

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Marina Barreto Felisbino

**“REMODELAÇÃO CROMATÍNICA, ANOMALIAS
CROMOSSÔMICAS E MORTE CELULAR EM CONDIÇÕES
DE INIBIÇÃO DE DEACETILASES DE HISTONAS
EM CÉLULAS HELA E 3T3”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Marina Barreto Felisbino

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

F335r Felisbino, Marina Barreto, 1988-
Remodelação cromatínica, anomalias cromossômicas
e morte celular em condições de inibição de deacetilases
de histonas em células HeLa e 3T3 / Marina Barreto
Felisbino. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Cromatina. 2. Epigenética. 3. Ácido valproico.
4. Células HeLa. 5. Células 3T3. I. Mello, Maria
Luiza Silveira, 1943-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Chromatin remodeling, chromosome abnormalities and cell death under histone deacetylase inhibition in HeLa and 3T3 cells

Palavras-chave em Inglês:

Chromatin
Epigenetics
Valproic acid
HeLa cells
3T3 cells

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]
Luciana Bolsoni Lourenço
Maurício Machaim Franco

Data da defesa: 24-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 24 de fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA

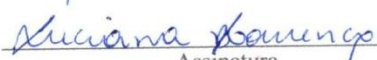
Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco


Assinatura

Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço Morandini


Assinatura

Profa. Dra. Maria de Fatima Sonati

Assinatura

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Assinatura

Agradecimentos

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, base da minha formação acadêmica, por toda a dedicação e o comprometimento com meu desenvolvimento profissional, assim como, pelo carinho e a atenção com meu desenvolvimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas presentes lições filosóficas e morais, e pelo exemplo de perseverança e dedicação ao trabalho.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, pela ajuda fundamental na concepção e realização de alguns experimentos, por me permitir a utilização das estruturas de seu laboratório de maneira tão livre, e por fim, pelos conselhos e amizade.

À técnica de laboratório Ana Lúcia Soledade, pela presteza em compartilhar seus conhecimentos e em auxiliar em tantos ensaios, além da agradável companhia matinal.

À Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro, por permitir utilizar a estrutura do seu laboratório, assim como a linhagem celular HeLa, em todas as ocasiões solicitadas, e à Bióloga Dirce Lima Gabriel, pela dedicação e auxílio em diversos experimentos realizados nesse laboratório.

À Profa. Profa. Dra. Maria Cristina C. Gomes Marcondes, por permitir a utilização do equipamento fluorômetro Fusion™ e a seus alunos, por auxiliar na sua manipulação.

À Profa. Dra. Liana Verinaud, por permitir a utilização da estrutura de seu laboratório, assim como a seus alunos Alliny C. D. Lima, Carolina Francelin de

Andrade, Rodolfo Thomé e Rosária Di Gangi, pela ajuda em uma série de técnicas e no uso de diversos equipamentos.

À Profa. Dra. Vera Lúcia G. S. Lopes por nos fornecer esfregaços de sangue humano.

Aos companheiros de laboratório presentes e passados Camila Dias Lourenço dos Santos, Elenice Monte Alvarenga, Eli Heber Martins dos Anjos, Isabela Santos Silva, Juliana Fulan Ribeiro, Lara Maldanis, Luana Nunes Santos, Marcela de Oliveira Silva e em especial à Flávia Gerelli Ghiraldini, pelo auxílio na utilização do microespectrofotometro de varredura, em contagens celulares, na discussão e concepção de experimentos ou ainda pela agradável companhia e conversa.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, por contribuir na manutenção da infra-estrutura para a realização do meu trabalho, e à secretária Líliam Panagio, pelo esclarecimento de dúvidas e problemas ao longo do caminho.

À FAPESP e ao CNPq, pelas bolsas de estudo de mestrado a mim concedidas e à CAPES por auxílios financeiros relacionados a projetos do nosso laboratório.

Ao meu querido Thiago, meu sinônimo de cumplicidade, por caminhar a meu lado, dividir minhas conquistas, afastar minhas incertezas, me trazer paz.

Aos meus amados pais, sobre a certeza da qual minha vida se baseia, sobre a verdade da qual minha vida se define, por me fazer quem eu sou e me apoiar.

A minha avó Neusa, por me ensinar gentileza e bondade, por incentivar cada pequeno passo, por não me permitir nunca duvidar que sou amada.

“the major problem, I think, is chromatin...
you can inherit something beyond the DNA sequence.
That’s where the real excitement of genetics is now”
(Watson, 2003).

"Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes..."
(Fernando Pessoa)

Sumário

Abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
Introdução	
1. Organização da cromatina	
Nucleossomos.....	1
Níveis de organização da cromatina.....	2
Eucromatina e heterocromatina.....	3
2. Epigenética	
Definição.....	6
Metilação de DNA.....	7
Modificações covalente e não covalentes de histonas.....	8
3. Inibição de HDACs.....	16
Objetivos.....	22
Capítulo I.....	23
Capítulo II.....	40
Conclusões.....	92
Referências bibliográficas.....	94

Abreviaturas

DNMTs - DNA metil transferases

ERK 1/2 - quinase reguladora de sinais extracelulares 1/2

H3K4me3 - Trimetilação na lisina 4 da histona H3

H3K9me - Mono metilação na lisina 9 da histona H3

H3K9me2 - Dimetilação na lisina 9 da histona H3

H3K9me3 - Trimetilação na lisina 9 da histona H3

H3K27me - Mono metilação na lisina 27 da histona H3

H3S10ph - Fosforilação na serina 10 da histona H3

H4S1ph - Fosforilação na serina 1 da histona H4

H4R3me - Metilação na arginina 3 da histona H4

H4K4ac - Acetilação na lisina 4 da histona H4

HAT - Acetiltransferase de histona

HDAC - Deacetilase de histona

HDACi - Inibidor de HDACs

TSA - Tricostatina A

VPA - Ácido valproico

Resumo

O ácido valproico (VPA) é um potente anti-convulsante conhecido como inibidor de deacetilases de histonas (HDACi) de classe I em diversos tipos celulares. Buscando conhecer se a estrutura cromatínica se alteraria quando da ação de HDACi, investigamos a supraorganização cromatínica de células tumorais HeLa e de células NIH 3T3, estas últimas caracterizadas por apresentarem áreas de heterocromatina conspícuas, sob tratamento com VPA. Essas informações foram associadas a da atividade enzimática de HDACs assim como do nível de acetilação das histonas H3 nesses modelos celulares tratados por VPA. As frequências de anomalias cromossômicas, morte celular e índices mitóticos também foram investigados. As células tratadas com VPA nas concentrações 0,05, 0,5 e 1,0 mM por 1-24 h foram submetidas à reação de Feulgen e analisadas através de microespectrofotometria de varredura automática e microscopia óptica. Western blots, análises enzimáticas e ensaio TUNEL também foram utilizados neste estudo. Células tratadas com tricostatina A (TSA), uma HDACi de atividade mais ampla do que o VPA, foram utilizadas como controles positivos. Em todas as condições de tratamento com VPA e TSA foi demonstrada descompactação cromatínica acompanhada de diminuição na atividade de HDACs e aumento na acetilação de histona H3. Essa alteração textural cromatínica também atingiu áreas heterocromáticas de células NIH 3T3. Nenhuma alteração nas frequências de anomalias cromossômicas, índices mitóticos e morte celular foi observada nesses modelos celulares nas condições relatadas, embora tenha ocorrido um aumento de fragmentação de DNA em células HeLa tratadas com VPA por 24 h e por TSA a partir de 4 h. Diminuição na proliferação celular nas células HeLa ocorreu apenas sob tratamento com VPA 5,0 mM por 48 h. Os resultados indicam que o VPA e a TSA promovem remodelação cromatínica em células tumorais HeLa e em células fibroblásticas NIH 3T3, que pode ser atribuída à sua ação de HDACi. Não se pôde descartar, porém, que o VPA atue sobre outras proteínas nucleares, cuja expressão poderia se apresentar diminuída sob sua ação.

Abstract

Valproic acid (VPA) is a potent anticonvulsant that inhibits class I histone deacetylases (HDACi) in several cell types. Seeking to know whether the chromatin structure would change when the action of HDACi, we investigated whether VPA would affect chromatin supraorganization of tumoral HeLa cells and NIH 3T3 cells, this latter characterized by presenting areas of conspicuous heterochromatin. This information was associated with enzymatic activity of HDACs as well as the level of H3 histone acetylation in these cell models treated with VPA. The frequency of chromosome abnormalities and cell death and mitotic indices were also investigated. VPA-treated cells at concentration 0.05, 0.5 and 1.0 mM for 1-24 h were subjected to the Feulgen reaction and analysed by automatic scanning microspectrophotometry and optical microscopy. Western blots, enzymatic analysis and TUNEL assay were also performed in this study. Trichostatin A (TSA)-treated cells, an HDACi whose activity is broader than VPA, were used as positive control. Chromatin decondensation was demonstrated under all TSA and VPA treatments and was associated with decrease in HDAC activity and with increase in the level of H3 histone acetylation. This chromatin textural change also affected heterochromatic areas of NIH 3T3 cells. No changes in chromosome abnormalities, mitotic indices or morphologically identified cell death were found in both cellular models with the VPA treatment conditions mentioned above, although there was an increase of DNA fragmentation after a 24 h-VPA treatment and a 4 h-TSA treatment in HeLa cells. Decrease in cell proliferation in HeLa cells occurred only under a 5.0 mM 48 h-VPA treatment. The results indicate that VPA and TSA promote chromatin remodeling in tumoral HeLa cells and fibroblastic NIH 3T3 cells, which may be attributed to their HDACi action. It may not be discarded, however, that VPA acts on other nuclear proteins whose expression could be reduced under its action.

Introdução

1. Organização da cromatina

Nucleossomos

Em células eucarióticas, o DNA genômico é complexado com histonas formando nucleossomos, unidades fundamentais da cromatina. Cada nucleóide nucleossomal consiste de um complexo de 8 proteínas histônicas constituído por 2 pares de H2A, de H2B, de H3 e de H4, ao redor do qual se enrola uma dupla fita de DNA de 147 pb. Cada nucleóide nucleossomal é separado do próximo por um DNA de ligação que varia de tamanho, entre poucos a 80 pb (Kornberg 1977, Luger et al. 1997).

Histonas são proteínas básicas de massa molecular relativamente baixa e se acham classificadas em cinco grupos (H1, H2A, H2B, H3 e H4) com base em seu teor de lisina e arginina. A histona H1 é muito rica em lisina, enquanto as histonas H2A e H2B são moderadamente ricas em lisina, e as histonas H3 e H4 são ricas em arginina (Elgin & Weintraub 1975). As histonas H3, H4, H2A e H2B possuem caudas N-terminais que se projetam do nucleóide histona-DNA e são alvos frequentes de modificações. O fato das histonas H3 e H4 estarem entre as proteínas mais conservadas dos eucariotos é um reflexo do seu papel fundamental na complexação com o DNA e na estrutura da cromatina. Apesar da alta conservação, organismos eucariotos também produzem pequenas quantidades de variantes de histonas especializadas H3, H2A e H2B que diferem das principais na sua sequência de aminoácidos e que se inserem no nucleóide nucleossomal (Urban et al. 1979).

Por muito tempo acreditou-se que, uma vez formados, os nucleossomos permanecessem fixos na sua posição no DNA em função da alta coesão entre o DNA e o octâmero de histonas. Caso fosse verdade, isso traria problemas no acesso das maquinarias de transcrição e replicação em regiões específicas da sequência de DNA. Porém, atualmente sabe-se que o DNA ligado ao octâmero de histonas pode se soltar parcialmente por alguns milissegundos permitindo sua ligação a outras proteínas (Alberts et al. 2008). Além disso, foi descoberta a existência de complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP, grandes maquinarias proteicas que podem interagir com o DNA e as histonas e através de ciclos de hidrólise de ATP promover o deslizamento dos nucleossomos pela fita de DNA ou mesmo a remoção de parte ou de todo o nucleóide nucleossomal (Allis & Muir 2011).

Níveis de organização da cromatina

O arranjo estendido de nucleossomos constitui o nível primário de organização da cromatina, formado por fibras de 11 nm conhecidas como "colar-de-contas". Quando um núcleo é delicadamente lisado e observado em microscopia eletrônica, a maior parte da cromatina é vista sob a forma de fibras de 30 nm, consideradas como segundo nível de organização da cromatina (Alberts et al. 2008). Apesar de décadas de estudos, ainda restam dúvidas em como os nucleossomos são empacotados para formar as fibras de 30 nm. Dois modelos têm sido propostos - o solenóide, no qual o DNA de ligação se curva para que nucleossomos contíguos se posicionem em uma única hélice e o zig-zag, no qual o DNA de ligação permanece reto formando duas pilhas de nucleossomos com arranjo helicoidal. Há evidências bioquímicas e estruturais

consideráveis para os dois modelos, sendo possível que ambos estejam corretos e que a cromatina nativa seja capaz de um polimorfismo estrutural (Fedorova & Zink 2008, Allis & Muir 2011). Essas diferentes configurações estruturais podem estar relacionadas ao tamanho variável do DNA de ligação, à presença ou ausência da histona de ligação H1 (maior e menos conservada que as demais, é capaz de se ligar ao DNA e a proteínas promovendo a aproximação dos nucleossomos) e ainda à presença de proteínas que se ligam ao DNA ou às histonas (Alberts et al. 2008, Allis & Muir 2011). A partir deste nível constituem-se níveis adicionais de compactação cromatínica, culminando numa supraorganização da cromatina visível em termos de microscopia de luz.

Euromatina e Heterocromatina

Nos núcleos de eucariotos a forma mais mais óbvia de organização estrutural do genoma é a compartimentalização em euromatina e heterocromatina. Em 1928, o botânico alemão Heitz distinguiu pela primeira vez euromatina de heterocromatina em função da diferença de colorabilidade associada à compactação no núcleo interfásico (Heitz 1928, Fedorova & Zink 2008). Tais estudos demonstraram que a cromatina de partes específicas de certos cromossomos permanecia condensada durante a intérfase, restando as propriedades de colorabilidade intensa, características de cromossomos metafásicos. A cromatina que apresentava esse comportamento foi então denominada heterocromatina, em contraposição à cromatina que se apresentava difusa, não compactada, durante a intérfase, denominada euromatina (Heitz 1928, Mello 1978).

A heterocromatina foi tradicionalmente subdividida em constitutiva e facultativa. A heterocromatina constitutiva corresponde a uma cromatina que está sempre condensada, independente da fase do ciclo celular e estado fisiológico da célula, e é geralmente considerada não codificadora. A heterocromatina facultativa, pode se descondensar em algumas circunstâncias e é considerada codificadora inativa, uma vez que não responde a estímulos para transcrição talvez por alterações em sua estrutura quartenária, o que, no entanto, pode ser reversível. As regiões cromossômicas ao redor dos centrômeros e telômeros são exemplos de heterocromatina constitutiva, enquanto os genes silenciados à partir de um certo ponto durante o desenvolvimento podem constituir a heterocromatina facultativa, que pode ser encontrada intercalada ao longo dos braços cromossômicos (Mello 1978, Grewal & Jia 2007).

A eucromatina cuja estrutura apresenta-se menos condensada é relativamente rica em genes e é potencialmente ativa transcricionalmente (Elgin & Grewal 2003). Contudo, estas diferenças não são sempre tão claras, como demonstrou uma análise recente do genoma humano, onde se observou que algumas regiões pericentroméricas são descondensadas e que algumas regiões eucromáticas são condensadas (Gilbert et al. 2004).

A divisão citológica da cromatina em eucromatina e heterocromatina não necessariamente nos remete a uma definição molecular direta. Entretanto, há diferentes marcadores bioquímicos associados à cromatina que são importantes na distinção entre esses dois estados funcionais da cromatina.

Os elementos de DNA repetitivo e RNA não codificantes parecem apresentar um papel no direcionamento dos complexos bioquímicos heterocromáticos aos domínios cromossômicos específicos (Henikoff 2000). Acredita-se que os transposons e DNA satélites, os quais compõem a principal porção das sequências heterocromáticas, preferencialmente recrutem a maquinaria heterocromática, levando ao silenciamento dos genes vizinhos. Em *Schizosaccharomyces pombe*, o elemento repetitivo centromérico é um centro de nucleação da heterocromatina, e está envolvido no silenciamento regional de um domínio de aproximadamente 20kb (Hall et al. 2002).

Dessa forma, uma característica chave da heterocromatina é sua capacidade de se propagar e assim reprimir a expressão gênica ao longo do domínio, fenômeno conhecido como "efeito de posição". A heterocromatina pode também proteger a integridade genômica inibindo a recombinação com elementos dispersivos de DNA repetitivo. O controle de elementos transponíveis "parasitas" é sugerido como um benefício evolutivo original do silenciamento heterocromático (Henikoff 2000).

Embora silenciamento gênico possa ter se tornado praticamente sinônimo de heterocromatização, há vários casos reportados na literatura em que a formação de heterocromatina é requerida para a ativação de expressão gênica (Lu et al. 2000, Yasuhara & Wakimoto 2006, Finnegan 2011). Dessa forma, é possível que alguns dos conceitos aceitos sobre heterocromatina precisem ser redefinidos.

Na maior parte do século 20, acreditava-se que a cromatina tivesse apenas um papel estrutural, promovendo a compactação do DNA no núcleo. Atualmente é claro o conceito de que a estrutura da cromatina exerce um papel dinâmico, regulando um grande número de processos essenciais para as funções de uma célula normal,

incluindo transcrição gênica, replicação, reparo e recombinação do DNA. (Lanctôt et al. 2007, Latham & Dent 2007, Fedorova & Zink 2008). A estrutura dinâmica da cromatina é governada por uma série de eventos inseridos no recente campo de estudo da epigenética.

2. Epigenética

Definição

O termo epigenética foi originalmente utilizado para descrever eventos que não podiam ser explicados por princípios genéticos. Conrad Waddington, a quem foi dado crédito por cunhar o termo, definiu epigenética como "um ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, os quais trazem o fenótipo para o ser" (Waddington 1942).

A epigenética compreende fenômenos nos quais há mudança no produto final de um locus ou cromossomo sem haver alteração na sequência de bases do DNA. Um exemplo esclarecedor é a diferenciação celular, na qual as células de um organismo pluricelular embora possuam o mesmo genótipo, durante o desenvolvimento, se diferenciam em células com perfis de expressão gênica e funções celulares diversas. Dessa forma, a epigenética pode ser definida hoje como "o estudo de qualquer mudança potencialmente estável e idealmente herdável na expressão gênica ou no fenótipo celular sem alteração na sequência de DNA" (Allis et al. 2007b, Goldberg et al. 2007).

Ao longo dos anos, numerosos fenômenos biológicos considerados estranhos ou inexplicáveis foram inseridos na categoria de epigenética. Isso inclui processos aparentemente não relacionados, como a paramutação no milho (uma interação entre dois alelos no qual um alelo causa mudanças herdáveis no outro alelo), variação por efeito de posição em *Drosophila* (no qual a localização cromossomal de um gene determina a sua expressão) e imprinting de loci específicos maternos ou paternos em mamíferos. Hoje entende-se, em parte, os mecanismos moleculares que permeiam esses fenômenos biológicos diversos (Goldberg et al. 2007).

A maior parte das pesquisas em epigenética atualmente estão relacionadas ao estudo de modificações covalentes e não covalentes no DNA e em histonas, à interferência por RNA, e nos mecanismos nos quais esses eventos influenciam a estrutura da cromatina.

Metilação de DNA

A metilação do DNA é a modificação química da cromatina melhor caracterizada. Consiste na adição de um grupo metil no carbono 5 de resíduos de citosina do DNA. Em mamíferos, aproximadamente toda metilação do DNA ocorre em resíduos de citosina de dinucleotídeos CpG (dinucleotídeos de citosina e guanina). As regiões do genoma que contêm alta concentração de CpG são denominadas ilhas CpG (Allis et al. 2007a, Goldberg et al. 2007, Zhang et al. 2012).

A adição de grupos metil é catalisada por enzimas metil transferases (DNMTs). DNMTs de manutenção adicionam grupos metil em DNA hemi-metilados durante a replicação, sendo fundamentais para o processo de herança do padrão de metilação.

DNMTs *de novo* adicionam grupos metil em sítios não anteriormente metilados (Groth et al. 2007). Embora bastante estável, a metilação do DNA é uma modificação reversível, sendo a remoção de grupos metil catalisada por enzimas demetilases.

A distribuição do DNA metilado no genoma é mais densa em regiões não codificantes como heterocromatina centromérica e elementos de DNA repetitivo evidenciando seu papel na repressão transcricional. De fato, a metilação do DNA é o mecanismo epigenético conhecido há mais tempo como repressor da expressão gênica (Razin & Riggs 1980).

A metilação do DNA tem um papel fundamental em muitos processos celulares como na regulação gênica e organização da cromatina durante a embriogênese e a gametogênese (inativação do cromossomo X de fêmeas de mamíferos placentários, imprinting em mamíferos) (Fagundes et al. 2011) e silenciamento de sequências repetitivas e centroméricas de fungos a mamíferos (sendo considerado um mecanismo de defesa do genoma hospedeiro contra sequências externas) (Yang & Kuroda 2007). Além disso, a formação da heterocromatina em muitos organismos é mediada pela metilação do DNA e suas proteínas de ligação, em combinação com modificações em histonas e RNA de interferência (Zaratiegui et al. 2007).

Modificações covalentes e não covalentes de histonas

Há muito tempo tem sido reconhecido um possível papel das proteínas ligadas ao DNA de eucariotos, principalmente as histonas, em modificar as propriedades do DNA.

Stedman e Stedman (1950) propuseram que as histonas agiriam como repressoras da expressão gênica, dessa forma, cada tipo de célula no organismo deveria ter diferentes tipos de histonas tornando possível os diferentes fenótipos.

Posteriormente, houve um período em que se acreditava que as histonas eram proteínas supressoras que passivamente silenciavam a expressão gênica, portanto a ativação gênica se daria com a dissociação das histonas do DNA, levando a um estado semelhante ao dos procariotos (Bonner et al. 1963). Porém, algumas evidências mostraram não haver extensas regiões de DNA livre em células eucarióticas (Clark & Felsenfeld 1971). Além disso, mesmo que esse modelo fosse correto não se sabia como seria dado o controle da retirada das histonas.

A resolução dessas questões começou quando se especulou que a acetilação de histonas poderia estar relacionada com ativação gênica e que cromatina ativa não necessariamente seria livre de histonas (Allfrey et al. 1964). Na década de 70 houve maior interesse em se examinar a relação entre modificações de histona e expressão gênica, porém esclarecer esse problema tornou-se muito mais simples após a descoberta da estrutura do nucleossomo por Kornberg e Thomas (1974). Entre as informações estruturais importantes, a extensão da cauda amino terminal das histonas que se projeta do octâmero de histonas tornava evidente a sua acessibilidade a modificações.

A partir de 1980, Grunstein e colaboradores (Wallis et al. 1980, Durrin et al. 1991) conseguiram provar que as caudas amino terminais das histonas são essenciais para a regulação gênica e para o silenciamento de domínios de cromatina. Desde

então, novas modificações de histonas têm sido identificadas assim como tem-se reavaliado o papel daquelas previamente conhecidas (Allis et al. 2007a).

Modificações não covalentes como a incorporação de histonas variantes especializadas, provêm a célula com ferramentas adicionais para introduzir variação estrutural e funcional na cromatina.

Com exceção da histona H4, todas as histonas do core nucleossomal apresentam algumas variantes. As variantes de histonas podem conter pequenas alterações na sequência de aminoácidos, como é o caso das variantes H3.1, H3.2 e H3.3 ou mudanças estruturais significantes como nas variantes macroH2A e na proteína centrômero específica CENP-A. As variante possuem nível de expressão específico para diferentes tipos celulares. Podem ser classificadas como dependentes da replicação, independentes da replicação e tecido-específicas, em função do seus perfis de expressão (Banaszynski et al. 2010).

Complexos remodeladores da cromatina, dependentes de ATP, modificam a acessibilidade da cromatina, alterando as interações histona-DNA e permitindo a introdução de histonas variantes no nucleóide nucleossomal com o auxílio de proteínas chaperonas (Polo & Almouzni 2006, Allis & Muir 2011).

As variantes de histonas geram nucleossomos bioquimicamente únicos para a regulação da dinâmica da cromatina. A maioria das variantes pertence à classe independente da replicação, sendo expressa independente da fase S e incorporada independente da replicação do DNA. Sua expressão tempo- e tecido-específica somada à sua maquinaria de deposição exclusiva dão às variantes de histonas uma

habilidade única para regular processos chaves do desenvolvimento (Banaszynski et al. 2010, Boyarchuk et al. 2011).

As primeiras modificações covalentes pós-traducionais identificadas nas histonas foram a acetilação, normalmente associada com domínios ativos de cromatina ou regiões que são geralmente permissivas à transcrição, e a fosforilação, em alguns resíduos, associados com cromatina condensada, onde normalmente não acontece transcrição. Atualmente reconhece-se um número grande de modificações covalentes nas histonas como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, citrulinação, propionilação, glicosilação e n-nitrosação (Stephan et al. 2001, Grewal & Moazed 2003, Gilbert et al. 2004, 2005, Kuo et al. 2004, Sharma et al. 2005, Zilberman & Henikoff 2005, Rao et al. 2007, Burgess & Zhang 2010).

