



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARINA AMORIM ROCHA

EFEITOS DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A METILAÇÃO
DO DNA DURANTE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS
HELA

VALPROIC ACID EFFECTS ON DNA METHYLATION
DURING THE CELL CYCLE OF HELA CELLS

CAMPINAS

2018

MARINA AMORIM ROCHA

**EFEITOS DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A METILAÇÃO DO
DNA DURANTE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS HELA**

**VALPROIC ACID EFFECTS ON DNA METHYLATION DURING
THE CELL CYCLE OF HELA CELLS**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Celular e Estrutural
na Área de Biologia Celular.*

*Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements for
the degree of Master degree in the Area of
Cell Biology.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA MARINA AMORIM ROCHA E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LUIZA
SILVEIRA MELLO.

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5812-348>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R582e Rocha, Marina Amorim, 1992-
Efeito do ácido valproico sobre a metilação do DNA durante o ciclo celular de células HeLa / Marina Amorim Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Maria Luiza Silveira Mello.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido valproico. 2. Metilação de DNA. 3. Ciclo celular. 4. Células HeLa. I. Mello, Maria Luiza Silveira, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Valproic acid effects on DNA methylation during the cell cycle of HeLa cells

Palavras-chave em inglês:

Valproic acid
DNA methylation
Cell cycle
HeLa cells

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Maurício Machaim Franco

Roger Frigério Castilho

Data de defesa: 22-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 22 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Prof. Dr. Roger Frigério Castilho

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Every difficulty in life presents us with an opportunity to turn inward and to invoke our own submerged inner resources. The trials we endure can and should introduce us to our strengths.” — Epictetus

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha grande amiga Eliane, que me apoiou e incentivou o meu ingresso na pós-graduação desta Instituição de Ensino e Pesquisa.

Agradecimentos

A CAPES (1648323), pela concessão de Bolsa de Mestrado, à FAPESP (Proc.2015/10536-2) e ao CNPq (Proc. 304668/2014-1) pelos auxílios financeiros imprescindíveis para a realização do presente trabalho.

Aos meus pais, por todo apoio e compreensão, oferecidos durante a elaboração desta pesquisa, bem como ao longo do curso. Mãe, amor incondicional, agradeço por todo amor, carinho e dedicação.

A minha família: irmãs (Mariane e Mayara), primos, tios, avós pelos momentos compartilhados com palavras, conselhos, carinho e principalmente pela torcida. A família Moitinho pelos encontros alegres, por toda energia que vocês transmitem, em especial a Srº Gerson e a Srª Hanako obrigada por todo carinho.

Sou infinitamente grata a minha amiga Eliane, que esteve presente durante toda essa etapa me incentivando, apoiando, ajudando e sempre acreditando. Obrigada Lili por toda disponibilidade, preocupação, paciência e carinho, você é especial. A Alex Vieira pela amizade, companheirismo e por poder contar sempre com você.

A minha orientadora Profª. Drª. Maria Luiza Silveira Mello, pela confiança, acolhida, ensinamentos e por acreditar no trabalho a ser desenvolvido, além da sua total dedicação a qual foi essencial para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo privilégio de conviver diariamente com um renomado cientista que tanto contribui para com a ciência.

A Profa. Drª. Maria Silvia Viccari Gatti pelo suporte, principalmente no que se refere a cultura celular, se mostrando sempre presente e preocupada com nosso aprimoramento, além de nos fornecer a estrutura para o cultivo celular. Agradeço ainda ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite por disponibilizar o espaço de cultura de células em seu laboratório quando foi necessário.

Aos professores que permitiram a utilização de equipamentos e/ou itens necessários para a efetivação dos experimentos: Prof. Dr. Alessandro dos Santos Farias, Prof. Dr. Edson Pimentel, Prof. Dr. Hernandes Carvalho, Prof. Dr. Jose Luiz Proenca Modena, Profª. Drª. Luciana Bolsoni Lourenço, Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus, Profª. Drª. Mary Anne Heidi Dolder, Profª. Drª. Shirlei M. Recco-Pimentel.

Aos núcleos de pesquisa, que não somente disponibilizaram os equipamentos para realização da pesquisa, mas também pelos profissionais qualificados com objetivo de oferecer os melhores serviços. No Hemocentro, à Irene Pereira dos Santos, pelo auxílio com as análises do ciclo celular; no LACTAD, ao Felipe Franco da Rocha e à Janine Schincariol Sabino, que compartilharam seus conhecimentos da citometria de fluxo e confocal.

Aos amigos, pelo companheirismo diário no laboratório e por compartilhar os conhecimentos e os diversos momentos serenos e/ou apreensivos: Camila Borges, Carlos Imperador, Eli Heber, Ana Lúcia Soledade, Ana Paula Moraes, Daniel Teixeira, Guilherme Milanez, Mariene Amorim, Marina Felisbino, Thiago Alves, Vinícius Boldrini. Em especial à Giovana Veronezi, pela sua disponibilidade em dividir suas experiências e por muito contribuir com a minha formação.

Agradeço aos membros da banca examinadora, ao Dr. Maurício Machaim Franco e ao Dr. Roger Frigério Castilho pelas sugestões e contribuições que se fizeram necessárias para a finalização da dissertação.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

1. Resumo

O ácido valproico (VPA), fármaco largamente utilizado como anticonvulsivo, é conhecido como inibidor de deacetilases de histonas, além de exercer outros efeitos ao nível do DNA e de histonas. Em células HeLa, o processo de demetilação de citosinas modificadas do DNA, induzido pelo VPA, é matéria de discussão, se por via ativa, com participação de enzimas da família das *ten-eleven-translocation* (TET), ou por via passiva (dependente da replicação do DNA), por inibição de DNA metiltransferases (DNMTs). No presente estudo, este processo foi investigado ao longo do ciclo celular de células HeLa sincronizadas ou não, tratadas com VPA 1 mM e 20 mM por 4 h e comparado ao de células tratadas com um agente geralmente utilizado como controle de demetilação passiva do DNA (5-aza-2'-deoxicitidina 5 µM por 28 h). Em células não sincronizadas, tratadas com VPA e 5-aza-CdR o estudo da progressão do ciclo celular e dos níveis de 5-metilcitosina (5mC) foram investigados por citometria de fluxo. Para células sincronizadas com lovastatina e/ou ácido mevalônico, tratadas com as drogas e coletadas na fase G1 e S, os níveis de metilação do DNA foram avaliados por citometria de fluxo, ELISA e imunofluorescência. Referentes aos derivados de 5mC avaliou-se a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) por citometria de fluxo, já os ensaios de imunofluorescência foram utilizados para detectar além dos níveis de 5hmC, a 5-carboxilcitosina (5caC) e a 5-formilcitosina (5fC). Os níveis de expressão gênica da DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e de enzimas da família das TET, TET1 e TET2 foram estudados por qPCR. Nas condições experimentais utilizadas, os tratamentos com VPA e 5-aza-CdR não induziram citotoxicidade, avaliada por MTT, porém afetaram a progressão do ciclo celular. Conclui-se que o VPA atua na demetilação do DNA predominantemente por via ativa, pois induz aumento da expressão de TET1 e TET2, diminuição na abundância de 5mC, bem como aumento na abundância de 5hmC, tanto em células paradas em G1 como em células proliferativas. Contudo, como o VPA afetou o perfil de expressão de DNMT1, sugere-se que possa também atuar na via passiva da demetilação do DNA. Por outro lado, embora a 5-aza-CdR reduza a expressão de DNMT1, na dependência das células estarem replicando o conteúdo de DNA e não afeta a expressão de TET1 e TET2 em nenhuma das fases do ciclo celular, ela induz aumento na abundância de 5hmC. Tal achado indica que a 5-aza-CdR possa atuar também na via ativa de demetilação do DNA, possivelmente induzindo o recrutamento das TETs ao DNA. Quanto às marcas de 5caC e 5fC, não se detectou efeito induzido pelos tratamentos com VPA ou com a 5-aza-CdR. Desde que o VPA pode reduzir os padrões de metilação do DNA de células HeLa replicantes e não

replicantes de maneira dose-dependente salienta-se uma importante implicação potencial de seu uso para a reversão terapêutica da metilação do DNA em tecido nos quais não haja mais participação do processo de divisão celular.

2. Abstract

Valproic acid (VPA), a drug widely prescribed as an anticonvulsant, is known as a histone deacetylase inhibitor besides exerting other effects at the DNA and histone levels. In HeLa cells, the VPA-induced DNA demethylation process involving modified cytosines is still a matter of discussion, if by an active pathway, with the participation of ten-eleven-translocation (TET) enzymes, or by a DNA replication-dependent passive pathway, with inhibition of DNA methyltransferases (DNMTs). In the present study, this process was investigated throughout the cell cycle of synchronized and non-synchronized HeLa cells treated with 1 mM and 20 mM VPA for 4 h and compared to the cell cycle of cells treated with an agent generally used as a control of passive DNA demethylation (5-aza-CdR 5 μ M for 28 h). In VPA- and 5-aza-CdR-treated non-synchronized cells, the cell cycle progression and the 5-methylcytosine levels (5mC) were investigated using flow cytometry. For cells synchronized with lovastatin and/or mevalonic acid, followed by treatment with the drugs and collected in the G1 and S phases, the DNA methylation levels were evaluated using flow cytometry, ELISA and immunocytochemistry. The 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) derivative was evaluated using flow cytometry; 5-carboxylcytosine (5caC) and 5-formylcytosine (5fC) were also investigated, using immunocytochemistry. Real-time quantitative PCR was performed to access information regarding gene expression levels of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and enzymes of the TET family (TET1 and TET2). Under present experimental conditions, the VPA and 5-aza-CdR treatments did not induce cytotoxicity, as evaluated by the MTT assay, but affected the progression of the cell cycle. It is concluded that in HeLa cells, VPA acts predominantly on the DNA demethylation process through the active pathway, because it induces TET1 and TET2 gene overexpression, a decrease in the 5mC abundance, as well as an increase in the 5hmC abundance, either in G1 cells or in proliferative cells. However, since VPA also affected the expression profile of DNMT1, it is assumed that it may also act in the passive DNA demethylation pathway. On the other hand, although 5-aza-CdR reduces the DNMT1 gene expression, depending on whether the cells are replicating their DNA content, and does not affect the gene expression of TET1 and TET2 at any stage of the cell cycle, it induces an increase in the abundance of 5hmC. This finding indicates that 5-aza-CdR may also act in the active pathway of DNA demethylation, possibly inducing the recruitment of TETs to DNA. Regarding the 5CaC and 5fC tags, no detectable effect was induced by the VPA or the

5-aza-CdR treatments. Because VPA can reduce the DNA methylation patterns of non-replicating HeLa cells in a dose-dependent manner, a significant potential implication of its use is suggested for the therapeutic reversal of DNA methylation in tissues where no further participation of the process of cell division occurs.

3. Lista de Abreviaturas

5-aza-CR – 5-azacitidina
5-aza-CdR – 5-aza-2'-deoxicitidina
5caC – 5-carboxilcitosina
5fC – 5-formilcitosina
5hmC – 5-hidroximetilcitosina
5hmU – 5-hidroxiuracil
5mC – 5-metilcitosina
AID – activation-induced deaminase
APOBEC – apolipoprotein
B mRNA-editing enzyme complex
BER – reparo por excisão de base
BrdU- 5-bromo-2'-deoxyuridine
CpG – citosina-fosfato-guanina
DNMT1 – DNA metiltransferase 1
DNMT3A – DNA metiltransferase 3A
DNMT3B – DNA metiltransferase 3B
FDA – Food and Drug Administration
HDAC – deacetilase de histona
HEK239- Human Embryonic Kidney 293 cells
SAM - S-adenosil metionina
TET – ten-eleven translocation
TET1 – ten-eleven translocation 1
TET2 – ten-eleven translocation 2
TET3 – ten-eleven translocation 3
TDG - thymidine DNA glycosilase
VPA – ácido valproico

4. Sumário

5. Introdução	16
5.1 Cromatina: Fundamentos.....	16
5.2 Epigenética e Cromatina.....	17
5.2.1 <i>Metilação do DNA</i>	18
5.2.2 <i>Processos demetilantes no DNA</i>	20
5.2.3 <i>Mecanismos de regulação da metilação do DNA modulados por drogas e o papel do ácido valproico (VPA).</i>	22
5.3 Influências do VPA no ciclo celular.....	25
5.4 Sincronização para o estudo de Ciclo Celular	25
5.5 Células HeLa como modelo de estudo	26
6. Objetivos	28
7. Materiais e Métodos	29
7.1 Cultura celular.....	29
7.2 Determinação da concentração da lovastatina e do Ácido Mevalônico para sincronização do ciclo celular.....	29
7.3 Sincronização para obtenção das células nas fases de G1 e S.....	30
7.4 Tratamentos com VPA e 5-aza-CdR	30
7.5 Ensaio MTT de citotoxicidade.....	31
7.6 Citometria de fluxo	31
7.7 Quantificação de 5-metilcitosina (5mC).....	33
7.8 Ensaio de Imunofluorescência para 5mC, 5hmC, 5caC e 5fC.....	34
7.9 PCR em tempo real quantitativo para DNMT1 E TETs.....	35
8. Resultados	36
8.1 Sensibilidade das células HeLa aos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR.....	36

8.2 Determinação da concentração de lovastatina necessária para inibição da síntese de DNA a partir do ensaio de viabilidade celular e análise das fases do ciclo celular em células HeLa	36
8.3 Determinação da duração de tratamento com ácido mevalônico para promoção da sincronização de células com maior porcentagem na fase S.	38
8.4 Distribuição das fases do ciclo celular após tratamento das células HeLa com VPA e 5-aza-CdR	39
8.5 Conteúdo de 5mC ao longo do ciclo celular difere após tratamento das células HeLa com VPA e 5-aza-CdR	41
8.6 VPA e 5-aza-CdR induzem demetilação do DNA em diferentes etapas do ciclo, em células HeLa sincronizadas.....	41
8.7 Os níveis de transcritos para os genes envolvidos nas vias de metilação e demetilação da citosina do DNA foi afetado pelo VPA e pela 5-aza-CdR em diferentes momentos do ciclo celular.....	43
8.8 Os níveis da abundância de 5-metilcitosina (5mC) diminuíram em células HeLa sincronizadas, coletadas na fase G1 e S após o tratamento com VPA, evidenciados em imunofluorescência.....	45
8.9 VPA e 5-aza-CdR induzem aumento nos níveis de 5hmC quando consideradas diferentes fases do ciclo celular de células HeLa sincronizadas	47
8.9.1 VPA e 5-aza-CdR não provocam mudanças visivelmente detectáveis na abundância de 5fC e 5caC	49
9. Discussão	50
10. Conclusões	57
11. Referências Bibliográficas	58
11. Anexos.....	67

5. Introdução

5.1 Cromatina: Fundamentos

Nos organismos eucariotos, o patrimônio genético contido no DNA nuclear integra um complexo nucleoproteico, compondo a cromatina. Ao DNA se associam proteínas básicas de alto ponto isoelétrico – as histonas – e proteínas não histônicas. A esse complexo podem ainda se associar moléculas de RNA. A cromatina é, pois, “a sede do armazenamento, transmissão e expressão das informações do patrimônio genético contido no DNA nuclear” (Mello & Vidal 2013).

No DNA residem as informações genéticas da célula, sendo ele seu vetor nas várias gerações celulares. Segundo o modelo clássico de Watson e Crick o DNA, na sua configuração B, é uma macromolécula composta por duas cadeias helicoidais de polinucleotídeos complementares associadas por ligações de hidrogênio entre suas bases nitrogenadas. Esta macromolécula tem 20 Å de espessura e 5 pares de bases por passo da hélice que gira para a direita ao redor de um eixo central imaginário. As bases nitrogenadas do DNA são purinas [guanina (G) e adenina (A)] e pirimidinas [citosina (C) e timina (T)]. Uma vez que a C pode se apresentar metilada (5-metil-citosina), esta é frequentemente considerada como um tipo adicional de base nitrogenada do DNA.

As histonas são classificadas em cinco tipos principais, com base em seu teor em resíduos de lisina e arginina, sendo elas H1 (muito rica em lisina), H2A e H2B (moderadamente ricas em lisina) e H3 e H4 (ricas em arginina). As histonas, por se ligarem ao DNA e eventualmente entre si, funcionam no empacotamento da cromatina, e conseqüentemente na regulação da expressão gênica (Alberts et al. 2015, Mello & Vidal 2013 - revisão).

As proteínas não histônicas englobam enzimas e proteínas estruturais cujo número atinge algumas centenas, e participam dos processos de transcrição, replicação e reparo do DNA, regulação da atividade gênica e remodelação estrutural da cromatina (Mello & Vidal 2013 – revisão).

Em termos estruturais, a cromatina assume níveis hierárquicos de condensação. O nível mais fundamental consiste na formação do nucleofilamento, com 10 nm de espessura, e no qual se detecta a unidade estrutural da cromatina, o nucleossomo. Este é constituído por uma seqüência de nucleoides contendo cada um 147 pares de bases de DNA envolvendo um octâmero de histonas (2 moléculas de H2A, H2B, H3 e H4) e que são separadas entre si por um DNA espaçador com número variável de pb. A histona H1 se posiciona lateralmente no

nucleoide, ligando-se ao DNA espaçador. Para alguns autores o conceito de nucleossomo envolve o nucleoide mais o DNA espaçador e a participação de uma molécula de H1. Para outros, se considerar a participação de H1, a unidade cromatínica deveria se denominar cromatossomo (Van Holde et al. 1995).

O nível hierárquico organizacional subsequente da cromatina é o solenoide, com 20-30 nm de espessura, no qual o nucleofilamento adquire uma distribuição helicoidal com 5 a 6 unidades repetitivas da cromatina por giro de hélice. Os níveis superiores seguintes de organização da cromatina envolvem a formação de alças, dobraduras, domínios e territórios. Em células em divisão, a unidade cromatínica mais empacotada é identificada como o cromossomo (Alberts et al. 2015 – revisão).

Nas histonas H3 e H4, principalmente, suas caudas N-terminais se projetam para o exterior da estrutura do nucleossomo, formando superfícies ideais para modificações covalentes que podem levar a alteração na compactação da cromatina e ao recrutamento de reguladores transcricionais, modulando a expressão gênica de diversas maneiras (Khorasanizadeh 2004, Alberts et al. 2015).

5.2 *Epigenética e Cromatina*

Desde longo tempo vem sendo constatado que tecidos com o mesmo genótipo possam vir a apresentar diferentes fenótipos sem que haja mutação no DNA e que tais fenótipos possam persistir por diversas gerações. Este tipo de fenômeno é abordado no campo de conhecimento da Epigenética. Além disso, a epigenética está envolvida em vários processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, neurogênese e renovação de células adultas (Sadakierska- Chudy & Filip 2015).

O embriologista e geneticista Conrad Waddington foi o primeiro a definir o campo da Epigenética em 1942, referindo-se como o ramo da Biologia que estudaria os “mecanismos causais” pelos quais os genes provocam efeitos fenotípicos, uma vez que estudos no campo da Genética, até então, assumiam que alterações no genótipo desencadeariam mudanças no fenótipo, mas não eram estudados os mecanismos envolvidos nesse processo.

