BELSHAW, 2008). A hipermetilação é associada a vários tumores malignos humanos, doenças não neoplásicas e envelhecimento (SAWAN et al., 2008).

### 1.3. Metilação e câncer

O câncer é provavelmente a melhor doença estudada com forte componente epigenético. Em tumores, a perda de metilação (hipometilação) do genoma é observada e sugere-se que a hipometilação inicia e propaga a carcinogênese por meio de indução de instabilidade cromossômica e ativação transcricional de oncogenes (TOST, 2009). No câncer também ocorrem áreas de densa hipermetilação em ilhas CpG localizadas na região promotora de certos genes supressores de tumores, como o  $p16^{INK4a}$ , *BRCA1* e *hMLH*, silenciando os genes (ESTELLER, 2006).

Durante a carcinogênese, as células cancerosas necessitam desenvolver certas características como evasão de apoptose, insensibilidade a sinais de parada do ciclo celular e de limites do potencial de replicação, além de produzir sinais de crescimento que possibilitam a angiogênese e invasão tecidual. Muitos genes que afetam estas vias estão metilados no câncer. Portanto, genes envolvidos na apoptose (*Caspase-8*, *TP53*), adesão intracelular (*E-cadherin*, *CD44*), reparo de DNA (*MLH1*, *MGMT*) e biotransformação de fármacos (*GSTP1*) são exemplos de genes que podem tornar-se inativados em tumores por mecanismos epigenéticos (TEODORIDIS; STRATHDEE; BROWN, 2004).

O estado de metilação de ilhas CpG pode ser utilizado para caracterizar e classificar os tumores e também pode ser usado como um ponto de partida para o tratamento antineoplásico, pois a metilação do DNA é uma modificação que não envolve mutação e é possivelmente reversível (TOST, 2009). A identificação das alterações epigenéticas do gene supressor tumoral *TP53* é adequada para o estudo da etiologia, exposição e suscetibilidade ao câncer, porque o gene *TP53* está envolvido em muitos processos celulares (GOLDMAN; SHIELDS, 2003). A proteína p53 é uma supressora tumoral que tem uma importante função central na resposta celular ao dano no DNA por agentes genotóxicos, tais como as radiações ultravioletas (UV), espécies reativas e certos medicamentos utilizados no tratamento do câncer, como a doxorrubicina. Dependendo do tipo celular e da extensão do dano ao DNA, a proteína p53 pode modular muitas funções celulares, incluindo parada no ciclo celular, reparo no DNA e apoptose (NITHIPONGVANITCH et al., 2007).

A hipermetilação do promotor compromete a indução de p53 quando linhagens celulares são expostas ao etoposido, um indutor de dano no DNA que ativa a p53, e esta inativação é revertida quando estas linhagens são tratadas com agentes demetilantes, como por exemplo a 5-azadeoxicitidina ou zebularine (HURT et al., 2006). Chanda et al. (2006) estudaram o padrão de metilação do gene *TP53* em pessoas expostas ao arsênio e que apresentavam sintomas de arsenicose e observaram hipermetilação dos genes *p16* e *TP53*. Além do mais, a região promotora do gene *TP53* estava hipermetilada em indivíduos com câncer de pele induzido pelo arsênio, comparado com aqueles indivíduos com câncer de pele não relacionados com a exposição ao arsênio (CHANDA et al., 2006). Dados de estudo em pacientes brasileiros mostraram que a metilação do gene *TP53* é um evento importante associado com tumores de cérebro extra-axial, pois 52% das metástases apresentavam hipermetilação e assim a metilação do *TP53* estava envolvida na progressão destes tumores (ALMEIDA et al., 2009). Em modelos experimentais demonstrou-se alteração na metilação

da região promotora do gene TP53 em ratos expostos ao medicamento fenobarbital (KOSTKA et al., 2008) e a dieta deficiente em grupos metil (POGRIBNY et al., 2000).

Apesar de ocorrer hipermetilação em muitos genes no câncer, nem todas as regiões promotoras serão afetadas. O mesmo gene *TP53* apresentou um estado não metilado tanto em tecidos saudáveis como em tecidos de carcinoma hepatocelular (DING et al., 2004) e em carcinoma fibrolamelar (VIVEKANANDAN; TORBENSON, 2008). Esta divergência está associada ao fato de que algumas ilhas CpG estão metiladas somente em certos tipos de tumores (TEODORIDIS; STRATHDEE; BROWN, 2004).

Sawan et al. (2008) sugerem que a epigenética silencia genes e pode induzir mudanças genéticas. Como exemplo, o produto do gene *GSTP1*, responsável pela detoxicação de produtos genotóxicos ambientais e endógenos, protege o DNA de danos enquanto os genes de reparo do DNA são responsáveis por reparar o DNA lesionado. As alterações epigenéticas (metilação do DNA e modificações nas histonas) silenciam tanto o gene de detoxicação (*GSTP1*) ou genes de reparo (*MGMT*, *MLH1*, *BRCA1*) que podem aumentar a extensão de dano ao DNA e aumentar a taxa de mutação e instabilidade de microsatélite. Portanto, o evento epigenético primário pode predispor a várias mudanças genéticas, como quebras de DNA e mutações que resultam em instabilidade do cromossomo, que contribuem para o fenótipo do tumor.