Embora um grande número de resíduos de aminoácidos das histonas possa sofrer modificações, os resíduos de lisina e arginina são os mais comumente modificados. A localização mais comum destas modificações é na cauda N-terminal das histonas, embora também ocorram modificações nos domínios centrais e nas regiões C-terminais dessas proteínas (Latham & Dent 2007).

Grandes avanços têm sido feitos em identificar as consequências biológicas de algumas modificações pós-traducionais. As modificações podem afetar o contato entre histonas em nucleossomos contíguos ou entre as histonas e o DNA, resultando em alteração na supraorganização cromatínica. A acetilação de resíduos de lisina nas caudas das histonas neutraliza a carga básica desses resíduos, rompendo o contato entre histonas e/ou o contato com o DNA, alterando a compactação da cromatina. Outras modificações, como metilação, não rompem os contatos nucleossomais através

da alteração da carga dos resíduos, mas por meio da ligação de proteínas efetoras que possuem domínios especializados que facilitam o reconhecimento e a ligação a marcas metiladas, promovendo efeitos *downstream*. Os domínios caracterizados por reconhecer e se ligar a resíduos metilados são cromodomínios, domínios tudor, *PHD fingers*, domínios MBT, entre outros. Além disso, bromodomínios ligam-se a resíduos acetilados e domínios BRCT e BIR ligam-se a resíduos de treonina e serina fosforilados (Gardner et al. 2011).

Interpretar as consequências biológicas de cada modificação é ainda mais complicado pelo fato de que um resíduo de aminoácido particular pode receber mais de um tipo de modificação (resíduos de lisina podem ser metilados, acetilados, ubiquitinados e sumoilados), ou ainda o número de marcas de um determinado tipo de modificação pode levar a diferentes interpretações (H3K9me, H3K9me2, H3K9me3) (Shinkai 2007). Além disso, uma marca pode recrutar várias proteínas efetoras (Gardner et al. 2011).

As modificações de histonas não ocorrem isoladas, mas, ao contrário, de maneira combinatória em cassetes de modificações (modificações em resíduos adjacentes de uma cauda de histona particular, ex. H3K9me e H3S10ph ou H4S1ph, H4R3me e H4K4ac) ou entre caudas de histonas e mesmo nucleossomos diferentes. Além disso, as modificações são relacionadas a uma função de ativação ou repressão, dependendo de qual resíduo de aminoácido de uma determinada histona é modificado. Ações sinérgicas e antagônicas têm sido descritas pela combinação de marcas de ativação ou pela ação contrária de marcas de repressão (Zhang & Reinberg 2001; Berger et al. 2002, Allis et al. 2007b).

Essas constatações provocaram a elaboração da hipótese de que haveria um "código de histonas" (Strahl & Allis 2000), questão que ainda permanece aberta. Para efeito de comparação, o código genético tem se mostrado extremamente útil pela sua preditibilidade e universalidade. Ao contrário, as evidências mostram que os padrões de modificação de histona variam consideravelmente de um organismo para outro, principalmente entre eucariotos distantes evolutivamente. Porém, começa-se a identificar padrões não aleatórios e até previsíveis em muitos genomas (*S. pombe*, *A. thaliana*, células de mamíferos) como a correlação de H3K4me3 com regiões promotoras ativas (Strahl et al. 1999, Santos-Rosa et al. 2002, Bernstein et al. 2005) e H3K9 (Hall et al. 2002, Lippman et al. 2004, Martens et al. 2005) e H3K27 (Litt et al. 2001, Ringrose et al. 2004) metilada com heterocromatina silenciada.

A limitação do "código de histonas" talvez esteja no fato de que uma modificação não é invariavelmente traduzida em uma consequência biológica específica, mas a combinação e o acúmulo de modificações.

Além dessas discussões, há também um debate se a denominação "código" seria a mais apropriada, uma vez que se refere a combinações definidas levando a produtos absolutos. Alguns consideram mais adequada a denominação "linguagem" em que os complexos padrões de modificações formariam palavras, criando um vocabulário de comunicação entre histonas (Gardner et al. 2011).

Enzimas modificadoras da cromatina catalisam a adição, remoção e interpretação de modificações covalentes nas histonas. Normalmente residem em complexos de subunidades proteicas e catalisam suas reações com grande

especificidade ao resíduo alvo e ao contexto celular, dependendo de sinais externos e intrínsecos (Gardner et al. 2011).

As enzimas responsáveis pela adição de grupos acetil em resíduos de lisinas são chamadas acetiltransferase de histonas (HATs) e as enzimas responsáveis por sua remoção são conhecidas como deacetilases de histonas (HDACs). Elas só foram totalmente identificadas em 1995 (Kleff et al. 1995).

HATs são classificadas em dois grupos, HAT A e HAT B, de acordo com o mecanismo de catálise e a localização celular. Os membros da família HAT A são encontrados no núcleo, onde transferem o grupo acetil oriundo de um acetil-CoA a um grupo amino das caudas das histonas, após sua associação ao nucleossomo. A família HAT A pode ser dividida em 3 subclasses em função da sua homologia com proteínas de leveduras. Os membros da família HAT B atuam no citoplasma, transferindo o grupo acetil oriundo de um acetil-CoA a um grupo amino de histonas livre, antes de sua deposição nos nucleossomos (Peserico & Simone, 2010).

As HDACs identificadas em humanos são subdivididas em quatro classes, baseadas nas suas homologias com HDACs de leveduras, em suas localizações celulares e em suas atividades enzimáticas (Lagace et al. 2004, Bolden et al. 2006). As classes I, II e IV são relacionadas às proteínas de levedura Rpd3, HAd1 e Hos3 respectivamente e se enquadram na família clássica de HDACs dependentes de zinco. A classe III é NAD⁺ dependente e homóloga à proteína Sir2 de leveduras, correspondendo à família das sirtuínas (tabela 1) (Peserico & Simone, 2010).

Tabela 1. Membros da família HDAC de mamíferos

Classe	Homologia com leveduras	Membro dos mamíferos	Mecanismo de catálise	Localização celular
I	Rpd 3	HDAC1	Dependente de Zn^{+2}	Generalizada
		HDAC2		(núcleo e citoplasma)
		HDAC3		
		HDAC8		
II	Hda 1	HDAC4	Dependente de Zn^{+2}	Entre o núcleo e o citoplasma
		HDAC5		
		HDAC7		
		HDAC9		
		HDAC6		
		HDAC10		
III	Sir2	SIRT1	Dependente de NAD^{+}	Núcleo
		SIRT2		Citoplasma
		SIRT3		Mitocôndria
		SIRT4		Mitocôndria
		SIRT5		Mitocôndria
		SIRT6		Núcleo
		SIRT7		Núcleo
IV	HOS3	HDAC11	Dependente de Zn^{+2}	Núcleo

Adaptado de Peserico & Simone, 2010

HATs e HDACs atuam de maneira antagônica no equilíbrio da acetilação das histonas. Como a acetilação é uma marca relacionada com transcrição ativa, HATs têm sido consideradas associadas a genes ativos e HDACs a genes inativos. Atualmente há evidências de uma presença simultânea e interação física de HATs e HDACs em

complexos na região regulatória dos genes. Essa interação física explicaria as rápidas mudanças que ocorrem no perfil de acetilação de promotores que leva a uma flutuação da expressão gênica em função de sinais externos (Wang et al. 2009, Peserico & Simone, 2010) .

Além disso, HATs e HDACs parecem regular a atividade uma da outra como observado na HAT p300 que pode inativar a HDAC6 afetando sua capacidade de interagir com outros modulares de ativação (Han et al. 2009).

HDACs atuam também sobre muitos substratos proteicos não histônicos como fatores de transcrição, mediadores de transdução do sinal, enzimas de reparo do DNA, reguladores de importação nuclear, receptores de hormônios, proteínas chaperonas e proteínas do citoesqueleto (Marks & Dokmanovic 2005, Rosato & Grant 2005, Bolden et al. 2006, Minucci & Pelicci 2006, Wanczyk et al. 2011). A acetilação desses substratos pode aumentar ou diminuir a função e a estabilidade dessas proteínas e de suas interações (Glozak et al. 2005, Xu et al. 2007).

3. Inibição de HDACs

Nos últimos anos a inibição de HDACs tem sido proposta como uma estratégia potencial para reverter mudanças epigenéticas associadas a várias doenças. Nesse sentido, muitas classes estruturalmente diversas de inibidores de HDACs (HDACis) têm sido purificadas a partir de produtos naturais, ou desenvolvidas sinteticamente. HDACis podem atuar, por exemplo, como novos agentes anticancerígenos, induzindo apoptose nas células tumorais por uma via intrínseca ou extrínseca e diferenciação e/ou parada do ciclo celular principalmente na fase G1/S. Podem atuar induzindo a expressão de

genes que codificam receptores de morte celular e seus ligantes correlatos ou mediando a repressão de genes que codificam inibidores dessas vias (Shin et al. 2003, Li et al. 2005, Bolden et al. 2006, Hayakawa et al. 2008, Liu et al. 2008, Frew et al. 2009, Noh et al. 2009, Wu et al. 2010). Além disso, afetam crescimentos neoplásicos de tumores através da regulação da resposta imune do hospedeiro e do controle da vascularização tumoral (Bolden et al. 2006, Chen et al. 2006, Takai & Narahara 2007).

Embora, muitas drogas possam induzir significativamente apoptose em células tumorais, a maioria têm fortes efeitos colaterais para as células saudáveis periféricas. Dessa forma, a pesquisa e o desenvolvimento de drogas anticancerígenas com alta qualidade e seletividade ao tumor são necessários (Zhang et al. 2011). Em testes clínicos, HDACis têm mostrado pronunciada atividade antitumoral com resultados promissores, inclusive com a aprovação pela Food and Drug Administration. Tal é o caso do uso do HDACi vorinostat em linfomas cutâneos de células T em estágio avançado (Akilov & Geskin 2011). Tais resultados promissores se relacionam principalmente à seletividade de certos tipos de HDACis às células tumorais, sendo menos ou não tóxicos para células normais (Minucci & Pelicci 2006, Marks 2007). Há achados indicativos de que essa seletividade esteja relacionada à quinase reguladora de sinais extracelulares 1/2 (ERK 1/2) cuja via é associada com a proliferação e a sobrevivência celular (Ballif & Blenis 2001, Junttila et al. 2008). HDACis parecem ativar ERK 1/2 em células normais expostas a agentes apoptóticos, impedindo a morte celular, porém não ativam ERK 1/2 em células tumorais, as quais entram em apoptose de modo significativo (Yoshikawa et al. 2010, Zhang et al. 2011).

Dentre os vários tipos de inibidores de HDAC identificados, o ácido valproico (VPA) ou ácido 2-*n*-propylpentanoico, comercialmente conhecido como Depakote, Depakote ER, Depakene, Depacon, Stayzor, Mylproin, Ergenyl, Ácido dipropilacetico, Ácido miproico, Dipropilacetato ou Convulex (Gavin et al. 2009, Chateauvieux et al. 2010) tem sido muito utilizado. O VPA é um ácido graxo simples, com cadeia ramificada de oito carbonos, tendo propriedades de um ácido fraco (pK_a 4.95) (Silva et al. 2008). Foi produzido pela primeira vez em 1882 como um solvente orgânico, mas seu potencial terapêutico foi descoberto acidentalmente em 1962, quando Carraz e seus colaboradores o utilizaram como um solvente para anti-convulsivos experimentais e reconheceram que ele mesmo tinha uma atividade anti-convulsiva (Lagace et al. 2004). Estas descobertas foram publicadas em 1963 e são consideradas um marco na história do tratamento da epilepsia. Hoje o VPA é comumente prescrito em todo o mundo, como uma droga antiepiléptica de amplo espectro, com indicação específica para muitas formas de epilepsia e convulsões que afetam crianças e adultos (Silva et al. 2008).

Além de sua ação anticonvulsiva comprovada, o VPA é indicado também no tratamento de transtorno bipolar, e por administração intravenosa tem sido pesquisado num possível tratamento de enxaqueca (“acute migraine”) (Frazee & Foraker 2008). Além disso, pesquisas recentes apontam o VPA como uma das classes de drogas psiquiátricas que protegem o cérebro de produtos tóxicos da replicação do HIV e da neuroinflamação (Ances et al. 2008), além de reduzir comportamentos de vício, sendo testado em pacientes em estágio de detoxificação (Chateauvieux et al. 2010).

Em concentrações terapêuticas (0,3-0,7 mM) o VPA inibe HDACs em vários tipos celulares, incluindo-se células tumorais, como HeLa, F9 teratocarcinoma e Neuro2A neuroblastoma (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Eyal et al. 2004), mas também células não-tumorais, como osteoblastos e adipócitos (Lagace & Nachtigal 2004, Qiao et al. 2006, Schroeder et al. 2007).

Apesar de seu amplo alcance em aplicações terapêuticas, o VPA tem dois efeitos colaterais graves: teratogenicidade e toxicidade hepática. Há evidências recentes de que o efeito colateral de má formação do tubo neural possa estar relacionado à ação inibitória do VPA sobre as enzimas HDACs (Eikel et al. 2006). Por outro lado, a hepatotoxicidade gerada pelo VPA, principalmente em crianças com idade abaixo de dois anos, parece estar relacionada primariamente à sua interferência na β -oxidação mitocondrial (Clarkson & Choonara 2002, Silva et al. 2008).

Nos experimentos em que se pesquisa a inibição de HDACs, outra droga utilizada é a tricostatina A (TSA). A TSA foi originalmente isolada do *Streptomyces hygroscopicus* como um agente fungicida. Sua principal ação foi encontrada acidentalmente através da análise de modificação de histonas, revelando que as células tratadas com TSA apresentavam acetilação em alta extensão, não usual. Experimentos posteriores revelaram que a hiperacetilação induzida por TSA era devida não a um aumento de acetilação, mas a uma diminuição na deacetilação de histonas (Yoshida & Horinouchi 1999). Assim como no caso do VPA, a ação da TSA como inibidora de HDACs em células tumorais e não tumorais vem sendo relatada em diversas publicações (Catania et al. 2006, Rao et al. 2007, Roy et al. 2008).

Tendo em vista a ação de inibidores de HDACs sobre a modificação de histonas, é de se esperar que ela possa ser acompanhada por alterações na supraorganização da cromatina. De fato, foi encontrado em células HeLa que a TSA induz descompactação da cromatina (Tóth et al. 2004; Rao et al. 2007). Além disso, foram reportadas mudanças dose e tempo dependentes na estrutura nuclear de células cancerígenas prostáticas *in vitro* e *in vivo*, quando tratadas com VPA (Kortenhorst et al. 2009).

No presente estudo buscamos associar a inibição de HDACs pelo VPA com padrões de alteração na supraorganização cromatínica, na proliferação celular, em anomalias cromossômicas e em morte celular em dois modelos celulares, células tumorais humanas (HeLa) e células fibroblásticas não tumorais de camundongo (NIH 3T3). Em particular, pelo fato das células NIH 3T3, originadas de fibroblastos de camundongo, apresentarem áreas de heterocromatina conspícuas, configuram-se em modelo de interesse para discriminação de respostas à ação do VPA em áreas de cromatina condensada e não condensada. Foi assim verificado em que medida alterações promovidas pelo VPA em marcadores epigenéticos afetariam os níveis hierárquicos superiores de organização da cromatina e os padrões de anomalias cromossômicas e de morte celular presentes nos tipos celulares escolhidos.

Uma vez que no caso das células NIH 3T3 desconhece-se o nível de citotoxicidade e de inibição de HDAC pelo VPA, sua determinação precedeu o estudo da cromatina propriamente dito. Para o caso das células HeLa dados publicados indicam diminuição significativa da viabilidade celular (62,5% de sobrevivência em relação ao controle) após tratamento com VPA 1,2 mM (Sami et al. 2008). Tal efeito

torna-se mais pronunciado com o aumento da dose de tratamento com VPA (Sami et al. 2008).

Além disso, estudos revelam um aumento na acetilação de histonas H3 e H4 da ordem de $685 \pm 127\%$ em relação ao controle em células HeLa tratadas com VPA nas concentrações 0,5 e 1,0 mM e diminuição na atividade de HDACs (com $K_i = 0,5 \pm 0,03$ mM) (Eyal et al. 2004, Tóth et al. 2004), matéria que também foi investigada nas células NIH 3T3.

3. Objetivos

Frente às informações apresentadas na Introdução, o presente trabalho teve como objetivos:

1- Avaliar, por análise de imagem, a indução de alteração nos padrões de supraorganização cromatínica em células HeLa e NIH 3T3 pelo VPA e pela TSA, usando-se diferentes tempos de tratamento e concentrações das drogas.

2- Avaliar se os níveis de proliferação celular, de anomalias cromossômicas, e de morte celular se tornariam afetados por VPA e TSA em células HeLa e NIH 3T3, usando-se análise morfológica e teste TUNEL.

3- Conhecer o nível de citotoxicidade e da ação do VPA sobre as HDACs e sobre a acetilação das histonas H3 de células NIH 3T3 para subsidiar a interpretação dos achados de supraorganização cromatínica, proliferação celular, anomalias cromossômicas e morte celular nessas células.

Artigo: **Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells**. Artigo publicado em PLoS One 6(12):e29144, 2011.

doi:10.1371/journal.pone.0029144

Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells

Marina Barreto Felisbino¹, Wirla M. S. C. Tamashiro², Maria Luiza S. Mello^{1*}

1 Department of Structural and Physiological Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, **2** Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

Abstract

Background: Valproic acid (VPA) is a potent anticonvulsant that inhibits histone deacetylases. Because of this inhibitory action, we investigated whether VPA would affect chromatin supraorganization, mitotic indices and the frequency of chromosome abnormalities and cell death in HeLa cells.

Methodology/Principal Findings: Image analysis was performed by scanning microspectrophotometry for cells cultivated for 24 h, treated with 0.05, 0.5 or 1.0 mM VPA for 1–24 h, and subjected to the Feulgen reaction. TSA-treated cells were used as a predictable positive control. DNA fragmentation was investigated with the TUNEL assay. Chromatin decondensation was demonstrated under TSA and all VPA treatments, but no changes in chromosome abnormalities, mitotic indices or morphologically identified cell death were found with the VPA treatment conditions mentioned above, although decreased mitotic indices were detected under higher VPA concentration and longer exposure time. The frequency of DNA fragmentation identified with the TUNEL assay in HeLa cells increased after a 24-h VPA treatment, although this fragmentation occurred much earlier after treatment with TSA.

Conclusions/Significance: The inhibition of histone deacetylases by VPA induces chromatin remodeling in HeLa cells, which suggests an association to altered gene expression. Under VPA doses close to the therapeutic antiepileptic plasma range no changes in cell proliferation or chromosome abnormalities are elicited. The DNA fragmentation results indicate that a longer exposure to VPA or a higher VPA concentration is required for the induction of cell death.

Citation: Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS (2011) Chromatin Remodeling, Cell Proliferation and Cell Death in Valproic Acid-Treated HeLa Cells. PLoS ONE 6(12): e29144. doi:10.1371/journal.pone.0029144

Editor: Rakesh K. Srivastava, The University of Kansas Medical Center, United States of America

Received: August 3, 2011; **Accepted:** November 21, 2011; **Published:** December 19, 2011

Copyright: © 2011 Felisbino et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grant no. 2010/50015-6 from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and grants no. 471303/2009-7 and 301943/2009-5 from the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq). MBF received a Master's fellowship from CNPq (132345/2010-2) and FAPESP (2009/11763-0) and MLSM received a research fellowship from CNPq (301943/2009-5). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mlsmello@unicamp.br

Introduction

Valproic acid (VPA) is a drug widely prescribed for the treatment of seizure disorders, including epilepsy, episodes related to bipolar disorder and migraine headaches [1–3]. In addition to inhibiting the transamination of the neurotransmitter GABA and blocking the voltage-gated sodium channels and T-type calcium channels [4] within a therapeutic antiepileptic plasma range (0.3 mM–0.7 mM), VPA is a potent inhibitor of class I histone deacetylases (HDACs) in several cell types [1,5–12]. Recent findings have supported the proposal of a dynamic interplay between histone acetylation, histone methylation and DNA demethylation in response to VPA treatment in certain cell systems [7,13–15].

While there is only a minute amount of acetylated histones in HeLa cells, treatment of these cells with VPA at a concentration as low as 0.25 mM increases the amount of acetylated histone H4, and treatment at a concentration of 2 mM induces its massive acetylation [5]. Accumulation of acetylated histone H4 was observed as early as 1 h after the addition of 0.5 or 1.0 mM VPA to the culture medium [6]. Maximum histone H4 acetylation

in HeLa cells appears nearly 12–16 h after VPA addition [6]. Acetylation of histone H3 also significantly increases in HeLa and L929 cells after VPA treatment [16,17].

The epigenetic effect of hyperacetylation of histones by VPA activates transcription from diverse promoters [1] and has been considered promising for the control of certain cell malignancies [5,8,18–21]. On the other hand, the hyperacetylation of histones induced by a class I-specific HDAC inhibitor (HDACi) like VPA or by a pan-HDACi such as trichostatin A (TSA) [11] has been considered totally or at least partly responsible for the similar teratogenic side-effects in vertebrate embryos [1,17,22].

Changes in chromatin supraorganization and nuclear architecture in HeLa cells after treatment with TSA have been described as a result of the enhanced acetylation of nucleosome core histones [23,24]. Exposure to VPA, in addition to histone acetylation, has also been shown to induce the depletion of proteins that maintain chromatin structure in breast MCF-7 cancer cells thus leading to the potentiation of DNA-damaging agents [7]. Treatment of prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* with VPA has been reported to result in dose- and time-dependent changes in nuclear structure [8].

HDACs have also been implicated in the cell cycle arrest and apoptosis intrinsic and extrinsic pathways, inducing the expression of genes encoding cell death receptors and their cognate ligands or mediating the repression of genes that encode inhibitors of these pathways [18,25–33]. In addition to eliciting apoptotic pathways, HDACs have been reported to be involved with the induction of autophagic cell death, mitotic cell death and senescence in various transformed cell lines [27,33]. Acetylation of non-histone proteins by HDACs may account for their reported antitumor responses or synergistic effects when HDACs are combined with pro-apoptotic agents [26,27,31].

Here, we investigated whether VPA, as a consequence of its epigenetic action, would affect chromatin supraorganization in HeLa cells similarly to TSA in these cells [23] or to VPA in prostate cancer cells [8] or even in breast cancer cells [7], using an appropriate image analysis method. In addition, as cell proliferation and cell death may also be affected by VPA, Feulgen-DNA C classes, cell death morphological aspects and DNA fragmentation were investigated in parallel with chromatin texture analysis and with the frequency of chromosome abnormalities.

Results

Image Analysis

False-color images suggestive of chromatin unpacking could be observed especially with shorter (1–2 h) VPA treatment in the Feulgen-stained nuclei. Nuclear areas covered by condensed chromatin packaging (revealed as green points), which were abundant in untreated controls (Fig. 1 A), appeared reduced in VPA-treated cells (Fig. 1 B). Scatter diagrams in which nuclear relative areas covered with condensed chromatin (Sc %) were related to the level of textural contrast between condensed and non-condensed chromatin (AAR), were obtained for the nuclei analyzed by scanning microspectrophotometry. These scatter plots were compared with the schematic model by Vidal [34] and Mello et al. [35], which allows for the discrimination of the position in this diagram of points corresponding to specific nuclear phenotypic images (Fig. 2 A). When HeLa cells were treated with 100 ng/mL TSA as a positive control to induce chromatin loosening, decreased Sc% values with increasing AAR values were demonstrated in the scatter plot representation (Fig. 2 B) or after statistical comparison (Table 1).