O interesse na Epigenética, bem como o uso desse termo, aumentou significativamente desde então (Deans & Maggert 2015). Em 2006, mais de 2500 artigos relacionados à Epigenética foram publicados (Bird 2007). No entanto, em 2013, este número aumentou para mais de 17 mil, com 45 novas publicações diárias. Atualmente, conceitos epigenéticos se espalharam em campos que não abordam rotineiramente a Genética, como

Ecologia (Burriss & Baccarelli 2013), Fisiologia (Ho & Burggren 2009) e Psicologia (Ngun & Vilain 2014).

Segundo Wu & Morris (2001), a Epigenética estuda mudanças reversíveis na expressão e silenciamento gênicos que não envolvem alterações na sequência de bases do DNA e que fornecem uma “memória” celular. Esta extrapola o potencial de informação do código genético do DNA, podendo ser herdável por mitose ou meiose.

Outras propostas de definição deste campo de conhecimento vêm sendo apresentados ao longo do tempo. Em 2008, durante uma reunião científica no Cold Spring Harbor Laboratory nos USA, foi proposta a definição de Epigenética como envolvendo “mudanças herdáveis que possam afetar a expressão gênica sem serem causadas por alteração no próprio DNA” (Berger 2009).

Existem duas propostas para a função mecanicista dessas modificações. Uma se refere a uma alteração diretamente na cromatina, sendo responsável por abrir ou fechar o polímero de DNA, e controlar assim o acesso de proteínas de ligação ao DNA, tais como fatores de transcrição. A outra é que as modificações no DNA podem alterar a superfície dos nucleossomos, promovendo a associação da cromatina com outras proteínas (Golson & Kaestner 2017).

Alterações epigenéticas possibilitam modificações na cromatina. As principais delas se referem à metilação do DNA, modificações pós-traducionais nas histonas (acetilações, deacetilações, metilações, dentre outras), variantes de histonas e mecanismos mediados por RNAs não codificantes, como RNAs de interferência. Estes últimos podem levar ao recrutamento de complexos proteicos que regulam a transcrição (Berger 2007).

No presente trabalho sobre modificações epigenéticas, nos limitaremos a comentar abaixo sobre o processo de metilação/demetilação do DNA.

5.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma das principais e mais bem estudadas modificações epigenéticas que ocorrem no genoma, além de estar entre os mecanismos epigenéticos mais clássicos em vertebrados. Fundamental para o controle da estrutura cromatínica e da expressão gênica em células de mamíferos, consiste na adição de um grupamento metil predominantemente na posição 5 de uma base nitrogenada citosina presente em uma sequência de dinucleotídeos CpG (citosina-fosfato-guanina) com a participação da S-adenosil metionina (SAM) como doadora do grupo metil. Tal processo resulta na formação da 5-metilcitosina

(5mC) e é catalisado por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Reik et al. 2001, Lötsch et al. 2013). Embora a metilação ocorra principalmente na citosina em um local de CpG, existem relatos de metilação de DNA fora dessa região, o qual é prevalente em células-tronco pluripotentes, cérebro e oócitos (Shirane et al. 2013)

Os padrões de DNA metilado são estabelecidos em momentos-chave do desenvolvimento embrionário (exceto nos genes que sofrem *imprint*) com participação essencial das DNMTs 3A e 3B. Estas enzimas são responsáveis pela metilação *de novo*, ou seja, a adição de grupamentos metil em regiões de citosinas ainda não modificadas (Okano et al. 1999). Uma vez estabelecidos os padrões de metilação do DNA, imaginou-se por muito tempo que estes seriam mantidos estáveis ao longo das divisões celulares, o que seria possível pela ação da enzima de manutenção DNMT1 (Razin & Shemer 1995).

Associada à forquilha de replicação do DNA, a DNMT1 promove a metilação do ácido nucleico concomitante ao seu processo de duplicação. Esta enzima possui afinidade por fitas hemimetiladas de DNA e realiza a formação de 5mC na nova fita, de acordo com o padrão de citosinas metiladas da fita de DNA parental. Isso impediria a introdução de novos pontos de metilação ou a perda de resíduos metil em células maduras durante as divisões celulares (Araujo et al. 1998, Goll & Bestor 2005).

Existe uma relação bilateral entre os níveis de DNMTs e o ciclo celular, uma vez que sua atividade é amplamente regulada ao longo do ciclo celular, além disso tal regulação encontrar-se alterada em células transformadas (Szyf 2001).

Caso o padrão de metilação do DNA fosse acuradamente copiado ao longo da divisão celular, ele permaneceria imutável nas diferentes fases de um ciclo celular e nenhuma perda seria notada, uma vez completada a síntese de DNA. No entanto, Brown e colaboradores (2007) desafiaram essa visão ao provar que os níveis de metilação do DNA em células HeLa e MRHF variam de acordo com a progressão do ciclo celular, com hipometilação na fase G1. Outro trabalho apresentou ainda uma diminuição no nível de trimetilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) antes da entrada na fase G1 do ciclo celular (McManus et al. 2006).

A marca epigenética H3K9me3, assim como a metilação do DNA, é muito frequente na heterocromatina. Sugere-se, então, que exista uma mudança global do perfil epigenético das células ao longo do ciclo celular, particularmente com hipometilação tanto de DNA quanto de histonas antes do reinício do ciclo. Por outro lado, um estudo mais recente, não mostrou diferenças na proporção de marcação de citosina metilada em relação ao conteúdo de DNA entre as fases G1 e S, mas identificou um atraso no início de G2/M antes que os níveis máximos de 5mC fossem observados (Desjobert et al. 2015).

Em outro trabalho recente, em que foram utilizadas culturas primárias de fibroblastos em passagens iniciais, foi relatado não haver mudança no padrão global de metilação de DNA em escala genômica entre as fases G1 e G2 do ciclo celular; porém a fase S não foi avaliada (Vandiver et al. 2015). Foi argumentado que as células usadas para esse estudo eram menos proliferativas do que as de linhagens celulares, sendo possível que mudanças dependentes do ciclo celular ocorressem em outros tipos celulares. Dessa forma, a extensão das mudanças no padrão de metilação do DNA ao longo das fases do ciclo celular é ainda pouco conclusiva, com dados aparentemente contraditórios.

5.2.2 Processos demetilantes no DNA

Pesquisas mostram que, sob circunstâncias específicas, a metilação do DNA possa estar sujeita a mudanças dinâmicas. Entretanto, apesar da promoção de metilação pelas DNA metiltransferases serem bem caracterizadas, a perda de metilação do DNA, ou a demetilação do DNA, não está clara, uma vez que o mecanismo molecular envolvido é mal compreendido e controverso. Esse mecanismo tem sido estudado em diferentes contextos biológicos e sabe-se que essa alteração pode ocorrer de forma ativa ou passiva (He et al. 2011, Kohli & Zhang 2013, Weber 2016). A inibição de DNMTs durante a replicação do DNA foi proposta como mecanismo responsável por reduzir no genoma os níveis de 5mC. Sem a sua atuação, as novas fitas de DNA não recebem o padrão de metilação da fita parental, resultando em um mecanismo passivo, com diminuição dos níveis de 5mC e dependente da replicação do DNA (Niehrs 2009).

Outro caminho de demetilação de DNA é também conhecido; trata-se da chamada via ativa, que envolve enzimas da família *ten-eleven translocation* (TET). A descrição inicial da sua atividade enzimática em promover hidroxilação foi descoberta em 2009. Desde então ela tornou-se um foco de grande interesse, uma vez que sua descoberta indicou várias vias quimicamente plausíveis para a reversão da metilação do DNA e promoveu grandes avanços para compreensão desse mecanismo (Pastor et al. 2013).

As três proteínas TETs de mamíferos são nomeadas como: TET1, TET2 e TET3; elas oxidam sucessivamente 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), as quais são referidas como intermediários do processo de demetilação do DNA (Ito et al. 2011, Wu & Zhung 2011). Todas as três formas de metilcitosina oxidadas são conhecidas por estarem presentes em vários tecidos de mamíferos, além de serem dioxigenases dependentes de Fe²⁺ e 2-oxoglutarato (Weber 2016).

Em relação aos mecanismos ativos, 5fC e 5caC podem ser removidas pela enzima *thymidine DNA glycosilase* (TDG) e podem seguir para o mecanismo de reparo do DNA por excisão de base (BER), que é capaz de adicionar uma citosina no sítio básico, completando o processo de demetilação, embora este mecanismo não funcione em tipos celulares específicos durante o desenvolvimento (He et al. 2011). Devido à existência desses mecanismos enzimáticos para remoção de 5fC e 5caC, estudos justificam parte dos motivos dos níveis desses dois intermediários se apresentarem baixos quando comparados com 5hmC em células de mamíferos (Ito et al. 2011).

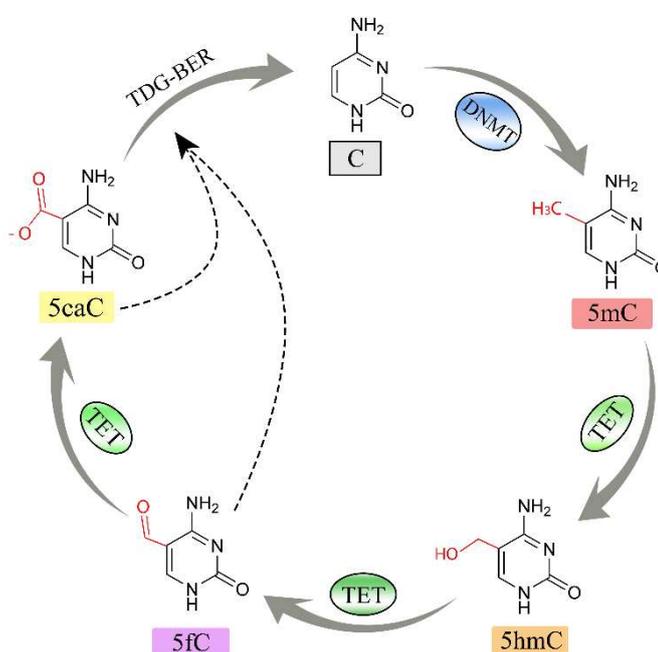


Figura 1. Ciclo de modificação dinâmica da citosina no DNA. A conversão da citosina em 5mC é introduzida pela DNA metiltransferase (DNMT). Enzimas da família ten-eleven-translocation (TET) podem oxidar 5mC em 5hmC, 5fC e 5caC. Os intermediários 5caC e 5fC podem ser removidos pela *thymidine DNA glycosilase* (TDG), gerando um sítio abásico onde será incorporada uma citosina pelo mecanismo de BER. Esquema modificado de Kohli & Zhang (2013).

Existem outros mecanismos propostos de demetilação, embora sejam menos bem esclarecidos. Um deles é caracterizado pela deaminação da 5hmC por enzimas da família AID (*activation-induced deaminase*) e APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*). Nesse caso, as enzimas AID desaminam as bases citosina no DNA produzindo a 5-hidroxiuracil (5hmU). Esta, por sua vez, é removida pela *single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1* (SMUG1) ou por TDGs para a inserção da citosina pelo mesmo mecanismo de reparo da BER (Guo et al. 2011, Pastor et al. 2013).

Embora a demetilação de DNA passiva seja geralmente compreendida e aceita, a evidência de demetilação de DNA ativa e como esse processo ocorre, é controversa (Kohli & Zhang 2013). É importante salientar que essas duas vias não acontecem de forma independentes; na verdade, podem ocorrer interações entre elas, como será reportado mais à frente. Há relatos de que algumas drogas atuem tanto na via ativa com a redução de 5mC correlacionada com a diminuição de DNMT1 (passiva), assim como promovendo um aumento na expressão de alguns dos intermediários da via ativa.

5.2.3 Mecanismos de regulação da metilação do DNA modulados por drogas e o papel do ácido valproico (VPA).

Uma variedade de relatos demonstram que drogas possam induzir alterações nos padrões de metilação do DNA ou de modificações pós-traducionais de histonas. A descoberta de que a 5-azacitidina (5-aza-CR) se incorpora ao DNA e, quando presente neste, inibe a sua metilação, levou a um uso generalizado dessa droga e da 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR) para demonstrar a correlação entre perda de metilação em regiões específicas de genes e ativação dos genes associados. Entretanto, a 5-aza-CdR é incorporada apenas ao DNA, enquanto a 5-aza-CR pode ser adicionada também aos diferentes tipos de RNA e, com isso, interferir na síntese proteica (Christman et al. 2002).

Tanto a 5-aza-CR como a 5-aza-CdR estão envolvidas na reativação de genes supressores de tumores, silenciados pela metilação do promotor, e proporcionam uma abordagem alternativa na terapia do câncer (Ghoshal et al. 2005). Atualmente, essas drogas são aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como terapêuticos em leucemia (Derissen et al. 2013, Kim et al. 2016).

Foi descoberto que a DNMT1 liga-se irreversivelmente a estes compostos, perdendo sua atividade catalítica; portanto a 5-aza-CR e a 5-aza-CdR foram consideradas como agentes clássicos de demetilação passiva do DNA (Ghoshal et al. 2005, Datta et al. 2009). No entanto, a via de demetilação por ação desses compostos não está ainda totalmente estabelecida. Alguns trabalhos recentes apontam que tais compostos possam atuar também por outro mecanismo, o qual estaria relacionado à via das proteínas TETs (Sajadian et al. 2015, Manzoni 2016, Veronezi 2017)

De fato, já havia sido comprovado pela primeira vez que a 5-aza-CR seria capaz de desencadear um processo de demetilação ativa dependente de TET2 com mudanças significativas nos intermediários 5hmC em carcinoma hepatocelular (Sajadian et al. 2015).

Estudos realizados em linhagens primárias de fibroblastos demonstraram a perda de metilação associada com um aumento tanto de 5fC quanto de 5caC, indicando a capacidade da 5-aza-CR participar de um efeito demetilante ativo, possivelmente mediado através da proteína TET2 (Manzoni 2016).

No que se refere a 5-aza-CdR, em células leucêmicas humanas tratadas com esse composto, constatou-se uma redução nos níveis globais de 5mC, concomitantemente ao aumento nos níveis de 5hmC, 5fC e 5caC. Entretanto, não foi notada qualquer alteração nos níveis e na expressão gênica das TETs (Chowdhury et al. 2015).

Em relação às drogas utilizadas para modular essas marcas epigenéticas, outros compostos, como o ácido valproico (VPA), podem ser considerados. Esta droga, além de exercer modificações da atividade do neurotransmissor inibitório de GABA, dos canais de sódio e de cálcio do tipo-T, atuando como fármaco antiepiléptico clássico, é também um inibidor direto de deacetilases de histonas de classe I, promovendo modificação na estrutura da cromatina quanto da hiperacetilação das caudas N-terminais das histonas H3 e H4 (Göttlicher et al. 2001, Perucca 2002, Lötsch et al. 2013).

O VPA é um ácido graxo simples de cadeia curta que teve sua aplicação terapêutica contra a epilepsia descoberta na década de 60, em estudos que buscavam por anticonvulsivos e usavam o VPA apenas como solvente. Após testes clínicos, teve seu uso aprovado (Lagace et al. 2004). Além disso, o VPA também é um agente terapêutico para enxaquecas e desordens humorais, como a bipolaridade (Chateauvieux et al. 2010).

Mais recentemente, surgiram indicações de que o VPA possa induzir demetilação do DNA, concomitante à hiperacetilação de histonas, em células HEK293 (Detich et al. 2003, Milutinovic et al. 2007), em cérebro de rato (Dong et al. 2010, Wang et al. 2010), e em células HeLa (Veronezi et al. 2017), embora isso não aconteça em linhagens celulares linfoblastoides (Tabolacci et al. 2008) ou em embriões de camundongo (Tung & Winn 2010).

No caso de células HeLa, o VPA induz não apenas acetilação de histonas e remodelação cromatínica (Felisbino et al. 2011), mas também demetilação do DNA (Veronezi et al. 2017). Enquanto a indução de acetilação de histonas é uma marca muito dinâmica, de menor estabilidade que outras marcas epigenéticas, acredita-se que a demetilação de DNA traga consequências mais prolongadas para o programa de regulação da expressão do genoma (Jiang et al. 2012). Esses achados trazem melhor conhecimento sobre processos de atuação de uma droga cujo uso vem se estendendo desde o tratamento de surtos epilépticos a propostas de tratamento de alguns tumores, apresentando efeitos antiproliferativos e anticancerígenos em câncer de ovário e fígado (Jones & Baylin 2002, Bolden et al. 2006, Han et al. 2013).

O caminho metabólico da possível ação de demetilação do DNA induzido pelo VPA em células HeLa, recentemente analisado, é sugestivo de que ocorra de forma ativa, por mecanismos possivelmente relacionados à via das proteínas TETs (Veronezi 2017, Veronezi et al. 2017). No entanto, nesse caso não foram examinadas células sincronizadas nem foram feitas investigações ao longo do ciclo celular.

A fim de investigar qual a via de demetilação do DNA, deveriam ser realizadas análises que permitissem um acompanhamento das células em divisão ou em células não proliferativas, mediante tratamentos com agentes demetilantes, uma vez que a demetilação de resíduos de 5mC pode ocorrer por um mecanismo ativo ou um mecanismo passivo envolvendo replicação de DNA.

Um acompanhamento dessas duas possibilidades foi empreendido no trabalho de Barreto et al. (2007), no qual se investigou a via de demetilação promovida pelos agentes demetiladores: Gadd45a (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha*), uma proteína nuclear, e a 5-aza-CdR. Foi concluído que em células HEK293 em divisão tratadas com 5-aza-CdR ocorria uma redução de 5mC, porém não em células não proliferantes, um indicativo de que o processo envolvido seja o de demetilação passiva. No entanto, quando foi utilizado o Gadd45a, também em células HEK293, houve demetilação de DNA tanto em células replicativas como as que não estão em proliferação, comprovando uma demetilação não dependente da replicação celular, ou seja, por via ativa.

Além de ter sido comprovada a redução da 5mC promovida pela Gadd45a em células não-proliferantes, essa redução também foi constatada em oócitos na ausência de replicação de DNA, comprovando, mais uma vez, a promoção de demetilação ativa (Simonsson & Gurdon 2004). A importância de se mencionar tais estudos é com o intuito de reportar a relevância desse tipo de metodologia o qual analisa células proliferativas e não proliferativas a fim de auxiliar na compreensão das vias de demetilação por agentes demetilantes.

Tendo em vista os achados contraditórios dos padrões de demetilação do DNA ao longo do ciclo celular, assim como da atuação e dos níveis de DNMT1, um acompanhamento dos mesmos ao longo das diferentes fases do ciclo celular em células HeLa tratadas com VPA é fundamental para a interpretação dos achados de demetilação e hidroximetilação de DNA, reportados previamente (Veronezi 2017). Além disso, a avaliação dos níveis de 5mC em células sincronizadas em G1 poderia corroborar a hipótese de indução de demetilação ativa pelo VPA, uma vez que pode-se analisar e comparar tais eventos em condições que as células estão replicando o conteúdo de DNA, para isso a marcação com bromo-desoxiuridina (BrdU) permite identificar as células replicativas.

5.3 Influências do VPA no ciclo celular

Muitos compostos e condições fisiológicas são capazes de alterar a progressão do ciclo celular. Algumas drogas de ação epigenética, como os inibidores de HDACs, apresentam tal propriedade (Kim et al. 2000, Finzer et al. 2001).