#### 1.4. Metilação e instabilidade genômica

A hipometilação global do DNA genômico observada em células cancerosas é um importante achado de malignidade, porque há uma perda de metilação de sequências repetitivas e de elementos transponíveis no genoma que estão associados a instabilidade dos cromossomos das células cancerosas (MULERO-NAVARRO, ESTELLER, 2008).

Três tipos de instabilidade genômica podem ser influenciados pela metilação do DNA, a instabilidade de microsatélites, instabilidade cromossômica e as translocações cromossômicas (GRADY, 2004). As quebras de fita dupla do DNA (*double strand breaks*) são apontadas como o tipo de dano no DNA mais relevante para a instabilidade genômica e viabilidade celular. Células pré-neoplásicas frequentemente contêm lesões no DNA, tais como pareamento errôneo de bases e quebras de cadeia simples e dupla do DNA (McCABE; CAUDILL, 2005). Se estas quebras não forem reparadas podem levar às alterações genéticas

como mutações e translocações cromossômicas encontradas em muitos tipos de cânceres (SAWAN et al., 2008).

A investigação dos componentes da dieta envolvidos no processo de metilação do DNA e na prevenção do câncer deveria considerar as possíveis respostas específicas de certos micronutrientes sobre o genoma e a instabilidade cromossômica. Entre os ensaios que são recomendados e apropriados estão o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa *in vivo* (SPEIT; SCHUTZ, 2008). O ensaio do cometa é empregado para investigar o impacto de fatores da dieta na estabilidade do DNA em humanos, pois é uma técnica fácil de realizar e relativamente com menor custo que outros métodos como a análise de aberrações cromossômicas ou a análise de micronúcleo (HOELZL et al., 2009).

### 1.5. Metilação e medicamentos

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 arsênio e o níquel (BOMBAIL; MOGGS; ORPHANIDES, 2004; YOKOCHI; ROBERTSON, 2004). Além dos medicamentos quimioterápicos, o padrão de metilação pode ser influenciado pelas radiações ionizantes e pela ingestão insuficiente de micronutrientes (SINGH; MURPHY; O'REILLY, 2003). Em pacientes com leucemia que receberam tratamento com decitabina (5-aza-2'-deoxicitidina), observou-se que em doses altas ( $75\text{mg}/\text{m}^2$ ) ocorre indução de apoptose devido a formação de aductos e parada do ciclo celular, enquanto que doses baixas ( $5\text{-}20\text{mg}/\text{m}^2$ ), até trinta vezes menor do que a dose máxima tolerada, as mudanças na expressão gênica ocorrem devido a inibição da Dnmt que poderia favorecer a diferenciação, reduzir a proliferação e aumentar a apoptose (ISSA et al., 2004). Como consequência, os agentes citotóxicos convencionais em concentrações menores que a dose máxima tolerada, ou os agentes demetilantes, como os derivados da 2'-deoxicitidina, podem restaurar a sensibilidade de vários agentes quimioterápicos, incluindo a cisplatina, epirrubina e temozolomida (TEODORIDIS; STRATHDEE; BROWN, 2004).

A doxorrubicina é uma antraciclina que se intercala no DNA e é indicada no tratamento de um amplo espectro de tumores sólidos (ex. mama, bexiga, endométrio, tireóide, pulmão, ovário, estômago e sarcomas) e no tratamento de linfoma, assim como leucemias linfoblásticas e mieloblásticas (YOKOCHI; ROBERTSON, 2004). Como os demais agentes

intercalantes de DNA da classe das antraciclina, a doxorubicina é um agente com atividade antitumoral devido a formação de um complexo clivável com a topoisomerase II, resultando em apoptose (SPENCER et al., 2008) e induz quebras de fita simples e dupla no DNA (ANTUNES; TAKAHASHI, 1999; ANTUNES et al., 2007). Apesar da intensa utilização clínica, os mecanismos de ação das antraciclina nas células cancerosas ainda não foram completamente esclarecidos. Entre os mecanismos conhecidos, pode-se considerar (a) a intercalação na molécula de DNA, levando à inibição da síntese de macromoléculas; (b) a geração de radicais livres que resulta em danos no DNA e peroxidação lipídica; (c) a formação de ligações cruzadas com a molécula de DNA; (d) a indução de danos na molécula de DNA, pela inibição da enzima DNA topoisomerase II; e (e) a indução de apoptose (PENAULT-LLORCA et al., 2003).