Similar to the data obtained for TSA-treated cells, the results obtained for the cells treated with 0.05, 0.5 or 1.0 mM VPA for 1,

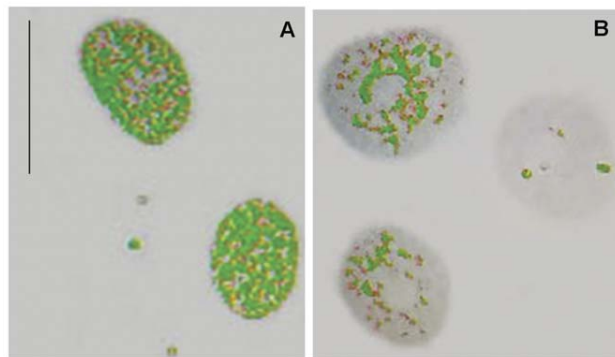


Figure 1. False-colored images of Feulgen-stained HeLa cells. Condensed chromatin packaging revealed as green points is less frequent in VPA-treated cells (B) in comparison with untreated controls (A). Scale bar, 25 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g001

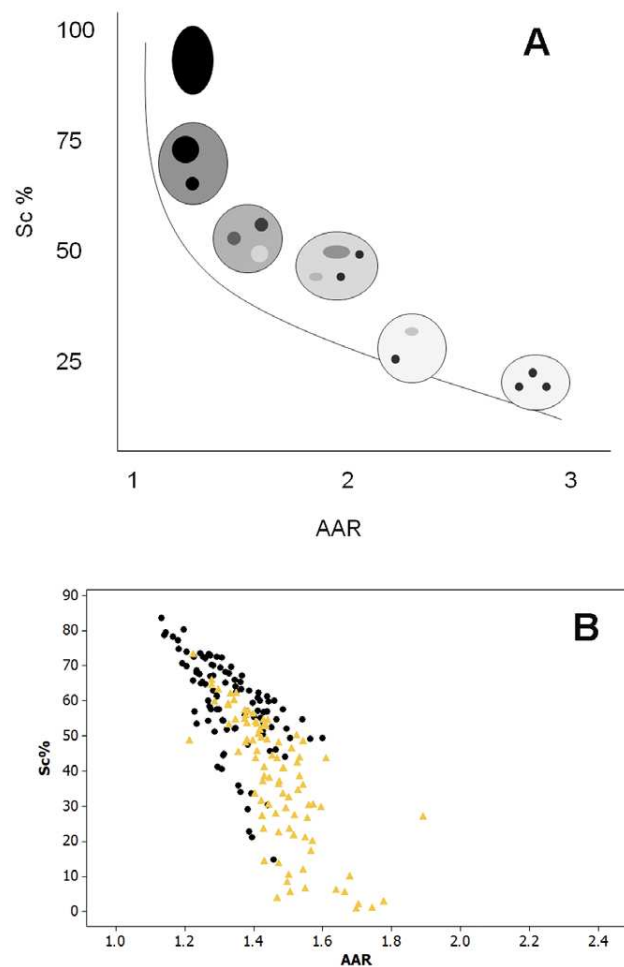


Figure 2. Scatter diagrams representing positioning of nuclei with different phenotypic images in Feulgen-stained cells. These diagrams relate Sc% (relative condensed chromatin area) and AAR (the level of textural contrast between condensed and non-condensed chromatin). A. Schematic model diagram modified from Vidal (1984) and Mello et al. (2009). B. HeLa cells treated with 100 ng/mL TSA (yellow), in comparison to untreated controls (black).
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g002

2, 4 or 24 h showed decreasing values of Sc % and generally increased values of AAR in comparison with the respective untreated controls (Fig. 3, 4, 5; Tables 2, 3, 4).

Table 1. Condensed chromatin area and chromatin textural contrast in HeLa cells treated with 100 ng/mL TSA for 24 h.

Treatment	Sc %			AAR		
	X	S	Md	X	S	Md
Untreated control	58.77	13.12	60.05 ^a	1.33	0.10	1.32 ^a
TSA	37.74	18.20	40.86 ^b	1.47	0.12	1.45 ^b

^{a,b}, The median values of the TSA and control groups differ significantly from each other at the $P_{0.05}$ level (Mann-Whitney test); AAR, average absorption ratio; Md, median; S, standard deviation; Sc %, relative condensed chromatin area; TSA, trichostatin A; X, arithmetic mean; n, 100
doi:10.1371/journal.pone.0029144.t001

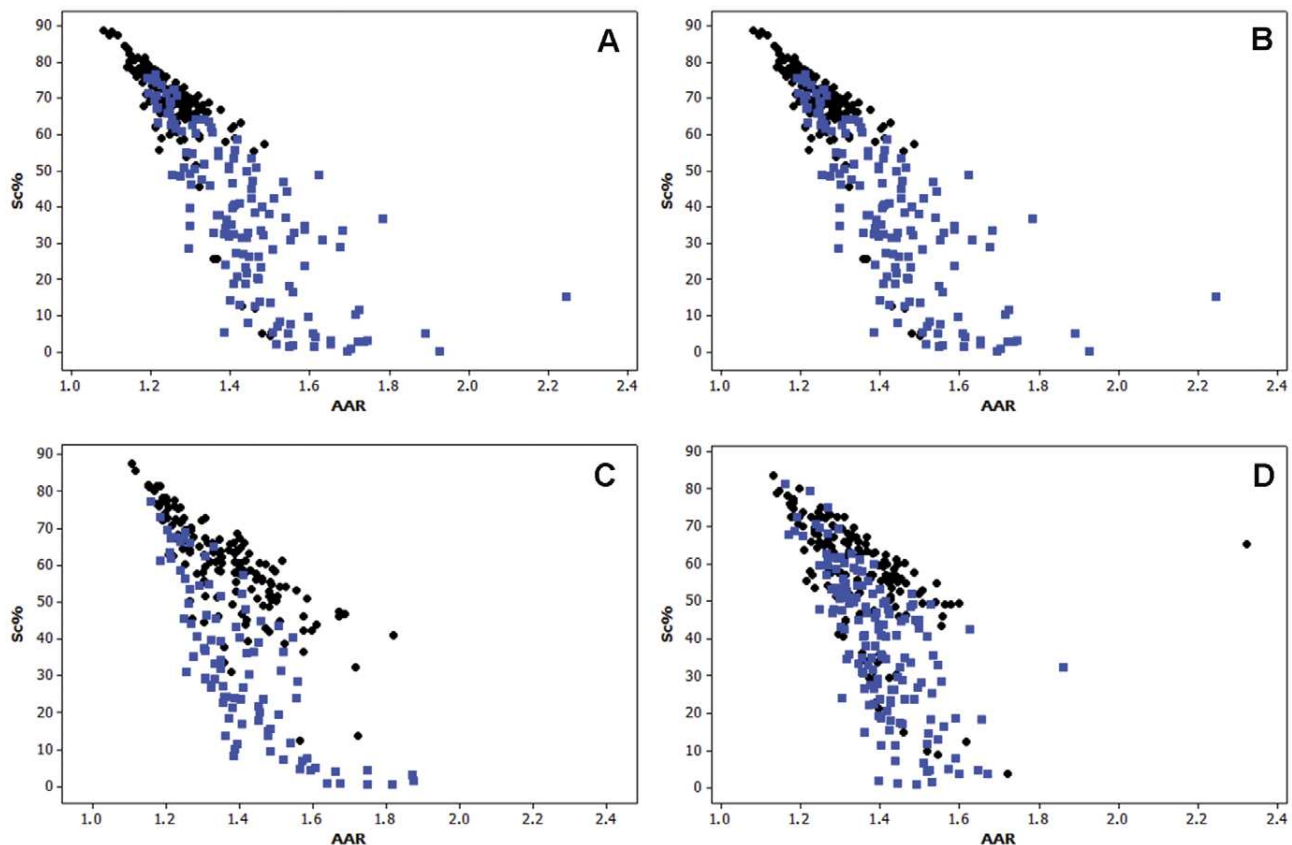


Figure 3. Scatter diagrams of Sc% vs. AAR for Feulgen-stained HeLa cells. The nuclei from cells treated with 0.05 mM VPA for 1 (A), 2 (B), 4 (C), or 24 h (D) are represented in blue in comparison with untreated controls, which are represented in black. n, 200.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g003

DNA content was not found to increase with VPA treatments. Indeed, the significant decrease in A_T values in the VPA-treated cells (Table 5) was due to a smaller frequency of nuclei with larger Feulgen-DNA amounts in comparison to respective controls (Fig. S1, S2, S3, and S4). An increase in the nuclear areas after 1- and 2-h VPA treatments was demonstrated statistically by the Mann-Whitney test (Table 5); however, after longer exposure times, this increase was masked when considering the arithmetic means and medians of the S_T values, most likely because the frequency of nuclei with the highest Feulgen-DNA values under these conditions diminished (Fig. S1, S2, S3, and S4).

In most cases, > 50% of the nuclei were found to present a Feulgen-DNA content in the “~2 C” Feulgen-DNA degree class (G1 phase) irrespective of control or VPA treatments (Figs. S1, S2, S3, and S4). The “~2 C” degree class was named here as the class containing the smallest values presented by control cells after 1 h in growing conditions, considering that HeLa cells constitute a heteroploid cell strain with aneuploidy characteristics [36], and was also comparable to the Feulgen-DNA value distribution presented by human lymphocytes (Fig. S1). A decrease in the frequency of nuclei in the next doubling DNA C classes was generally induced by VPA as early as 1 h following treatment and at a drug dose as low as 0.05 mM. Conversely, an increase in the frequency of nuclei with Feulgen-DNA values < “~2C” occurred with the VPA treatments.

All of these data indicate that chromatin decondensation occurred under the treatment conditions studied here.

Mitotic Indices, Mitotic Abnormalities, Micronucleation and Cell Death Ratios

No statistically significant changes in the mitotic index were observed for the 0.05, 0.5 or 1.0 mM VPA treatments for 1, 2, 4 and 24 h (Table S1). However, when the cells were treated for 48 h at a VPA concentration that is considerably higher (5.0 mM) than the therapeutic range [5,6], the mitotic indices significantly decreased (Table S1).

Abnormal mitoses were observed under all experimental conditions analyzed. However, no change in the frequency of mitotic abnormalities, micronuclei and giant nuclei was introduced by the VPA treatment, except for a decrease in the frequency of giant nuclei after treatment with 5.0 mM VPA for 48 h (Table S1). The high frequency of abnormal mitosis in the preparations treated with 5.0 mM VPA for 48 h resulted from the reduced number of mitoses under this condition and their generally abnormal characteristics of the cells (Table S1). Examples of mitotic abnormalities, such as tripolar spindles, chromosome bridges, lagging chromosomes, a micronucleated cell and a giant nucleus, are shown in Figures 6 D-I.

Cell death morphologies associated with apoptosis and cell death preceded by multinucleation (Fig. 6 A–C) were also observed in all cell preparations examined. The apoptotic ratios and the frequency of cell death preceded by multinucleation based on cell morphological aspects detected in the Feulgen-stained preparations were not affected by VPA treatments in comparison with untreated controls (Table S1).

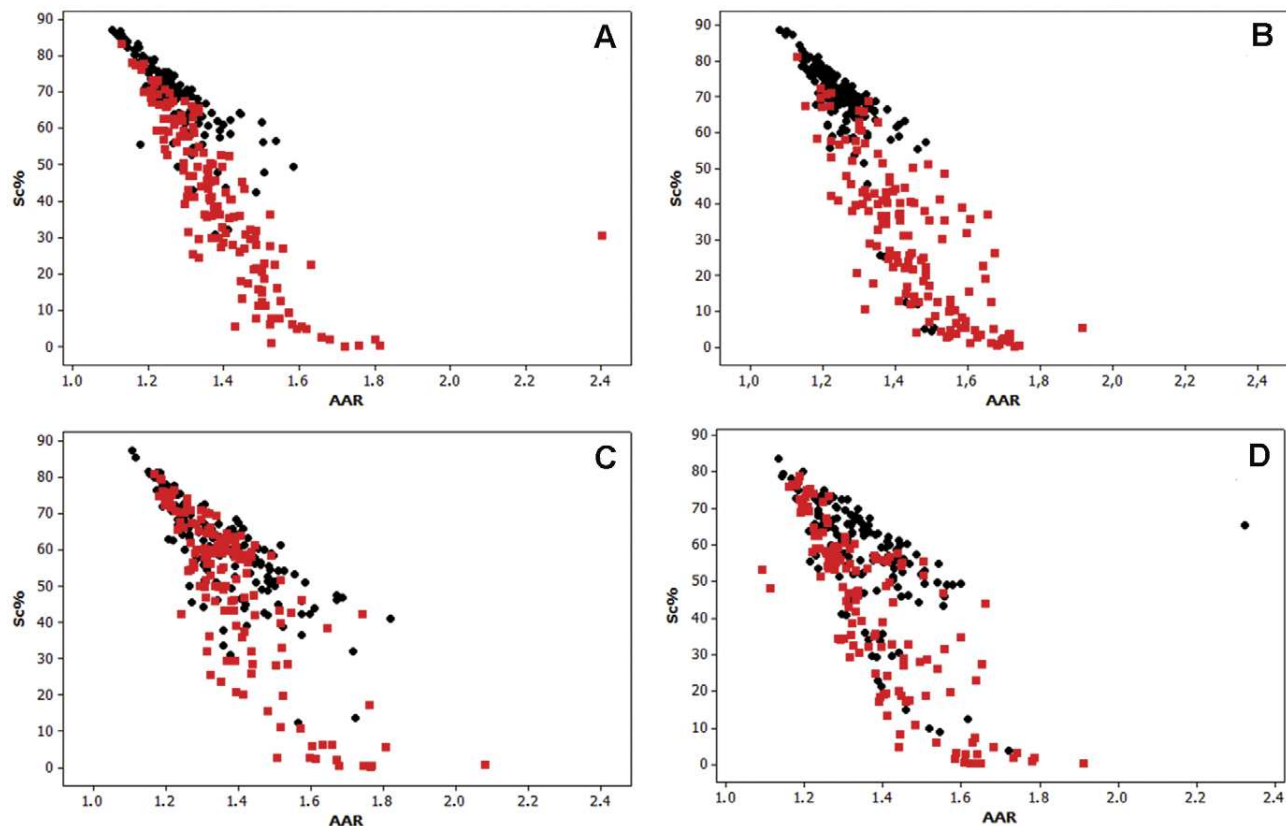


Figure 4. Scatter diagrams of Sc% vs. AAR for Feulgen-stained HeLa cells. The nuclei from cells treated with 0.5 mM VPA for 1 (A), 2 (B), 4 (C), or 24 h (D) are represented in red in comparison with untreated controls, which are represented in black. n, 200.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g004

DNA Fragmentation as Assessed by the TUNEL Assay

No labeling was found in the absence of TdT (negative control) (Fig. 7 A, B), indicating that the positive immunocytochemical response was not caused by endogenous cell peroxidases. In addition, there was a very strong positive response in cells treated with DNase (positive control) (Fig. 7 C). Variations in the intensity of the positive response to the TUNEL assay (weak, moderate and strong) were detected in HeLa cells in the absence or presence of TSA or VPA treatment (Fig. 7 D–I, G, H; Table 6). DNA fragmentation was also detected in cells undergoing cell death preceded by multinucleation (Fig. 7 F).

While the positive response in the TUNEL assay increased with all doses of the 4 and 24-h TSA treatment used, only the 24 h VPA treatments induced a significant increase in this response (Table 6).

Discussion

The results indicate an induction of chromatin decondensation in VPA-treated HeLa cells as assessed by image analysis procedures. Image analysis cytometry similar to that employed here has allowed the identification of chromatin remodeling in several other cell types under different physiological or pathological conditions [23,34,35,37–41]. Chromatin decondensation in HeLa cells was not a VPA-selective or direct effect, as it also occurred by HDAC inhibition in VPA-treated MCF-7 cells [7] and in TSA-treated HeLa cells [23,24]. Chromatin decondensation in HeLa cells was verified at VPA exposure times as short as 1 h and at drug doses as low as 0.25 mM. VPA-induced

acetylation of histones H3 and H4 have been verified under these mild experimental conditions in MCF-7 cells [7].

The observed textural changes in the chromatin appeared under conditions in which several reports demonstrated that HDAC activity decreased and histone acetylation increased under treatment with VPA and TSA in HeLa cells [6,16,23]. Consequently, we found it unnecessary to repeat the previously reported biochemical experiment on HDAC activity and Western blot analysis in the present study. In addition, current studies in our laboratory involving image analysis of NIH 3T3 cells treated with VPA and TSA and a previous study on the human glioma NG97 cells, which is a cell line described to derive from a grade III astrocytoma [42], indicate similar textural changes in chromatin. The results for the NIH 3T3 cells are accompanied by increased histone H3 and H4 acetylation (demonstrated by Western blotting) and decreased HDAC activity.

It is well known that histone modification, specifically, histone acetylation and deacetylation, is a key factor in the regulation of gene expression, and that dynamic changes in gene expression can affect chromatin structure and its interaction with regulatory factors [7]. HDACs like VPA induce gene deregulation, leading, for instance, to the expression of specific genes [10,43,44] and to the induction of teratogenicity [22]. Because VPA elicits chromatin decondensation in HeLa cells, it most likely affects the expression of at least some of their genes. Indeed, treatment of HeLa cells with 3.0 mM VPA for 24 h, a condition that approaches that required for the induction of H4 hyperacetylation, has revealed deregulation of 6% of HeLa cell genes (1625), as assessed by DNA chip analyses [12]. In this case, more genes are

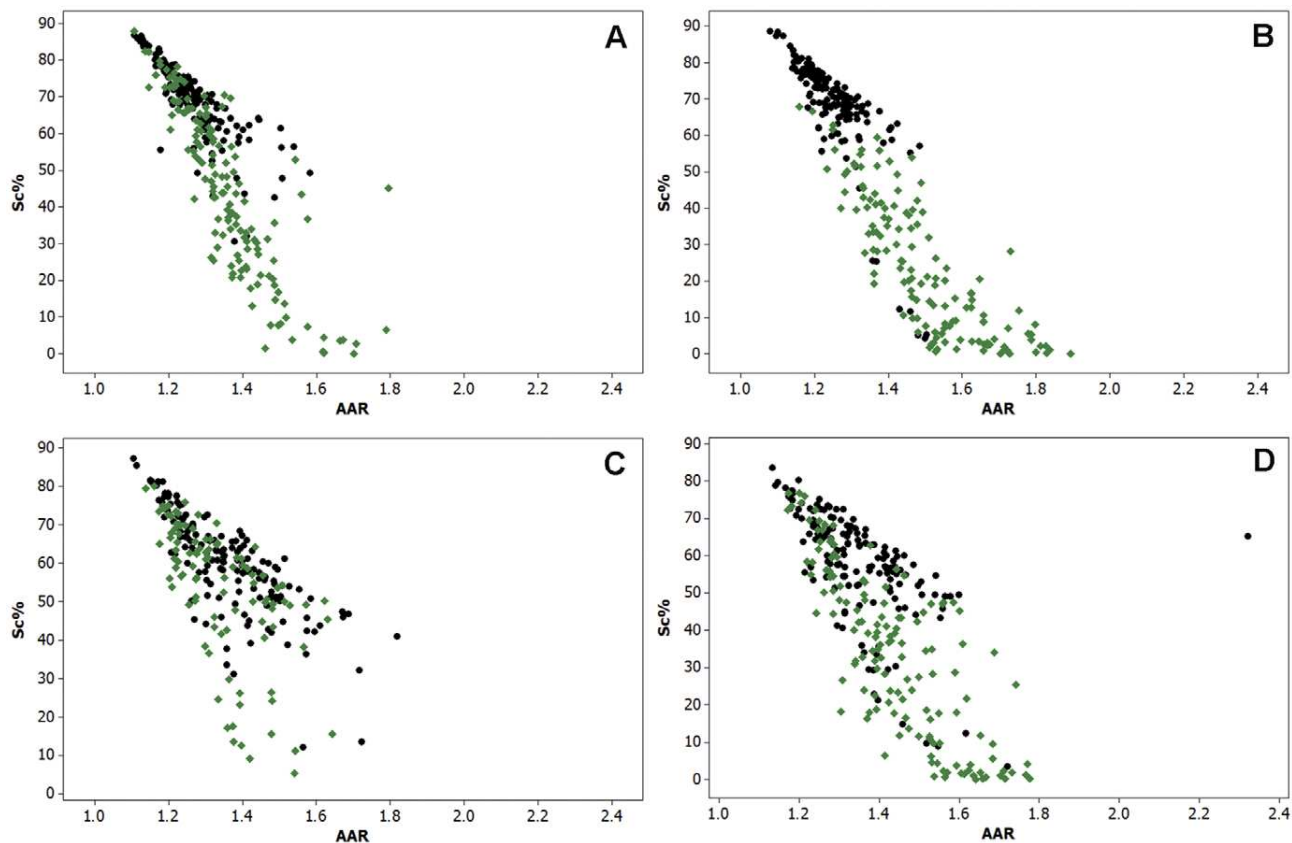


Figure 5. Scatter diagrams of Sc% vs. AAR for Feulgen-stained HeLa cells. The nuclei from cells treated with 1.0 mM VPA for 1 (A), 2 (B), 4 (C), or 24 h (D) are represented in green in comparison with untreated controls, which are represented in black. n, 200.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g005

up-regulated (1074) than down-regulated (551). In addition, more genes are deregulated by VPA than the knockdown of HDAC1, -2 and -3 [12]. Genes that were up-regulated more than 2-fold compared to those in the untreated or scrambled control groups were found to be related to the cell cycle (e.g., p21, HRAS-like

suppressor 3 and cyclin D2), cell signaling (RAS guanyl releasing protein 2, transforming growth factor- α and glycoprotein hormones) and other functions (pyruvate dehydrogenase kinase 4 and ATPase class V, type IOD) [12]. Down-regulated genes were found to be related to importin β , Fas apoptotic inhibitory

Table 2. Condensed chromatin area and chromatin textural contrast in 0.05 mM VPA- treated HeLa cells							
Treatment		Sc%			AAR		
time (h)	Drug	X	S	Md	X	S	Md
1	Untreated control	69.17	10.13	70.77 ^a	1.27	0.09	1.26 ^a
	VPA	36.33	25.04	38.22 ^b	1.40	0.17	1.37 ^b
2	Untreated control	68.53	14.52	70.65 ^a	1.25	0.08	1.24 ^a
	VPA	37.29	22.07	36.85 ^b	1.44	0.16	1.42 ^b
4	Untreated control	60.15	13.17	60.86 ^a	1.36	0.14	1.35 ^a
	VPA	33.43	20.81	31.25 ^b	1.40	0.15	1.38 ^b
24	Untreated control	57.75	14.84	59.91 ^a	1.35	0.14	1.32 ^a
	VPA	38.76	18.96	40.84 ^b	1.40	0.11	1.39 ^b

^{a,b}, The median values of the VPA group and the respective control for each treatment time differ significantly from each other at the P_{0.05} level (Mann-Whitney test); AAR, average absorption ratio; Md, median; S, standard deviation; Sc %, relative condensed chromatin area; VPA, valproic acid; X, arithmetic mean; n, 200
doi:10.1371/journal.pone.0029144.t002

Table 3. Condensed chromatin area and chromatin textural contrast in 0.5 mM VPA- treated HeLa cells.							
Treatment		Sc%			AAR		
time (h)	Drug	X	S	Md	X	S	Md
1	Untreated control	69.17	10.13	70.77 ^a	1.27	0.09	1.26 ^a
	VPA	41.30	21.91	41.76 ^b	1.39	0.16	1.36 ^b
2	Untreated control	68.53	14.52	70.65 ^a	1.25	0.08	1.24 ^a
	VPA	30.51	20.73	31.11 ^b	1.44	0.15	1.43 ^b
4	Untreated control	60.15	13.17	60.86 ^a	1.36	0.14	1.35 ^a
	VPA	49.52	21.42	56.41 ^b	1.39	0.15	1.38 ^a
24	Untreated control	57.75	14.84	59.91 ^a	1.35	0.14	1.32 ^a
	VPA	42.31	22.42	47.41 ^b	1.38	0.15	1.34 ^a

^{a,b}, The median values of the VPA groups and their respective control for each treatment time differ significantly from each at the P_{0.05} level (Mann-Whitney test); AAR, average absorption ratio; Md, median; S, standard deviation; Sc %, relative condensed chromatin area; VPA, valproic acid; X, arithmetic mean; n, 200
doi:10.1371/journal.pone.0029144.t003

Table 4. Condensed chromatin area and chromatin textural contrast in 1.0 mM VPA- treated HeLa cells.

Treatment		Sc%			AAR		
time (h)	Drug	X	S	Md	X	S	Md
1	Untreated control	69.17	10.13	70.77 ^a	1.27	0.09	1.26 ^a
	VPA	44.53	22.93	45.57 ^b	1.36	0.13	1.34 ^b
2	Untreated control	68.53	14.52	70.65 ^a	1.25	0.08	1.24 ^a
	VPA	23.96	18.88	20.67 ^b	1.50	0.16	1.48 ^b
4	Untreated control	60.15	13.17	60.86 ^a	1.36	0.14	1.35 ^a
	VPA	53.20	17.86	56.93 ^b	1.34	0.12	1.32 ^a
24	Untreated control	57.75	14.84	59.91 ^a	1.35	0.14	1.32 ^a
	VPA	34.18	22.18	35.55 ^b	1.44	0.15	1.42 ^b

^{a,b}, The median values of the VPA groups and their respective control for each treatment time differ significantly at the $P_{0.05}$ level (Mann-Whitney test); AAR, average absorption ratio; Md, median; S, standard deviation; Sc %, relative condensed chromatin area; VPA, valproic acid; X, arithmetic mean; n, 200
doi:10.1371/journal.pone.0029144.t004

molecule and cyclin B1 [12]. In rat neurons treated with VPA or TSA, microarray analysis has revealed that 726 genes are up-regulated (particularly those involved in epileptogenesis), whereas 577 genes are down-regulated (particularly those responsible for the development of GABAergic inhibitory neurons) [45]. In this case, the acetylation of histones H3 and H4 is increased only in the promoters of the up-regulated genes [45].

It is worth mentioning that in the human breast cancer cell line MCF-7, the chromatin decondensation that is promoted in response to VPA-induced HDAC inhibition is accompanied by an increased sensitivity of DNA to nucleases and an increased association of DNA with intercalating agents that have been assumed to be modulated by the depletion of non-histone proteins involved in the maintenance of chromatin structure (SMC) [7]. A decrease in the expression of genes encoding the SMC proteins, SMC-associated proteins, DNA methyltransferase 1 and HP1 (heterochromatin protein 1), as determined by microarray analysis, has been ascribed to HDAC inhibition, rather than to a direct VPA effect [7]. In the present study, the role of depletion of such proteins on chromatin decondensation in HeLa cells cannot be ruled out.