O VPA é um conhecido inibidor de HDACs com ação antiproliferativa em diversos tipos celulares por induzir principalmente a ocorrência de apoptose e parada do ciclo celular (Catalano et al. 2005, Wu & Guo 2008). Em células leucêmicas tratadas com VPA foi percebida uma desregulação do ciclo celular com as células se tornando paradas nas fases G2 / M e a expressão de ciclinas apresentando-se desregulada com a divisão celular (Jazi et al. 2016).

Embora já foram realizados estudos referentes aos efeitos do VPA na progressão do ciclo celular de células HeLa, os efeitos foram diversos afetando diferentes fases do ciclo a depender do tempo de tratamento ou dose. Em células HeLa tratadas com VPA (1 a 3 mM) por 24 h obteve-se células paradas em G1, entretanto frente a concentração de 10 mM o VPA promoveu parada na fase G2/M (Han et al. 2013). Feng et al. (2016) relata também parada na fase G1 quando as concentrações de VPA foram 1 mM, 2,5 mM e 5 mM por 72 h. Entretanto, com o mesmo tempo de exposição (72 h) com VPA 4 mM Tsai et al. (2013) relataram que as células HeLa ficaram retidas na fase G2/M. Diante desses diferentes efeitos na progressão do ciclo celular em células HeLa tratadas com o VPA, se fez necessário verificar as implicações do VPA na distribuição das fases do ciclo celular com as doses e tempos aqui estudados.

5.4 Sincronização para o estudo de Ciclo Celular

A sincronização das células de mamífero é essencial para investigações que envolvem a proliferação celular, podendo dessa forma obter populações de células sincronizadas, enriquecidas em diferentes fases do ciclo celular (Shen et al. 2013, Keyomarsi 1996). Vários métodos foram desenvolvidos para sincronização. O mais comum é conseguido por privação de soro ou por tratamento com drogas. A privação de soro é um mecanismo bastante utilizado para sincronizar células normais, no entanto, foi demonstrado que em células tumorais ou transformadas a proliferação é relativamente independente da presença de soro ou fatores de crescimento. Como resultado, na maior parte dessas células não cessa a proliferação após privação de soro (Medrano & Pardee, 1980). Além disso, a privação também submete as culturas a longos períodos de incubação na ausência de nutrientes essenciais e fatores de

crescimento, diante disso, as células são metabolicamente desequilibradas (Keyomarsi et al. 1991).

Por outro lado, a inibição da síntese também pode ser conseguida com a Lovastatina, uma vez que ela é utilizada para reter muitos tipos de células na fase G1 do ciclo celular, apresentando algumas vantagens: 1. Essa sincronização não é tóxica para células e pode ser revertida por mevalonato; 2. as substâncias nutricionais e os fatores de crescimento são suficientes, o que pode não causar desordem de metabolismo celular; 3. pode ser usado para alcançar um grande número de células em G1; 4. a sincronização pode ser aplicada repetidamente (Keyomarsi et al. 1991, Kamrani & Keyomarsi 2008, Shen et al. 2013). Além disso, ao testar esse método de sincronização em várias linhagens celulares, incluindo as células normais e tumorais obteve-se resultados bem sucedidos com mínimas perturbações metabólicas (Keyomarsi et al. 1991).

A lovastatina, é um metabólito fúngico isolado a partir de culturas de *Aspergillus terreus*, e é um agente amplamente usado para o tratamento de hipercolesterolemia. Este agente suprime a síntese do ácido mevalônico por competitivamente inibir reversivelmente a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima necessária para a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico. Em adição à inibição da síntese do mevalonato, a lovastatina inibe também a replicação do DNA, e essa replicação é restaurada pela adição de mevalonato, o produto da reação catalisada por HMG-CoA redutase (Larson et al. 1982, Sinensky & Logel 1985, Keyomarsi 1996). O ácido mevalônico é um metabólito crítico necessário para estimular a divisão celular (Larson et al. 1982). A adição de mevalonato para as células tratadas com a lovastatina é necessária para reverter os efeitos da lovastatina nos inibidores de crescimento (Keyomarsi 1996).

5.5 Células HeLa como modelo de estudo

As células HeLa constituem uma linhagem celular originária de um carcinoma cervical da paciente Henrietta Lacks, que veio a falecer em decorrência deste, em 1951. Foi a primeira linhagem celular cancerígenas humanas estabelecida em cultura (Gey et al. 1952). Desde então, estas células humanas se tornaram as mais amplamente utilizadas em pesquisa biológica, contribuindo com inúmeros desenvolvimentos e avanços científicos em imunologia, oncologia, radiação e virologia, entre outras áreas da Medicina moderna. Um dos primeiros

usos das células HeLa foi o de desenvolvimento da vacina contra o vírus da poliomielite (Scherer et al. 1953).

Por outro lado, sabe-se da existência de limitações relacionadas a utilização de linhagens celulares derivadas de câncer humano como modelo biológico, uma vez que suas advertências são bem conhecidas (Gillet et al. 2013, Borrell 2010). No entanto, esforços tem sido realizados para desenvolver protocolo padronizado e banco de dados com pesquisa pública para autenticação dessas linhagens (Barallon et al. 2010). Este é um passo importante para minimizar, se não para erradicar a identificação errada da linha celular.

Em 2013, Landry evidenciou os primeiros relatos de forma detalhada das células HeLa, por caracterização genômica e transcriptômica, revelando seu impacto na expressão gênica e na função celular. A segmentação do genoma de acordo com o seu número de cópias revelou um nível alto de aneuploidia e numerosas variantes estruturais, que pode ter sido desencadado a partir da própria carcinogênese (Maher & Wilson 2012). Ao ser analisado o perfil de expressão gênica dessa linhagem celular, várias vias, incluindo-se o ciclo celular e o reparo do DNA, exibiram padrões de expressão diferentes daqueles dos tecidos humanos normais. No entanto, é importante ressaltar que desde 1988, aberrações cromossômicas substanciais já haviam sido revelados em células HeLa por métodos citogenéticos (Landry 2013).

Estudos como os mencionados acima, que fornecem descrição detalhada do genoma de uma linhagem HeLa, permitem que pesquisadores possam trabalhar com várias dessas linhagens garantindo a qualidade das informações biológicas derivadas dessas células. Além das células HeLa serem utilizadas em estudos principalmente na área de biologia celular e molecular humana (Skloot 2010), são também usadas em abordagens de expressão gênica baseadas em *microarray*, para investigar respostas ao meio ambiente e perturbações genéticas (Murray et al. 2004, Jaluria et al. 2007, Hnilicová et al. 2011). Skloot (2010) relata ainda que há células HeLa cultivadas até mesmo na Estação Espacial Internacional que orbita nosso planeta.

Portanto, as células HeLa continuam a ser um dos recursos bastante utilizados para estudos biológicos que necessitam de células humanas de origem tumoral. Neste contexto, a utilização desta linhagem celular se fez necessária pelo fato de que estudos propõem o VPA como sendo utilizado para tratamento de alguns tumores, podendo atuar ainda na retirada de grupos metil do DNA, o que já foi comprovado nessas células. Desta forma, se tornou importante entender detalhadamente qual mecanismo de ação dessa droga nessa linhagem celular.

6. Objetivos

1. Avaliar as frequências das fases de um ciclo celular de células HeLa, bem como entender a extensão das mudanças no padrão de metilação do seu DNA ao longo dessas fases com o tratamento pelo VPA.

2. Verificar se as mudanças promovidas pelo VPA ocorreriam somente nas células que estão replicando o conteúdo de DNA, com decréscimo da participação da DNMT1 (via passiva) ou se aconteceriam independentemente da proliferação, em condições em que as células estejam com o ciclo celular parado em G1, com participação das enzimas TETs e intermediários de demetilação da 5mC (via ativa).

7. Materiais e Métodos

7.1 Cultura celular

Células HeLa obtidas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil) na passagem 126, foram originalmente adquiridas da ATCC CCL-2 (Manassas, USA) e foram utilizadas neste trabalho nas passagens 210-230. Foram elas cultivadas em meio DMEM (Sigma®, St. Louis, USA) suplementado com soro fetal bovino (FCS) a 10% (Cultilab®, Campinas, Brasil) e penicilina-estreptomicina a 1% (Sigma®, 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente) sob atmosfera a 5% de CO₂ a 37°C.

Para a análise de imunofluorescência, as células foram semeadas em placas de 24 *wells* sobre lamínulas redondas na concentração de 5×10^4 células/mL. Para a extração de DNA e RNA e para citometria de fluxo as células foram cultivadas a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL em placas de 6 *wells*. Para o teste de citotoxicidade com ensaio MTT o cultivo celular foi feito em placas de 96 *wells* cuja concentração foi de 2×10^5 células /mL.

Após o cultivo por 24 h em meio com FCS a 10%, as células não sincronizadas receberam os devidos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR ou foram sincronizadas em ensaios separados, tratadas com as drogas e então coletadas nas fases G1 e S .

7.2 Determinação da concentração da lovastatina e do Ácido Mevalônico para sincronização do ciclo celular

Ensaio preliminares foram realizados a partir de adaptações aos protocolos de Keyomarsi (1991), Baldin et al. (1995) Keyomarsi (1996), Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi (2008) e Ma & Poon (2011), utilizando-se lovastatina (Sigma ®) e ácido mevalônico (Santa Cruz Biotechnology®, Dallas, Texas, USA), a fim de se estabelecer quais os tempos e concentrações propostos por tais autores seriam ideais para se obter as células nas fases desejadas e realizar tratamentos posteriores, sem que ocorresse citotoxicidade.

Primeiramente, verificou-se por ensaio de MTT, se as concentrações de lovastatina (20 µM, 30 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM), propostas na literatura para promover a parada de 80% das células HeLa na fase G1, seriam citotóxicas para a célula. Após essa verificação, seguiu-se com o cultivo e na sequência foi adicionado meio (FCS) a 1% contendo lovastatina em diferentes concentrações não citotóxicas (20 µM, 30 µM, 40 µM, 60 µM), por 24 h. Em seguida,

o meio foi aspirado e lavou-se as células duas vezes com PBS. Elas foram então coletadas e avaliadas por citometria de fluxo para determinar o seu conteúdo de DNA.

Após a escolha da concentração ideal de lovastatina, as células foram tratadas como descrito anteriormente e após as 24 h de tratamento com a lovastatina (20 μ M) o meio foi aspirado, lavou-se então as células duas vezes com PBS e adicionou-se meio fresco DMEM (FCS 10%) suplementado com ácido mevalônico 6 mM. As células foram colhidas em incrementos de tempo de 4 h após a adição do ácido mevalônico (até 2 vezes o tempo de duplicação) e a taxa de síntese do DNA foi medida por citometria de fluxo, a fim de verificar qual dos tempos seria ideal para fornecer o maior número de células na fase S.

7.3 Sincronização para obtenção das células nas fases de G1 e S

A partir da determinação da concentração ideal para que o ciclo celular fosse parado em G1, as células foram plaqueadas inicialmente e logo depois cultivadas em meio FCS fresco a 1% contendo lovastatina a 20 μ M durante 24 h (Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi 2008, Ma & Poon 2011).

Em outro ensaio o mesmo procedimento foi seguido e logo após lavaram-se as células com PBS e estas foram induzidas a continuar no ciclo celular através da substituição do meio por FCS a 10 %, contendo ácido mevalônico a 6 mM por 18 h, a fim de que fossem coletadas células na fase S (Ma & Poon 2011).

Para ambas condições, tanto para obter células paradas em G1 ou células na fase S, durante cada procedimento, as células receberam tratamento com VPA e 5-aza-CdR e procedeu-se com o tipo de análise desejada.

7.4 Tratamentos com VPA e 5-aza-CdR

Tanto as células não sincronizadas como aquelas que estavam paradas na fase G1 foram tratadas com ácido valproico (VPA) (Sigma®) na concentração de 1 mM e 20 mM por 4 h. Além disso, elas receberam o tratamento com VPA (1 mM) por 4 h e voltaram a serem cultivadas em meio sem a droga por 24 h. Tratamento com 5-aza-CdR (Sigma®), na concentração de 5 μ M por 28 h, foi utilizado como controle positivo de demetilação de DNA. Todas essas condições foram comparadas a controles crescidos na ausência da droga.

Para as células sincronizadas e coletadas na fase S, os tratamentos foram realizados com VPA 1 mM e 20 mM por 4 h, e com 5-aza-CdR, na concentração de 5 μ M por 18 h, além de serem usados controles para todos os tempos em ausência das drogas.

7.5 Ensaio MTT de citotoxicidade

O ensaio de MTT foi realizado a partir de adaptações do protocolo de Denizot & Lang (1986). As células plaqueadas, foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ por 24 h. Após esse período elas receberam seus devidos tratamentos (controles 4, 28 e 48 h; VPA 1,0 e 20 mM por 4 h; VPA 1 mM por 4 h seguindo-se cultivo em meio sem a droga por 24 h e 48 h e 5-aza-CdR 5 μ M por 28 h). Na sequência, os tratamentos foram interrompidos por inversão da placa e foram adicionados 10 μ L de solução de MTT diluída em PBS em meio DMEM com concentração de 0,5 mg/mL.

A placa foi novamente incubada por 3 h a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, o MTT foi cuidadosamente removido e foram adicionados em cada poço 100 μ L de DMSO. A placa foi agitada vagarosamente por 10 min a fim de garantir a solubilização do azul de formazan. Foi utilizada a leitora de placas multi-modal, Cytation™ (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA) disponibilizada pelo Laboratório de Interações Nanopartículas-Células, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Brasil). Para medir a densidade óptica em cada poço, utilizou-se o comprimento de onda teste de 560 nm e o de referência de 690 nm. A utilização da leitura de um comprimento de onda de referência (690nm) é de grande importância, pois segundo Denizot & Lang (1986) quando este é subtraído da leitura da densidade óptica em 560 nm, ocorre a correção de artefatos como arranhões no fundo dos poços, uma vez que o formazan não é absorvido em 690 nm.

7.6 Citometria de fluxo

Para se determinar os tempos e concentrações das drogas necessárias para sincronização e analisar a distribuição das fases do ciclo celular de células não sincronizadas tratadas com as drogas, o perfil do ciclo celular foi avaliado através da técnica de citometria de fluxo, conforme proposto por Bártoová et al. (2005). Para isso, as células coletadas foram lavadas

duas vezes em PBS e fixadas durante 30 min em etanol a 70% (-20°C). Após repetidas lavagens com PBS, utilizou-se 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (Sigma ®) diluído em solução de Vindel [1 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1 mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 10 µg/ml RNase A] por 30 min a 37°C, para análise do conteúdo de DNA.

As células imunomarcadas aos níveis de 5mC e 5hmC sincronizadas (fase G1 e S) e não sincronizadas, tiveram o perfil do seu ciclo celular também avaliado através da citometria de fluxo, porém foram utilizadas adaptações no protocolo de Milutinovic et al. (2003) como referência. Em resumo, as células foram lavadas com PBS suplementado com 0,1% de Tween 20 e 1% de albumina de soro bovino (PBST-BSA), fixadas com paraformaldeído a 0,25% a 37°C durante 10 min e 88% de metanol a -20°C durante 30 min. Depois de duas lavagens com PBST-BSA, as células foram tratadas com HCl 2 N a 37°C por 30 min.

Para neutralizar a reação com o HCl, foi utilizada a solução tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,5) por 5 min. As células foram, então, bloqueadas com 10% de BSA (Sigma ®) em PBST-BSA durante 20 min a 37°C. Em seguida foram incubadas com anticorpo primário anti-5-mC (mouse) (Sigma®, 1:200) e anti-5hmC (rabbit) (Active Motif®, Carlsbad, EUA, 1:2000) em solução de bloqueio, *overnight*, à 4°C e protegidas da luz, seguidas de extensas lavagens com PBS e incubação com anticorpo secundário conjugado ao FITC, anti-mouse (Sigma®, 1:50 diluído em BSA 1%) e Alexa-Fluor 488 anti-Rabbit (Life Technologies® Carlsbad, EUA) (1: 1000) por 1 h no escuro; o PI (40 µg/mL) com 10 µg/ml RNase foi incluso por 30 min após a lavagem do anticorpo secundário, para permitir análise do ciclo celular. Finalmente, as células foram lavadas três vezes e ressuspensas em PBS para serem analisadas por citometria de fluxo.

O perfil do ciclo celular foi determinado com um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, San José, Califórnia) o qual é acoplado ao software BD FACS Diva™ localizado no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

As análises foram realizadas conforme descrição em Desjobert *et al.* (2015). Brevemente, visando à exclusão de *debris* e agregados ou células mortas, as células foram avaliadas em dot-plot FSC/SSC. Posteriormente, a quantificação da fluorescência foi baseada nas médias de intensidade de fluorescência (mfi). Uma razão foi calculada através da proporção entre a intensidade de 5mC ou 5hmC e o conteúdo de DNA. Para análise do ciclo celular foi utilizado o ModFit LT™ (Fig. 2 a,b,c) disponibilizado pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas, Brasil), para quantificação de 5mC e 5hmC utilizou-se o software FlowJo® (Fig. 2 d,e,f).

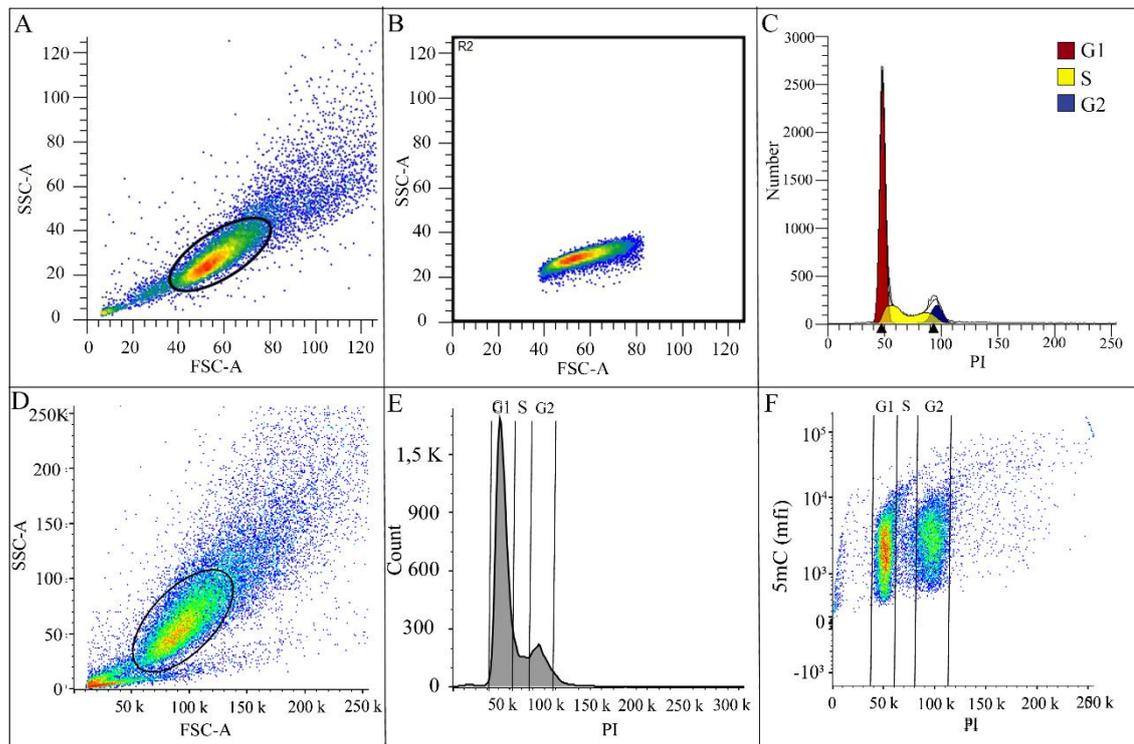


Figura 2. Análise da distribuição das fases no ciclo celular e quantificação de 5mC e 5hmC, utilizando-se os softwares ModFit LT™ (A, B, C) e FlowJo® (D, E, F). As células tratadas, coradas com PI foram selecionadas de acordo com seu FSC e SSC (A e B), utilizou-se então a escala de PI para determinar as fases do ciclo (C). Para quantificar o conteúdo de 5mC e 5hmC as células foram marcadas com anticorpo anti-5mC ou anti-5hmC antes da coloração do DNA com iodeto de propídio (PI). Elas também foram selecionadas de acordo com FSC X SSC (D) e utilizou-se a escala de PI para determinar as fases do ciclo celular (E), que foram combinadas com o conteúdo de 5mC (F) ou 5hmC. A média das intensidades de fluorescência (mfi) de 5mC ou 5hmC foi obtida em cada fase do ciclo (PI).