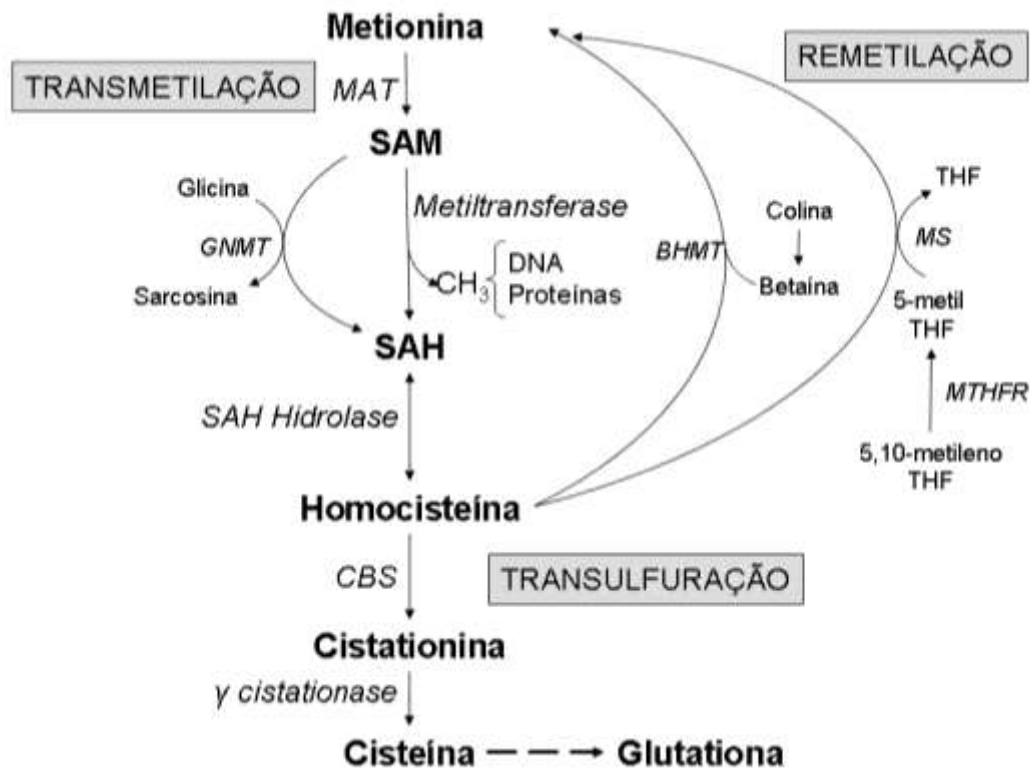
Assim como as demais antraciclina, além das suas propriedades intercalantes na molécula de DNA, a doxorubicina induz a peroxidação lipídica, geração de espécies reativas de oxigênio e é um inibidor direto da enzima DNA topoisomerase II (FERRARO et al., 2000). As espécies reativas ao oxigênio, como o radical superóxido,  $H_2O_2$  e radical hidroxil podem reagir com a maioria dos componentes celulares e induzir muitos tipos de danos celulares incluindo quebras de fita simples e dupla do DNA, modificações de base e *cross-links* DNA-proteína (RAGU et al., 2007). A doxorubicina é um fármaco conhecido por induzir a expressão da proteína p53, fato este observado em linfomas (DEMERS et al., 2009), porém apresenta efeitos citotóxicos tais como nefrotoxicidade (EL-SHITANY; EL-HAGGAR; EL-DESOKY, 2008) e hepatotoxicidade (EL-SAYYAD et al., 2009). Embora o mecanismo exato pelo qual a doxorubicina induz nefrotoxicidade permaneça desconhecido, acredita-se que seja mediado por meio da formação de espécies reativas ao oxigênio que lesam macromoléculas e resulta em peroxidação lipídica (LIU et al., 2007).

A doxorubicina bloqueia a transcrição por meio da intercalação no DNA em regiões ricas em CG e por meio de interferências com as alterações topológicas necessárias para a função da RNA polimerase II e topoisomerase I e II (KANGASPESKA et al., 2008). Também é conhecida a interência na ação da Dnmt por meio da intercalação ao DNA (YOKOCHI; ROBERTSON, 2004) que resulta em redução da metilação da região promotora do gene *pS2* *in vitro* (KANGASPESKA et al., 2008).

## 1.6. Metilação e nutrientes

Os componentes dos alimentos têm a capacidade de influenciar a metilação do DNA em pelo menos três vias diferentes (ROSS, 2007). Primeiro, a dieta é importante para fornecer e regular o suprimento de grupos metil disponíveis para a formação do *S*-adenosilmetionina (SAM), o doador universal de grupos metil. Segundo, a dieta modifica a utilização dos grupos metil, incluindo mudanças na atividade das DNA metiltransferases (Dnmt). Finalmente, o padrão de metilação do DNA pode influenciar na resposta a nutrientes por meio de regulação de genes (ativando ou silenciando) que influenciam na absorção, metabolismo ou altera o sítio de ação para os componentes bioativos da dieta (ROSS, 2007).