In addition to histone hyperacetylation, DNA demethylation of specific genes is also triggered by VPA in HEK293 cells [13,14], but not in FXS (fragile X syndrome) lymphoblastoid cell lines in which the FMR1 gene is silenced by DNA methylation [46] or in mouse embryos [47]. It should be emphasized that in contrast to histone acetylation, the induction of DNA demethylation by VPA can cause long-term consequences for the integrity of gene expression programming by reversing stable DNA methylation patterns in nondividing cells [13,14]. HDAC inhibition by VPA and TSA has also been recently reported to induce histone methylation in rat cortical neurons and astrocytes in which these drugs up-regulate overall and gene-specific H3K4 di- and trimethylation [15] and to increase H3K4 methylation but decrease H3K9 methylation in mouse embryos [47]. There is no record of HDACi-promoted histone methylation or DNA demethylation in HeLa cells. Consequently, chromatin remodeling

Table 5. DNA content and nuclear area in VPA-treated HeLa cells

Treatment		A _T (arbitrary units)			S _T (μm ²)		
time (h)	VPA (mM)	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	123.91	55.28	100.25 ^a	209.95	71.54	191.00 ^a
	0.05	87.93	33.91	74.80 ^b	242.21	61.76	231.25 ^b
	0.5	88.45	34.01	79.32 ^b	236.06	81.05	222.88 ^c
	1.0	95.76	46.93	79.43 ^b	237.78	84.88	216.25 ^c
2	zero	138.86	62.13	116.72 ^a	251.97	88.40	237.50 ^a
	0.05	108.73	46.60	98.00 ^b	311.12	110.77	296.88 ^b
	0.5	99.77	41.56	95.56 ^b	301.52	108.03	295.13 ^b
	1.0	60.30	21.85	60.66 ^c	199.95	57.02	193.00 ^c
4	zero	143.62	85.52	115.56 ^a	287.55	102.09	261.50 ^a
	0.05	88.20	31.52	82.01 ^b	262.89	95.41	242.88 ^b
	0.5	109.32	52.79	96.44 ^c	262.32	77.61	241.50 ^c
	1.0	100.82	31.17	93.18 ^c	248.93	77.17	236.00 ^b
24	zero	138.97	72.65	112.06 ^a	306.20	103.73	288.50 ^a
	0.05	93.43	41.31	90.86 ^b	263.90	104.72	261.00 ^b
	0.5	98.31	40.05	94.42 ^b	270.31	87.50	253.75 ^b
	1.0	100.03	42.13	92.73 ^b	292.64	90.93	277.75 ^a

^{b, c}, The median values of the VPA groups differ significantly from each other and from their respective control (zero, ^a) at the $P_{0.05}$ level (Mann-Whitney test)
AT, nuclear DNA content; Md, median; S, standard deviation; S_T, nuclear area; VPA, valproic acid; n, 200 cells per experimental condition.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.t005

in HeLa cells, as found in this study, cannot be discussed in these terms. Certainly, further investigation is required, including image analysis of cells first treated with VPA and subsequently cultured in the absence of this drug, comparison of these results with data obtained on cells treated with 5-azacytidine and biochemical studies on this matter.

The increase with the VPA treatments in the number of nuclei containing subdiploid class Feulgen-DNA amounts, which is not accompanied by an increase in DNA fragmentation or in frequency of cell death images, probably indicates an increased apurinic acid solubilization during the acid hydrolysis phase of the Feulgen reaction. This increase in apurinic acid solubilization could be due to a decrease in resistance of the DNA to the hydrolytic process [48] because of the chromatin unraveling promoted by the HDACi. Indeed, VPA-induced chromatin decondensation in MCF-7 cells has been associated with an increased sensitivity of the DNA to nucleases and with an increased access of the DNA to intercalating agents [7]. Given these findings, the apparent decrease in the frequency of nuclei with the largest Feulgen-DNA values with the 0.05–1.0 mM VPA treatment for 1, 2, 4 and 24 h does not mean decreased cell proliferation, which is supported by the fact that mitotic indices are unaffected under these experimental conditions.

The significant decrease in mitotic indices revealed with the 5.0 mM VPA treatment for 48 h indicates that relatively long periods of treatment and/or high doses of this drug are required for an effect on HeLa cell proliferation, which confirms previous data for this cell line [16] and is also consistent with a report for leukemic cells [33]. Conversely, even under this antiproliferative condition, no effect was verified on the frequency of cell death, as determined by morphology in Feulgen-stained preparations, which was used for the calculation of cell death ratios in VPA-

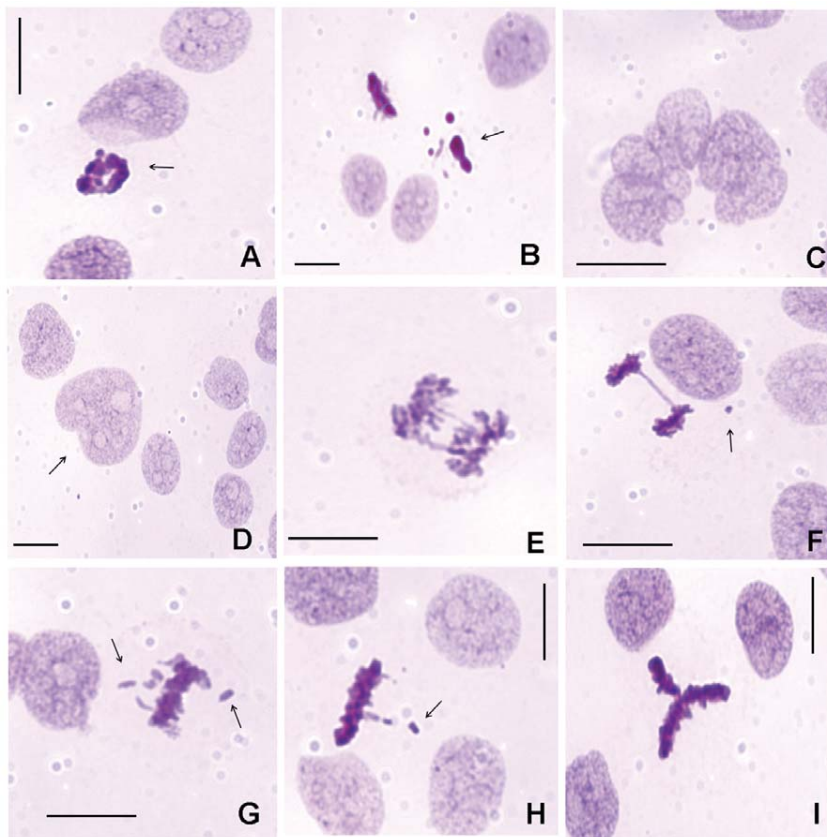


Figure 6. Cell death aspects, mitotic abnormalities and micronuclei in Feulgen-stained HeLa cells. Apoptosis (A, B – arrows), cell death preceded by multinucleation (C), a giant nucleus (D – arrow), chromosome bridges (E, F), a micronucleus (F – arrow), lagging chromosomes (G, H – arrows), and a tripolar spindle (I) are observed. Scale bar, 25 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0029144.g006

treated HeLa cells. However, DNA fragmentation, as identified by a positive response in the TUNEL assay, increased after a 24-h treatment with VPA and a ≥ 4 -h treatment with TSA. This finding indicates that a longer VPA exposure time and/or a higher drug concentration is required for the DNA fragmentation pathways to proceed to chromatin condensation and the release of apoptotic bodies. As regards the TSA action, the much earlier induction of DNA fragmentation as found in the present study is in agreement with reports for apoptosis reported for HeLa and other tumor cell lines [28–30,32,49]. Additionally, DNA fragmentation could be facilitated by chromatin decondensation promoted by the HDAC inhibitors.

Materials and Methods

Cell Culture

HeLa cells at passage 176 were grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) (Sigma®, St. Louis, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab®, Campinas, Brazil) and 50 μ g/mL of garamycin (Sigma®) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. HeLa cells were originally acquired from the Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brazil) at passage 126 which by turn had been commercially acquired from ATCC CCL-2 (Manassas, USA). The cells were seeded into 24-well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) containing round glass coverslips at a concentration of 5×10^4 cells/mL in complete medium for 24 h. Next they were treated with VPA (Sigma®) dissolved in PBS

and diluted in the DMEM medium supplemented with 1% FCS at doses of 0.05, 0.5 or 1.0 mM for varying times (1, 2, 4 and 24 h). Only to evaluate mitotic indices, nuclear abnormalities and cell death ratios, cells treated with VPA at the dose of 5.0 mM for 48 h was also analyzed. VPA at concentrations of 0.3–1.0 mM acts as a potent inhibitor of HDAC activity [5]. TSA (Sigma®) dissolved in DMSO (Labsynth, Diadema, Brazil) and diluted in medium containing 1% FCS at the dose of 100 ng/mL for 24 h (image analysis) and at the doses of 10, 20 and 100 ng/mL for 4 and 24 h (TUNEL assay) was used as a positive control of pan-HDACI activity [23,24]. Controls in the absence of the drugs were also used.

Cell Fixation and DNA Topochemistry

The cells adhered to round glass coverslips were fixed in a mixture of absolute ethanol-glacial acetic acid (3:1, v/v) for 1 min, rinsed in 70% ethanol and air dried at room temperature. Another set of cell preparations was fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, rinsed in phosphate saline buffer and air dried.

The cells fixed in acetic ethanol were used for DNA topochemistry and image analysis, and for the establishment of mitotic indices and apoptotic ratios. They were subjected to the Feulgen reaction with hydrolysis carried out in 4 M HCl for 60 min at 25°C. The hydrolyzed material was treated with Schiff reagent for 40 min, rinsed three times (5 min each) in sulfurous water and once in distilled water, air dried, cleared in xylene and mounted in Canada balsam ($n_D = 1.54$). Acetic ethanol-fixed

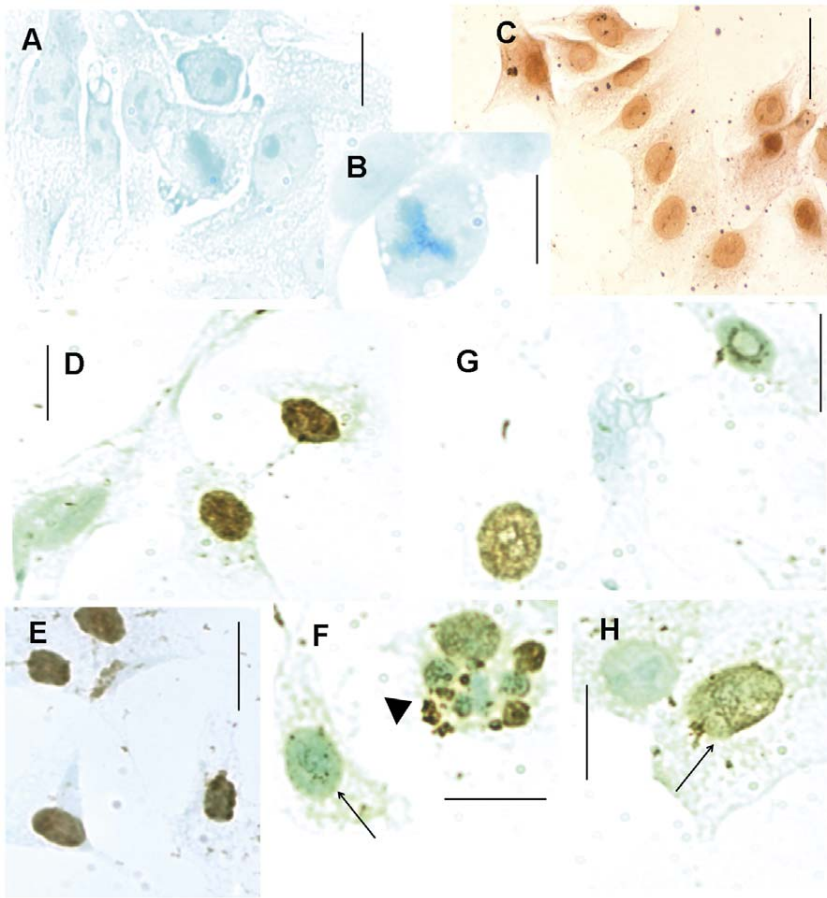


Figure 7. DNA fragmentation revealed in HeLa cells with the TUNEL assay. A, B. Negative control; C. Positive control. D-F. TSA-treated cells (arrowhead, cell death preceded by multinucleation); G, H. VPA-treated cells. Positive response intensities: strong (D, E), moderate (G, H (arrow)), weak (F, arrow). Scale bars, 25 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0029144.g007

smears of human lymphocytes were subjected to the Feulgen reaction under hydrolysis conditions which enabled maximal depurination (4 M HCl for 90 min at 25°C). These cells were used as a control for 2 C ploidy.

The cells fixed in paraformaldehyde were used for the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick 3'-end DNA labeling (TUNEL) assay.

Scanning Microspectrophotometry Image Analysis

Images of the Feulgen-stained nuclei were obtained with a Zeiss automatic scanning microspectrophotometer (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) interfaced to a personal computer. The operating conditions used were as follows: Planapo objective 63/0.90; optovar 2.0; measuring diaphragm diameter, 0.25 mm; field diaphragm diameter, 0.20 mm; LD-Epiplan 16/0.30 condenser; scanning spot of 0.5 μ m x 0.5 μ m; halogen 100-W/12-V lamp; stabilized electronic power supply, Zeiss light modulator; λ = 565 nm obtained with a Schott monochromator filter ruler; R-928 photomultiplier; and a Pentium II microcomputer. Grid points (individual measuring points) showing absorbances no higher than 0.020 were considered to be background and were automatically removed from the nuclear image. The cutoff point of 0.100 was selected to evaluate the areas covered by condensed chromatin in HeLa cells after a preliminary test done for untreated controls. Two hundred nuclei

were chosen at random and measured individually for each experimental condition.

The image analysis parameters pertinent to this investigation were as follows: A_T , total integrated absorbance = nuclear Feulgen-DNA values or IOD (integrated optical density) in arbitrary units; A_C , integrated absorbance over the preselected cutoff ("condensed" chromatin Feulgen-DNA values); A_C %, "condensed" chromatin Feulgen-DNA values relative to the nuclear (whole chromatin) Feulgen-DNA values; S_T , nuclear absorbing area in μ m²; S_C , area in μ m² covered with stained chromatin showing absorbance above the selected cutoff point; S_C %, area covered with "condensed" chromatin relative to the nuclear area; $AAR = (A_C/S_C)/(A_T/S_T)$, average absorption ratio, a dimensionless parameter that expresses how many times the average absorbance of the "condensed" chromatin exceeds that of the entire nucleus [50]. A scatter diagram relating AAR to S_C % was plotted as previously proposed [34,51]. This diagram allows for the discrimination of the position of points that correspond to specific nuclear phenotypes [34,35,51].

Mitotic Abnormalities, Micronucleation, Mitotic Indices and Cell Death Ratios

The frequency of abnormal metaphases, lagging chromosomes, chromosome bridging, giant nuclei, micronucleation and mitotic indices were estimated in Feulgen-stained preparations.

Table 6. TUNEL positivity in VPA-treated HeLa cells

Treatment			TUNEL positive response (%)			
time (h)	Drug	Concentration	Total	Strong	Moderate	Weak
1	VPA	zero	0.37 ^a	0.00 ^a	0.09 ^a	0.28 ^a
		0.05 mM	0.90 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.90 ^a
		0.5 mM	0.80 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	0.80 ^a
		1.0 mM	1.80 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a	1.80 ^a
2	VPA	zero	2.35 ^a	0.10 ^a	0.30 ^a	1.95 ^a
		0.05 mM	3.60 ^a	0.00 ^a	0.10 ^a	3.50 ^a
		0.5 mM	4.40 ^a	0.00 ^a	0.60 ^a	3.80 ^a
		1.0 mM	4.00 ^a	0.10 ^a	0.60 ^a	3.30 ^a
4	VPA/TSA	zero	1.70 ^a	0.00 ^a	0.50 ^a	1.20 ^a
	VPA	0.05 mM	1.80 ^a	0.00 ^a	0.10 ^a	1.70 ^a
		0.5 mM	1.30 ^a	0.10 ^a	0.00 ^a	1.20 ^a
		1.0 mM	8.10 ^a	3.50 ^a	1.70 ^a	2.90 ^a
	TSA	10 ng/mL	30.10 ^b	12.60 ^b	9.70 ^b	7.80 ^a
		20 ng/mL	35.90 ^b	24.50 ^b	6.30 ^b	5.10 ^a
		100 ng/mL	43.90 ^b	18.95 ^b	20.00 ^b	4.95 ^a
24	VPA/TSA	zero	5.90 ^a	0.30 ^a	0.40 ^a	5.20 ^a
	VPA	0.05 mM	14.90 ^b	0.60 ^a	1.90 ^a	12.40 ^b
		0.5 mM	21.50 ^b	1.10 ^a	1.20 ^a	19.20 ^b
		1.0 mM	36.00 ^b	0.70 ^a	3.60 ^a	31.70 ^b
	TSA	10 ng/mL	11.00 ^a	0.70 ^a	0.30 ^a	10.00 ^a
		20 ng/mL	31.40 ^b	1.20 ^a	4.60 ^a	25.60 ^b
		100 ng/mL	60.90 ^b	7.80 ^b	13.60 ^b	39.60 ^b

^b, VPA- or TSA-treated groups differ significantly from their respective controls (zero,

^a) at the $P_{0.05}$ level (Mann-Whitney test); TSA, trichostatin A; VPA, valproic acid; n, 1000 cells per experimental condition.

doi:10.1371/journal.pone.0029144.t006

Apoptotic cells and cells identified as those suffering “cell death preceded by multinucleation” (denomination recommended in substitution to mitotic catastrophe) [52] were also evaluated in the preparations subjected to the Feulgen reaction. Apoptotic cells were considered here as cells presenting extremely condensed chromatin or apoptotic bodies. Approximately 2000 cells per preparation were examined in all cases.

TUNEL Assay

TUNEL analysis was performed following the manufacturer’s instructions (Roche, Mannheim, Germany). Endogenous peroxidase was blocked with 3% H_2O_2 in absolute methanol for 10 min at room temperature. Some preparations were processed by omitting TdT (negative control) or by including a DNase treatment before TdT addition (positive control). Counterstaining was performed in a methyl green (Merck, Darmstadt, Germany) solution. Nuclei with brown-stained spots indicated TUNEL positive cells. The intensities of positive responses in the TUNEL assay were visually ranked as weak, moderate or strong. This classification was supported by a quantitative image analysis approach, which was performed by defining values of nuclear relative areas covered by the “dark” brown spots that resulted from the immunocytochemical assay. Image analysis was conducted with Kontron KS400 version 3 software and Zeiss Axiophot 2/Kontron equipment (Oberkochen/Munich, Germany), using a Neofluar objective 40/0.75, an optovar factor of 1.4 and a Zeiss AxioCam HRc color video camera. After the area for the whole nucleus was computed, the

definition of the image area covered by the dark spots was obtained in this system by fixing the low and high threshold range levels to 60 and 100 units, respectively. While maintaining these parameters, nuclei with a strong response in the TUNEL assay were defined as those that contained dark spots over $\geq 50\%$ of their area. Nuclei with moderate and weak responses contained dark spots over 5–49% and $<5\%$ of their areas, respectively. The use of mean gray values as a quantitative parameter for discrimination of the TUNEL response did not appear adequate because the reaction observed in this assay was not found to conform to the Beer-Lambert law. The TUNEL assay response was determined for 1000 cells under each experimental condition. Three coverslips for each experimental condition were examined.

Statistics

Calculations and statistical analyses were performed using Minitab 12TM software (State College, PA, USA). Statistical significance was calculated by the two-sided Student t-test when the samples showed a normal distribution. The Mann-Whitney test was performed to assess the statistical significance when the samples did not show a normal distribution. $P_{<0.05}$ was considered the critical level for rejection of the null hypothesis.

Supporting Information

Figure S1 Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 1 h. n, 200.

Human lymphocytes were used as a reference for class 2 C Feulgen-DNA. (TIF)

Figure S2 Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 2 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1. (TIFF)

Figure S3 Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 4 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1. (TIFF)

Figure S4 Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 24 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1. (TIFF)

References

- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, et al. (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogene. *J Biol Chem* 276: 36734–36741.
- Frazee LA, Foraker KC (2008) Use of intravenous valproic acid for acute migraine. *Ann Pharmacother* 42: 403–407.
- Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruitter JPN, Ijst L, et al. (2008) Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inher Metab Dis* 31: 205–216.
- Perucca E (2002) Overtreatment in epilepsy: adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res* 52: 25–33.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, et al. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969–6978.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, et al. (2004) The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737–744.
- Marchion DC, Bickau E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN (2005) Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65: 3815–3822.
- Kortenhorst MSQ, Isharwal S, van Diest P, Chowdury WH, Marlow C, et al. (2009) Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 8: 802–808.
- Fortson WS, Kayarthodi S, Fujimura Y, Xu HL, Matthews R, et al. (2011) Histone deacetylase inhibitors, valproic acid and trichostatin-A induce apoptosis and affect acetylation status of p53 in ERG-positive prostate cancer cells. *Int J Oncol* 39: 111–119.
- Xu XSS, Wang L, Abrams J, Wang G (2011) Histone acetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer. *J Hematol Oncol* 4: art 17.
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, et al. (2008) Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409: 581–589.
- Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, et al. (2008) Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol Cancer* 7: 70.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003) Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278: 27586–27592.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28: 560–571.
- Marinova Z, Leng Y, Leeds P, Chuang DM (2011) Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacol* 60: 1109–1115.
- Sami S, Hóti N, Xu HM, Shen Z, Huang X (2008) Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both *in vitro* and *in vivo*. *J Biochem* 144: 357–362.
- Gotfryd K, Hansen M, Kawa A, Ellerbeck U, Nau H, et al. (2011) The teratogenic potencies of valproic acid derivatives and their effects on biological end-points are related to change in histone deacetylase and Erk1/2 activities. *Basic & Clin Pharm Toxicol* 109: 164–174.
- Li XN, Shu Q, Su JMF, Perlaky L, Blaney SM, et al. (2005) Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Therap* 4: 1912–1922.
- Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzl T, et al. (2007) Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Cancer* 97: 177–182.
- Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, et al. (2007) Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic

Table S1 Mitotic index, nuclear abnormalities and cell death ratios in Feulgen-stained VPA-treated HeLa cells. (DOC)

Acknowledgments

We thank Dr. Vera Lúcia G.S. Lopes (Faculty of Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil) for generously providing human lymphocyte smears, Dirce L. Grabriel for cell-culture technical assistance and Marcela O. Silva for assistance in cell counting.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MLSM WMSCT. Performed the experiments: MBF. Analyzed the data: MBF WMSCT MLSM. Contributed reagents/materials/analysis tools: WMSCT MLSM. Wrote the paper: MBF WMSCT MLSM.

- acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 110: 2302–2308.
- Braithe F, Soriano AO, Garcia-Manero G, Hong D, Johnson MM, et al. (2008) Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res* 14: 6296–6301.
- Jergil M, Forsberg M, Salter H, Stockling K, Gustafson AL, et al. (2011) Short-time gene expression response to valproic acid analogs in mouse embryonic stem cells. *Toxic Sci* 121: 328–342.
- Tóth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stohr M, Stohr M, et al. (2004) Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117: 4277–4287.
- Rao J, Bliattacharya D, Banerjee B, Sarin A, Shivashankar GV (2007) Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 263–268.
- Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Kim SJ, Jang KL, et al. (2003) Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. *Oncogene* 22: 3853–3858.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Rev Drug Discov* 5: 769–784.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26: 5541–5552.
- Gan YH, Wang J, Coselli J, Wang XL (2008) Synergistic induction of apoptosis by HMG-CoA reductase inhibitor and histone deacetylases inhibitor in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 365: 386–392.
- Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T (2008) Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420–24425.
- Liu PY, Chan JYH, Lin HC, Wang SL, Liu ST, et al. (2008) Modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/Cip1} gene by Zacl through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase 1 in HeLa cells. *Mol Cancer Res* 6: 1204–1214.
- Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE (2009) Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280: 125–133.
- Noh EJ, Lim DS, Jeong GJ, Lee JS (2009) An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G₂/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 378: 326–331.
- Elknerova K, Myslivcova D, Lacinova Z, Marinov I, Uherkova L, et al. (2011) Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines – induction of cell death and senescence. *Neoplasia* 58: 35–44.
- Vidal BC (1984) Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. *Biol Cell* 50: 137–146.
- Mello MLS, Aldrovani M, Moraes AS, Guaraldo AMA, Vidal BC (2009) DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 40: 577–585.
- Johnson RT, Mullinger AM, Downes CS (1978) Human minisegregant cells. In: Prescott DM, ed. *Methods in Cell Biology*, Vol 20. New York: Academic Press Inc. pp 255–314.
- Mello MLS, Russo J (1990) Image analysis of Feulgen-stained c-H-ras-transformed NIH/3T3 cells. *Biochem Cell Biol* 68: 1026–1031.
- Mello MLS, Contente S, Vidal BC, Plandling W, Schenck U (1995) Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Expt Cell Res* 220: 374–382.
- Vidal BC, Russo J, Mello MLS (1998) DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. *Expt Cell Res* 244: 77–82.