7.7 Quantificação de 5-metilcitosina (5mC)

Em células paradas na fase G1 e na fase S do ciclo celular o DNA genômico foi extraído usando-se o kit QIAamp DNA mini (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e quantificado, usando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®, Carlsbad, EUA). Concomitante à análise de concentração, encontrou-se uma proporção nos comprimentos de ondas 260/280 nm de aproximadamente 1,8 para as amostras, indicando a pureza da extração, de acordo com o fabricante. Quantidades iguais do DNA extraído (100 ng) foram utilizadas por amostra no kit de ELISA de 5-metilcitosina no DNA (Zymo®, Irvine, EUA). A quantificação de 5mC foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

7.8 Ensaio de Imunofluorescência para 5mC, 5hmC, 5caC e 5fC

Para células HeLa plaqueadas sobre lamínulas de vidro, sincronizadas e coletadas na fase S, adicionou-se bromo-desoxiuridina 10 mM (BrdU, Sigma®) ao meio durante 1 h a 37°C. Logo após, as células foram fixadas em metanol absoluto a -20°C por 10 min, lavadas em PBS e submetidas à hidrólise por 1 h em solução de HCl 2 N a 37°C. Após duas lavagens em tampão borato (ácido bórico 100 mM, NaCl 75 mM e tetraborato de sódio 25 mM, pH 8,5), as preparações foram bloqueadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS durante 30 min.

As células foram incubadas com anticorpos primários anti-5mC (Sigma®, 1:100), anti-5hmC (Active Motif®) (1: 2000), em solução de bloqueio *overnight*, à 4°C e protegidas da luz, seguido por extensas lavagens em PBS. Para 5mC foi utilizado o anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao Alexa-Fluor 647 (Life Technologies®) (1: 250); já para o 5hmC utilizou-se o anti-rabbit conjugado também ao Alexa-Fluor 647 (Life Technologies®) (1: 1000). Ambos foram incubados durante 1 h, no escuro. Por fim, realizou-se a incubação com anti-BrdU-FITC (1:50, Abcam, *Cambridge, Reino Unido*) por 1 h no escuro.

As células cujo ciclo celular estava parado em G1 também foram imunomarcadas conforme relatado acima, entretanto, não se utilizou o anti-BrdU. Os anticorpos utilizados foram o anti-5mC e anti-5hmC conforme relatado acima, além de anti-5caC (rabbit) (Diagenode®, Liege, Belgium) (1:500) e anti-5fC (rabbit) (Active Motif®) (1:500) também em solução de bloqueio *overnight* à 4°C, protegidos da luz. Como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo anti-rabbit conjugado ao Alexa-Fluor 647 (1: 1000) por 1 h no escuro.

As amostras foram analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Wetzlar, Alemanha), no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (Brasil). As imagens foram capturadas para cada condição em parâmetros idênticos e quando necessário utilizou-se o *plugin* de trama de superfície 3D interativa do software ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

7.9 PCR em tempo real quantitativo para DNMT1 E TETs.

Para a análise da expressão gênica, as células tratadas com as drogas e coletadas na fase G1 e S foram submetidas ao isolamento de RNA total usando-se o mini-kit RNeasy (Qiagen®) seguido da produção de cDNA usando-se o *kit* de transcrição reversa de cDNA (Qiagen®). O equipamento Nanodrop avaliou a qualidade do RNA isolado. As placas de reação de RT-PCR foram preparadas usando-se o *Kit* QuantiNova Probe PCR (Qiagen®), o cDNA produzido e TaqMan Gene Expression Assay para DNMT1 (Hs00945875_m1), TET1 (Hs00286756_m1), TET2 (Hs00325999_m1) e GAPDH (Hs02758991_g1) como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada no Applied Biosystems 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems®) e os valores do limiar de ciclo (Ct) foram calculados com base em experimentos realizados em triplicata e normalizados em relação ao gene de controle endógeno GAPDH.

8. Resultados

8.1 Sensibilidade das células HeLa aos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR

Os resultados obtidos com o ensaio MTT não indicaram alteração significativa da viabilidade celular para todos os tratamentos utilizados, nos quais as células foram tratadas por 4 h com VPA ou com retorno ao meio sem a droga por 24 h ou 48 h bem como com 5-aza-CdR por 28 h (Fig.3). Para ensaios posteriores optou-se por se excluir o tratamento de 4 + 48 h e seu respectivo controle, uma vez que essa condição não se mostrou necessária.

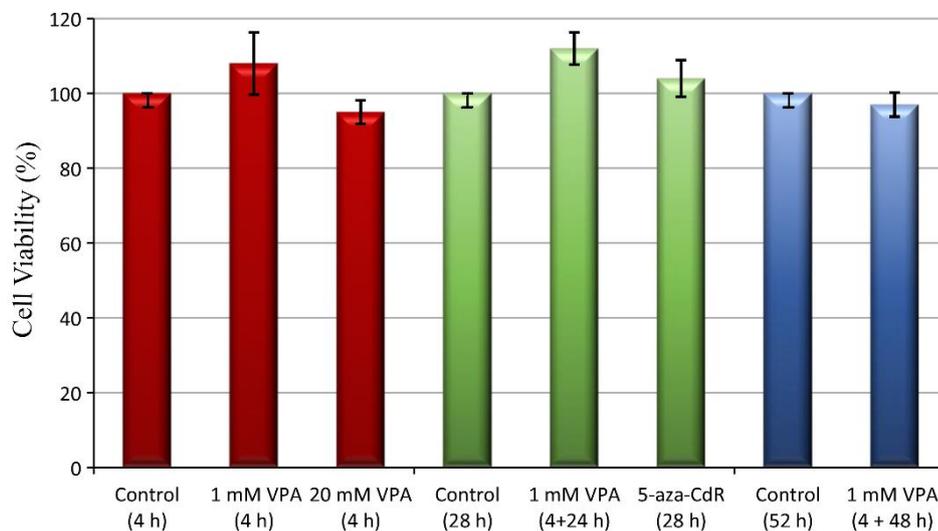
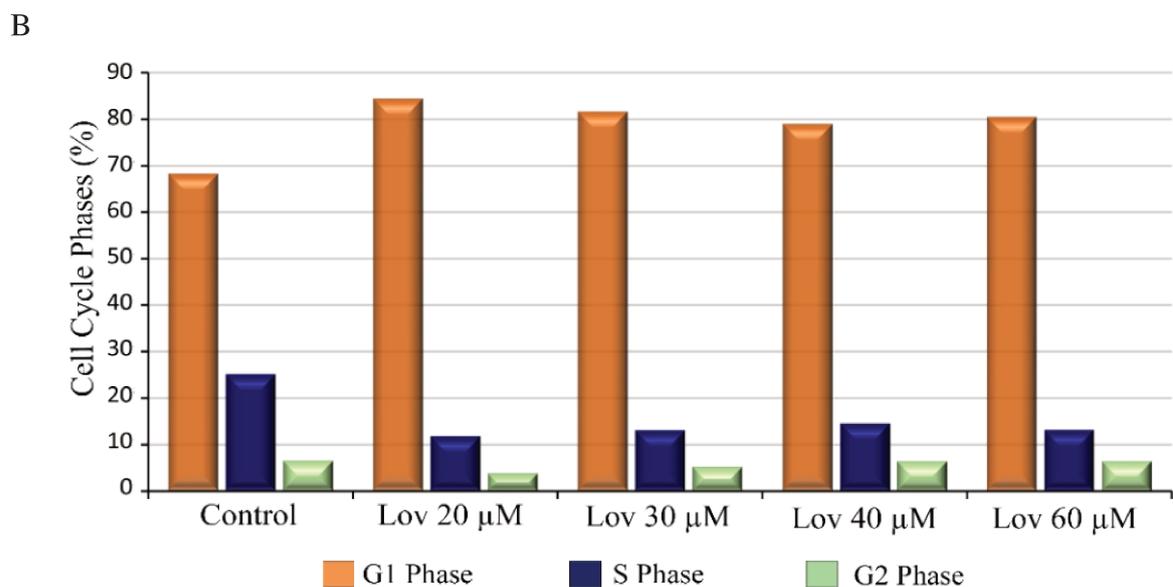
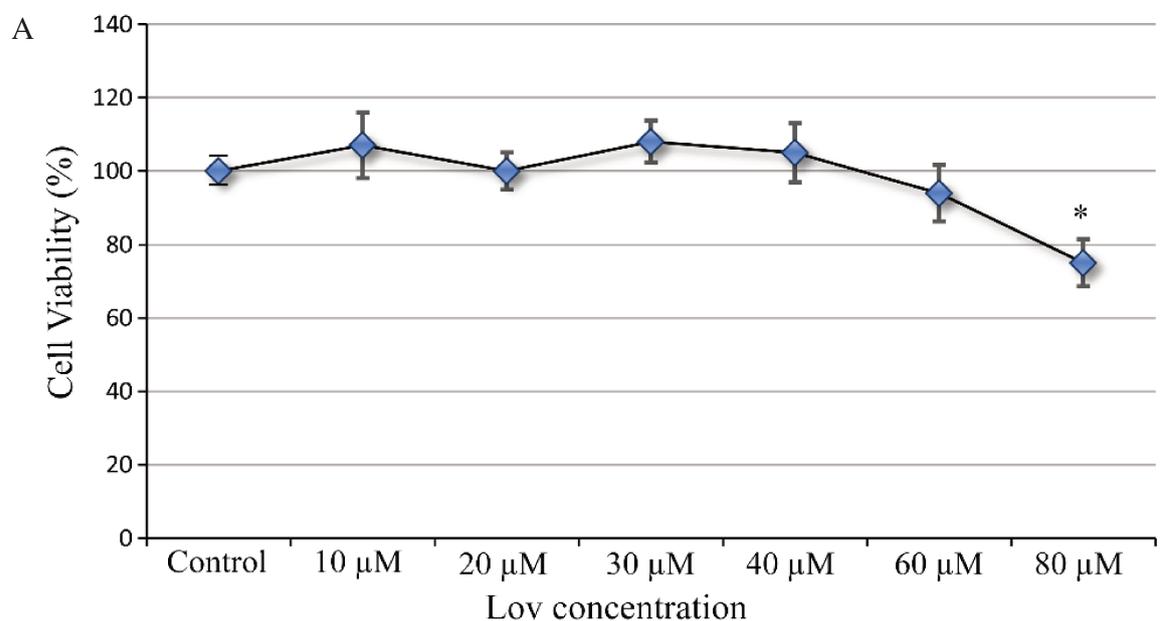


Figura 3. Viabilidade celular determinada com ensaio MTT. Ao tratamento das células com VPA seguiu-se ou não cultivo por 24 h e 48 h em ausência da droga. Para análise dos resultados foram realizados o teste t de Student. Os dados representam as médias e desvio padrão de quatro experimentos independentes.

8.2 Determinação da concentração de lovastatina necessária para inibição da síntese de DNA a partir do ensaio de viabilidade celular e análise das fases do ciclo celular em células HeLa

Os dados obtidos a partir do ensaio de MTT indicam que após tratamento por 24 h com várias concentrações de lovastatina, droga utilizada para parar o ciclo celular em G1, a viabilidade celular se tornou reduzida significativamente apenas quando a concentração utilizada foi de 80 μ M (Fig. 4 A). Esta redução foi de 25% em relação ao respectivo controle. Também foram realizados ensaios referentes às fases do ciclo celular por citometria de fluxo, a fim de averiguar quais das concentrações com efeito não citotóxico seriam capazes de promover

parada no ciclo celular com no mínimo 80 % das células em G1, conforme proposto na literatura (Keyomarsi, 1996). Portanto, após o tratamento das células com lovastatina e análises da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo, constatou-se que a concentração de 20 μM é suficiente para se obter porcentagem de células em G1, uma vez que, mesmo aumentando a concentração dessa droga o número de células em G1 não foi proporcionalmente aumentado (Fig. 4 B, C). Diante disso e apoiando-se em outros trabalhos já publicados (Ma & Poon 2011, Kamrani & Keyomarsi 2008) optou-se por utilizar como padrão a concentração de 20 μM por 24 h para promover a sincronização dessas células.



C

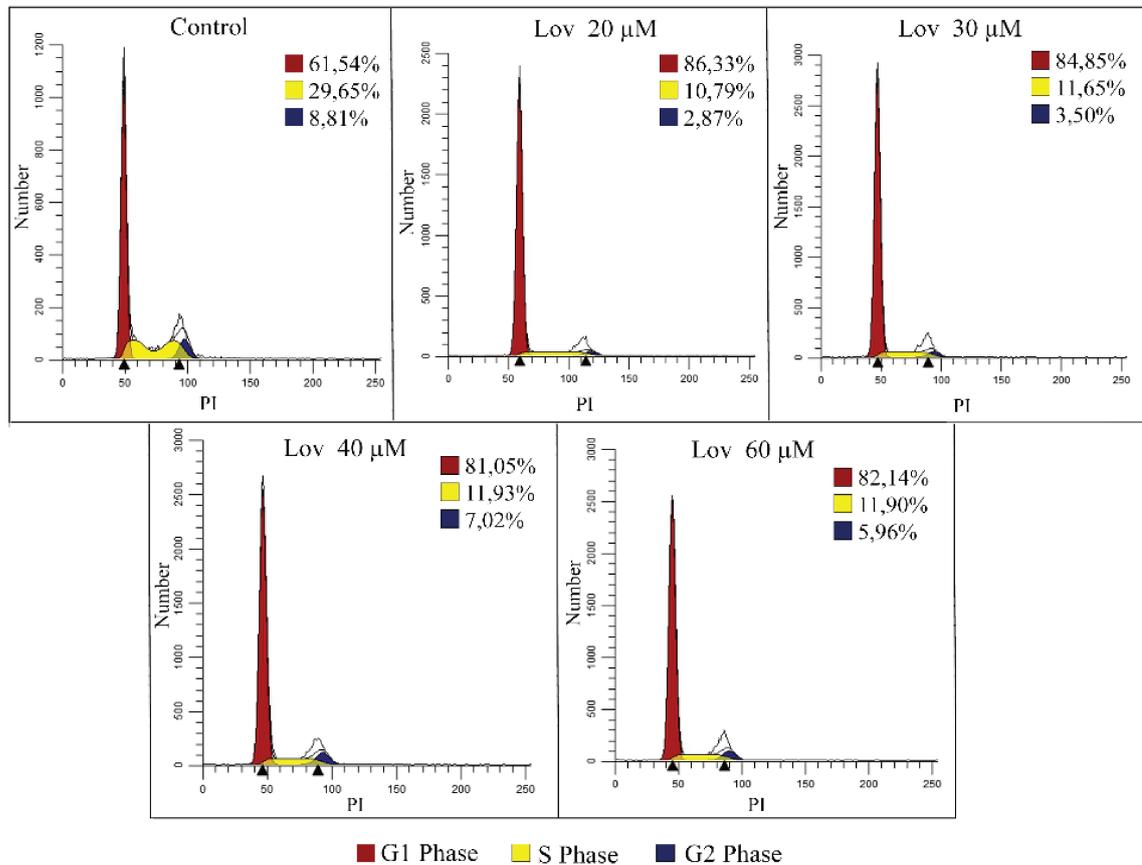


Figura 4. Viabilidade celular após o tratamento com lovastatina (Lov) determinada com ensaio MTT (A) e distribuição das fases do ciclo celular com utilização da citometria de fluxo (B, C). Os dados de média e erro padrão são representativos de um total de três experimentos independentes para ambas condições. *P < 0,05 comparado ao grupo controle (A).

8.3 Determinação da duração de tratamento com ácido mevalônico para promoção da sincronização de células com maior porcentagem na fase S.

Após o tratamento das células com lovastatina, ela foi substituída por meio contendo ácido mevalônico, a fim de promover a retomada do ciclo celular. As células foram colhidas em incrementos de tempo de 4 h após a adição do ácido mevalônico (até 2 vezes o tempo de duplicação) e a taxa de síntese do DNA foi medida por citometria de fluxo. O tempo ideal para obtenção do maior número de células sincronizadas na fase S foi no intervalo de 16 h a 20 h (Fig. 5). Após esse período iniciou-se uma diminuição na frequência de células na fase S e aumento na fase G2, sendo assim um indicativo de saída das células da fase S e entrada em

G2. Portanto o tempo padrão escolhido para coletar a maior porcentagem de células na fase S foi o de 18 h.