Para manter a metilação apropriada do DNA pela Dnmt e SAM, tem-se notado que não somente o 5-metil-tetrahydrofolato, mas também a vitamina B12 (cobalamina, cofator para a transferência enzimática do 5-metil-tetrahydrofolato para a homocisteína), a vitamina B2 (riboflavina, cofator para a redução enzimática do 5,10-metileno-tetrahydrofolato em 5-metil-tetrahydrofolato), assim como a vitamina B6 (piridoxina, cofator para a formação enzimática do 5,10-metileno-tetrahydrofolato a partir do tetrahydrofolato e serina) são requeridas para a metilação do DNA funcional induzidas pela SAM, além de metionina e colina (que são fontes dietéticas diretas de grupos metil). Estes compostos formam uma complexa e inter-dependente rede de relação que é o metabolismo de um carbono na célula (BOLLHEIMER et al., 2005) (Figura 3). Em relação aos nutrientes, os padrões de metilação do DNA são suscetíveis ao excesso ou deficiência de uma variedade de compostos da dieta (KIM, 2007). Assim, os indivíduos com excesso ou depleção de metionina seriam candidatos aos protocolos terapêuticos de intervenção dietética, para a restauração dos padrões específicos de metilação do DNA (WATERLAND, 2006).



**Figura 3.** Metabolismo da metionina.

(Fonte: Rowling et al. (2002) com adaptações. BHMT = betaína homocisteína metiltransferase; CBS = cistationina  $\beta$ -sintetase; MAT = metionina adenosiltransferase; MS = metionina sintetase; SAH = S-adenosilhomocisteína; SAM = S-adenosilmetionina; THF = tetra-hidrofolato)

A metionina é um aminoácido essencial que é requerido para a síntese de proteínas e como fonte de grupos metil para várias reações (ROWLING et al., 2002). Seu metabolismo envolve reações de transmetilação, remetilação e transulfuração (Figura 3). A combinação da transmetilação e remetilação compreende o ciclo da metionina, o qual ocorre na maioria das células. Já o catabolismo, um processo irreversível, é realizado pela via de transulfuração cuja distribuição é limitada e restrita ao fígado, rim, intestino e pâncreas (BROSNAN; BROSNAN, 2006).

Na transmetilação, a primeira etapa no metabolismo da metionina, forma-se a SAM pela ação da metionina adenosiltransferase (MAT). Sob condições normais, a maioria da SAM gerada é usada nas reações de transmetilação, na qual a SAM é convertida a S-adenosilhomocisteína (SAH) pela transferência do grupo metil para diversos aceptores biológicos entre eles proteínas e DNA. Em seguida, a SAH é convertida a homocisteína e adenosina em reação reversível catalisada pela SAH-hidrolase (PUROHIT et al., 2007). Na

via de remetilação, a homocisteína pode ser remetilada a metionina pela metionina sintetase (MS) que está em todas as células, e no fígado também pela betaína homocisteína metiltransferase (BHMT). A MS utiliza o 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF) como doador metil, enquanto a BHMT usa a betaína que é produzida durante a oxidação da colina ou é obtida a partir da dieta (BROSNAN; BROSNAN, 2006). Na transulfuração, a homocisteína condensa-se com a serina para formar cistationina, utilizando a cistationina  $\beta$ -sintetase (CBS) que requer vitamina B6 como cofator. A cistationina é, então, clivada por outra enzima dependente de vitamina B6, a  $\gamma$ -cistationase, que resulta em liberação de cisteína livre, o precursor limítrofe para a síntese da glutatona (PUROHIT et al., 2007).

A SAM controla o metabolismo da metionina por meio da regulação das enzimas envolvidas no ciclo de um carbono (BROSNAN; BROSNAN, 2006). A concentração de SAM deve ser controlada, pois é um substrato essencial na metilação de DNA e proteínas. Estas reações dependentes de SAM regulam a expressão de genes. Um aumento na concentração de SAM acima da concentração normal poderia resultar em aumento na atividade das enzimas metiltransferases e em hipermetilação do substrato (REES; WILSON; MALONEY, 2006). Entretanto, o produto da transmetilação, SAH, é um potente inibidor competitivo de todas metiltransferases e a extensão da inibição depende da razão da concentração intracelular de SAM:SAH. Sob condições normais, SAH é rapidamente hidrolisada a homocisteína e adenosina, e a reação é totalmente reversível. Se a homocisteína acumula, a hidrólise da SAH é mais lenta com consequente inibição da metiltransferase (INGROSSO et al., 2003).