40. Moraes AS, Vidal BC, Guaraldo AM, Mello MLS (2005) Chromatin supraorganization and extensibility following starvation and refeeding. *Cytometry Part A* 63: 94–107.
41. Moraes AS, Guaraldo AM, Mello MLS (2007) Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. *Cytometry Part A* 71: 28–37.
42. Machado CML, Ikemori RY, Zorzeto TQ, Nogueira ACMA, Barbosa SDS, et al. (2008) Characterization of cells recovered from the xenotransplanted NG97 human-derived glioma cell line subcultured in a long-term in vitro. *BMC Cancer* 8: 291.
43. Lagace DC, McLeod RS, Nachtigal MW (2004) Valproic acid inhibits leptin secretion and reduces leptin messenger ribonucleic acid levels in adipocytes. *Endocrinology* 145: 5493–5503.
44. Qiao LP, Schaack J, Shao JH (2006) Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Endocrinology* 147: 865–874.
45. Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, et al. (2009) Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res* 65: 35–43.
46. Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, et al. (2008) Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics* 18: 738–741.
47. Tung EWY, Winn LM (2010) Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 201–209.
48. Mello MLS, Vidal BC (1980) Acid lability of deoxyribonucleic acids of some polytene chromosome regions of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma* 81: 419–429.
49. Platta CS, Greenblatt DY, Vaccaro A, Kunni-malaiyaan M, Chen H (2007) Trichostatin A induces morphologic differentiation and inhibits growth in small cell lung cancer cells. *J Surg Res* 137: 213–214.
50. Vidal BC, Schlüter G, Moore GW (1973) Cell nucleus pattern recognition: influence of staining. *Acta Cytol* 17: 510–521.
51. Mello MLS, Vidal BC, Planding W, Schenck U (1994) Image analysis: video system adequacy for the assortment of nuclear phenotypes based on chromatin texture evaluation. *Acta Histochem Cytochem* 27: 23–31.
52. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, et al. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3–11.

Figure S1.

Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 1 h. n, 200.
Human lymphocytes were used as a reference for class 2 C Feulgen-DNA.

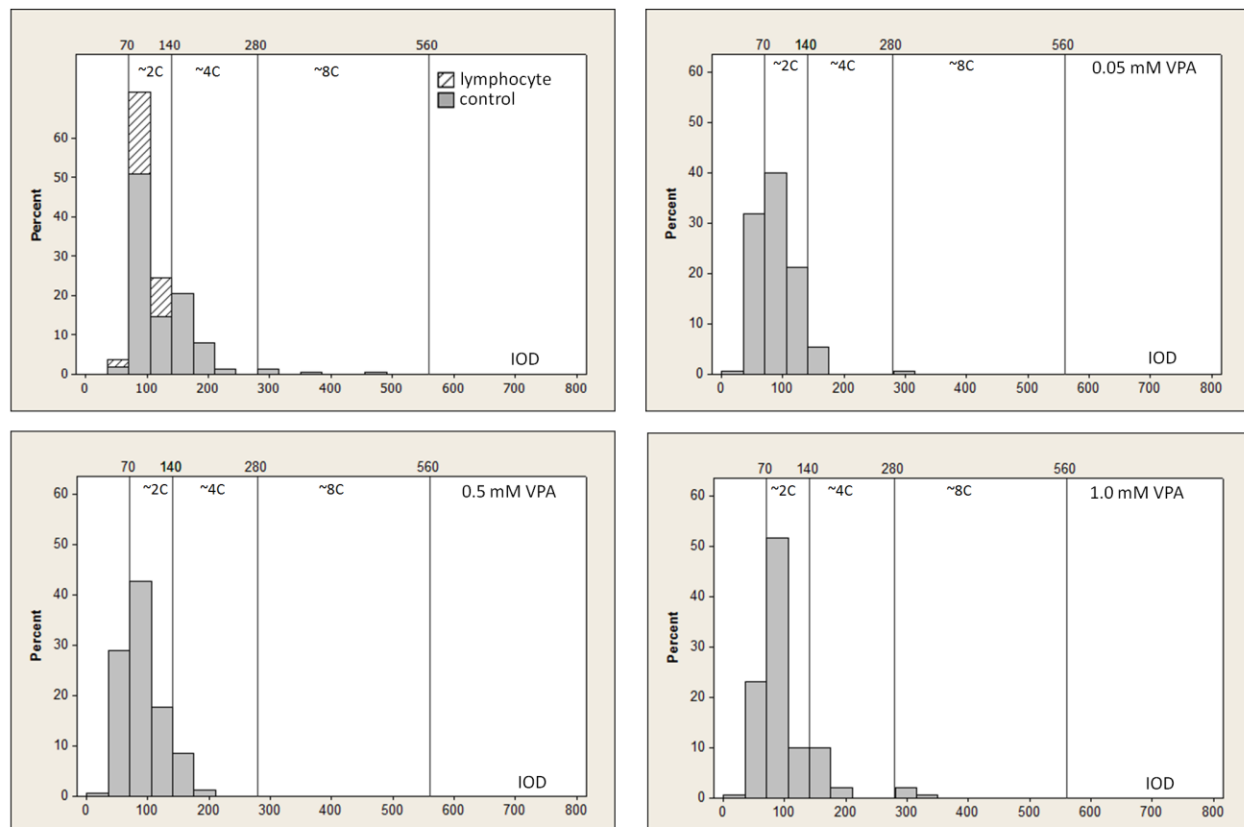


Figure S2.

Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 2 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1.

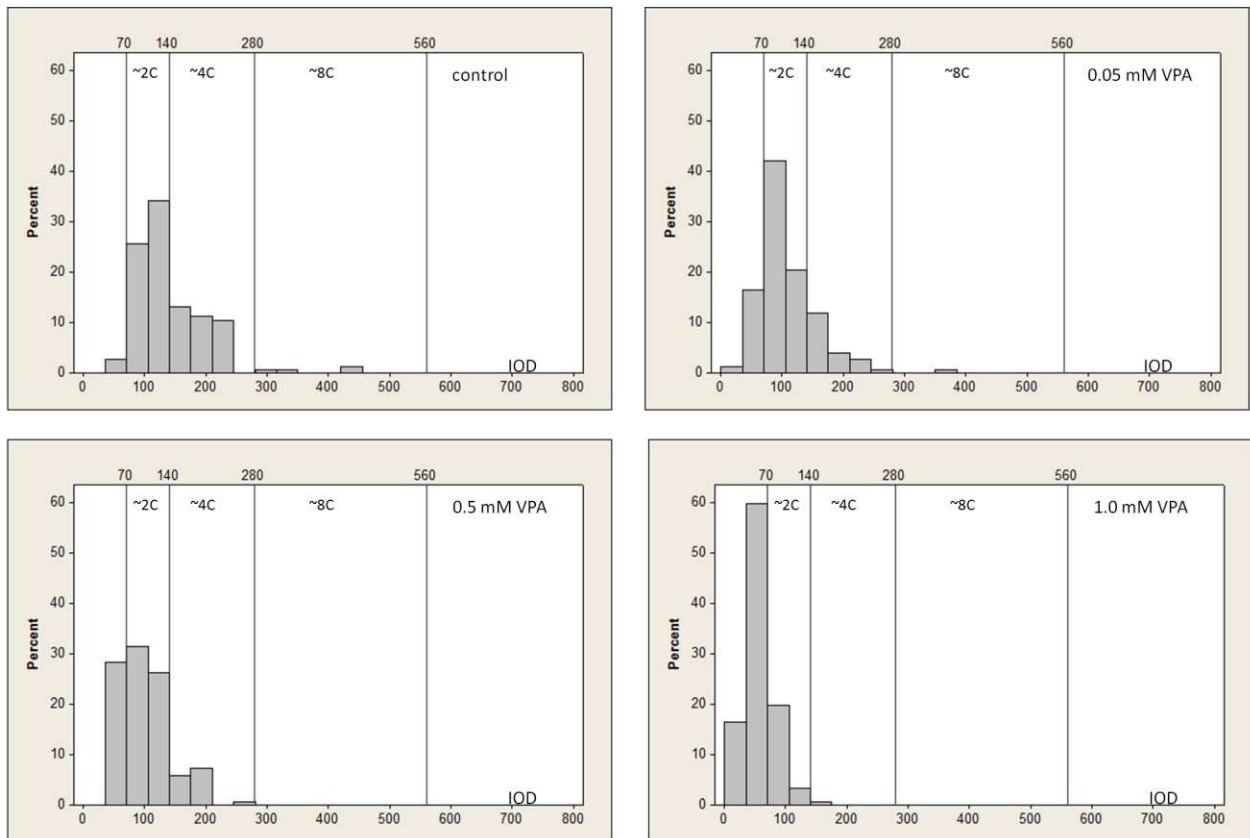


Figure S3.

Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 4 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1.

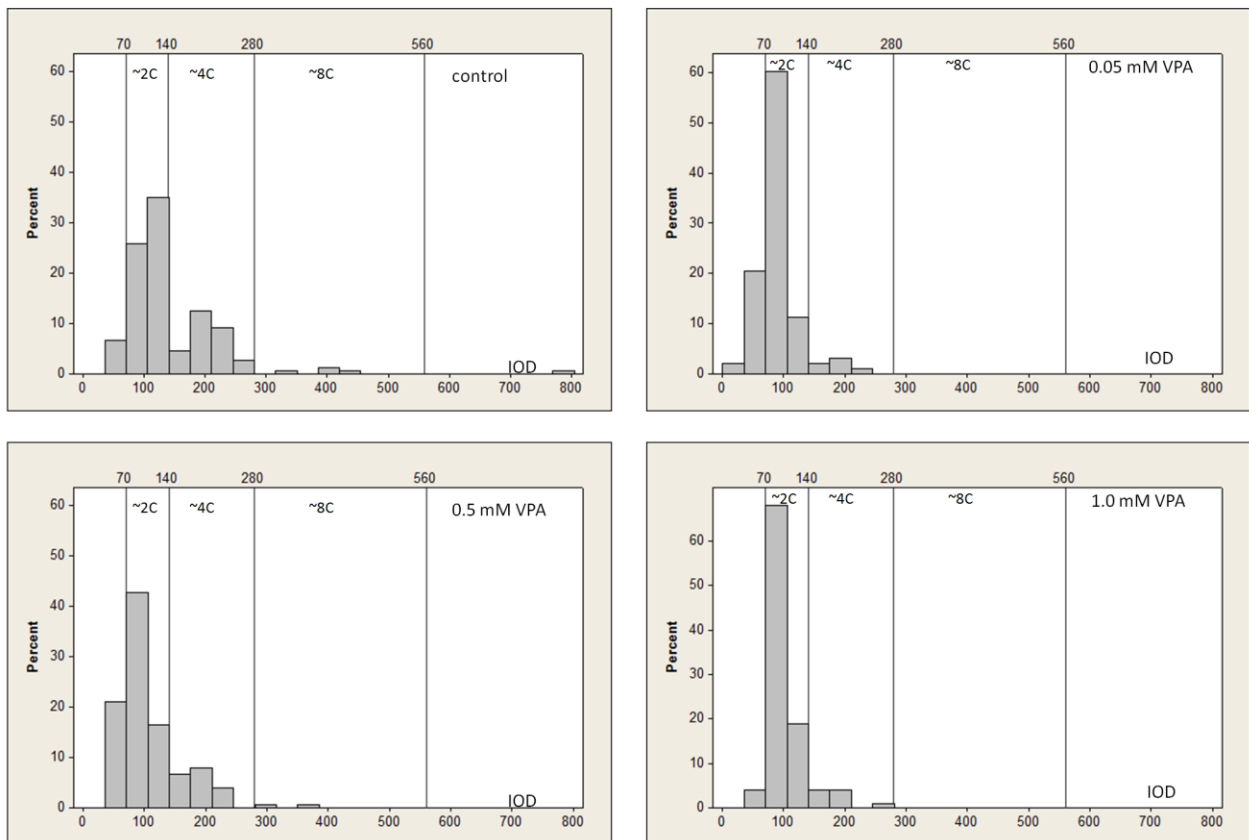


Figure S4.

Frequency histograms of Feulgen-DNA values in HeLa cells treated with VPA for 24 h. n, 200. For the reference on human lymphocyte, see Fig. S1.

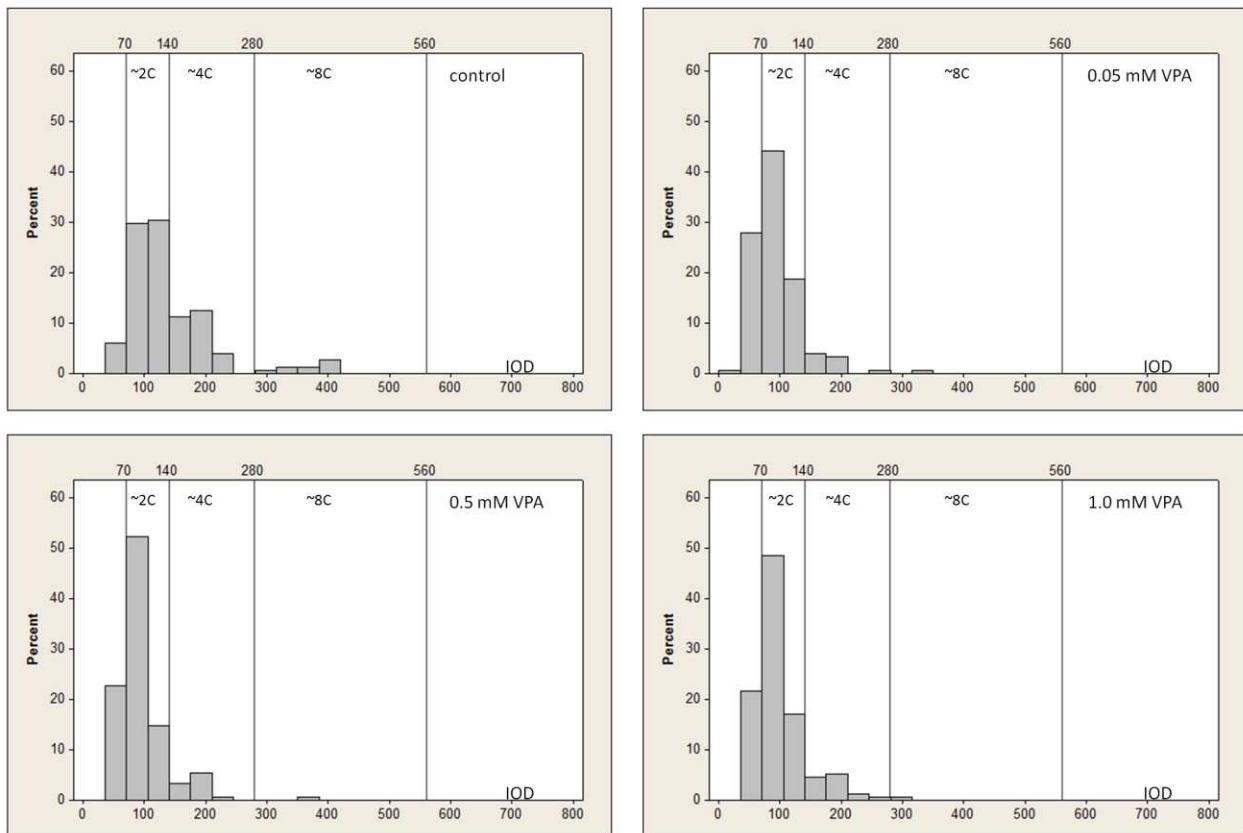


Table S1.

Mitotic index, nuclear abnormalities and cell death ratios in Feulgen-stained VPA-treated HeLa cells.

Treatment		Mitotic index (%)			Abnormal mitosis (%)			Giant nuclei (%)			Micronuclei (%)			Apoptotic ratio (%)			CDPM ratio (%)		
Time (h)	VPA (mM)	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	2.97	0.82	2.63	60.95	7.29	64.00	0.23	0.15	0.20	2.63	0.82	2.63	0.20	0.17	0.15	0.23	0.20	0.30
	0.05	1.99	0.62	2.17	55.48	3.31	56.25	0.22	0.08	0.20	3.51	2.83	2.89	0.07	0.08	0.05	0.35	0.27	0.30
	0.5	2.34	0.42	2.28	49.70	23.30	60.60	0.20	0.13	0.25	2.30	0.73	2.13	0.21	0.12	0.20	0.25	0.22	0.15
	1.0	2.85	1.91	2.60	61.68	13.65	65.06	0.20	0.05	0.20	3.53	2.39	3.05	0.30	0.30	0.15	0.33	0.24	0.44
2	zero	2.67	0.96	2.44	58.84	10.70	60.87	0.22	0.16	0.15	3.34	1.17	3.63	0.26	0.12	0.25	0.20	0.09	0.20
	0.05	2.87	1.43	2.28	52.98	17.04	61.97	0.20	0.05	0.20	2.98	1.97	2.00	0.20	0.13	0.15	0.12	0.08	0.10
	0.5	2.94	1.57	3.58	56.89	2.82	57.41	0.08	0.03	0.10	2.91	1.63	2.69	0.33	0.14	0.30	0.18	0.14	0.10
	1.0	2.08	0.59	1.91	45.20	12.11	50.00	0.13	0.03	0.15	3.75	2.58	4.33	0.38	0.31	0.20	0.25	0.13	0.29
4	zero	2.45	0.74	2.09	55.14	10.43	50.00	0.10	0.10	0.10	3.13	1.15	3.19	0.32	0.26	0.25	0.12	0.11	0.05
	0.05	1.90	0.56	2.20	66.48	15.22	69.44	0.12	0.10	0.15	4.47	1.36	4.02	0.21	0.04	0.20	0.07	0.08	0.05
	0.5	2.71	1.03	2.90	31.10	11.44	30.43	0.20	0.13	0.15	2.43	0.68	2.81	0.12	0.08	0.10	0.23	0.23	0.10
	1.0	1.91	0.08	1.92	58.89	13.24	54.84	0.24	0.14	0.30	5.37	2.47	5.18	0.19	0.11	0.20	0.17	0.19	0.08
24	zero	2.74	0.26	2.74	53.69	7.15	52.50	0.15	0.09	0.10	3.26	1.33	2.58	0.54	0.39	0.45	0.20	0.04	0.20
	0.05	2.85	0.79	2.98	56.76	8.55	55.17	0.32	0.10	0.35	3.46	1.64	3.45	0.38	0.13	0.40	0.18	0.03	0.20
	0.5	2.23	0.23	2.19	49.17	1.44	50.00	0.38	0.11	0.45	2.78	0.42	2.54	0.53	0.13	0.55	0.27	0.16	0.20
	1.0	2.54	0.50	2.69	47.46	11.71	42.22	0.15	0.05	0.15	2.36	1.03	1.85	0.43	0.18	0.45	0.10	0.09	0.15
48	zero	2.42	0.78	2.65 ^a	42.45	9.37	40.45	0.50	0.08	0.50 ^a	0.14	0.09	0.17	0.51	0.27	0.55	0.25	0.26	0.20
	5.0	0.50	0.26	0.45 ^b	70.00	44.70	100.	0.18	0.11	0.15 ^b	0.08	0.07	0.10	0.55	0.31	0.45	0.20	0.14	0.20

Superscript letters a and b in the Md columns of the mitotic index and of the giant nuclei indicate that the VPA group differs significantly from respective control at the $P_{0.05}$ level (Mann-Whitney test); CDPM, cell death preceded by multinucleation; Md, median; S, standard deviation; VPA, valproic acid; X, arithmetic mean; n = 2000 cells per experimental condition; number of preparations per experimental condition = 3

Artigo: **Remodelação cromatínica em células NIH 3T3 com o tratamento por ácido valproico e tricostatina A.** Artigo em fase de elaboração para submissão.

Remodelação cromatínica em células NIH 3T3 com o tratamento por ácido valproico e tricostatina A

Marina Barreto Felisbino¹, Maria Silvia Viccari Gatti², Maria Luiza S. Mello^{1*}

¹Departamento de Biologia Estrutural e Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brasil.

*E-mail: mlsmello@unicamp.br

Resumo

O ácido valproico (VPA), droga anti-epileptica com amplo espectro de ação, é conhecido como inibidor de deacetilases de histonas (HDACi) de classe I em diversos tipos celulares. Admitindo-se que frente à inibição de deacetilases de histonas a estrutura cromatínica poderia se alterar, neste trabalho investigamos se o VPA afetaria a supraorganização cromatínica de células NIH 3T3, modelo escolhido para a discriminação de respostas em áreas de cromatina condensada e não condensada por apresentarem áreas de heterocromatina conspícuas. Frequências de anomalias cromossômicas, morte celular e índice mitótico, assim como o nível de acetilação de histona H3 foram também investigados. As células foram tratadas com VPA nas concentrações 0,05, 0,5 e 1,0 mM por 1-24 h, submetidas à reação de Feulgen e analisadas através de microespectrofotometria de varredura automática e microscopia óptica. Western blots e análises enzimáticas foram também utilizadas. Células tratadas com tricostatina A (TSA), HDCAi de espectro de atuação mais amplo que o VPA, foram utilizadas como controles positivos. Nas condições experimentais utilizadas não se constatou citotoxicidade pelas drogas. Descompactação cromatínica foi demonstrada com análise de imagem em todas as situações de tratamento com VPA e TSA, acompanhada por diminuição na atividade de HDACs e aumento na acetilação de histona H3. A alteração textural cromatínica também atingiu áreas heterocromáticas. Porém, nenhuma alteração nas frequências de anomalias cromossômicas, de índices mitóticos e de morte celular foi observada. Os resultados indicam que a inibição de HDACs por VPA e TSA induz aumento de acetilação de histonas acompanhado por remodelação cromatínica. Entretanto não se pode descartar que outras proteínas nucleares tenham sido afetadas, cuja expressão pode se apresentar diminuída pela ação dessa drogas, participando na alteração da textura cromatínica, inclusive de áreas heterocromáticas. Possivelmente, condições mais drásticas de exposição ao VPA e à TSA devam ser requeridas para alteração na proliferação celular e morte celular.

Palavras chaves: Remodelação cromatínica, Epigenética, Células 3T3, VPA, TSA, Análise de Imagem

Introdução

O ácido valproico (VPA) ou ácido 2-*n*-propylpentanoico, comercialmente conhecido como Depakote, dentre muitos outros nomes, (Gavin et al. 2009, Chateauvieux et al. 2010) apresenta amplo espectro de utilização. Além de sua ação anticonvulsiva comprovada, é indicado também no tratamento de transtorno bipolar e de enxaqueca (“acute migraine”) (Frazee & Foraker 2008). Em concentrações terapêuticas (0,3-0,7 mM), vem sendo relatada a ação do VPA em inibir HDACs de classe I em diversos tipos celulares (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Eyal et al. 2004, Lagace & Nachtigal 2004, Qiao et al. 2006, Schroeder et al. 2007). Assim como no caso do VPA, a ação da trichostatina A (TSA), inibidora de diversos tipos de HDACs (Khan et al. 2008), vem sendo relatada em diversas publicações (Catania et al. 2006, Rao et al. 2007, Roy et al. 2008) e é comumente usada como controle positivo para ensaios que envolvam inibição de HDACs.

Tendo em vista a ação de inibidores de HDACs (HDACis) sobre a modificação de histonas, é de se esperar que essa ação possa ser acompanhada por alterações na supraorganização da cromatina e na arquitetura nuclear. De fato, foi encontrado em células HeLa que o VPA e TSA induzem descompactação da cromatina (Tóth et al. 2004; Rao et al. 2007, Felisbino et al. 2011). Além disso, foram reportadas mudanças na frequência de fragmentação do DNA, não acompanhadas de alteração nas taxas de morte celular e anomalias cromossômicas em células HeLa tratadas com VPA e TSA, bem como decréscimo na proliferação celular sob condições mais severas de tratamento com VPA (Felisbino et al. 2011).

A investigação do efeito do VPA em células fibroblásticas não tumorais de camundongo (NIH 3T3) seria particularmente de interesse, pois essas células apresentam áreas de heterocromatina conspícuas. Seria possível, dessa forma, verificar em que medida, alterações promovidas por essas drogas em marcadores epigenéticos afetariam os níveis hierárquicos superiores de organização da cromatina identificáveis ao microscópio de luz.

Investigamos assim se o VPA e a TSA, como consequência de suas ações epigenéticas, afetariam a supraorganização cromatínica de células NIH 3T3, em semelhança ao que ocorreu em células HeLa (Felisbino et al. 2011), utilizando para isso um método de análise de imagem apropriado. Além disso, classes Feulgen-DNA, aspectos morfológicos de morte celular e índices mitóticos foram investigados em paralelo às análises de texturas cromatínica e frequências de anomalias cromossômicas. Uma vez que para essas células se desconhece o efeito do VPA sobre a acetilação de histonas H3, sua determinação foi essencial para subsidiar as investigações acima mencionadas.