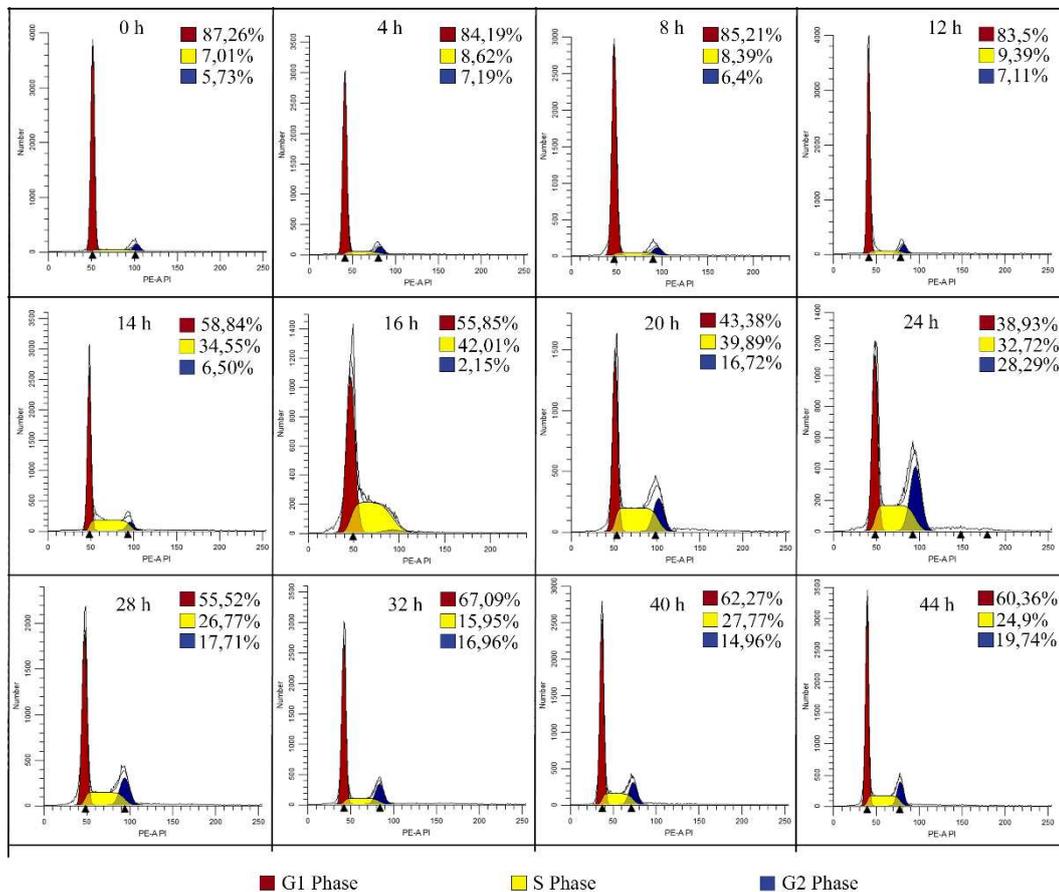
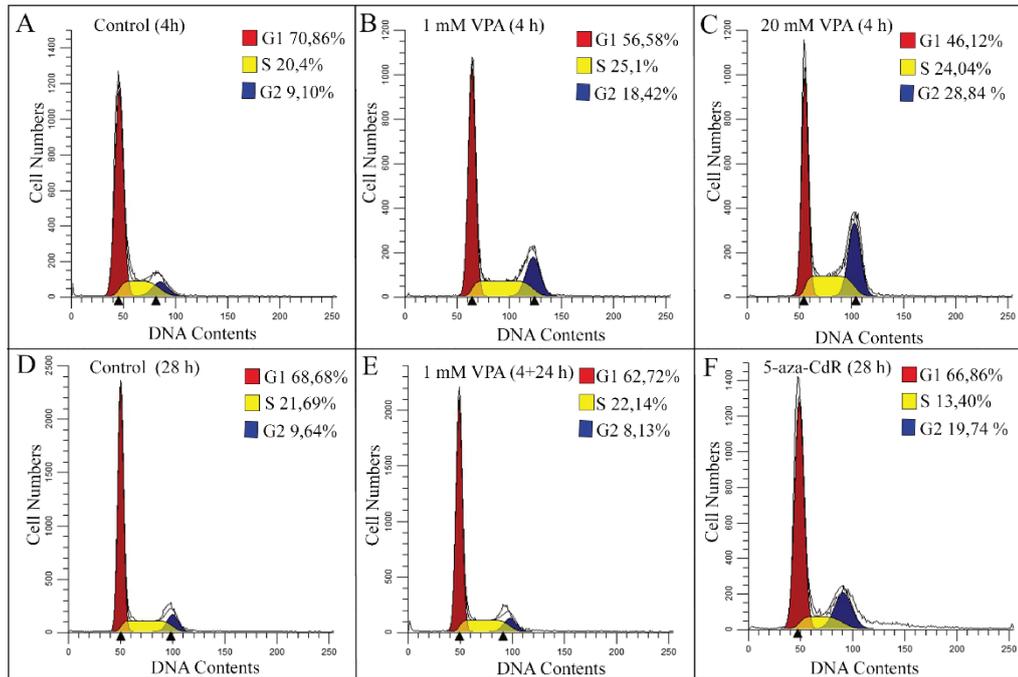


Figura 5. Determinação do tempo para obtenção de células sincronizadas na fase S. O meio de cultura fresco contendo ácido mevalônico (6 mM) foi adicionado em tempo zero. O número de células em cada fase do ciclo foi determinado por citometria de fluxo. Os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos 2 vezes.

8.4 Distribuição das fases do ciclo celular após tratamento das células HeLa com VPA e 5-aza-CdR

A distribuição das frequências das fases G1, S e G2 do ciclo celular mostrou aumento no número e na porcentagem de células na fase G2 em resposta aos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR (Fig. 6 - I e II). Tal aumento foi influenciado, ainda mais, em condições de maior concentração do VPA (Fig. 6 - I C e II).

I



II

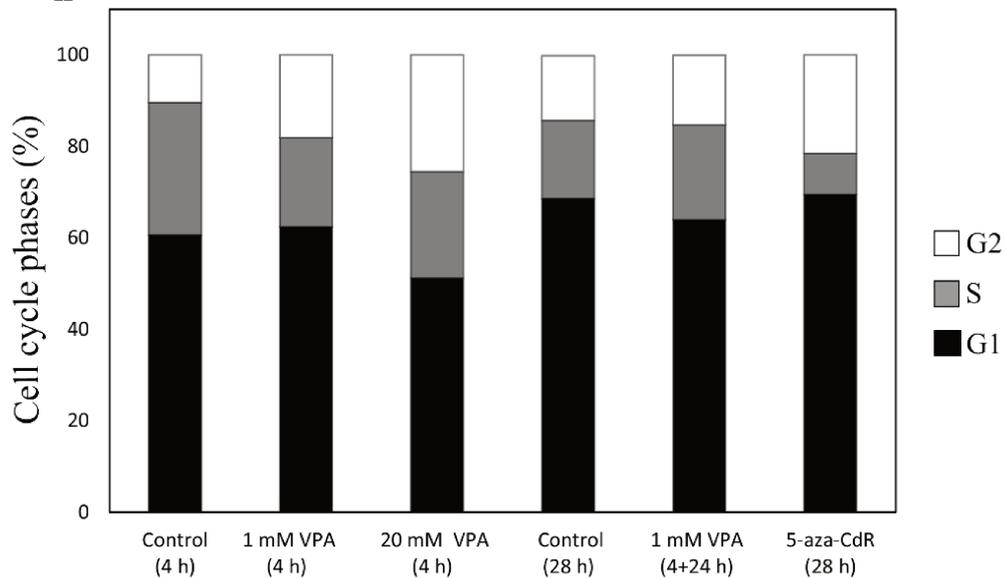


Figura 6. Efeitos do VPA e de 5-aza-CdR sobre as fases do ciclo celular de células HeLa, avaliados por citometria de fluxo. São apresentadas as frequências absolutas (I) e relativas (II) das diferentes fases do ciclo após tratamento com VPA e 5-aza-CdR. Ao tratamento das células com VPA seguiu-se ou não o cultivo por 24 h em ausência da droga.

8.5 Conteúdo de 5mC ao longo do ciclo celular difere após tratamento das células HeLa com VPA e 5-aza-CdR

A figura 7 evidencia uma diminuição no conteúdo de 5mC nas fases G1, S e G2 em células HeLa não sincronizadas tratadas com VPA. Já o tratamento com 5-aza-CdR promoveu a diminuição significativa de 5mC apenas nas fases S e G2.

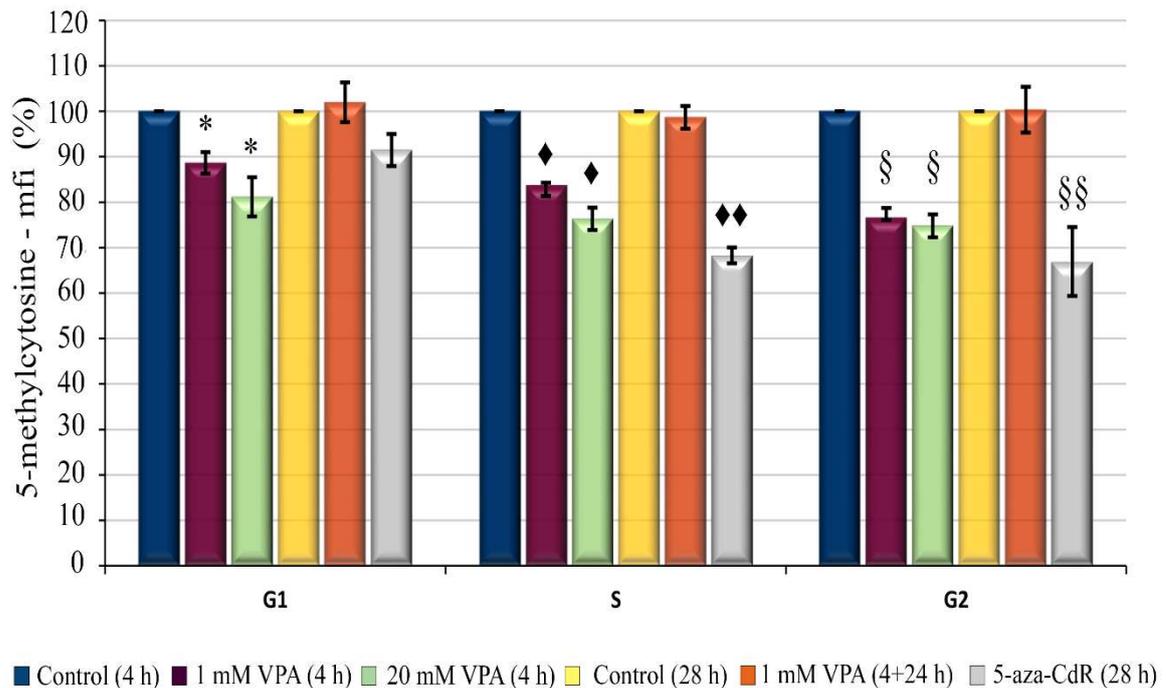


Figura 7. Variação no conteúdo de 5mC conforme a fase do ciclo celular e tratamentos, em células HeLa não sincronizadas: análise por citometria de fluxo. As células foram analisadas pelo seu conteúdo de 5mC de acordo com o estado do seu ciclo celular. Os dados de 5mC/DNA foram calculados a partir da média das intensidades de fluorescência (mfi) de 5mC vs. iodeto de propídeo (PI). Este último expressa o conteúdo de DNA das células. O teste t de Student indicou diferença significativa em $P < 0,05$ para tratamentos em comparação com os controles de 4 h (*, ♦, §) e com o controle de 28 h (♦♦, §§) em diferentes fases do ciclo.

8.6 VPA e 5-aza-CdR induzem demetilação do DNA em diferentes etapas do ciclo, em células HeLa sincronizadas

Os níveis de 5mC foram reduzidos em células HeLa após a exposição por 4 h ao VPA em diferentes concentrações, tanto em células com ciclo celular parado em G1 quanto em células proliferativas (coletadas na fase S). Entretanto o tratamento dessas células com a 5-aza-

CdR só promoveu redução de 5mC das células em replicação. Tais resultados foram demonstrados tanto por ensaios de ELISA (Fig. 8 A) quanto por citometria de fluxo (Fig. 8 B).

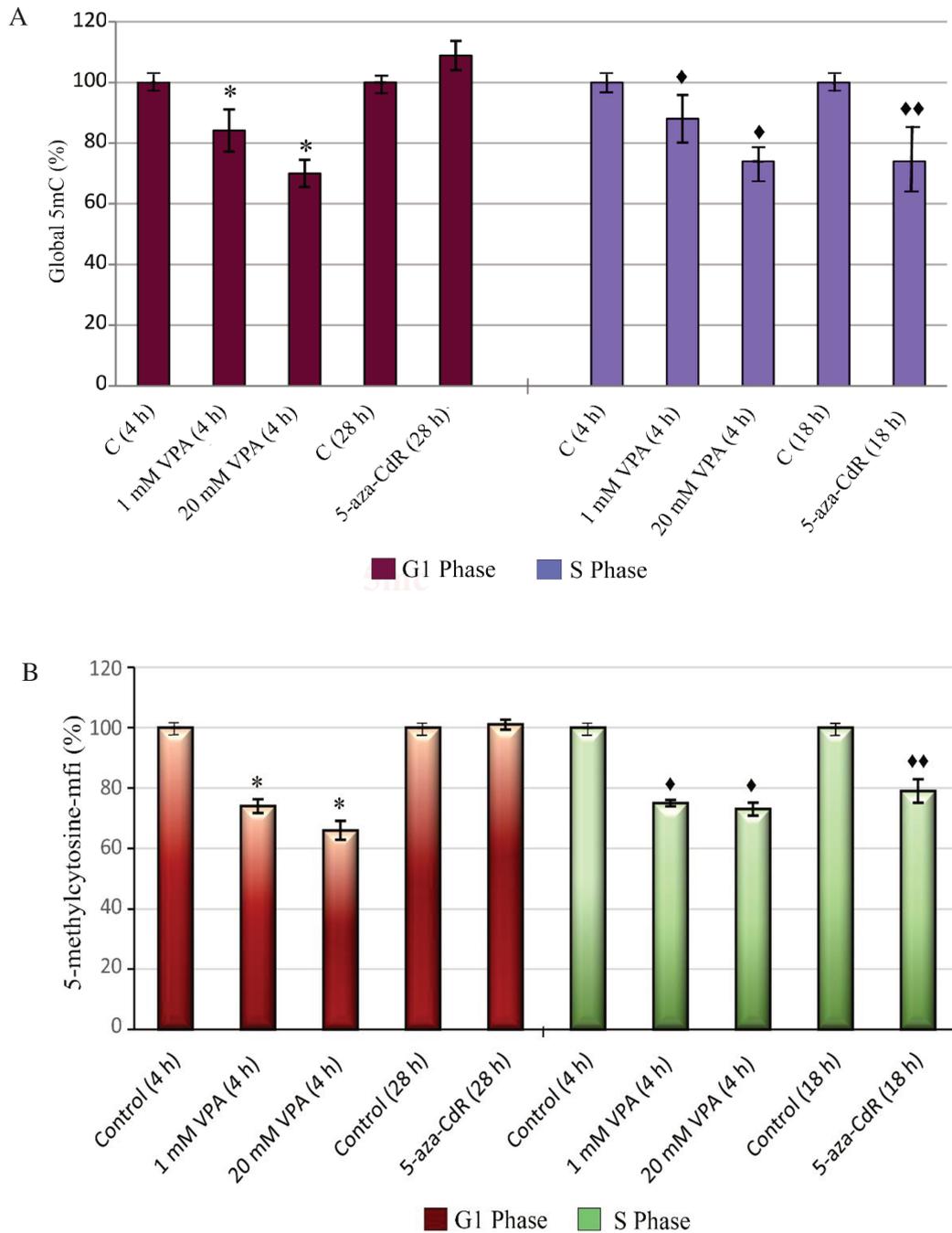


Figura 8- Níveis globais de 5mC do ciclo celular de células HeLa sincronizadas, avaliados por ensaio de ELISA (A) e citometria de fluxo (B). O teste t de Student indicou diferença significativa ao nível de $*P < 0,05$ (*, ♦, ♦♦) para células tratadas com VPA em comparação com os controles de 4 h (*), (♦) fase G1 e S, respectivamente. Já o tratamento com 5-aza-CdR (18 h) promoveu a diminuição significativa de 5mC somente em células coletadas na fase S (♦♦).

O intermediário da via ativa de demetilação (5hmC) também foi avaliado em células na fase G1 e S por citometria de fluxo. Nos tratamentos com VPA os níveis de 5hmC aumentaram significativamente nas duas condições (células com o ciclo parado e células proliferativas). Já o tratamento das células com 5-aza-CdR o aumento nos níveis de 5hmC ocorreram somente em células proliferativas (Fig. 9).

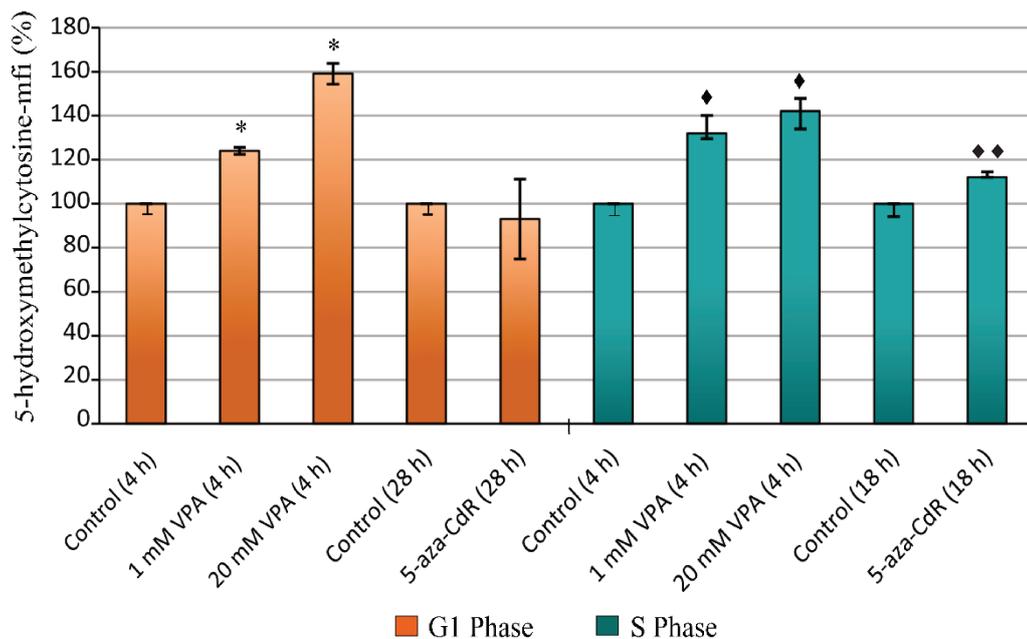


Figura 9. Conteúdo de 5hmC em células sincronizadas, paradas na fase G1, e células proliferativas, coletadas na fase S. As células foram analisadas quanto ao seu conteúdo de 5hmC utilizando-se citometria de fluxo. Os dados foram calculados a partir da média das intensidades de fluorescência (mfi) dos sinais para 5hmC em que o anticorpo secundário foi conjugado com Alexa 488. O teste t de Student indicou diferença significativa em *, ♦, ♦♦ $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. Os dados são representativos de um total de dois experimentos independentes.

8.7 Os níveis de transcritos para os genes envolvidos nas vias de metilação e demetilação da citosina do DNA foi afetado pelo VPA e pela 5-aza-CdR em diferentes momentos do ciclo celular

Os resultados apresentados até agora indicaram o papel para o VPA como indutor de processos ativos de demetilação de DNA (independente da proliferação celular). As drogas estudadas modularam a expressão dos genes de três enzimas diretamente envolvidas na dinâmica de derivados da citosina metilada, DNMT1, TET1 e TET2 em diferentes momentos do ciclo celular. Em células HeLa cujo ciclo celular estava estacionado na fase G1 e em células proliferativas, coletadas na fase S, os níveis de mRNA da DNMT1, envolvida na manutenção da metilação do DNA, foi significativamente reduzido, após tratamentos de 4 h com VPA 1mM

e 20 mM. Já a 5-aza-CdR só promoveu alteração na expressão da DNMT1 em células proliferativas (coletadas na fase S) (Figs. 10 A e D). Para as mesmas condições do ciclo celular, apenas células tratadas com VPA levaram a um aumento significativo nos níveis de mRNA de TET1 e TET2 em comparação aos controles. A 5-aza-CdR não promoveu mudança significativa na expressão gênica para os genes que estão envolvidos na demetilação ativa (Fig. 10 B, C e E). Um achado inesperado foi encontrado em células na fase S, quando a menor concentração de VPA (1 mM) promoveu maior redução na expressão da DNMT1 em comparação à resposta com a concentração mais elevada (20 mM) (Fig. 10 D).