Estudos em animais mostraram que há um potencial para efeitos indesejáveis na ingestão excessiva de metionina mediado pelas mudanças no metabolismo da glicina e perturbação nas reações de metilação (REES; WILSON; MALONEY, 2006). A ingestão de altas concentrações de metionina resulta em aumento da homocisteína plasmática em roedores (JIANG et al., 2007). A conversão da homocisteína para metionina é uma reação essencial para conservar a metionina, detoxicar a homocisteína e produzir a SAM (PUROHIT et al., 2007). O mecanismo exato da toxicidade da homocisteína não é claro e varia entre diferentes células. A toxicidade da homocisteína pode ser mediada diretamente pela SAH (REES; WILSON; MALONEY, 2006) que interfere no processo de metilação de DNA e proteínas por meio da inibição das metiltransferases (BROSNAN; BROSNAN, 2006).

O ensaio em roedores é amplamente usado como um modelo animal para estudos da influência da composição da dieta sobre o padrão de metilação do DNA em ratos jovens e adultos (POGRIBNY et al., 1995; POIRIER, 2002). Ghoshal et al. (2006) verificaram que em



animais jovens, submetidos por longos períodos à dieta deficiente em metionina e ácido fólico, ocorreu a inativação dos genes que codificam as enzimas DNA metiltransferases, responsáveis pela manutenção da metilação do DNA. Os autores concluíram que as alterações epigenéticas foram permanentes e que a administração de uma dieta normal posteriormente não foi capaz de reativar a expressão gênica.

O estado nutricional materno pode alterar o estado epigenético do genoma fetal e níveis de expressão de genes de *imprinting* com consequências ao longo da vida (STOVER, 2004). A suplementação materna com grupos metil (WATERLAND; JIRTLE, 2003) ou genisteína (DOLINOY et al., 2006) alterou o fenótipo dos filhotes viáveis de camundongos agouti ( $A^{vy}$ ) por meio do aumento da metilação do loci  $A^{vy}$ . Portanto, a suplementação dietética pode ter influência na regulação epigenética em humanos (WATERLAND; JIRTLE, 2003).

O efeito da dieta deficiente em metil (colina, metionina ou ácido fólico) está amplamente descrito na literatura (GOSHAL et al., 2006; POGRIBNY et al., 2009), entretanto o efeito da dieta suplementada com grupos metil na metilação gene específica ainda não está completamente elucidado. Além disso, a interação da dieta com o excesso de metionina e fármacos quimioterápicos necessita de estudos adicionais.

Portanto, a interação entre fármacos e dieta no contexto epigenético é de fundamental importância para se estabelecer um tratamento individualizado a cada paciente de acordo com seu quadro clínico e perfil epigenético. Este trabalho avaliou o padrão de metilação da suplementação de metionina associada com o antitumoral doxorubicina, visto que o padrão de metilação em regiões específicas do genoma da célula normal ainda é pouco explorado. Conhecer o perfil de metilação na região promotora do gene *TP53* permitirá entender a regulação epigenética deste gene e estabelecer o possível mecanismo associado a interação dieta-medicamento envolvido, e assim favorecer a prevenção de doenças crônicas relacionadas com o excesso de ingestão de nutrientes.

*Conclusões*

## 2. CONCLUSÕES

Conclui-se que em ratos:

- ✓ A suplementação com metionina (2%) na dieta por seis semanas associada ou não ao antitumoral doxorrubicina (1mg/Kg p.c., duas administrações) não alterou o estado de metilação da região promotora do gene *TP53* em ambos tecidos, fígado e rins;
- ✓ A suplementação com metionina associada ou não a doxorrubicina manteve a razão entre SAM e SAH, porém a associação inibiu a depleção de GSH induzida pela doxorrubicina em ambos tecidos;
- ✓ A metionina não induziu instabilidade genômica *per si*, e quando associada à doxorrubicina, não houve redução na instabilidade induzida pelo fármaco no fígado e rins;

## *Referências*

### 3. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AGNER, A. R.; BARBISAN, L. F.; SCOLASTICI, C.; SALVADORI, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver médium-term assay. **Food Chem Toxicol.**, v. 42, p. 1687-1693, 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun 2003.

ALMEIDA, L. O.; CUSTÓDIO, A. C.; PINTO, G. R.; SANTOS, M. J.; ALMEIDA, J. R. W.; CLARA, C. A.; REY, J. A.; CASARTELLI, C. Polymorphisms and DNA methylation of gene *TP53* associated with extra-axial brain tumors. **Genet Mol Res.**, v. 8, p. 8-18, 2009.

AMARAL, C. L.; FRANCESCATO, H. D.; COIMBRA, T. M.; COSTA, R. S.; DARIN, J. D.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Arch. Toxicol.**, v. 82, p. 363-370, 2008.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350-355, 2004.

ANSARI, K.M.; CHAUHAN, L.K.S.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. Unequivocal evidence of genotoxic potential of argemone oil in mice. **Int J Cancer**, v. 112, p. 890-895, 2004.

ANTUNES, L. M. G.; 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. 155-161, 2007.

ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacol Res.**, v. 41, p. 405-411, 2000.

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, 1999.

BANDYOPADHYAYA, G.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, B.D.; CHAKRABORTY, A. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. **Eur J Pharmacol.**, v. 588, p. 151-157, 2008.