Materiais e Métodos

Cultura celular

Células 3T3 Balb-c (procedência NIH) foram cultivadas no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biologia da Unicamp. O meio utilizado para o

desenvolvimento das células foi o D-MEM (Sigma ®, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®, Brasil), com adição de 1% penicilina e estreptomicina (Sigma ®, USA) (concentração 10.000UI e 100 mg/mL, respectivamente) e 1% de tampão Hepes (Sigma ®, USA) (200 mM). Foi utilizada estufa (Thermaforma®, USA) a 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Os ensaios foram realizados em meio DMEM suplementado com 2% de SFB, com soluções de VPA dissolvidas em PBS, nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1,0 mM, e de TSA dissolvidas em DMSO, nas concentrações de 10, 20 e 100 ng/mL por 1, 2, 4 e 24 h de tratamento. Os controles negativos foram processados na ausência das drogas.

Citotoxicidade por VPA e TSA

A avaliação de citotoxicidade nas células NIH 3T3 tratadas com VPA e TSA foi efetuada através do teste MTT. Além disso, uma curva dose-resposta foi estabelecida para as células submetidas a esses tratamentos.

O teste MTT é um ensaio colorimétrico largamente usado em estudos de citotoxicidade para se avaliar a sobrevivência celular em presença de agentes testados. Consiste na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) pela enzima dehidrogenase mitocondrial, levando à formação do produto azul formazan, cuja concentração é proporcional ao número de células vivas presentes na cultura (Denizot & Lang 1986).

Para tal avaliação foi utilizado um inóculo inicial de 10⁵ células NIH 3T3 por concavidade (placa de 96 wells). Após os tratamentos com VPA e TSA, e removidas as

soluções com as drogas, foi adicionada solução de MTT em meio D-MEM a uma concentração final de 1 mg/mL por 3 h a 37°C. Posteriormente à remoção dessa solução, foi adicionado propanol. A placa foi vigorosamente agitada por 1 min e a absorbância das soluções de cada concavidade foi medida em leitora de absorbância de microplaca (VersaMax™, Sunnyvale, USA) nos comprimentos de onda de 540 e 690 nm.

Fixação e citoquímica

Preparados de células NIH 3T3 sobre lamínulas redondas foram fixados em etanol absoluto–ácido acético glacial 3:1 (v/v) por 1 a 2 min e lavados em etanol 70% e então submetidos à reação de Feulgen, método citoquímico específico para DNA (Mello 1997), sendo que a hidrólise foi realizada em HCl 4 M a 25°C por 60 min, seguida de um rápido tratamento com HCl 0,1 M a frio e de tratamento pelo reativo de Schiff por 40 min. Logo após, os preparados foram lavados em 3 banhos de água sulfurosa (5 min cada), e um banho em água destilada, e secados ao ar (Mello & Vidal 1978), clarificados em xilol por 10 min e montados sobre lâmina de vidro em bálsamo do Canadá natural. Esse material se destinou à análise de imagem por microespectrofotometria de varredura e à detecção de índices mitóticos, de anomalias mitóticas, de micronúcleos, de índices apoptóticos e de morte celular catastrófica.

Esfregaços sanguíneos de camundongos Balb-C fixados em etanol/ácido acético foram submetidos à reação de Feulgen em condição de hidrólise que permitiu

depurinação máxima (HCl 4M, 90 min, 25°C) e foram utilizados como controle de ploidia 2C.

Imagens Nucleares

A título de visualização dos aspectos nucleares das células NIH 3T3, foram obtidas imagens em pseudocores dos núcleos submetidos à reação de Feulgen antes e após tratamento por VPA e TSA em microscópio Zeiss Axiophot 2 e usando software Kontron KS400-3 (Oberkochen/Munich, Alemanha).

Análise de imagens por microespectrofotometria de varredura automática

As imagens nucleares de preparados de células 3T3, submetidas à reação de Feulgen, foram obtidas em microespectrofotômetro de varredura automático Zeiss com interface a computador. As condições de operação foram as seguintes: objetiva Planapo 63/0,90; optovar 2,0; diafragma de medida com diâmetro 0,25 mm; condensador LD-Epiplan 16/0,30; “scanning spot” 0,5 μm x 0,5 μm ; lâmpada de halogênio 100-W/12-V, e $\lambda = 565\text{nm}$, obtido com régua monocromadora Schott. O ponto de discriminação de áreas de cromatina condensada (“cutoff point”) foi o de absorbância = 0,200 selecionado com base em teste preliminar para controles não tratados por VPA ou TSA.

Os parâmetros obtidos com a análise de imagem foram: A_T , absorbância nuclear total (corresponde aos valores Feulgen-DNA por núcleo ou IOD (densidade óptica integrada)); A_C , absorbância acima do cutoff pré-selecionado (corresponde aos valores

Feulgen-DNA da cromatina “condensada”); S_T , área nuclear (μm^2); S_C , área nuclear coberta por cromatina “condensada” (μm^2); $S_C\%$, área de cromatina “condensada” em relação à área nuclear; e AAR (A_C/S_C)/ A_T/S_T), razão de absorção média, estabelecido por Vidal et al. (1973). Diagramas de dispersão relacionando AAR a $S_C\%$ como previamente proposto (Vidal 1984, Vidal et al. 1998), foram então plotados. Esses diagramas permitem a discriminação de núcleos com fenótipos específicos, definidos em termos de suas porcentagens de cromatina “condensada” ($S_C\%$) e do contraste entre cromatina condensada e não condensada (AAR) (Vidal 1984, Vidal et al. 1998) e conforme também demonstrado para as células HeLa tratadas com VPA e TSA (Felisbino et al. 2011). Além disso, histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA foram também construídos.

Índices mitóticos, anomalias mitóticas, micronúcleos e morte celular

Os preparados celulares submetidos à reação de Feulgen também se prestaram à observação, com microscópio binocular Zeiss e objetiva de 40 x, dos índices mitóticos, das frequências de micronúcleos, núcleos gigantes, metáfases anormais (tripolares e presença de pontes cromossômicas e de cromossomos “lagging”). Igualmente se prestaram ao cálculo de índices apoptóticos e de morte celular precedida por multinucleação (denominação recomendada em substituição à morte catastrófica) (Kroemer et al. 2009).

Análise enzimática de HDACs

Para a análise da atividade de HDACs em células 3T3 foi utilizado o “HDAC assay kit” (Sigma[®]), seguindo-se as recomendações do fabricante. Extratos de células tratadas por diferentes tempos e em diferentes concentrações de VPA e TSA foram incubados em placas de 96 wells com o substrato da reação (peptídeo com resíduo de lisina acetilada e grupo fluorescente ligado) por 30 min. Após esse período, houve a adição do revelador que promove a quebra do substrato deacetilado pelas HDACs presentes nas amostras e liberação do grupo fluorescente. A fluorescência diretamente proporcional à atividade de deacetilação das amostras foi medida em fluorômetro Fusion™ (Packard Instrument Company, USA).

Western Blotting

A detecção do efeito do VPA e da TSA sobre o grau de acetilação das histonas H3 das células NIH 3T3 foi obtida em Western Blots.

A concentração de proteínas em cada uma das amostras foi padronizada pela dosagem de proteínas estabelecida com as absorbâncias medidas em espectrofotômetro (Quimis[®], Diadema, Brasil) utilizando-se o corante de Bradford. As células NIH 3T3 foram incubadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0,025% Azul de bromofenol) por 5 min em fervura e submetidas à eletroforese vertical em SDS-PAGE com amperagem constante de 36 mA. Seguiu-se a esse procedimento a transferência do gel de poliacrilamida a 17% para membrana de nitrocelulose (Applied Biosystem[®], Carlsbad, USA) em amperagem fixa de 250 mA por 90 min. A membrana foi então incubada em leite em pó

desnatado (Molico[®]) diluído em tampão TBST (Tris-HCl 0,01M pH 8, 0,15M NaCl, 1% Triton-X) por 2 h e posteriormente nesse tampão foi adicionado o anticorpo Anti H3 acetil (Millipore[®], Billerica, USA) para incubação “overnight” a 4°C. Após remoção do tampão contendo anticorpo primário e lavagens com TBST foi adicionado novo tampão contendo anticorpo secundário conjugado com peroxidase e procedida a incubação por 2 h. A revelação por quimioluminescência foi realizada com o kit “ECL Detection Reagents” (Amersham[®], Pittsburgh, USA), de acordo com protocolo do fabricante. Posteriormente a membrana foi revelada em filme fotográfico Amersham Hyperfilm ECL (Amersham[®]), usando-se revelador e fixador Kodak[®] (Rochester, USA) (Kurien & Scofield 2006). Para garantir que as diferenças de marcação do anticorpo de interesse não fossem devidas a diferenças de concentração de proteínas presentes nas amostras, a mesma membrana foi incubada com um anticorpo contra uma proteína constitutiva (Anti histona H4) (Abcam[®], Cambridge, USA) atuando assim como controle de carga (Dovey et al. 2010).

A análise comparativa dos resultados obtidos foi efetuada usando-se software ImageJ[®] (NIH, Bethesda, USA).

Análise Estatística

Todos os dados apresentados foram analisados em software Minitab 14[®] (State College, PA, USA) pelo teste de Mann-Whitney, sendo a significância dada a $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade por VPA foi investigada em células 3T3 para subsidiar a escolha de concentrações e tempos de tratamento com essa droga para os estudos de supraorganização da cromatina. Dados obtidos com TSA foram usados como controle positivo da atuação dos HDCAis.

Com os diferentes tempos e concentrações de VPA e TSA não houve decréscimo significativo na viabilidade celular em células NIH 3T3 em relação ao controle não tratado (Figs. 1 e 2). A utilização dessas condições experimentais para a pesquisa de efeitos do VPA e TSA em células NIH 3T3 exclui, portanto, efeito citotóxico por essas drogas nas condições descritas.

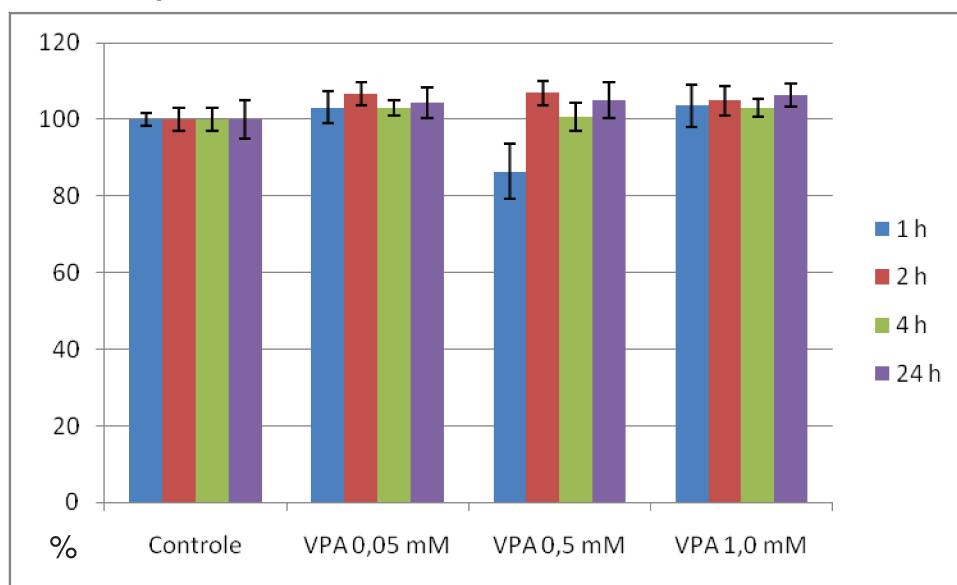


Fig. 1. Viabilidade de células NIH 3T3 tratadas por diferentes tempos com VPA em relação ao controle não tratado. Não foram demonstradas diferenças ao nível de $P_{0,05}$ (Teste de Mann-Whitney), $n = 4$.

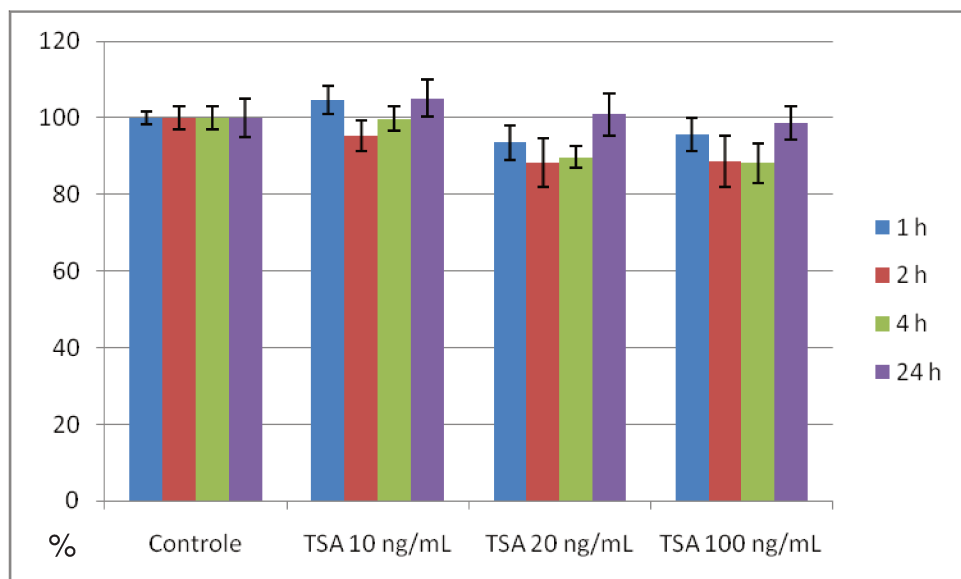


Fig. 2. Viabilidade de células NIH 3T3 tratadas por diferentes tempos com TSA em relação ao controle não tratado. Não foram demonstradas diferenças ao nível de $P_{0,05}$ (Teste de Mann-Whitney), $n = 4$.

Além disso, a viabilidade das células tratadas por 1 h com essas drogas foi analisada através de uma curva dose-resposta, buscando comprovar que no intervalo de concentração das drogas, aqui utilizado para a comprovação de remodelação cromatínica, não havia sido atingido o IC_{50} (Figs. 3 e 4).

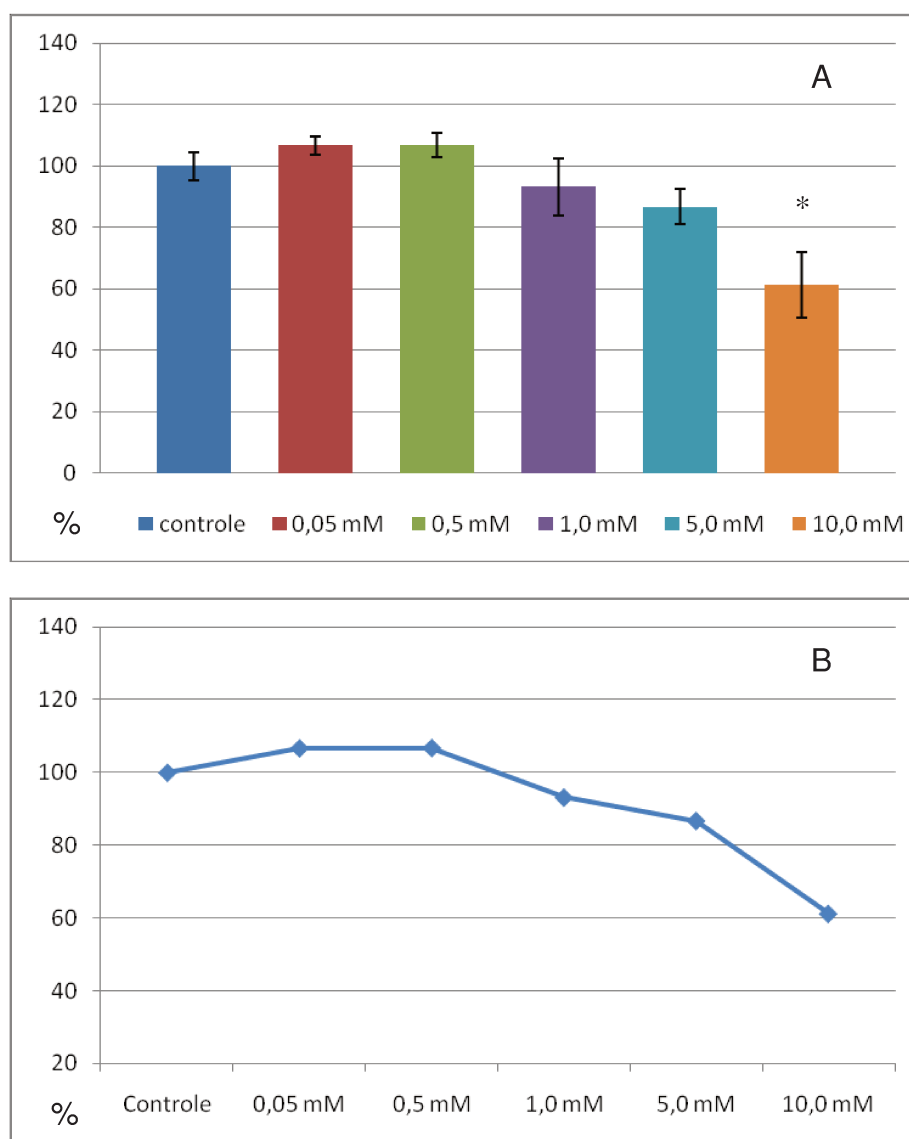


Fig. 3. Representação dose-resposta da porcentagem de viabilidade de células NIH 3T3 tratadas com VPA por 1 h em relação ao controle não tratado. (A) * representa diferença significativa em relação ao controle não tratado ao nível $P_{0,05}$ (teste de Mann-Whitney). Em B, curva construída com as médias dos valores obtidos em A. $n = 3$.

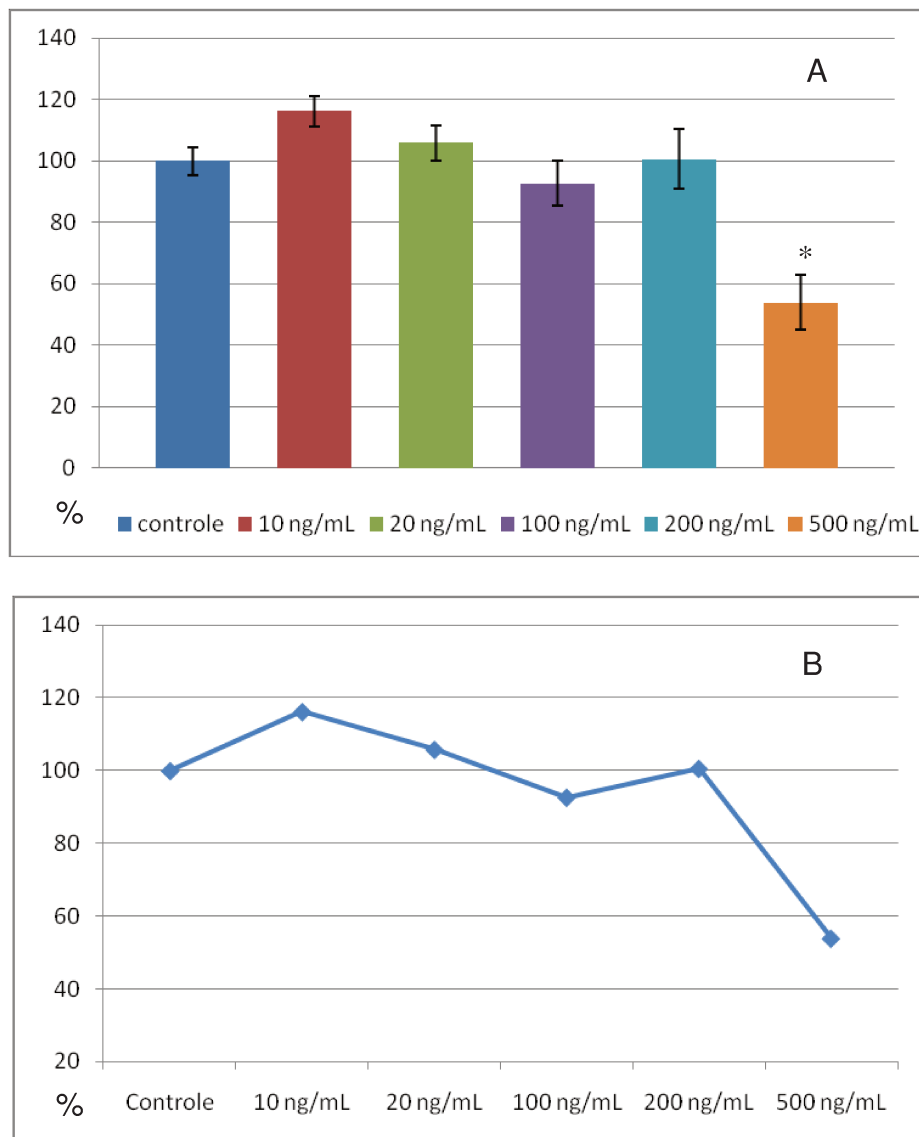


Fig. 4. Representação dose-resposta da porcentagem de viabilidade de células NIH 3T3 tratadas com TSA por 1 h em relação ao controle não tratado. (A) * representa diferença significativa em relação ao controle não tratado ao nível $P_{0,05}$ (teste de Mann-Whitney). Em B, curva construída com as médias dos valores obtidos em A. $n = 3$.

Efeito do VPA sobre a supraorganização da cromatina em células interfásicas

Nas células tratadas com VPA e TSA, uma análise visual preliminar de imagens coradas por reação de Feulgen captados pelo analisador por sistema vídeo as quais

são convertidas em tonalidades de cinza é sugestiva de um aspecto de descompactação cromatínica (Figs. 5 e 6).

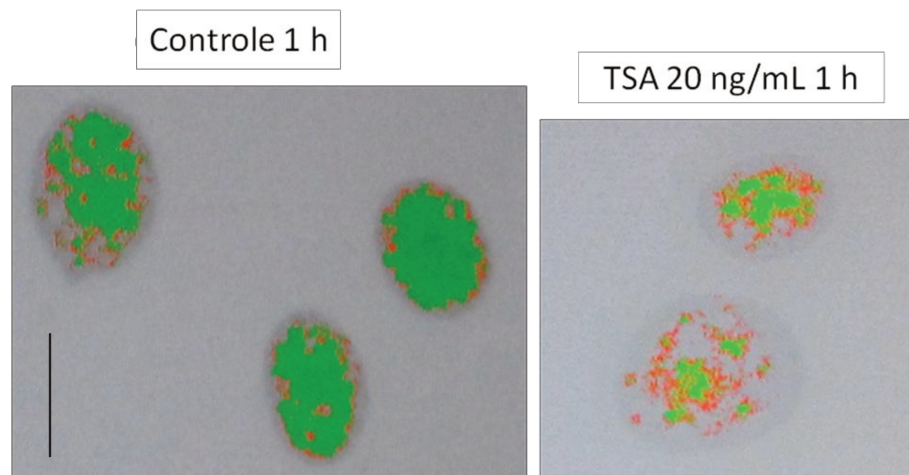


Fig. 5. Núcleos de células 3T3 corados por Feulgen revelando em cores falsas áreas de cromatina mais compactada (verde) que se reduzem em células tratadas com TSA em comparação ao controle não tratado. Barra de escala, 25 μ m.

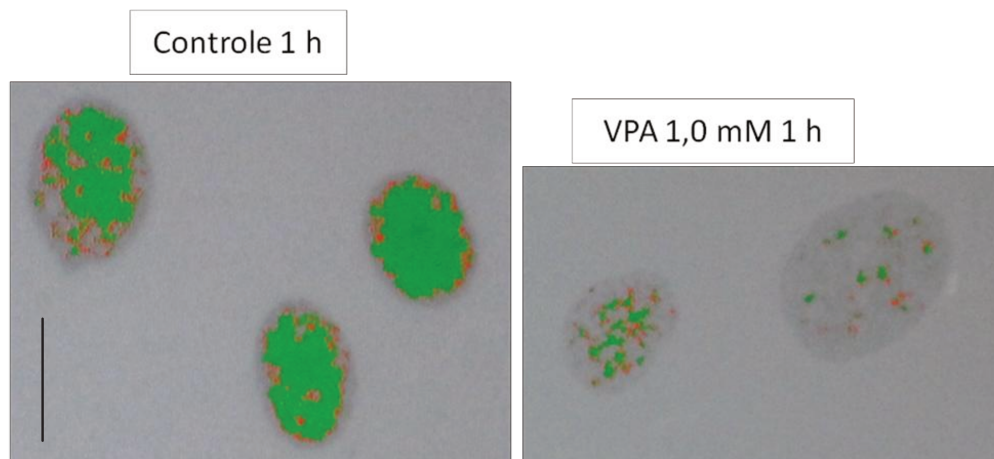


Fig. 6. Núcleos de células 3T3 corados por Feulgen revelando em cores falsas áreas de cromatina mais compactada (verde) que se reduzem em células tratadas com VPA em comparação ao controle não tratado. Barra de escala, 25 μ m.

Os diagramas de dispersão relacionando AAR vs Sc%, conforme proposição de Vidal (1984) (Fig. 7) nas várias condições experimentais propostas, podem ser observados nas Figuras 8-13.