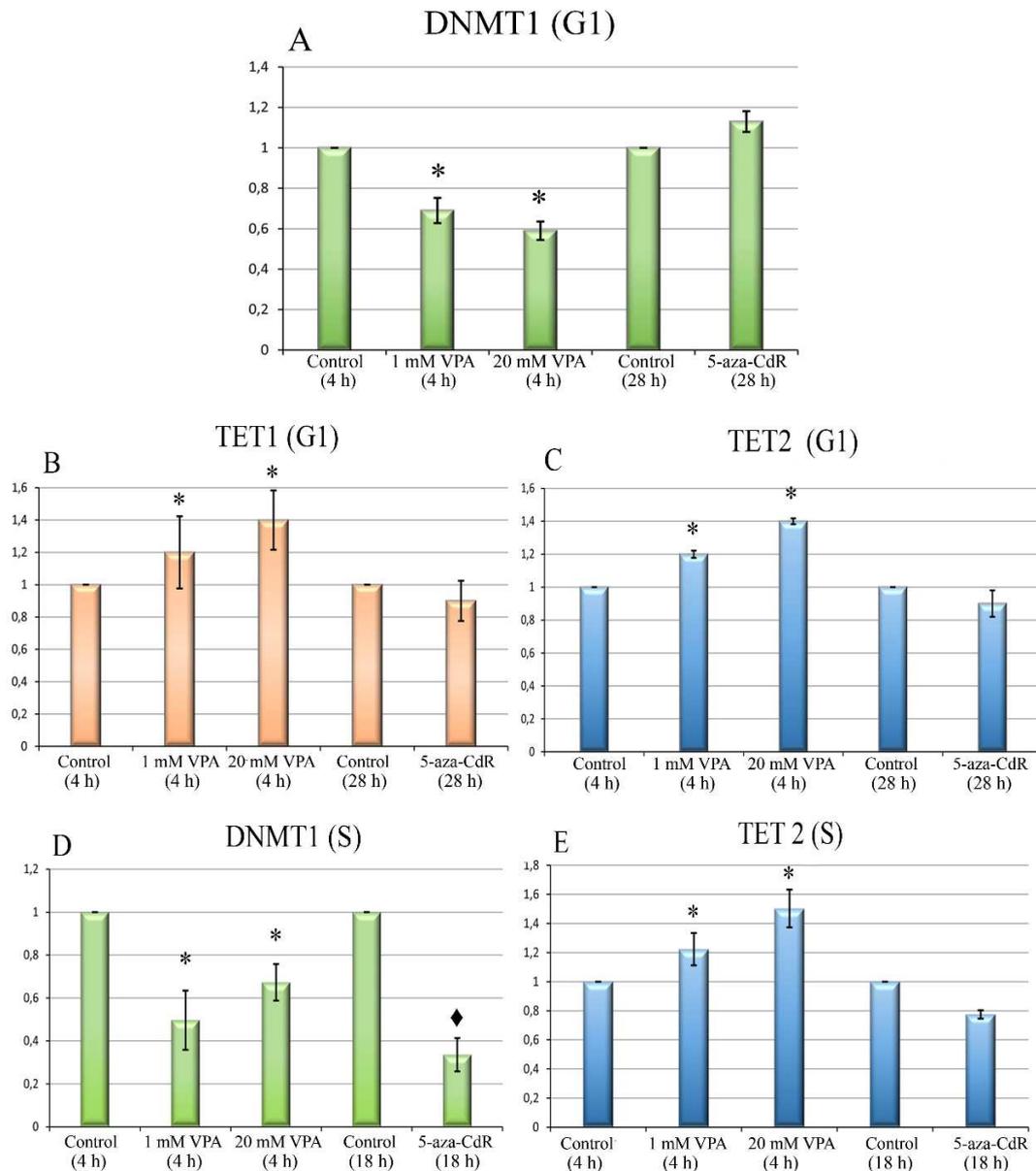


Figura 10. Expressão gênica de DNMT1, TET1 e TET2 em células HeLa após sincronização e exposição ao VPA e 5-aza-CdR. Os dados foram obtidos a partir da análise de RT-PCR e normalizados ao controle endógeno GAPDH. As diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$ (*) para tratamentos em comparação com os controles de 4 h ou (♦) para controle de 18 h foram avaliadas pelo teste t de Student. Os dados são representativos de um total de três experimentos independentes.

8.8 Os níveis da abundância de 5-metilcitosina (5mC) diminuíram em células HeLa sincronizadas, coletadas na fase G1 e S após o tratamento com VPA, evidenciados em imunofluorescência

Tanto em células paradas na fase G1 (Fig. 11) quanto em células proliferativas (Fig. 12) o teste de imunofluorescência para 5mC demonstrou que o tratamento com VPA promoveu diminuição na abundância de metilação do DNA em células HeLa. A intensidade da perda de sinal foi maior com a maior concentração de VPA em ambas fases do ciclo, sugerindo que o VPA provoque uma resposta dose-dependente. A diminuição de 5mC em resposta a 5-aza-CdR foi detectado apenas em células proliferativas (Fig. 12). É importante ressaltar que em todos os casos, as fotografias foram obtidas sob as mesmas condições para cada grupo.

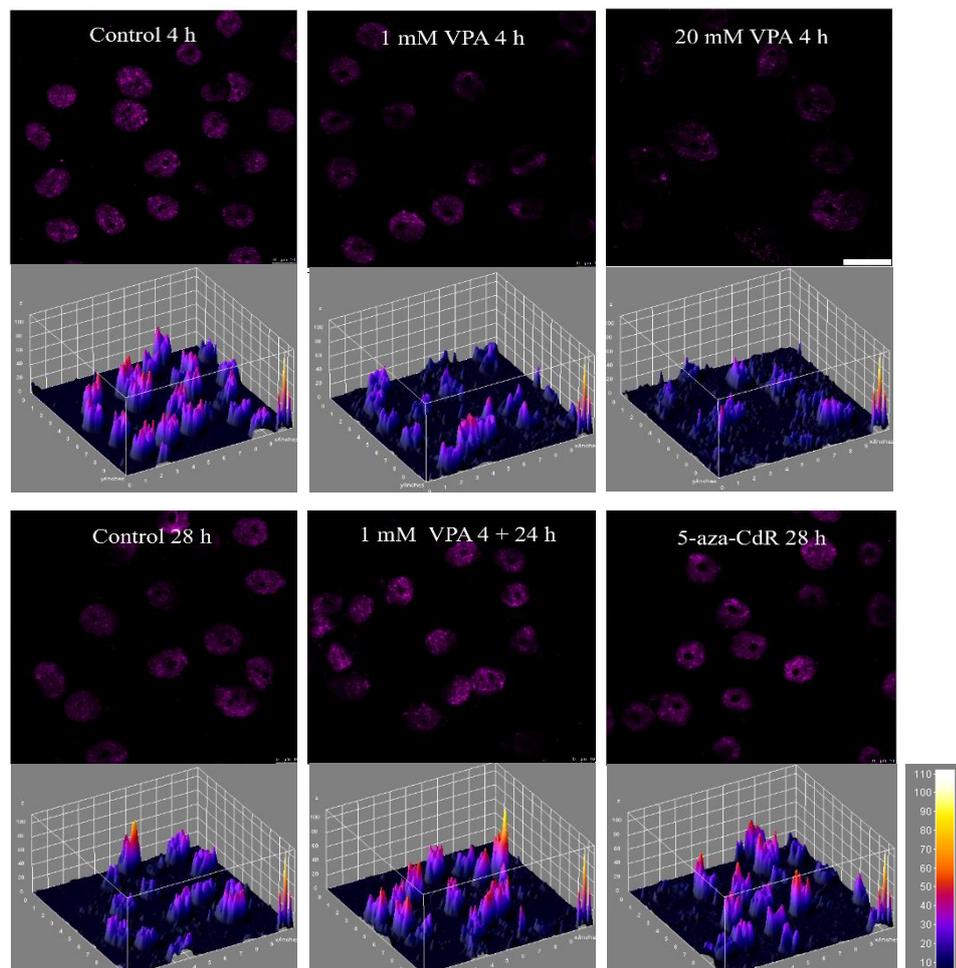


Figura 11. Sinais de imunofluorescência para 5mC do DNA em células HeLa não proliferativas, tratadas com VPA e 5-aza-CdR, coletadas na fase G1. O tratamento com VPA induziu diminuição na abundância de 5mC nos núcleos em comparação com controle não tratado. As células foram tratadas com Lovastatina, para parar o ciclo na fase G1 e a seguir com as drogas. O anticorpo secundário foi conjugado ao Alexa-Fluor 647. A barra de escala indica 20 µm. As imagens são representativas de um total de dois experimentos. As imagens da intensidade de fluorescência também são mostradas usando o ImageJ 3D plugin software. A unidade arbitrária são baseadas na escala de intensidade de 8 bits (0–110).

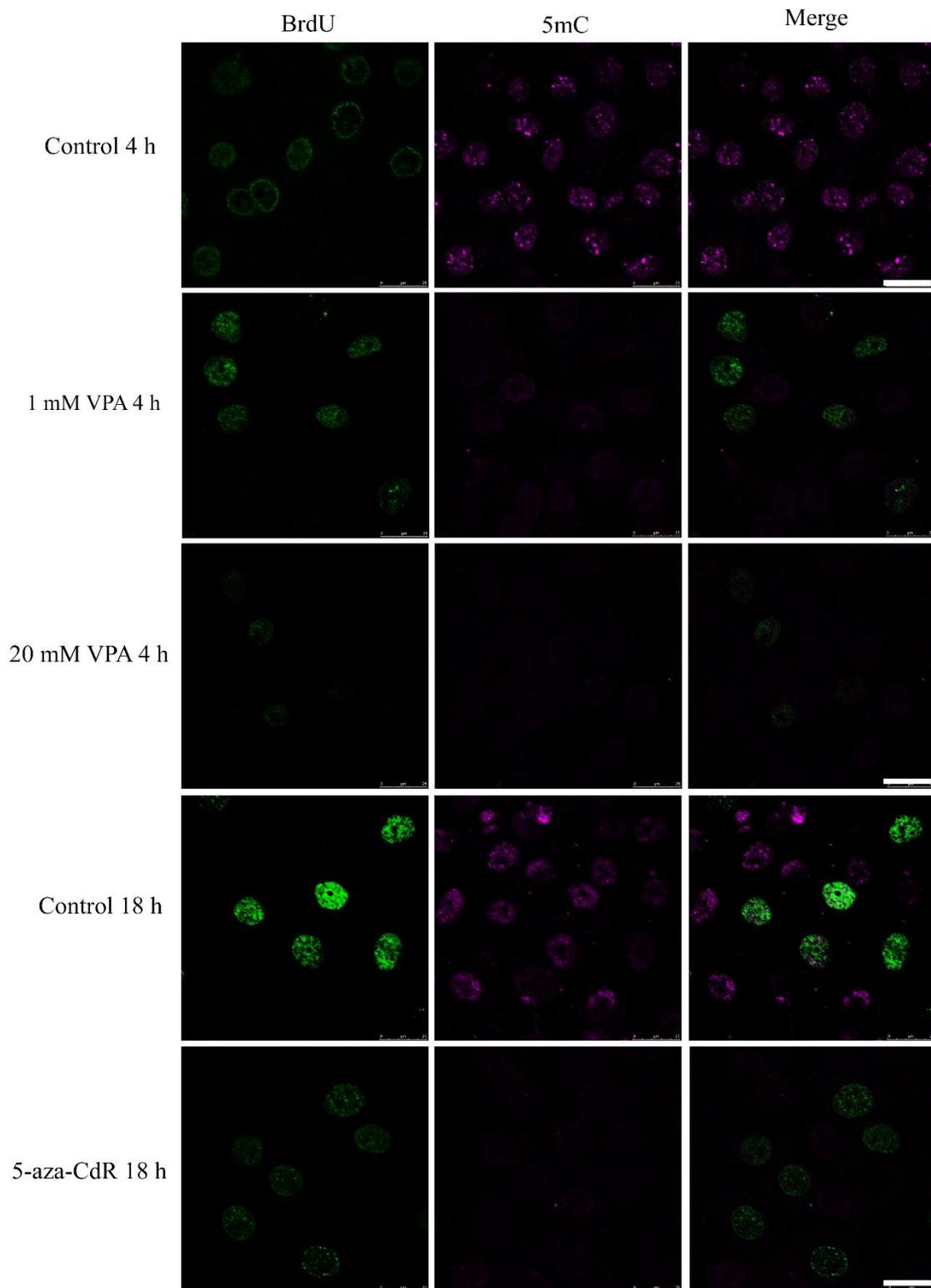


Figura 12. Abundância de 5mC em células HeLa na fase S, tratadas com VPA e 5-aza-CdR. Houve alteração na abundância de 5mC para células tratadas em comparação com o respectivo controle. As células sincronizadas e tratadas com as drogas foram pulsadas durante 1 h com 10 mM de BrdU. DNA em síntese evidenciado com FITC (verde), 5mC evidenciada por Alexa 647 (púrpura). A barra de escala indica 25 μ m.

8.9 VPA e 5-aza-CdR induzem aumento nos níveis de 5hmC quando consideradas diferentes fases do ciclo celular de células HeLa sincronizadas

Inicialmente, buscou-se determinar as mudanças nos padrões de 5hmC em células paradas e em proliferação, mediante o tratamento com o VPA, utilizando a 5-aza-CdR apenas como controle. Observou-se aumento nos níveis de 5hmC em células paradas em G1 (Fig. 13) e proliferativas (Fig.14), após o tratamento com VPA. Um achado inesperado foi o aumento do conteúdo de 5hmC em células tratadas com 5-aza-CdR, em condições replicativas (Fig. 14), nos levando a repensar a atuação dessa droga por intermédio da via de demetilação passiva, proposta por muitos autores, uma vez que esse tratamento promoveu alteração em um dos intermediários da via ativa (5hmC). Os gráficos 3D de imagens representativas foram plotados usando o software Image J para demonstrar as mudanças observadas no perfil de 5hmC (Fig.13).

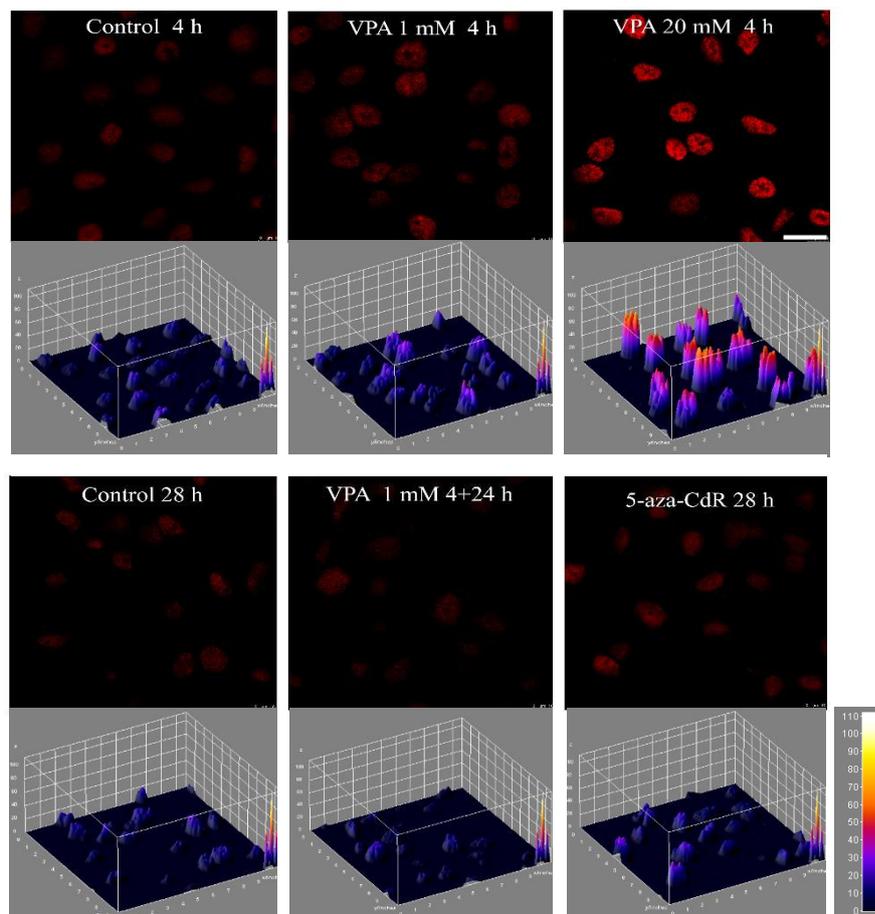


Figura 13. O efeito do VPA e 5-aza-CdR sobre 5hmC em células com o ciclo celular parado em G1. Os tratamentos com VPA induziram aumento nos níveis globais de 5hmC em comparação com controle não tratado; já em resposta à 5-aza-CdR as células não apresentaram nenhuma alteração. 5hmC está evidenciada por Alexa 647 (vermelho). A barra de escala indica 20 μ m. As imagens são representativas de um total de dois experimentos. Os gráficos 3D traçados das respectivas imagens representativas revelaram intensidade de fluorescência com base em uma escala de intensidade de 8 bits (0-110).

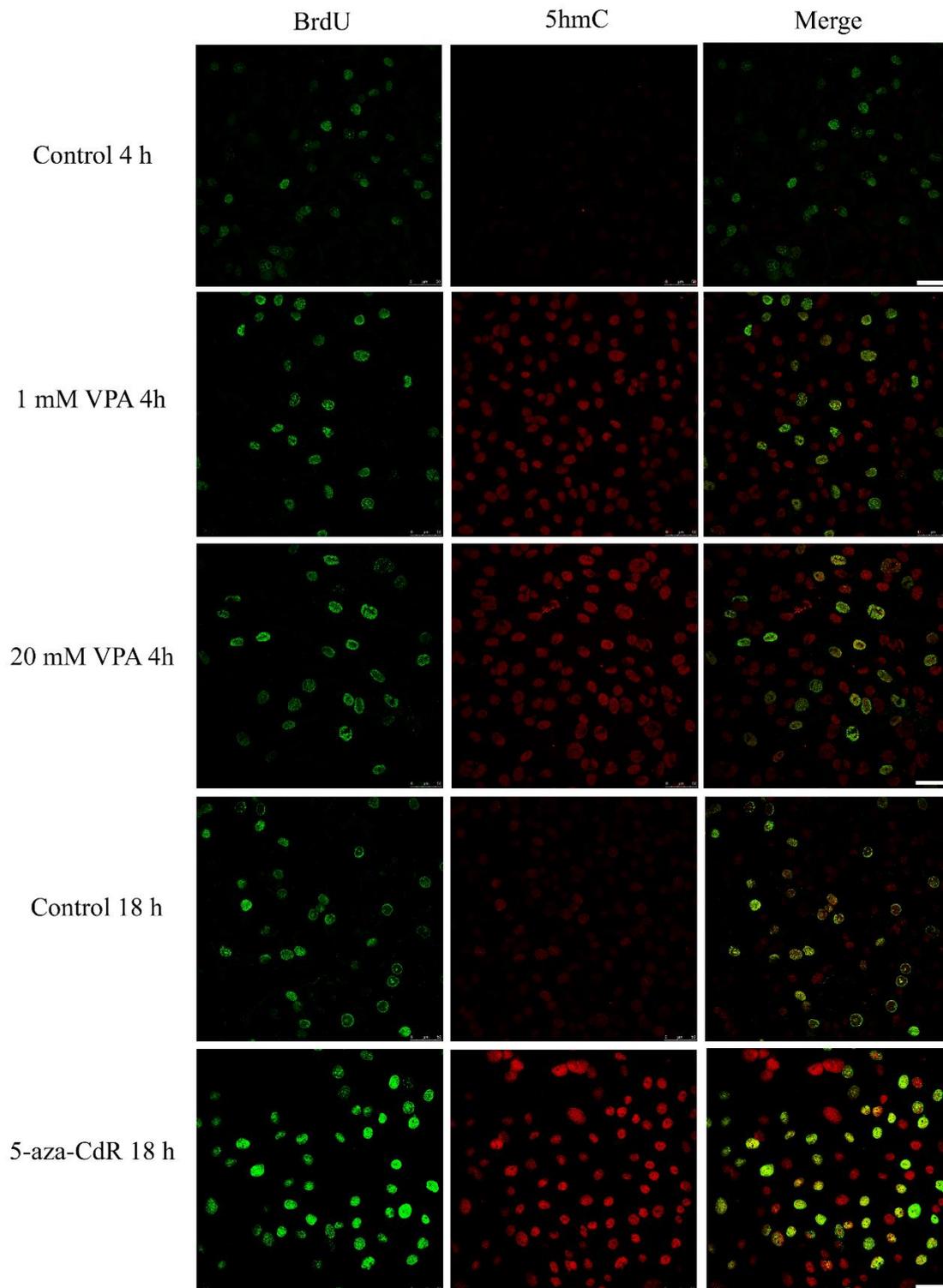


Figura 14. Abundância de imunofluorescência para 5hmC em células HeLa sincronizadas, tratadas com VPA e 5-aza-CdR e coletadas na fase S. Os tratamentos com VPA e 5-aza-CdR induziram aumento na abundância de 5hmC em comparação com controle não tratado. As células, foram sincronizadas, tratadas com as drogas e pulsadas durante 1 h com 10 mM de BrdU. DNA em síntese evidenciado com FITC (verde). 5hmC evidenciada por Alexa 647 (vermelho). A barra de escala indica 50 μ m. As imagens são representativas de um total de dois experimentos.