---

<sup>1</sup> De acordo com a Norma Técnica da ABNT NBR 6023 – Informação e Documentação – Referências – Elaboração (ago./2000). Abreviatura de periódicos segundo Norma Técnica da ABNT NBR 6032 – Abreviação de Títulos de Periódicos e Publicações.

- BERTAZZOLI, C.; ROVERO, C.; BALLERINI, L.; LUX, B.; BALCONI, F.; ANTONGIOVANNI, V.; MAGRINI, U. Experimental systemic toxicology or 4'-epidoxorubicin, a new, less cardiotoxic anthracycline antitumor agent. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 79, p. 412-422, 1985.
- BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. **Bioinformatics**, v. 21, p. 4067-8, 2005.
- BOLLHEIMER, L. C.; BUETTNER, R.; KULLMANN, A.; KULLMANN, F. Folate and its preventive potential in colorectal carcinogenesis. How strong is the biological and epidemiological evidence? **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 55, p. 13-36, 2005.
- BOMBAIL, V.; MOGGS, J.G.; ORPHANIDES, G. Perturbation of epigenetic status by toxicants. **Toxicol Lett.**, v.149, p.51-58, 2008.
- 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.
- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. The sulfur-containing amino acids: an overview. **J Nutr.**, v. 136, p. 1636S-1640S, 2006.
- BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup. **Mutat Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.
- CADENAS, S.; BARJA, G. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO<sub>3</sub>. **Free Radic Biol Med.**, v. 26, p. 1531-1537, 1999.
- CHANDA, S.; DASGUPTA, U. B.; GUHAMAZUMDER, D.; GUPTA, M.; CHAUDHURI, U.; LAHIRI, S.; DAS, S.; GHOSH, N.; CHATTERJEE, D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. **Toxicol Sci.**, v. 89, p. 431-437, 2006.
- CHENG, X.; BLUMENTHAL, R. M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. **Structure**, v. 16, p. 341-350, 2008.
- DEMERS, M.; COUILLARD, J.; GIGLIA-MARI, G.; MAGNALDO, T.; ST-PIERRE, Y. Increased galectin-7 gene expression in lymphoma cells is under the control of DNA methylation. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 387, p. 425-429, 2009.

DENNIS, C. Changes to the genome that don't affect DNA sequence may help to explain differences between genetically identical twins. *Nature*, v. 42, p. 686-688, 2003.

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

DIGEL, W.; LÜBBERT, M. DNA methylation disturbances as novel therapeutic target in lung cancer: preclinical and clinical results. *Crit Rev Oncol Hematol.*, v. 55, p. 1-11, 2005.

DING, S.; GONG, B. D.; YU, J.; GU, J.; ZHANG, H. Y.; SHANG, Z. B.; FEI, Q.; WANG, P.; ZHU, J. D. Methylation profile of the promoter CpG islands of 14 "drug-resistance" genes in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*, v. 10, p. 3433-3440, 2004.

DOLINOY, D. C.; WEIDMAN, J. R.; WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Maternal genistein alters coat color and protects A<sup>vy</sup> mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect.*, v. 114, p. 567-572, 2006.

EATON, D. L.; GILBERT, S. G. Principles of toxicology. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 7. ed. New York : McGraw-Hill, 2008.

EL-SAYYAD, H. I.; ISMAIL, M. F.; SHALABY, F. M.; ABOU-EL-MAGD, R. F.; GAUR, R. L.; FERNANDO, A.; RAJ, M. H.; OUHTIT, A. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci.*, v. 5, p. 466-473, 2009.

EL-SHITANY, N. A.; EL-HAGGAR, S.; EL-DESOKY, K. Silymarin prevents adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol.*, v. 46, p. 2422-2428, 2008.

ESTELLER, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer*, v. 94, p. 179-183, 2006.

FELL, D., BENJAMIN, L. E., STEELE, R. D. Determination of adenosine and S-adenosyl derivatives of sulfur amino acids in rat liver by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.*, v. 345, p. 150-156, 1985.

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.

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

GEHRING, M.; REIK, W.; HENIKOFF, S. DNA demethylation by DNA repair. *Trends Genet.*, v. 25, p. 82-90, 2009.

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.

GOLDMAN, R.; SHIELDS, P.G. Food mutagens. **J Nutr.**, v. 133, p. 965S-973S, 2003.

GRADY, W. Genomic instability and colon cancer. **Can Metastasis Rev.**, v. 23, p. 11-27, 2004.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLISON, B.; CLAY P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, RR. International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4<sup>th</sup> International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYATSU, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutat Res.**, v. 659, p. 77-82, 2008.

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.

HOELZL, C.; KNASMÜLLER, S.; MISÍK, M.; COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; NERSESYAN, A. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends. **Mutat Res.**, v. 681, p. 68-79, 2009.

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.

HURT, E. M.; THOMAS, S. B.; PENG, B.; FARRAR, W. L. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. **Cancer Biol Ther.**, v. 5, p. 1154-1160, 2006.