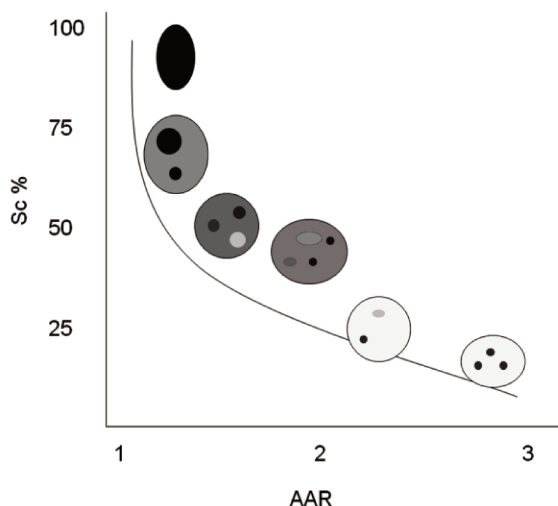


Fig. 7. Diagrama de dispersão Sc% vs. AAR (vide texto) discriminando a posição de fenótipos nucleares diferentes quanto à textura da cromatina (modificado de Vidal (1984) e publicado em Felisbino et al. 2011).

As células 3T3 tratadas por diferentes tempos e em diferentes concentrações de VPA sofreram um decréscimo significativo nos valores de Sc%, concomitante a um aumento de contraste entre cromatina condensada e não condensada (maior AAR) (Figs. 8 a 10; Tabelas 1 a 3). O mesmo ocorreu com as células tratadas com TSA, aqui usada como um controle positivo (Figs. 11 a 13; Tabelas 4 a 6). Estes resultados apontam para uma descompactação da cromatina induzida em todas as condições testadas de tratamento pelo VPA bem como pela TSA.

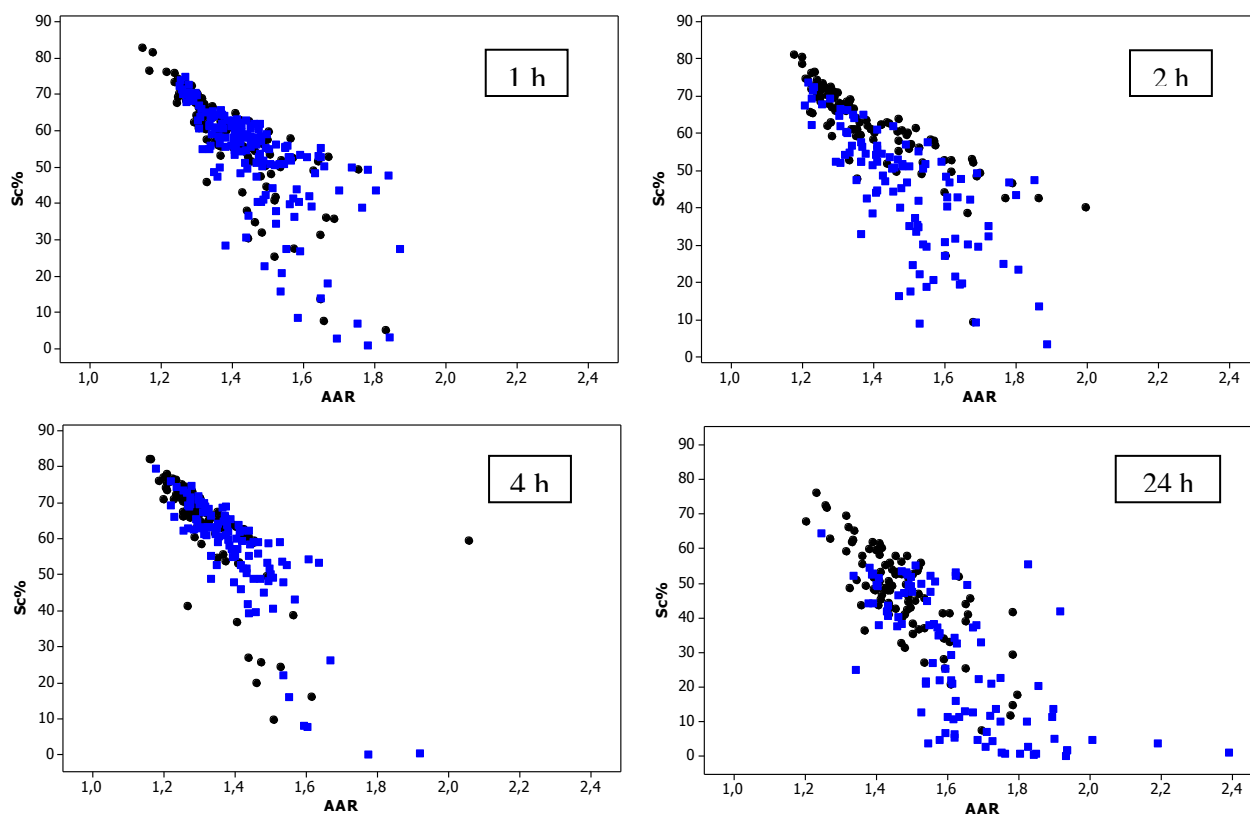


Fig. 8. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com VPA 0,05 mM (azul) em comparação à distribuição dos pontos que representam núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 1. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com VPA 0,05 mM

Tratamento			Sc%			AAR	
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	VPA	52,44	14,82	55,85 ^a	1,46	0,13	1,44 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	VPA	45,43	15,91	48,35 ^a	1,48	0,16	1,48 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	VPA	56,47	15,36	60,06 ^a	1,40	0,12	1,38 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	VPA	28,20	19,32	29,34 ^a	1,62	0,19	1,60 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,45 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X VPA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética.

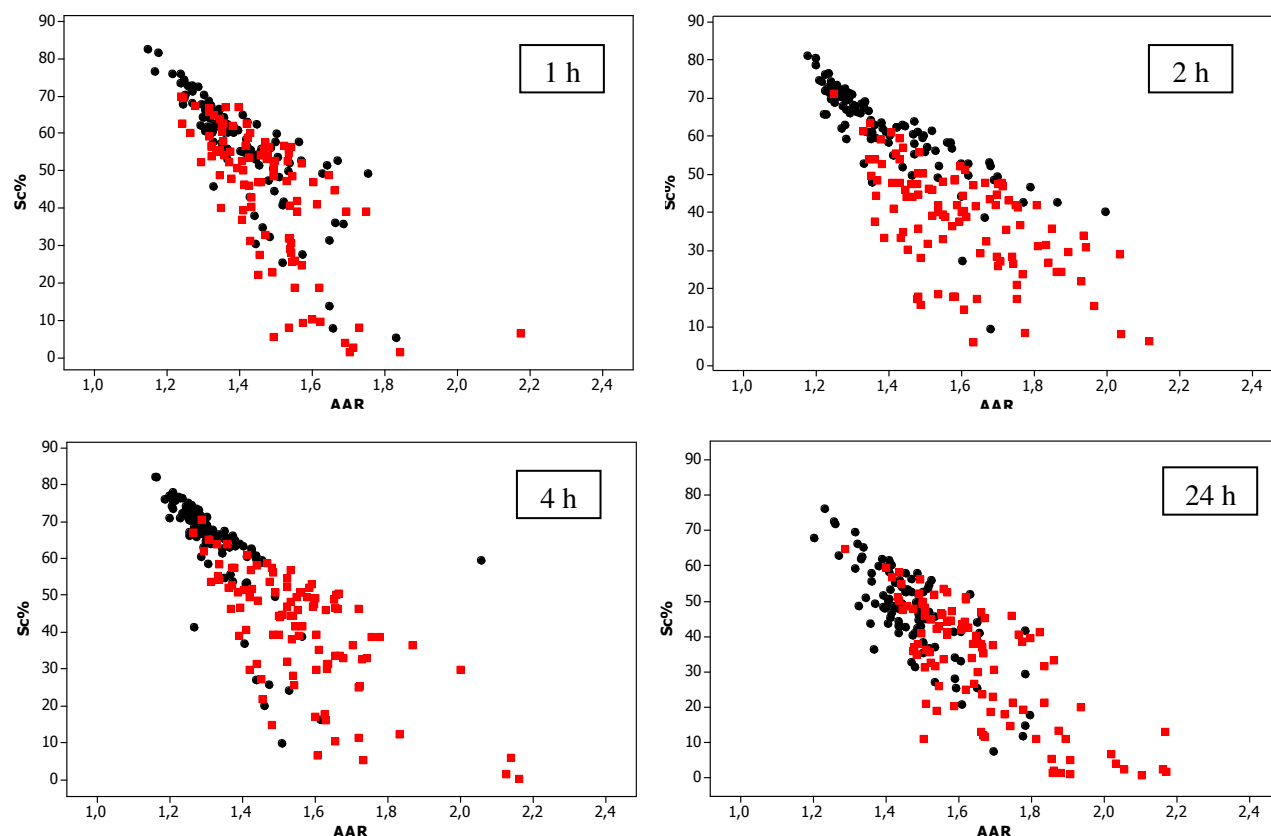


Fig. 9. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com VPA 0,5 mM (vermelho) em comparação à distribuição dos pontos que representam núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 2. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com VPA 0,5 mM

Tratamento		Sc%			AAR		
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	VPA	44,29	18,12	49,62 ^a	1,47	0,14	1,46 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	VPA	37,88	13,64	40,10 ^a	1,60	0,18	1,58 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	VPA	41,26	15,63	46,07 ^a	1,56	0,17	1,54 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	VPA	32,69	16,82	36,79 ^a	1,65	0,18	1,62 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,45 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X VPA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética.

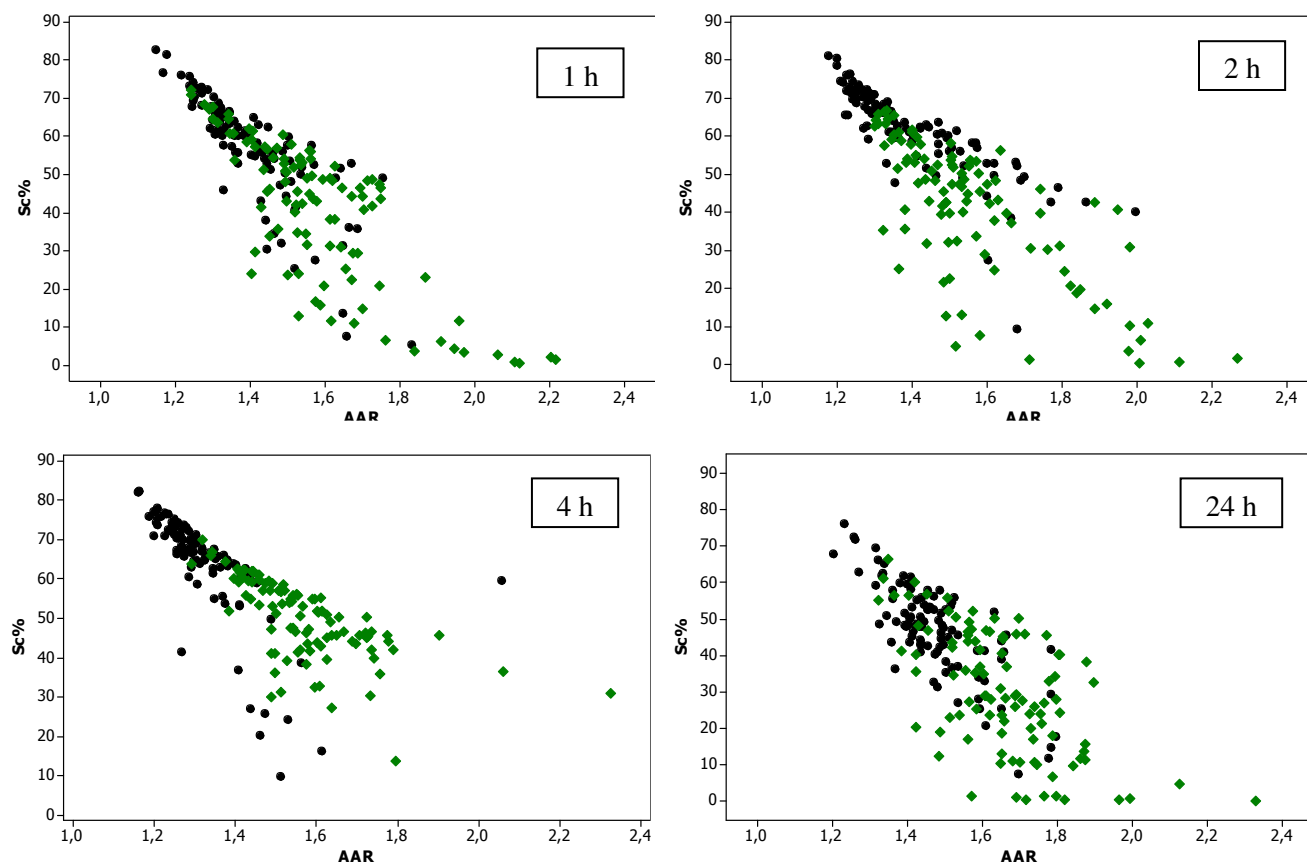


Fig. 10. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com VPA 1,0 mM (verde) em comparação à distribuição dos pontos que representam núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 3. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com VPA 1,0 mM

Tratamento		Sc%			AAR		
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	VPA	40,66	19,06	45,56 ^a	1,58	0,20	1,55 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	VPA	40,99	17,87	45,12 ^a	1,56	0,20	1,51 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	VPA	49,86	10,12	51,09 ^a	1,57	0,15	1,55 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	VPA	30,15	17,00	28,89 ^a	1,65	0,17	1,65 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,42 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X VPA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética

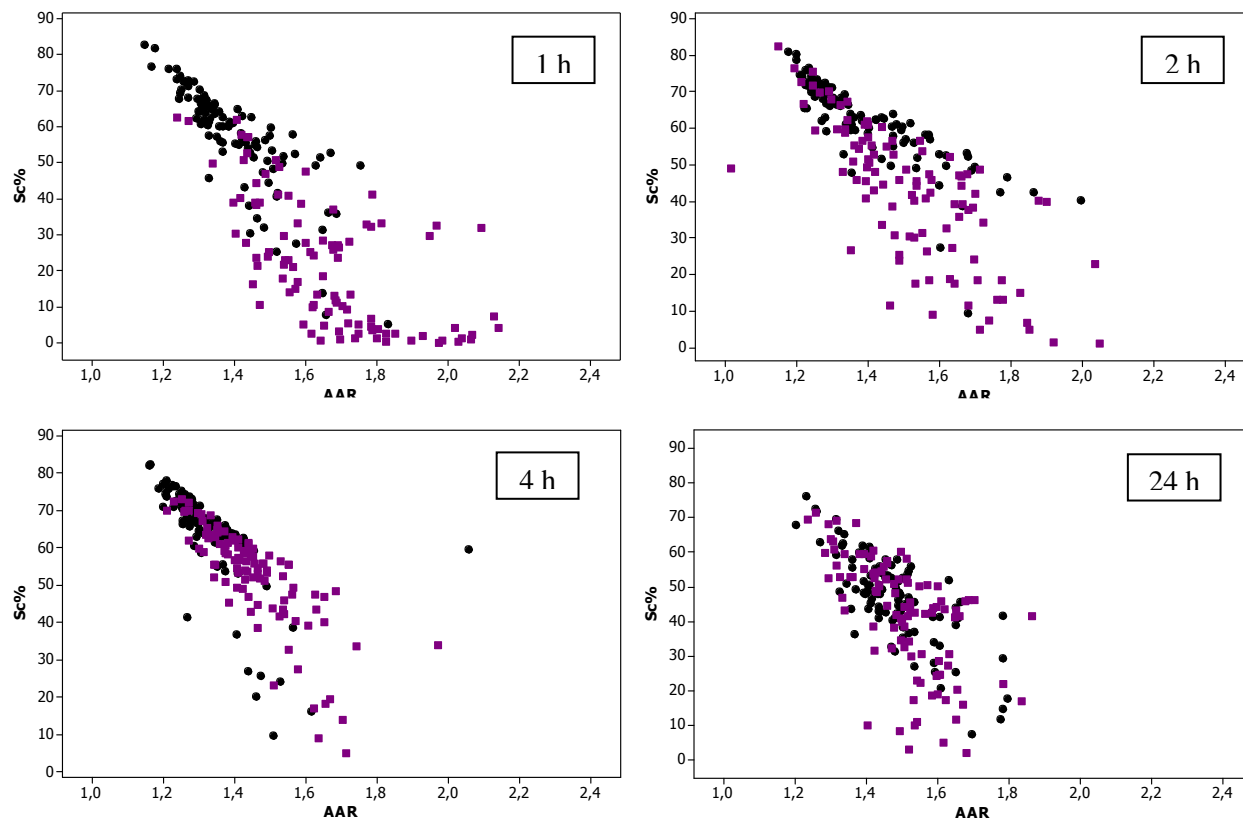


Fig. 11. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com TSA 10 ng/mL (violeta) em comparação à distribuição dos pontos referentes aos núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 4. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com TSA 10 ng/mL

Tratamento			Sc%			AAR	
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	TSA	22,47	17,89	22,36 ^a	1,66	0,20	1,64 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	TSA	41,93	19,05	44,99 ^a	1,52	0,19	1,51 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	TSA	52,72	13,90	55,69 ^a	1,45	0,13	1,43 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	TSA	41,80	16,67	44,21 ^a	1,50	0,13	1,51 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,45 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X TSA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética

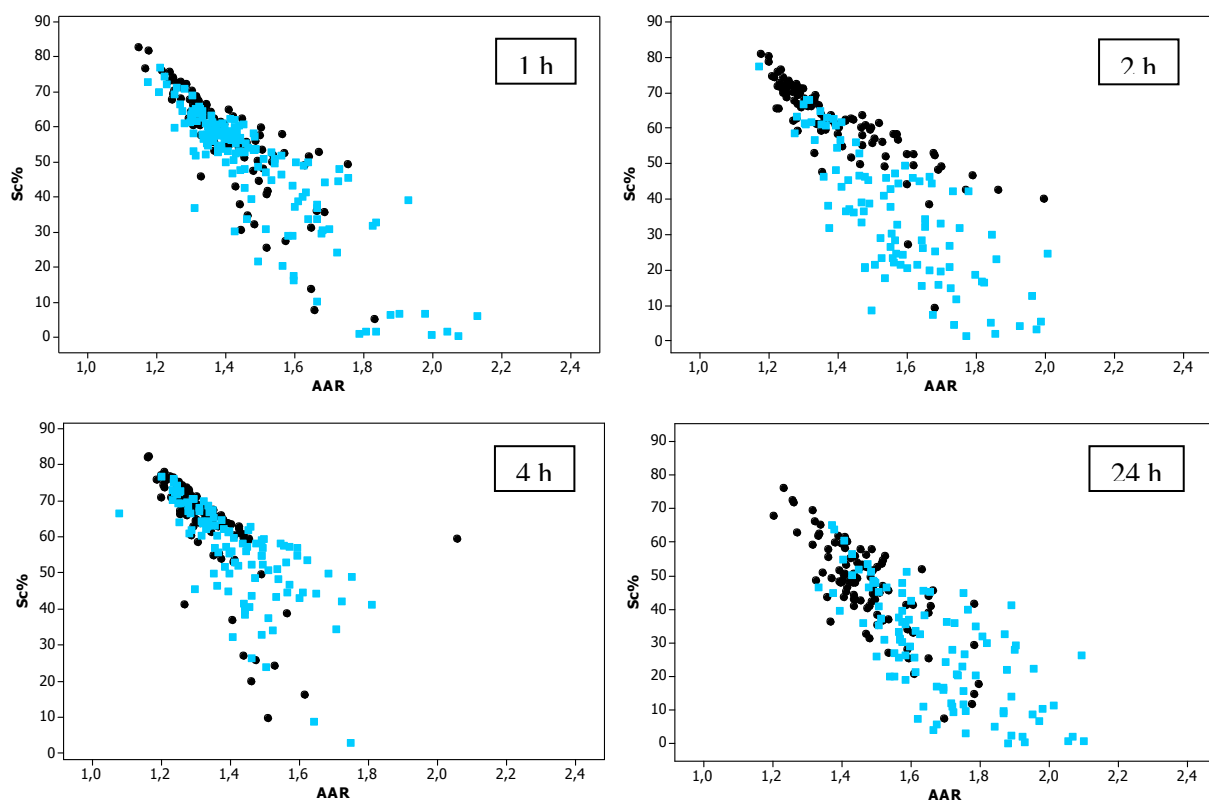


Fig. 12. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com TSA 20 ng/mL (azul claro) em comparação à distribuição dos pontos referentes aos núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 5. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com TSA 20 ng/mL

Tratamento			Sc%			AAR	
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	TSA	48,90	17,38	54,04 ^a	1,48	0,19	1,42 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	TSA	35,40	18,41	33,88 ^a	1,56	0,18	1,55 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	TSA	55,56	13,54	57,18 ^a	1,42	0,14	1,40 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	TSA	28,50	16,53	29,18 ^a	1,67	0,18	1,63 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,45 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X TSA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética.

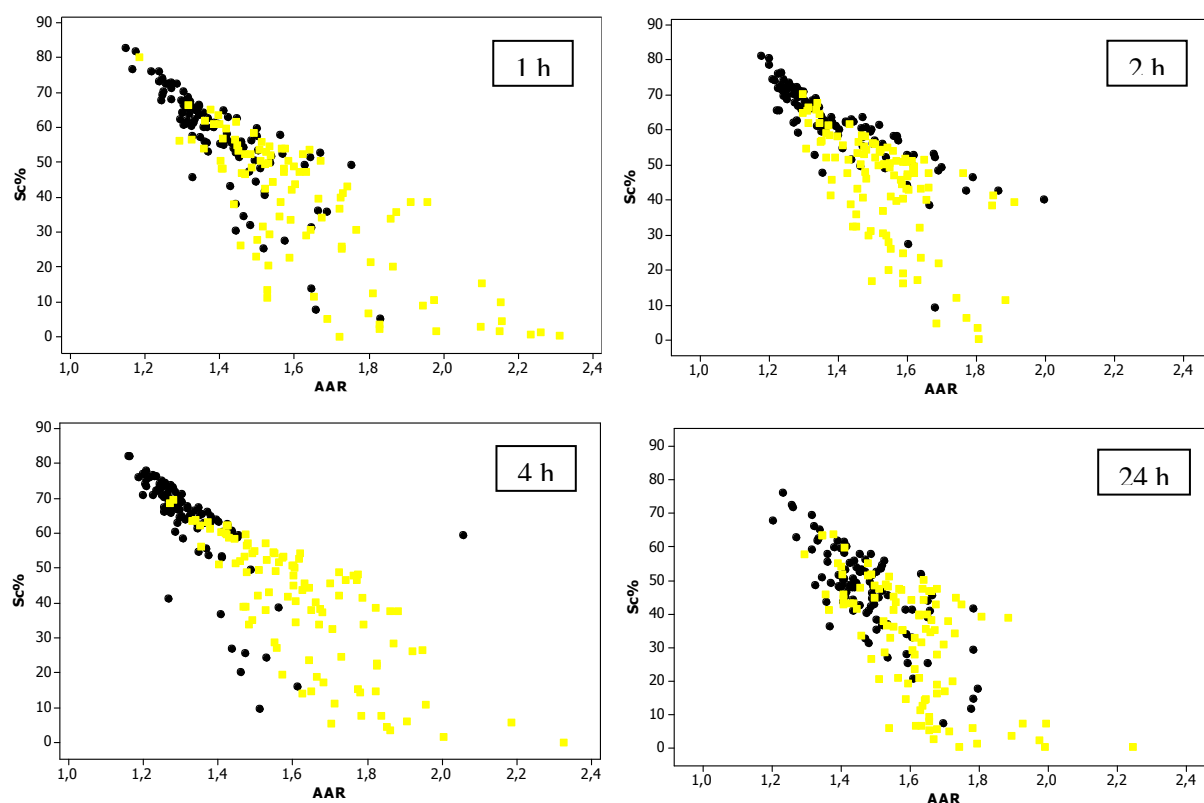


Fig. 13. Diagrama de dispersão Sc% versus AAR para células 3T3 tratadas com TSA 100 ng/mL (amarelo) em comparação à distribuição dos pontos referentes aos núcleos de células controle, não tratadas (preto). n = 100.

Tabela 6. Comparação dos valores Sc% e AAR em núcleos de células 3T3 tratadas com TSA 100 ng/mL

Tratamento			Sc%			AAR	
Tempo (h)	Droga	X	S	Md	X	S	Md
1	TSA	37,27	19,70	42,37 ^a	1,63	0,23	1,57 ^a
	Controle	56,77	14,52	60,12 ^b	1,40	0,13	1,37 ^b
2	TSA	44,19	15,52	47,82 ^a	1,53	0,14	1,53 ^a
	Controle	61,82	11,18	62,76 ^b	1,40	0,17	1,34 ^b
4	TSA	39,71	17,98	43,38 ^a	1,63	0,19	1,60 ^a
	Controle	64,10	13,71	67,22 ^b	1,32	0,11	1,29 ^b
24	TSA	32,49	17,56	36,66 ^a	1,60	0,15	1,61 ^a
	Controle	47,23	12,80	48,44 ^b	1,47	0,12	1,45 ^b

Letras diferentes para comparações Controle X TSA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); Md, mediana; S, desvio padrão; X, média aritmética.