8.9.1 VPA e 5-aza-CdR não provocam mudanças visivelmente detectáveis na abundância de 5fC e 5caC

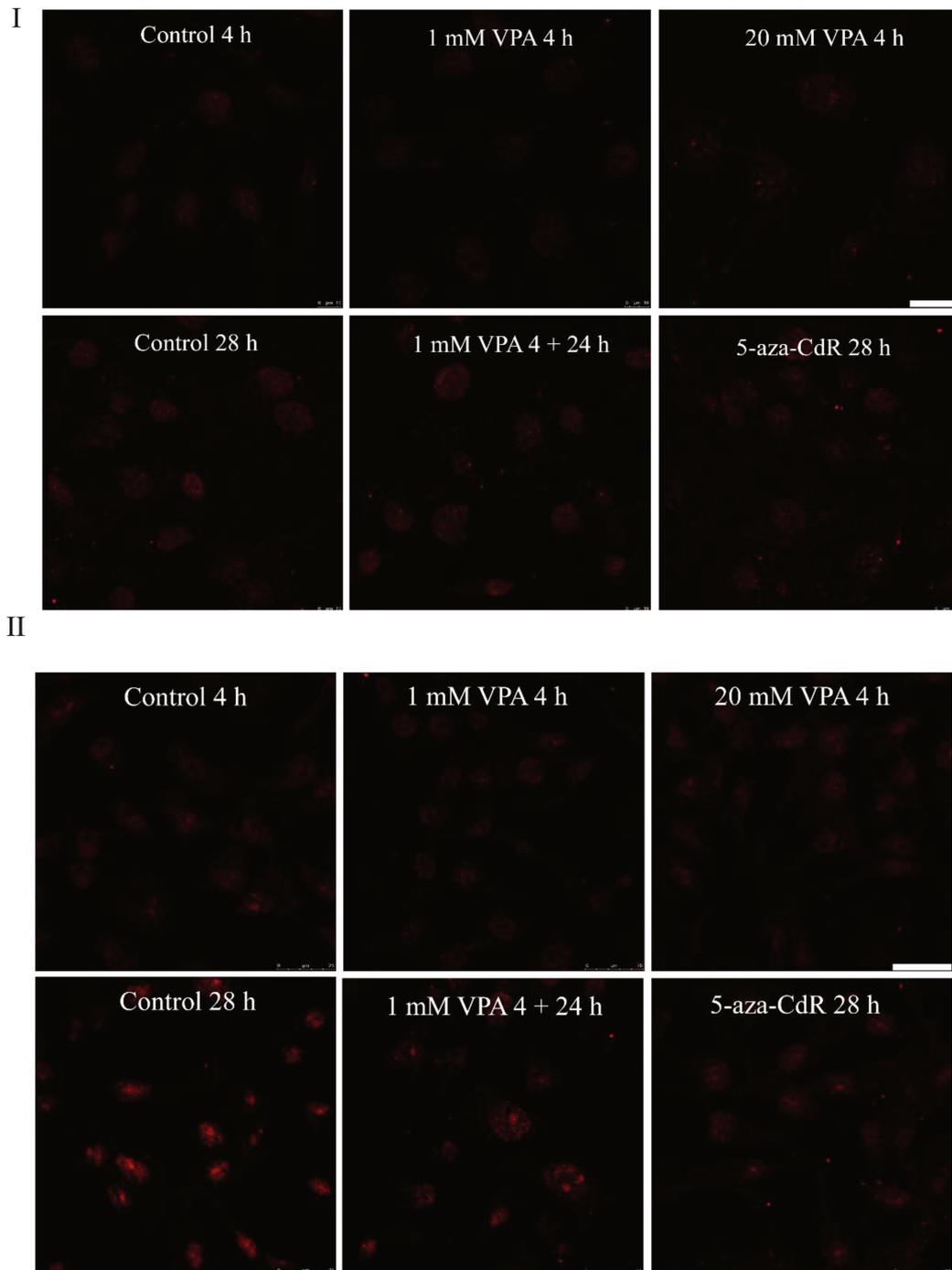


Figura 15. Sinais de imunofluorescência para 5fC (I) e 5caC (II) em células HeLa não proliferativas, tratadas com VPA e 5-aza-CdR e coletadas na fase G1. Nenhuma alteração visível foi observada para ambos derivados de citosina metilada quando comparado ao controle não tratado. O anticorpo secundário foi conjugado com Alexa 647. A barra de escala indica 20 μ m (I) e 25 μ m (II). As imagens são representativas de um total de dois experimentos.

9. Discussão

Vários são os mecanismos de ação do VPA, seja atuando como inibidor de HDAC (Milutinovic et al. 2007, Dong et al. 2010, Wang et al. 2010), seja na demetilação global do DNA (Veronezi et al. 2017), ou ainda na metilação e/ou demetilação de histonas (Tung & Winn 2010, Marinova et al. 2011, Ganai et al. 2015), contribuindo para processos de remodelação da cromatina (Felisbino et al. 2011). O mecanismo referente à remoção de 5mC do DNA é ainda pouco compreendido (Barreto et al. 2007, Thomson et al. 2013). É nessa perspectiva que o presente trabalho se insere, objetivando investigar por quais vias, ativa ou passiva, ocorreria a perda de 5mC do DNA, induzida por VPA, em células HeLa. Para tal, estudou-se esse processo ao longo do ciclo celular, ou melhor, em condições comparativas entre células cujo ciclo se encontrava parado na fase G1 e células proliferativas, coletadas na fase S. Como etapa preliminar de estudo, buscou-se compreender a dinâmica de ação do VPA sobre a demetilação do DNA em diferentes fases do ciclo celular. Foram assim investigados os efeitos do VPA na proliferação celular e na progressão do ciclo celular de células HeLa.

Embora existam relatos de que o VPA induza inibição da viabilidade celular (Han et al. 2013) e supressão da proliferação em células HeLa (Tsai et al. 2013, Feng et al. 2016), nas condições experimentais do presente estudo não se detectou redução na viabilidade celular. Admite-se que isso se deva aos tratamentos mais curtos pelo VPA realizados na presente investigação (1 e 20 mM por 4 h), enquanto nos experimentos de Han et al. (2013) as células HeLa foram tratadas com VPA 4 a 10 mM por 24 h ou 72 h e nos estudos de Tsai et al. (2013) e Feng et al. (2016) as células foram tratadas com VPA 1 mM e 2,5 mM por 72 h. Ainda, segundo Tsai et al. (2013), o VPA promove mais efeitos sobre a progressão do ciclo celular do que sobre a proliferação celular, mesmo com o tratamento por 72 h, o que se confirmou com os resultados obtidos após o tratamento curto aqui realizado. O fato de não ocorrer inibição da sobrevivência celular com o tratamento por 5-aza-CdR 5 μ M (conhecido controle de demetilação passiva do DNA) por 28 h, pode estar respaldado em fato semelhante relatado para células HeLa tratadas com esta droga nas concentrações de 0,05 μ M a 10 μ M por período mais longo (48 h), somente acontecendo redução quando as células eram tratadas acima de 10 dias com doses $> 1 \mu$ M (Palli et al. 2008).

Mesmo não se observando inibição no crescimento celular nas doses e tempo de tratamento pelo VPA testados, identificou-se que o mesmo exerce efeito sobre a progressão do ciclo celular, atuando com retenção das células na fase G2 de modo dose-dependente. Ao se retornar as células tratadas por 4 h com VPA, ao meio sem droga por mais 24 h não se observou alteração no número de células na fase G2, confirmando que a atuação do VPA resulta numa parada reversível do ciclo celular, de modo semelhante ao proposto para células de câncer de mama (Marchion et al. 2005). Para 5-aza-CdR já foi demonstrado que promova parada na fase G2 do ciclo de células HeLa, quando foram usadas concentrações acima de 1 μ M a curto ou longo prazo (Palli et al. 2008).

Em outros estudos há relatos de que células HeLa tratadas por 24h com VPA nas concentrações de 1 a 3 mM tiveram parada na fase G1, enquanto o VPA 10 mM induziu parada em fase G2 /M (Han et al. 2013). Em três linhagens de câncer cervical de diferentes origens moleculares e genéticas observou-se em células HeLa (1 mM, 2,5 mM e 5 mM) e CasKi (5 mM) que o VPA induzia parada em G1 enquanto em células HT-3 (2,5 mM) a indução ocorria na fase G2 (Feng et al. 2016). Em 2013 Tsai et al. observaram haver em células HeLa tratadas com VPA 4 mM por 72 h, um aumento de células na fase G2. Destaca-se, pois, que os efeitos do VPA no ciclo celular de células HeLa mostram-se diferentes frente a diferentes condições experimentais. Sugere-se então, que o VPA atue por diferentes mecanismos na promoção de parada no ciclo, dependendo do tipo celular, da dose e do tempo de tratamento com a droga.

Nos estudos sobre ciclo celular, a sincronização da fase celular é geralmente necessária para se obter populações de células sincronizadas enriquecidas em diferentes fases. Vários métodos têm sido propostos para sincronização, sendo um deles o que utiliza a lovastatina, recomendado por reter muitos tipos de células na fase G1 (Shen et al. 2013, Keyomarsi 1996). Após a verificação por teste MTT de quais concentrações dentre as propostas na literatura, para promover a sincronização das células HeLa em G1, causariam citotoxicidade, deu-se continuidade às análises excluindo-se a concentração citotóxica de 80 μ M. Essa análise se fez necessária porque, embora a lovastatina seja uma ferramenta bioquímica muito boa para sincronizar um número de diferentes linhagens de células, a sua aplicação para cada uma delas deve ser avaliada uma vez que essa droga pode induzir apoptose (Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi 2008).

Usando-se a citometria de fluxo para verificar a porcentagem de células na fase G1, após tratamento com diferentes concentrações de lovastatina, viu-se que essa frequência não aumentava proporcionalmente com a concentração da droga, concluindo-se que a concentração ideal para a obtenção de células sincronizadas em G1 era de 20 μ M por um período de 24 h, o

que proporcionou 84% de células nessa fase. Segundo Keyomarsi (1996), a concentração da lovastatina e a duração do tratamento de células que resultam em sincronização é determinada por monitoramento da taxa máxima de inibição da síntese de DNA em um mínimo de concentração da droga, pois se esse tratamento for estendido, pode resultar em citotoxicidade ou apoptose em alguns tipos celulares.

A adição de mevalonato no meio de cultivo de células tratadas com lovastatina foi necessária para inverter os efeitos inibidores de crescimento pela lovastatina (Keyomarsi 1996). Após essa adição, a síntese de DNA foi retomada depois de um período de latência de 12-14 h. Às 16 h e 20 h após a dessincronização em fase G1, a proporção de células na fase S atingiu um nível máximo para células HeLa. Esse período foi o mesmo já relatado para células HEC-1-A e células JEC (Shen et al. 2013). Na sequência ocorreu uma diminuição na frequência de células da fase S e aumento na fase G2, sendo um indicativo de saída das células da fase S e entrada em G2. A partir desses resultados, foi padronizada a sincronização das células HeLa na fase G1, tratando-as com lovastatina 20 μ M por 24 h. Para se obter as células sincronizadas em S, foi adicionado o ácido mevalônico e coletadas as células após 18 h de tratamento, uma vez que esse tempo se insere no intervalo ideal para obtenção da maior quantidade de células nessa fase.

Foi demonstrado no presente trabalho que em células HeLa o VPA tem um papel fundamental na demetilação do DNA por via ativa, conforme havia sido proposto por Veronezi et al. (2017) que utilizaram células não sincronizadas. Após a sincronização celular e tratamentos com VPA como realizados no presente trabalho, comprovou-se aumento da expressão dos genes para TET1 e TET2, bem como, diminuição na abundância de 5mC e aumento dos níveis de 5hmC, intermediário que está relacionado com essa via, confirmando tal mecanismo molecular. Tais fatos ocorreram mesmo com o bloqueio da proliferação celular. Além disso o VPA também alterou diminuindo, o perfil de expressão da DNMT1, enzima referente à via passiva de demetilação do DNA, o que é um argumento contra a ocorrência de demetilação somente por uma via ativa.

A redução significativa nos níveis de 5mC com o tratamento por VPA em células não proliferativas e células em replicação foi visualizada por imagens de imunofluorescência, bem como por análise da metilação global do DNA baseado em Elisa e por meio da quantificação de resultados obtidos pós citometria de fluxo, este último sendo utilizado também para análise de 5mC em células não sincronizadas. Concomitante a esses achados, observou-se o aumento na abundância de 5hmC nessas mesmas condições do ciclo celular, utilizando-se citometria de fluxo e imagens de fluorescência.

Os resultados aqui relatados de que o VPA induz a demetilação do DNA nas células não replicantes de maneira dose-dependente, também foram reportados em estudos que envolveram a transfecção transiente de plasmídeos metilados no interior celular, os quais demonstraram a independência da replicação de DNA para a demetilação, observada em tratamentos com VPA, uma vez que tais plasmídeos não foram replicados, mas tiveram seus níveis de 5mC reduzidos após tratamento com a droga. Assim, o VPA pode potencialmente reverter os padrões de metilação do DNA em células que não estão em divisão (Detich et al. 2003). Os presentes dados têm importantes implicações potenciais na reversão terapêutica de metilação do DNA em tecidos nos quais não haja mais divisão celular.

É sabido que modificações na metilação do DNA possam resultar em consequências a longo prazo. Então investigou-se a persistência da demetilação do DNA induzida pelo VPA em células sincronizadas não proliferativas. Para isso os preparados submetidos aos tratamentos com a menor concentração do fármaco foram retornados para um meio de cultura sem VPA. Curiosamente, a abundância das marcas de 5mC foi totalmente revertida nas primeiras 24 h sob este tratamento, o que difere do relato para células HeLa, porém em situação na qual as células não eram sincronizadas e em condições normais do ciclo (Veronezi et al. 2017). A fim de compreender qual a extensão do período no qual o VPA mantém as modificações na metilação do DNA em condições aqui estudadas, se faz necessário a realização de ensaios com tempos menores que 24 h de cultivo sem a droga. De qualquer forma, os presentes dados confirmam que as alterações na metilação do DNA sejam reversíveis (Milutinovic et al. 2007).

O estudo do efeito do VPA na expressão de DNMT1 e das TET 1 e 2, em diferentes estágios do ciclo celular teve o propósito de elucidar o mecanismo de mudanças afetando a metilação, induzidas pela droga. Em relação ao tratamento com o VPA por 4 h, a expressão de DNMT1 diminuiu significativamente para ambas condições do ciclo celular. Em células não proliferativas a resposta foi dose-dependente, entretanto um achado inesperado foi obtido em células coletadas na fase S, quando se observou maior redução de DNMT1 após tratamento com a menor concentração de VPA.

Assim, sugere-se a participação de componentes da via passiva (DNMT1) também no processo da demetilação promovida pelo VPA. Os efeitos do VPA sobre a DNMT1 são muito variáveis. No hipocampo de camundongos adulto o VPA não induz alterações nos níveis de DNMT1 (Aizawa & Yamamuro 2015). Em células epiteliais do cristalino humano tratadas com VPA 20 μ M por 3 dias, porém, relata-se aumento na expressão da DNMT1 (Palsamy et al. 2014); por outro lado, em câncer de mama e células leucêmicas descreve-se redução na expressão desse gene (Marchion et al. 2005, Lin et al. 2010).

Usando diferentes metodologias em um modelo celular de câncer cervical, este estudo, demonstrou-se que além de o VPA reduzir os níveis globais de 5-metilcitosina (5mC), ele também resulta em aumento dos níveis de 5hmC independente da célula estar ou não replicando o conteúdo de DNA. Por outro lado, até agora, o único mecanismo biológico conhecido por gerar 5hmC, 5fC, por oxidação de 5mC, envolve membros da família de enzimas TET (Wu & Zhung 2011) e esses por sua vez também foram influenciados em resposta ao VPA. Observou-se uma elevação na expressão de TET1, investigada somente em células paradas em G1 e em TET2 analisada em células nos dois estágios (paradas e proliferativas).

Por outro lado, os presentes resultados sugerem que a TET2 possa desempenhar papel importante no aumento de 5hmC induzido por VPA devido à notável elevação da quantidade de mRNA para esse gene usando-se uma maior concentração de VPA (20 mM). Ensaio adicional a nível proteico para DNMT1, TET1 e TET2, poderão vir a acrescentar mais informações sobre este achado.

Depreende-se, assim, que em células HeLa, o VPA possa inicialmente induzir a demetilação passiva pela supressão de DNMT1. Além disso, induz a demetilação por via ativa, independente da replicação; como resultado, o perfil de expressão de TET1 e TET2 e a abundância de um dos intermediários da via ativa de demetilação do DNA (5hmC), se tornam notavelmente aumentados, levando à redução da metilação global do DNA. Um relato de que o VPA possa agir nessas duas vias foi reportado para células epiteliais de cristalino humano. Nesse caso foi demonstrada alteração na expressão das enzimas da via de demetilação passiva do DNA (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) e da enzima da via de demetilação ativa do DNA, TET1 (Palsamy et al. 2014).