IARC. Biomarkers for biological agents. **IARC Sci Publ.**, v.1, p.127-142, 1997.

IBRAHIM, M. A.; ASHOUR, O. M.; IBRAHIM, Y. F.; EL-BITAR, H. I.; GOMAA, W.; ABDEL-RAHIM, S. R. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. **Pharmacol. Res.**, v. 06, p. 373-381, 2009.



- INGROSSO, D.; CIMMINO, A.; PERNA, A. F.; MASELLA, L.; DE SANTO, N. G.; DE BONIS, M. L.; VACCA, M.; D'ESPOSITO, M.; D'URSO, M.; GALLETTI, P.; ZAPPIA, V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. **Lancet**, v. 361, p. 1639-1699, 2003.
- ISSA, J. P.; GARCIA-MANERO, G.; GILES, F. J.; MANNARI, R.; THOMAS, D.; FADERL, S.; BAYAR, E.; LYONS, J.; ROSENFELD, C. S.; CORTES, J.; KANTARJIAN, H. M. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. **Blood**, v. 103, p. 1635-1640, 2004.
- 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.
- JOHNSON, I. T.; BELSHAW, N. J. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. **Food Chem Toxicol.**, v. 46, p. 1346-1359, 2008.
- KANGASPESKA, S.; STRIDE, B.; MÉTIVIER, R.; POLYCARPOU-SCHWARZ, M.; IBBERSON, D.; CARMOUCHE, R. P.; BENES, V.; GANNON, F.; REID, G. Transient cyclical methylation of promoter DNA. **Nature**, v. 452, p. 112-115, 2008.
- KAPUT, J.; RODRIGUEZ, R. L. Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. **Physiol Genomics**, v. 16, p. 166-177, 2004.
- 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.
- KOSTKA, G.; URBANEK-OLEJNIK, K.; WIADROWSKA, B.; BAŃKOWSKI, R. Phenobarbital-induced hypermethylation of the p53 promoter region in the liver of wistar rats. **Rocz Panstw Zakl Hig.**, v. 59, p. 455-465, 2008.
- LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Genet.**, v. 3, p. 253-266, 2003.
- LI, L. C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, p. 1427-1431, 2002.

- LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.-M.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315-322, 2009.
- LIU, L. L.; LI, Q. X.; XIA, L.; LI, J.; SHAO, L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 231, p. 81-90, 2007.
- McCABE, D.C.; CAUDILL, M.A. DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. **Nutr Rev.**, v. 63, p. 183-195, 2005.
- MILNER, J. A. Molecular targets for bioactive food components. **J Nutr.**, v. 134, p. 2492S-2498S, 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.
- MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. **Crit Rev Oncol Hematol.**, v. 68, p.1-11, 2008.
- NESSLANY, F.; ZENNOUCH, N.; SIMAR-MEINTIERES, S.; TALAHARI, I.; NKUI-MBOUI, E.N.; MARZIN, D. In vivo comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutat Res.**, v. 630, p. 28-41, 2007.
- NITHIPONGVANITCH, R.; ITTARAT, W.; COLE, M. P.; TANGPONG, J.; CLAIR, D. K.; OBERLEY, T. D. Mitochondrial and nuclear p53 localization in cardiomyocytes: redox modulation by doxorubicin (Adriamycin)? **Antioxid Redox Signal.**, v. 9, p. 1001-1008, 2007.
- PATEL, S.; PANDEY, A.K.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. **Mutat Res.**, v. 607, p. 176-183, 2006.
- PENAULT-LLORCA, F.; CAYRE, A.; BOUCHET MISHELLANY, F.; AMAT, S.; FEILLEL, V.; LE BOUEDEC, G.; FERRIÈRE, 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.
- PFUHLER, S.; KIRKLAND, D.; KASPER, P.; HAYASHI, M.; VANPARYS, P.; CARMICHAEL, P.; DERTINGER, S.; EASTMOND, D.; ELHAJOUJI, A.; KRUL, C.; ROTHFUSS, A.; SCHOENING, G.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THOMAS, C.; VAN BENTHEM, J.; CORVI, R. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities - Report from an ECVAM workshop. **Mutat Res.**, 2009. *in press*

- 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.; POGRIBNA, M.; CHRISTMAN, J. K.; JAMES, S. J. Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis. **Cancer Res.**, v. 60, p. 588-594, 2000.
- 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.**, v. 669, p. 56-62, 2009.
- 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.
- PRESTON, R.J. Epigenetic process and cancer risk assessment. **Mutat Res.**, v. 616, p. 7-10, 2007.
- PUROHIT, V.; ABDELMALEK, M. F.; BARVE, S.; BENEVENGA, N. J.; HALSTED, C. H.; KAPLOWITZ, N.; KHARBANDA, K. K.; LIU, Q. Y.; LU, S.C; McCLAIN, C. J.; SWANSON, C.; ZAKHARI, S. Role of S-adenosylmethionine, folate, and betaine in the treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium. **Am J Clin Nutr.**, v. 86, p. 14-24, 2007.
- RAGU, S.; FAYE, G.; IRAQUI, I.; MASUREL-HENEMAN, A.; KOLODNER, R. D.; HUANG, M. E. Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p.9747-952, 2007.
- RAMÍREZ, T.; GARCÍA-MONTALVO, V.; WISE, C.; CEA-OLIVARES, R.; POIRIER, L. A.; HERRERA, L. A. S-adenosyl-L-methionine is able to reverse micronucleous formation induced by sodium arsenite and other cytoskeleton disrupting agents in cultured human cells. **Mutat Res.**, v. 528, p. 61-74, 2003.
- REES, W. D.; WILSON, F. A.; MALONEY, C. A. Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: the impact of methionine in the maternal diet. **J Nutr.**, v. 136, p. 1701S-1705S, 2006.
- RIBEIRO, D. A.; CAMPOS, R. R.; BERGARNASCHI, C. T. Chronic renal failure induces genetic instability in multiple organs of Wistar rats. **Eur J Clin Invest.**, v. 39, p. 289-295, 2009.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **J Chromat B**, v. 391, p. 215-231, 1997.

- ROSS, S. A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. *Exp Oncol.*, v. 29, p. 250-256, 2007.
- ROWLING, M. J.; McMULLEN, M. H.; CHIPMAN, D. C.; SCHALINSKE, K. L. Hepatic glycine *N*-methyltransferase is up-regulated by excess dietary methionin in rats. *J Nutr.*, v. 132, 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. *J Nutr.*, v. 132, p. 365-369, 2002.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 74, p.5463–5467, 1977.
- 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.; VAISSIÈRE, T.; MURR, R.; HERCEG, Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res.*, v. 642, p. 1-13, 2008.
- SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.*, v. 24, p. 192-205, 1968.
- SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicol Pathol.*, v. 35, p. 751–755, 2007.
- SHEN, L.; KONDO, Y.; GUO, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, L.; AHMED, S.; SHU, J.; CHEN, X.; WATERLAND, R. A.; ISSA, J. P. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet.*, v. 3, p. 2023-2036, 2007.
- SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, v. 175, p. 184 – 191, 1988.
- 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.
- SPEIT, G.; SCHUTZ, P. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in the relation of cytotoxicity and clastogenicity. *Mutat Res.*, v.655, p.22-27, 2008.

- SPENCER, D. M. S.; BILARDI, R. A.; KOCH, T. H.; POST, G. C.; NAFIE, J. W.; KIMURA, K. I.; CUTTS, S. M.; PHILLIPS, D. R. DNA repair in response to anthracycline–DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. **Mutat Res.**, v. 638, p. 110–121, 2008.
- STOVER, P. J. Nutritional genomics. **Physiol Genomics.**, v. 16, p. 161-165, 2004.
- STOVER, P. J.; CAUDILL, M. A. Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions. **J Am Diet Assoc.**, v. 108, p. 1480-1487, 2008.
- TEODORIDIS, J. M.; STRATHDEE, G.; BROWN, R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. **Drug Resist Updat.**, v. 7, p. 267-278, 2004.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.
- TOST, J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. **Mol Biotechnol.**, 2009. (*in press*)
- TRUJILLO, E.; DAVIS, C.; MILNER, J. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. **J Am Diet Assoc.**, v. 106, p. 403-413, 2006.
- VAISSIÈRE, T.; SAWAN, C.; HERCEG, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **Mutat Res.**, v. 659, p. 40-48, 2008.
- VIVEKANANDAN, P.; TORBENSON, M. Epigenetic instability is rare in fibrolamellar carcinomas but common in viral-associated hepatocellular carcinomas. **Mod Pathol.**, v. 21, p. 670-675, 2008.
- WANG, W.; KRAMER, P. M.; YANG, S.; PEREIRA, M. A.; TAO, L. Reversed-phase high-performance liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-homocysteine in mouse liver and the effect of methionine on their concentrations. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.**, v. 762, p. 59-65, 2001.
- WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. **Mol Cell Biol.**, v. 23, p.5293-5300, 2003.
- WATERLAND, R.A. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. **J Nutr.**, v. 136, p. 1706S-1710S, 2006.

---

WEI, G.; XIAO, S.; SI, D.; LIU, C. Improved HPLC method for doxorubicin quantification in rat plasma to study the pharmacokinetics of micelle-encapsulated and liposome-encapsulated doxorubicin formulations. **Biomed Chromatogr.**, v. 22, p. 1252-1258, 2008.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; DE WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol Sci.**, v. 97, p. 21-26, 2007.

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

YOKOCHI, T.; ROBERTSON, K. D. Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis. **Mol Pharmacol.**, v. 66, p. 1415-1420, 2004.

ZILBERMAN, D.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. **Development.**, v. 134, p. 3959-3965, 2007.