Apesar da abundância de 5hmC ter sido afetada pelo VPA nas células HeLa em fase não proliferativa, a abundância de 5fC e 5caC não foi detectada. Essas duas modificações são relatadas como aparecendo naturalmente em baixa abundância em outros tipos celulares, podendo ser o motivo pelo qual não foi aqui possível detectá-las. Há também sugestões de que limitações no ensaio escolhido possam afetar sua detecção, e que, esses intermediários possam ser removidos por BER, que depende altamente da proteína TDG (Ito et al. 2011, Kohli & Zhang 2013, Thomson et al. 2013). Portanto, estudos adicionais referentes à proteína TDG se fazem necessários, uma vez que ela está associada à via ativa de demetilação do DNA promovendo a remoção da 5caC e 5fC.

Os presentes resultados comprovam ainda que a 5-aza-CdR remove marcas de 5mC do DNA através do “esgotamento” da manutenção da metiltransferase DNMT1 na célula. Estes efeitos somente apareceram em células cujo DNA estava em replicação. Por outro lado, mesmo

atuando na via passiva, a 5-aza-CdR induziu aumento de 5hmC, um dos intermediários da via ativa em células proliferativas. Mesmo com esse aumento, constatou-se regulação negativa para TET1 e TET2. Essa não associação das TETs com a 5hmC foi também relatada para células de câncer retal, onde se observou uma diminuição da TET1 mas o aumento de 5hmC, sugerindo que isso esteja acontecendo através de um mecanismo ainda não elucidado, pois o próprio mecanismo de atuação das TETs ainda está mal compreendido (Pastor et al. 2013, Kai et al. 2016).

O aumento de transcrição de TET2 e o aumento da abundância de derivados de citosina metilada são também relatados em câncer hepatocelular (HCC) e fibroblastos de pele humana em resposta à 5-aza-CR (Sajadian et al. 2015, Manzoni et al. 2016). Curiosamente, apesar da 5-aza-CR compartilhar muitas semelhanças estruturais e funcionais com 5-aza-CdR, o presente estudo mostrou que esta última não afetou a expressão dos genes que codificam as enzimas da família TET em nenhuma das fases do ciclo. Este resultado acha-se em concordância com os relatos de Chowdhury et al. (2015) para os níveis de transcrição de TET1, TET2 e TET3 após a exposição à 5-aza-CdR em células de leucemia mielóide aguda.

Chowdhury et al. (2015) relatam que a 5-aza-CdR, em leucemia mieloide, reduz os níveis globais de 5mC e promove aumento nos níveis de 5hmC, 5fC e 5caC, sem alterar as TETs. Os mesmos autores argumentam que esse mecanismo pode ter explicação se as enzimas TETs atuarem preferencialmente em CpG hemi-metiladas ao invés de dinucleótidos CpG totalmente metilados, afirmando que ao serem gerados dinucleotídeos hemi-metilados, a 5-aza-CdR poderia promover um maior recrutamento das TETs sem ocasionar alterações nos seus níveis, o que corroboraria os presentes achados de não alteração na expressão dessas enzimas em células HeLa. Além disso, o estudo de Chowdhury et al. (2015) comprovou pela primeira vez o aumento de TETs ligadas ao DNA após o tratamento com 5-aza-CdR, sugerindo alteração na dinâmica das TETs e sua conseqüente atividade enzimática após administração da droga, afirmando ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da abundância de 5hmC e dos outros derivados de 5mC.

Portanto, os relatos aqui evidenciados são sugestivos de um processo mais complexo de demetilação do DNA, tanto em resposta ao VPA quanto à 5-aza-CdR, ficando evidente que eles não atuam através de um sistema “fechado”, por uma só via de demetilação. Entretanto, os efeitos que contribuem para a remoção da 5mC, não aparentes em células HeLa não proliferativas, tratadas com 5aza-CdR, são indicativos da dependência dessa droga para com o processo de replicação do DNA atuando por intermédio da via passiva. Mesmo assim, componentes da via ativa poderiam estar participando ou sendo afetados durante esse processo,

o que já foi reportado em outras linhagens celulares, por mecanismos não claramente elucidados (Marchion et al. 2005, Lin et al. 2010).

Em contraste com a 5-aza-CdR, o VPA promove efeitos na demetilação do DNA, em células HeLa, sem a dependência da proliferação celular, em células que ainda estão com o ciclo parado em G1, confirmando assim a participação do VPA no processo ativo de demetilação, embora, componentes da via passiva também sejam afetados.

10. Conclusões

1. Em condições experimentais nas quais se procede tratamento de células HeLa com VPA não se manifesta redução na viabilidade celular, porém verifica-se efeito dose-dependente na progressão do ciclo celular, ocasionando retenção dessas células na fase G2 do ciclo celular.
2. O VPA exerce papel fundamental na demetilação do DNA por via ativa, em células HeLa sincronizadas. Isto, porque o tratamento com VPA promove aumento da expressão gênica de enzimas da família TET, diminuição na abundância global de 5mC e aumento nos níveis de 5hmC, intermediário no processo de demetilação do DNA, ocasionado possivelmente por ação de TET2, em células paradas em G1 ou em proliferação. No entanto, pelo fato do VPA na concentração de 1 mM poder reduzir, tanto em células paradas em G1 como nas proliferativas, o perfil de expressão da DNMT1, enzima atuante na via passiva de demetilação do DNA, conclui-se que ele possa também afetar essa via metabólica.
3. Uma vez que o VPA pode reduzir os padrões de metilação do DNA de células HeLa não replicantes, de maneira dose-dependente, está sendo salientada uma importante implicação potencial de seu uso para a reversão terapêutica da metilação do DNA em tecidos nos quais não mais haja divisão celular.
4. Embora, como esperado, a 5-aza-CdR, usada como controle de demetilação passiva do DNA, reduza a expressão de DNMT1 e não afete a expressão gênica de TET1 e TET2 em nenhuma das fases do ciclo celular de células sincronizadas, ela induz aumento na abundância de 5hmC, sugerindo que possa atuar em mecanismo proposto por Chowdhury et al. (2015), no qual a 5-aza-CdR induz o recrutamento das TETs ao DNA, sem interferir nos níveis destas enzimas. A 5-aza-CdR promova demetilação do DNA em células sincronizadas por meio da via passiva, na dependência das células estarem replicando o conteúdo de DNA para que exerça seu efeito, reduzindo a expressão da DNMT1. Todavia, ela também atua na via ativa, por aumentar a abundância de 5hmC.
5. O fato de que alterações na abundância de 5fC e 5caC que fossem induzidas por VPA ou pela 5-aza-CdR em células cujo ciclo celular estivesse parado em G1, não tenham sido detectadas possivelmente se deva pelos seus níveis muito baixos ou por atividade da proteína TDG.

11. Referências Bibliográficas

- Aizawa S, Yamamuro Y. Valproate administration to mice increases hippocampal p21 expression by altering genomic DNA methylation. *Neuroreport*. 26 (15): 915-920, 2015.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. DNA, chromosomes and genomes. In: *Molecular biology of cell* 6th ed. Garland science, Taylor & Francis Group. New York, 2015.
- Araujo FD, Knox JD, Szyf M, Price GB, Zannis - Hadjopoulos M. Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 19 (6): 4546, Jun 1999]. *Mol Cell Biol*. 18: 3475-3482, 1998.
- Baldin V, Ducommun B. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J Cell Sci*. 6: 2425-2432, 1995.
- Barallon R1, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C, Kerrigan L. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. (9):727-732, 2010.
- Barreto G, Schäfer A, Marhold J, Stach D, Swaminathan SK, Handa V, Döderlein G, Maltry N, Wu W, Lyko F, Niehrs C. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*. 445: 671-675, 2007.
- Bártová E, Pacherníck J, Harnicarová A et al. Nuclear levels and patterns of histone H3 modifications and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci*. 118: 5035-5046, 2005.
- Berger SL, Kourizades T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 23: 781-783, 2009
- Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*. 447: 407-412, 2007.
- Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*. 447: 396–398, 2007.

- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Rev Drug Disc.* 5: 769-784, 2006.
- Borrell B. How accurate are cancer cell lines? *Nature.* 18: 858, 2010
- Brown SE, Fraga MF, Weaver ICG et al. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics.* 2 (1): 54-65, 2007.
- Burris HH, Baccarelli AA. Environmental epigenetics: from novelty to scientific discipline. *J Appl Toxicol.* 34 (2):113-116, 2013.
- Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M et al. Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (3): 1383-1389, 2005.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.* 2010 1-18, 2010.
- Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury S R, Cho IH, Cooper B, Chevassut T, Lossie AC, Irudayara J. The hypomethylating agent decitabine causes a paradoxical increase in 5hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Sci Rep.* 5: 9281, 2015.
- Christman JK. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene.* 21 (35): 5483-5495, 2002.
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob S. A new class of quinolone-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* 69 (10): 4277-4285, 2009.
- Deans C, Maggert KA. What do you mean, "Epigenetic"? *Genetics.* 199: 887-896, 2015.
- Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 2: 271-277, 1986.
- Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacytidine and decitabine. *Oncologist.* 18 (5): 619-624, 2013.

- Desjobert C, El Maï M, Gérard-Hirne T, Guianvarc'h D, Carrier A, Pottier C, Arimondo PB, Riond J. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. *Epigenetics*. 10 (1): 82-91, 2015.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem*. 278: 27586-27592, 2003.
- Dong E, Chen Y, Gavin DP et al. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics*. 5: 730-735, 2010.
- Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS ONE*. 6: e29144, 2011.
- Feng S, Yang Y, Lv J, Sun L, Liu M. Valproic acid exhibits different cell growth arrest effect in three HPV-positive/negative cervical cancer cells and possibly via inducing Notch1 cleavage and E6 downregulation. *Int J Oncol*. 49(1): 422-430, 2016.
- Finzer P, Kuntzen C, Soto U et al. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene*. 20: 4768-4776, 2001.
- Ganai SA, Kalladi SM, Mahadevan V. HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. *J Biomol Struct Dyn*. 33 (6):1185-1197, 2015.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res*. 12: 264–265, 1952.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 5-aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*. 25 (11): 4727-4741, 2005.
- Gillet JP, Varma S, Gottesman MM. The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 7: 452-458, 2013.
- Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*. 74: 481-514, 2005.

- Golson ML, Kaestner KH. Epigenetics in formation, function, and failure of the endocrine pancreas. *Molecular Metabolism*. 1066-1076, 2017.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969-6978, 2001.
- Guo JU, Su Y, Zhong C et al. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle*. 10: 2662-2668, 2011.
- Han BR, You BR, Park WH. Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncol Rep*. 30 (6): 2999-3005, 2013.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*. 333: 1303-1307, 2011.
- Hnilicová J, Hozeifi S, Dušková E, Icha J, Tománková T, Staněk D. Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One*. 6 (2): 1-11, 2011.
- Ho DH, Burggren WW. Review Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective. *J Exp Bio*. 213, 3-16, 2009.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. 333: 1300-1303, 2011.
- Jaluria P, Betenbaugh M, Konstantopoulos K, Shiloach J. Enhancement of cell proliferation in various mammalian cell lines by gene insertion of a cyclin-dependent kinase homolog. *BMC Biotechnol*. 7: 1-11, 2007.
- Javanmoghadam-Kamrani S, Keyomarsi K. Synchronization of the cell cycle using lovastatin. *Cell Cycle*. 15: 2434-2440, 2008.
- Jazi MS, Mohammadi S, Yazdani Y, Sedighi S, Memarian A, Aghaei M. Effects of valproic acid and pioglitazone on cell cycle progression and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia Jurkat cells. *Iran J Basic Med Sci*. 19: 779-786, 2016.
- Jiang J, Lu J, Lu D et al. Investigation of the acetylation mechanism by GCN5 histone acetyltransferase. *PLoS ONE* 7: e36660, 2012.

- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3: 415-428, 2002.
- Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. TET1 depletion induces aberrant CpG methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One*. 11 (12): e0168281, 2016.
- Keyomarsi K, Sandoval L, Band V, Pardee AB. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*. 13: 3602-3609, 1991.
- Keyomarsi K. Synchronization of mammalian cells by Lovastatin. *Methods Cell Sci* 18: 109-114, 1996.
- Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 116 (2): 259-272, 2004.
- Kim KW, Roh JK, Wee HJ, Kim C. Molecular targeted anticancer drugs. In *Cancer Drug Discovery - Science and History*. Springer. New York, 2016.
- Kim YB, Ki SW, Yoshida M, Horinouchi S. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot*. 53 (10): 1191-1200, 2000.
- Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 502: 472-479, 2013.
- Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem*. 279: 18851-18860, 2004.
- Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3*. (8):1213-1224, 2013.
- Larson RA, Chung J, Scanu AM, Yachnin S. Neutrophils are required for the DNA synthetic response of human lymphocytes to mevalonic acid: evidence suggesting that a nonsterol product of mevalonate is involved. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79: 3028-3032, 1982.
- Lin CM, Lin FA, Mei XQ, Zhu YF, Zheng YH, Ye BG. [Investigation on the mechanisms of p15INK4B gene demethylation by valproate in Molt-4 cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 31(12): 835-838, 2010.

- Lötsch J, Schneider G, Reker D, Parnham MJ, Schneider P, Geisslinger G, Doehring A. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol Med* 19 (12): 742753, 2013.
- Maher CA, Wilson RK. Chromothripsis and human disease: piecing together the shattering process. *Cell*. (1-2): 29-32, 2012.
- Ma HT, Poon RYC. Synchronization of HeLa cells. *Method Mol Biol*. 761: 151-161, 2011.
- Manzoni EFM, Pennarossa G, deEguileor M, Tettamanti G, Gandolfi F, Brevini TAL. 5azacytidine affects TET2 and histone transcription and reshapes morphology of human skin fibroblasts. *Sci Rep*. 6: 37017, 2016.
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res*. 59: 3815-3822, 2005.
- Marinova Z, Leng Y, Leeds P, Chuang DM. Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacol*. 60 (7-8):1109-1115, 2011.
- McManus KJ, Biron VL, Heit R et al. Dynamic changes in histone H3 lysine 9 methylation: Identification of a mitosis-specific function for dynamics methylation in chromosome congression and segregation. *J Biol Chem* 281: 8888-8897, 2006.
- Medrano EE, Pardee AB. Prevalent deficiency in tumor cells of cycloheximide induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4123-4126, 1980.
- Mello MLS, Vidal BC. Cromatina e Cromossomos. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. (Org.). *A Célula*. 3ed. Barueri: Manole Ltda. 3: 185-204, 2013.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinog*. 28: 560-571, 2007.
- Milutinovic S, Zhuang Q, Niveleau A, Szyf M. Epigenomic stress response. Knockdown of DNA methyltransferase 1 triggers an intra-S-phase arrest of DNA replication and induction of stress response genes. *J Biol Chem*. 278 (17):14985-14995, 2003.

- Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, Myers RM, Brown PO, Botstein D. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell.* (5): 2361-2374, 2004.
- Ngun TC, Vilain E. The biological basis of human sexual orientation: is there a role for epigenetics? *Adv. Genet.* 86: 167-184, 2014.
- Niehrs A. Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation.* 77: 1-11, 2009.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99: 247-257, 1999.
- Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT et al. DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol.* 28 (2): 752-771, 2008.
- Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap 1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.* 121: 26-34, 2014.
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14: 341-356, 2013.
- Perucca E. Overtreatment in epilepsy: adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res.* 52: 25-33, 2002.
- Razin A, Shemer R. DNA methylation in early development. *Hum Mol Genet.* 4: 1751-1755, 1995.
- Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293 (5532): 1089-1093, 2001.
- Sadakierska-Chudy A, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox Res.* (2): 172-197, 2015.
- Sajadian SO, Ehnert E, Vakilian H, Koutsouraki E, Damm G, Seehofer D, Thasler W, Dooley S, Baharvand h, Sipos B, Nussler AK. Induction of active demethylation and 5hmC

- formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma. *Clin Epig* 7 (98): 1-14, 2015.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 5: 695-710, 1953.
- Shen H, Li X, Yang Y, Wang X, Zhang X. Lovastatin induces G1-phase synchronization of HEC-1-A cells and JEC cells. *Bangladesh J Pharm.* 8: 1-7, 2013.
- Shirane K, Toh H, Kobayashi H, Miura F, Chiba H, Ito T, Kono T, Sasaki H. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genet.* 4: 1-10, 2013.
- Sinensky M, Logel J. Defective macromolecule biosynthesis and cell-cycle progression in a mammalian cell starved for mevalonate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 3257-3261, 1985.
- Simonsson S, Gurdon J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nature Cell Biol.* 6: 984-990, 2004.
- Skloot R. *The immortal life of Henrietta Lacks.* Crown Publishing Group. New York, 2010.
- Szyf M. The role of DNA methyltransferase 1 in growth control. *Front Biosci.* 6: 599-609, 2001.
- Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M et al. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics.* 18: 738-741, 2008.
- Thomson JP, Hunter JM, Meehan RR. Deep C diving: mapping the low-abundance modifications of the DNA demethylation pathway. *Genome Biol.* 14 (118) 1- 4, 2013.
- Tsai C, Leslie JS, Franko-Tobin LG, Prasnal MC, Yang T, Vienna Mackey L, Fuselier JA, Coy DH, Liu M, Yu C, Sun L. Valproic acid suppresses cervical cancer tumor progression possibly via activating Notch1 signaling and enhances receptor-targeted cancer chemotherapeutic via activating somatostatin receptor type II. *Arch Gynecol Obstetr.* 288 (2): 393-400, 2013.
- Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 248: 201-209, 2010.

- Vandiver AR, Idrizi A, Rizzardi L et al. DNA methylation is stable during replication and cell cycle arrest. *Sci Rep.* 5 (17911): 1-8, 2015.
- Van Holde KJ, Zlatanova GA, Moudrianakis E. Elements of chromatin structure, histones, nucleosome, and fibres. In *Chromatin structure and gene expression* (ed. S.C.R. Elgin). Oxford University Press, Oxford, UK. 1-26, 1995.
- Veronezi GMB, A metilação do DNA em células HeLa após tratamento com ácido valproico. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de Biologia, UNICAMP. 88 f, 2017.
- Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, Vidal BC. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PloS ONE.* 12 (1): e0170740, 2017.
- Wang Z, Xu L, Zhu X et al. Demethylation of specific Wnt/b-catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec.* 293: 1947–1953, 2010.
- Weber AR, Krawczyk C, Robertson AB, Kusnierczyk A, Vågbo CB, Schuermann D, Klungland A & Schar P. Biochemical reconstitution of TET1–TDG–BERdependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat Comm.* 7:1-13, 2016.
- Wu CT, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 293: 1103–1105, 2001.
- Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25: 2436–2452, 2011.
- Wu Y, Guo SW. Histone deacetylase inhibitors trichostatin A and valproic acid induce cell cycle arrest and p21 expression in immortalized human endometrial stromal cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 137 (2): 198-203, 2008.

11. Anexos



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "***EFEITOS DO ÁCIDO VALPROICO SOBRE A METILAÇÃO DO DNA DURANTE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS HeLa***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Marina Amorim Rocha
Nome do(a) aluno(a): Marina Amorim Rocha

Assinatura: [Assinatura]
Nome do(a) orientador(a): Dra Maria Luiza Silveira Mello

Data: 27 de março de 2018

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITOS DO ÁCIDO VALPROÍCO SOBRE A METILAÇÃO DO DNA DURANTE O CICLO CELULAR DE CÉLULAS HELA**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de março de 2018.

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Marina Amorim Rocha**
RG n.º 1514363550

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **Dra Maria Luiza Silveira Mello**
RG n.º 3032241-8