É importante salientar que nas células 3T3 o “cutoff point” escolhido (0,200) discrimina áreas heterocromáticas nos preparados submetidos à reação de Feulgen, embora parte da população nuclear possa ter, além da heterocromatina, áreas de eucromatina condensada discriminadas, o que se encontra baseado em relatos prévios (Mello & Russo 1990, Mello et al. 1992). Para determinar se o VPA, em seu efeito de descondensação da cromatina, afetava também áreas heterocromáticas, buscou-se verificar a ocorrência desse fenômeno em núcleos com $Sc\% < 10\%$ (Fig. 14), o que foi constatado (Tabela 7). De fato, a frequência desses núcleos aumentou com o tratamento pelo VPA especialmente nas condições de 24 h de tratamento e com a TSA em todas as condições, mas de modo mais intenso, após 24 h de tratamento. Comprovou-se desse modo que alteração na supraorganização cromatínica com o VPA e a TSA também afeta áreas heterocromáticas.

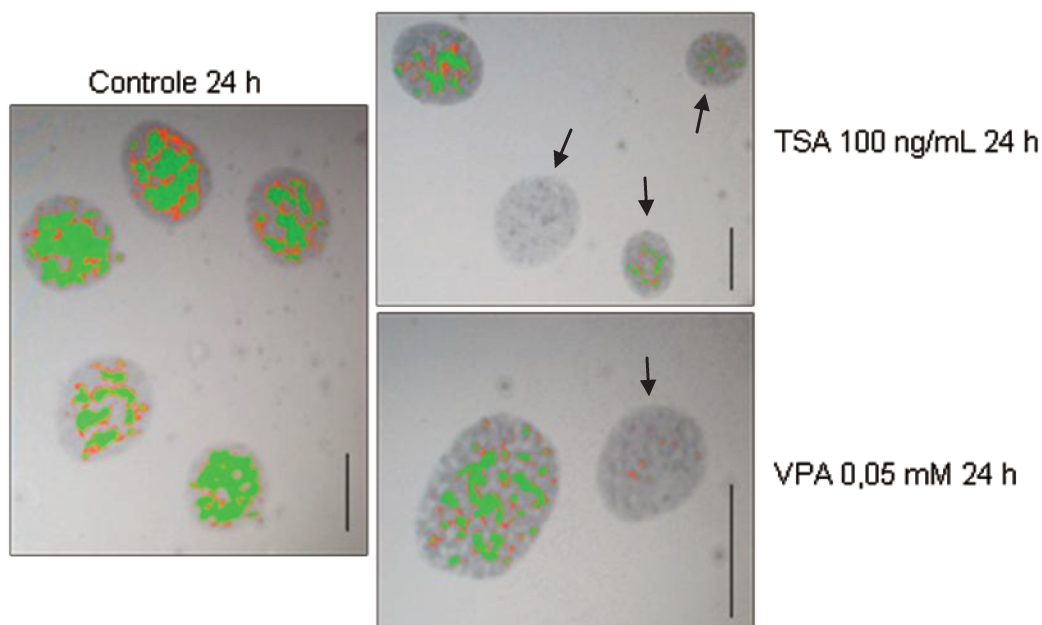


Fig. 14. Núcleos de células 3T3, tratados por TSA e VPA, corados por Feulgen revelando em cores falsas áreas de cromatina condensada (verde) menores que 10% de sua área total (setas). Barra de escala, 25 μm .

Tabela 7. Frequência de núcleos com Sc% < 10% em células NIH 3T3 tratadas com VPA e TSA

Tratamento				Tratamento			
Tempo (h)	Drogas	Concentração	Sc% < 10%	Tempo (h)	Drogas	Concentração	Sc% < 10%
1	VPA/TSA	zero	1	4	VPA/TSA	zero	0
	VPA	0,05 mM	5		VPA	0,05 mM	4
		0,5 mM	6			0,5 mM	5
		1,0 mM	11			1,0 mM	0
	TSA	10 ng/mL	41		TSA	10 ng/mL	2
		20 ng/mL	13			20 ng/mL	2
		100 ng/mL	19			100 ng/mL	9
2	VPA/TSA	zero	1	24	VPA/TSA	zero	1
	VPA	0,05 mM	2		VPA	0,05 mM	29
		0,5 mM	4			0,5 mM	13
		1,0 mM	8			1,0 mM	14
	TSA	10 ng/mL	6		TSA	10 ng/mL	5
		20 ng/mL	11			20 ng/mL	19
		100 ng/mL	5			100 ng/mL	20

Não foi observada alteração no conteúdo de DNA na maioria das condições de tratamento por VPA (Figs. 15 a 18). Um significativo decréscimo em valores A_T devido a uma menor frequência de núcleos com maiores conteúdos Feulgen-DNA, em comparação aos respectivos controles, ocorreu nas células tratadas com VPA por 2 h (Tabela 8) e na maioria das células tratadas com TSA (Tabela 9; Figs. 19 a 22). As exceções podem ter ocorrido por conta de um ciclo celular mais lento.

Aumento nos valores das áreas nucleares (S_T) ocorreu em todos os casos (Tabelas 8 e 9), à exceção das células tratadas com TSA por 1 h, quando esse parâmetro teve seu valor inalterado (Tabela 9) possivelmente por ter sido mascarado

pela menor representatividade de núcleos com valores Feulgen-DNA mais elevados na amostragem, e incluindo-se o aparecimento de núcleos com conteúdo Feulgen-DNA na classe $< \sim 2C$ (Tabela 11).

Em todos os casos, a maioria dos núcleos apresentou um conteúdo Feulgen-DNA (IOD) correspondente às classes Feulgen-DNA 2 C (fase G1) e 4 C (fases G2 e G1). A classe de grau "2 C" foi definida como aquela contendo os menores valores de IOD apresentados pelas células controle após 25 h de cultivo e em comparação à distribuição de valores Feulgen-DNA apresentados por linfócitos de camundongos.

Núcleos pertencentes à classe poliploide 8 C foram também encontrados nos preparados controle, sendo que sua frequência apresentou-se reduzida nos preparados tratados por VPA e TSA (Tabelas 10 e 11). Por outro lado, o aumento na frequência de núcleos com valores Feulgen-DNA $< \sim 2C$ foi mais evidente com o tratamento por TSA por 1 h (Tabela 11).

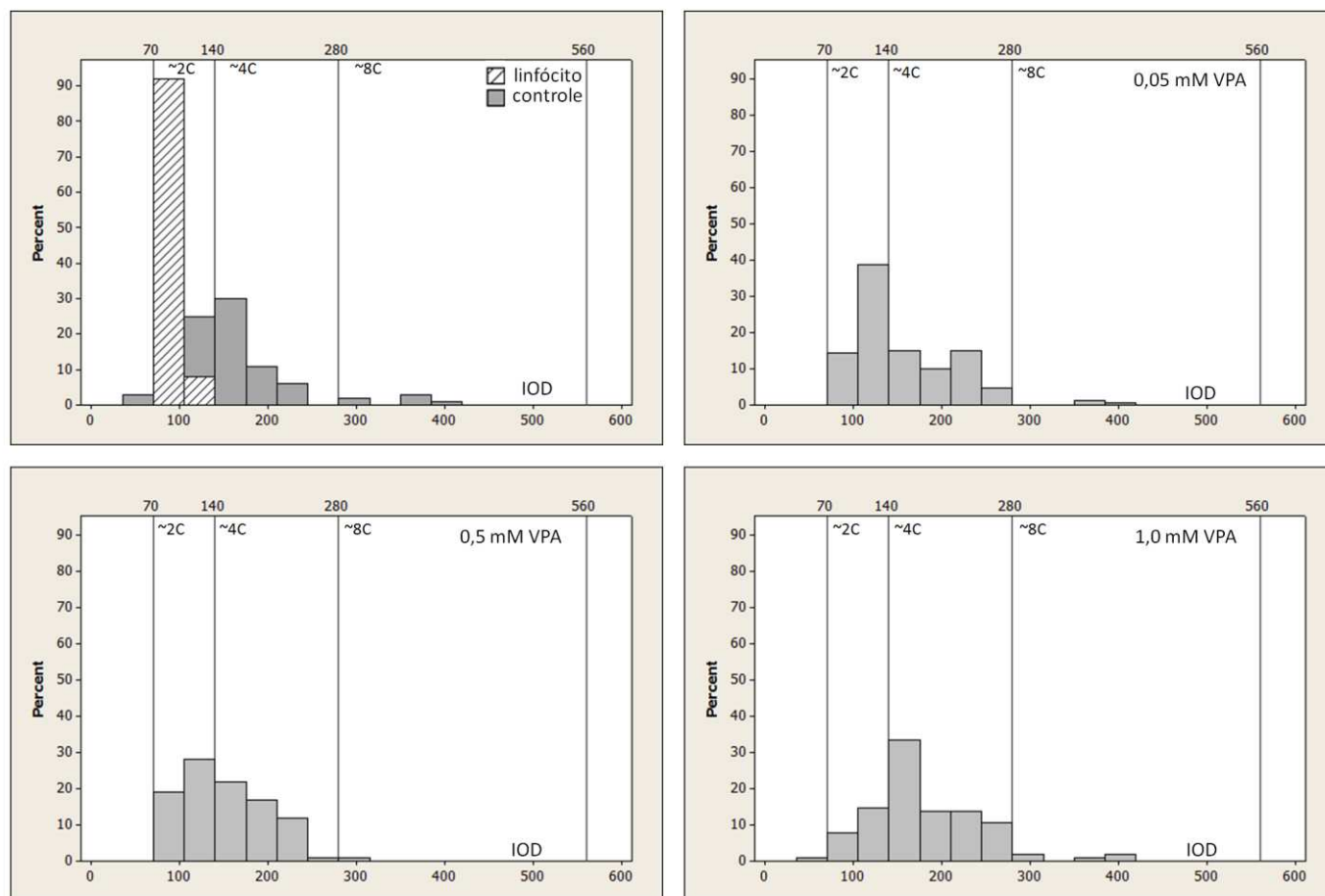


Fig. 15. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com VPA por 1 h. n, 200. Linfócitos de camundongos Balb-c foram usados como referência para classe Feulgen-DNA 2 C.

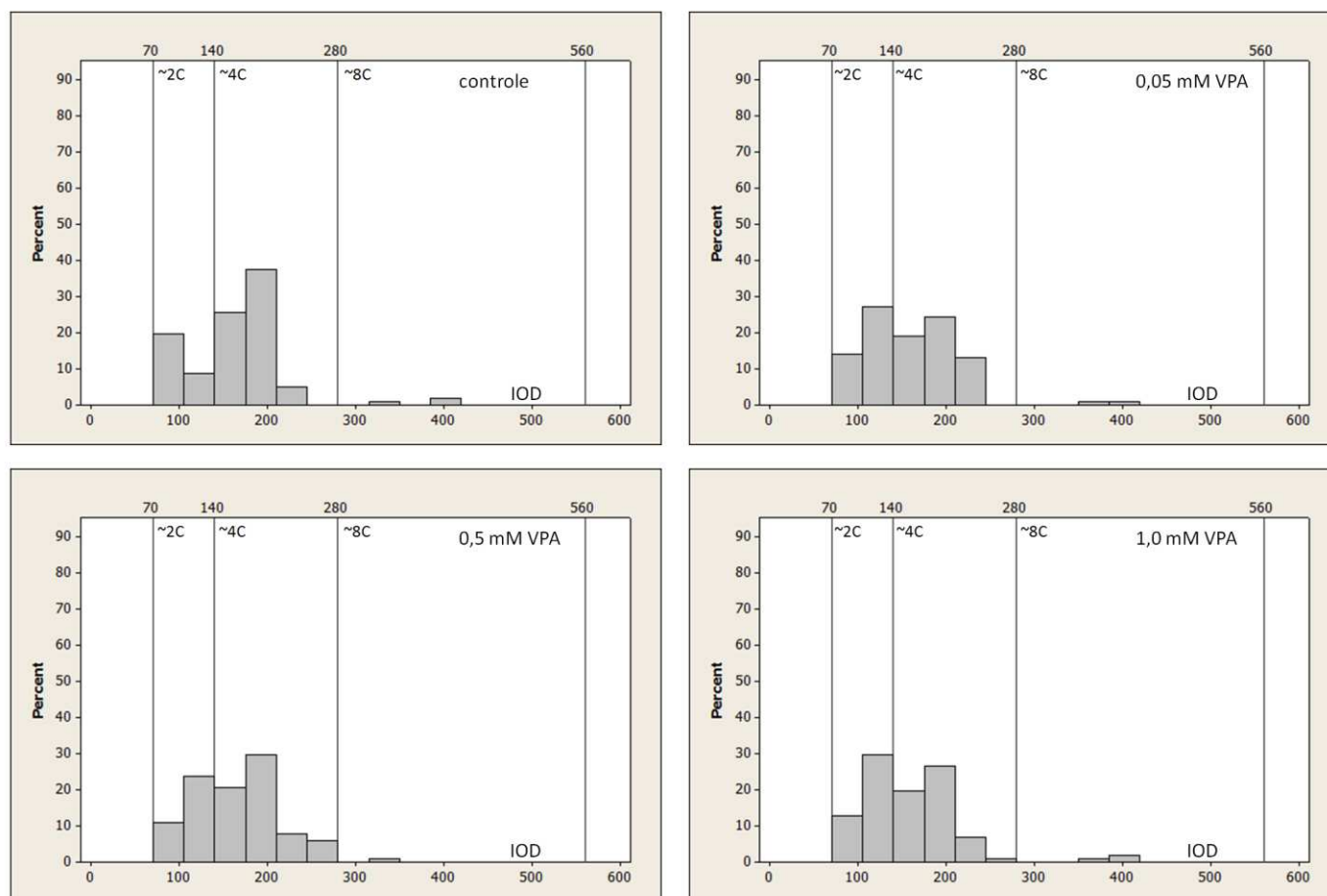


Fig. 16. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com VPA por 2 h. n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja figura 15.

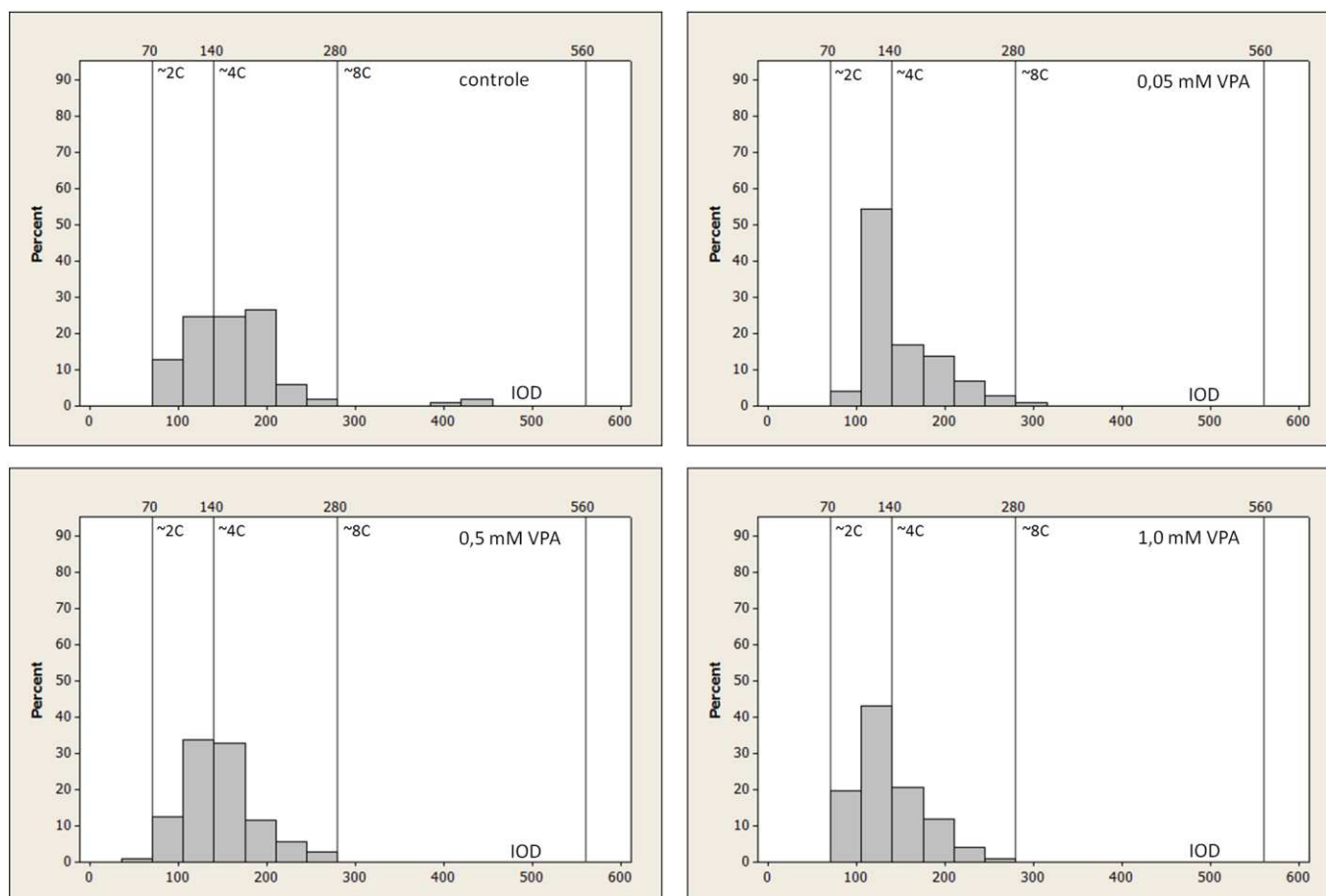


Fig. 17. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com VPA por 4 h. n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja figura 15.

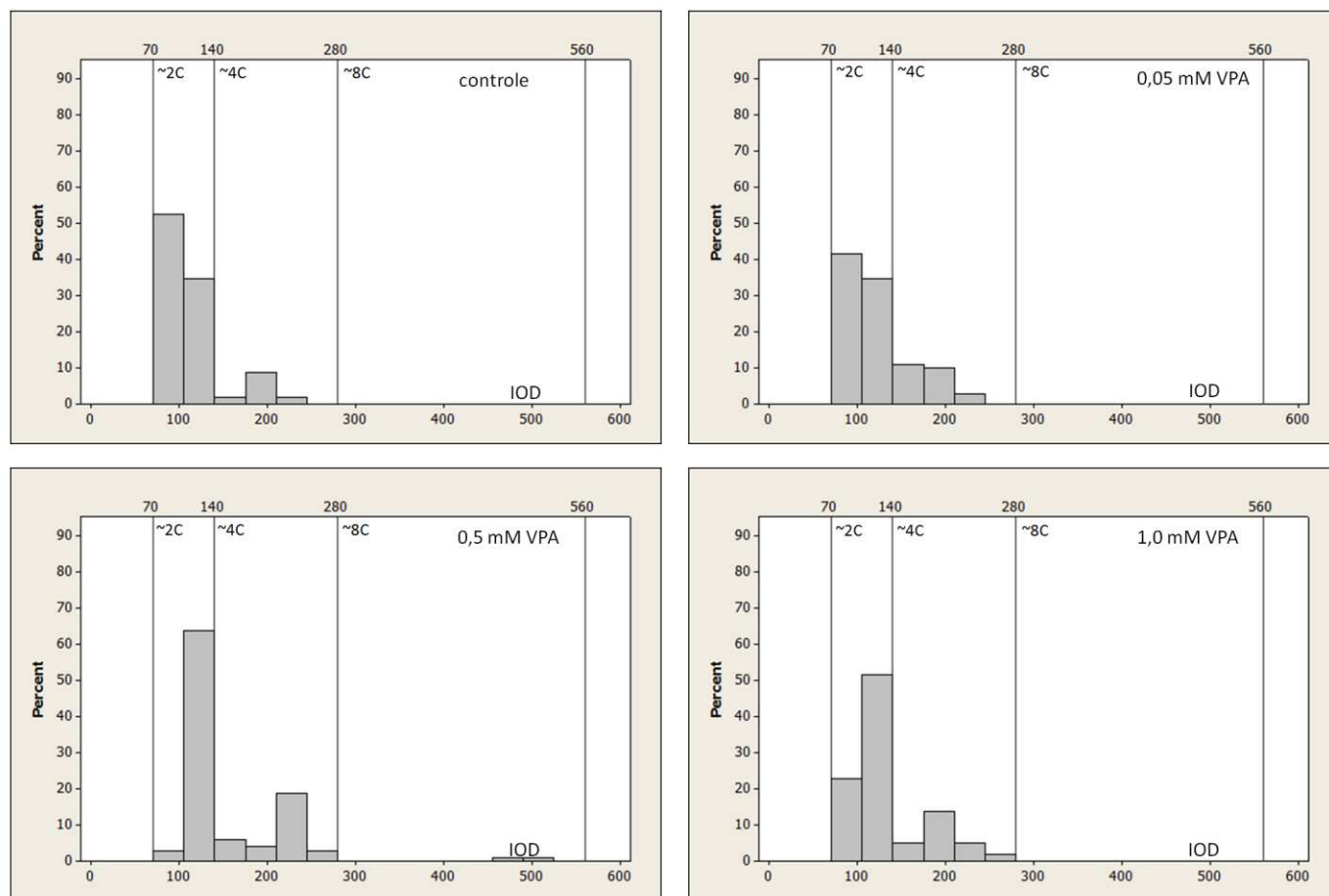


Fig. 18. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com VPA por 24 h. n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja figura 15.

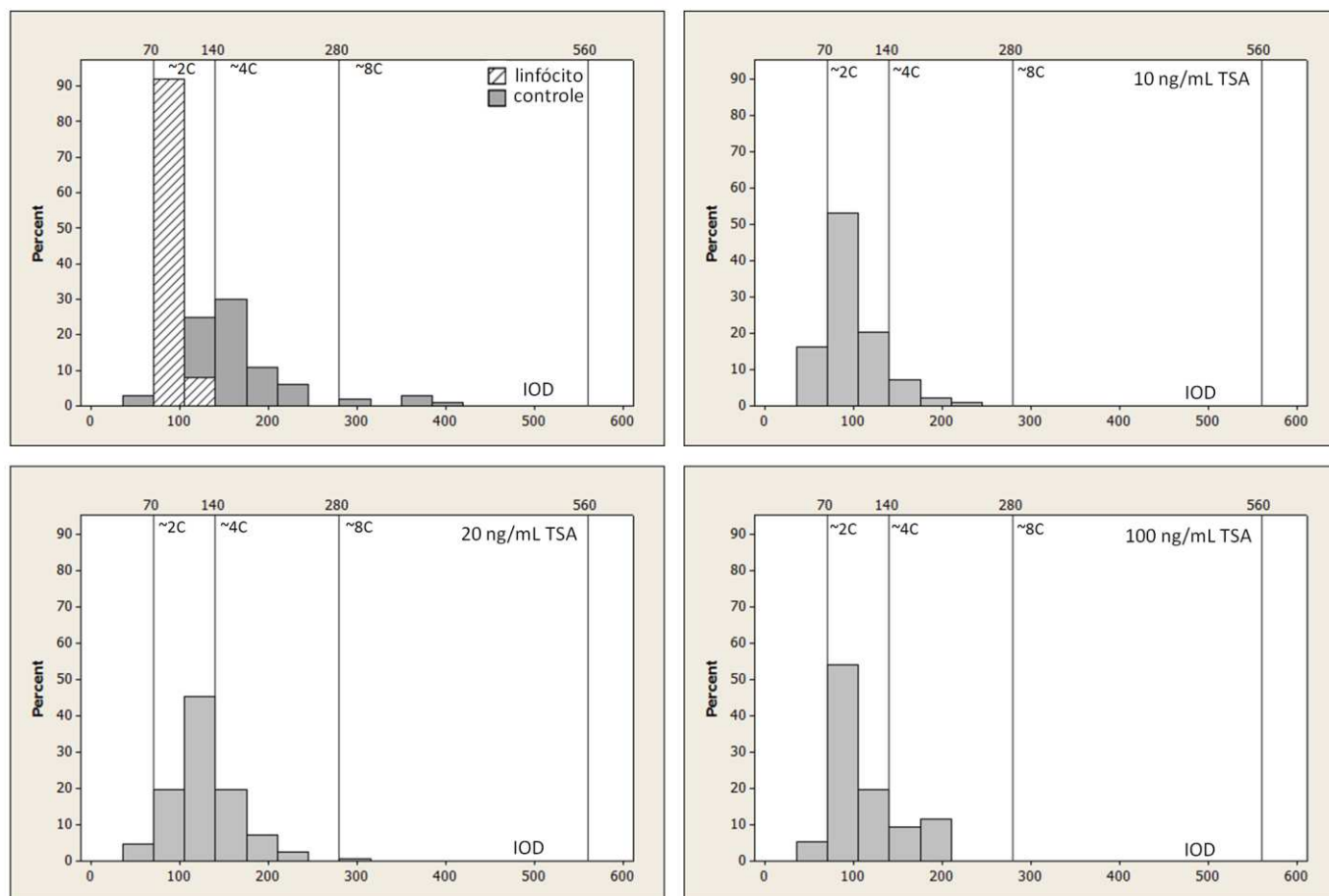


Fig. 19. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com TSA por 1 h. n, 200. Linfócitos de camundongos Balb-c foram usados como referência para classe Feulgen-DNA 2 C

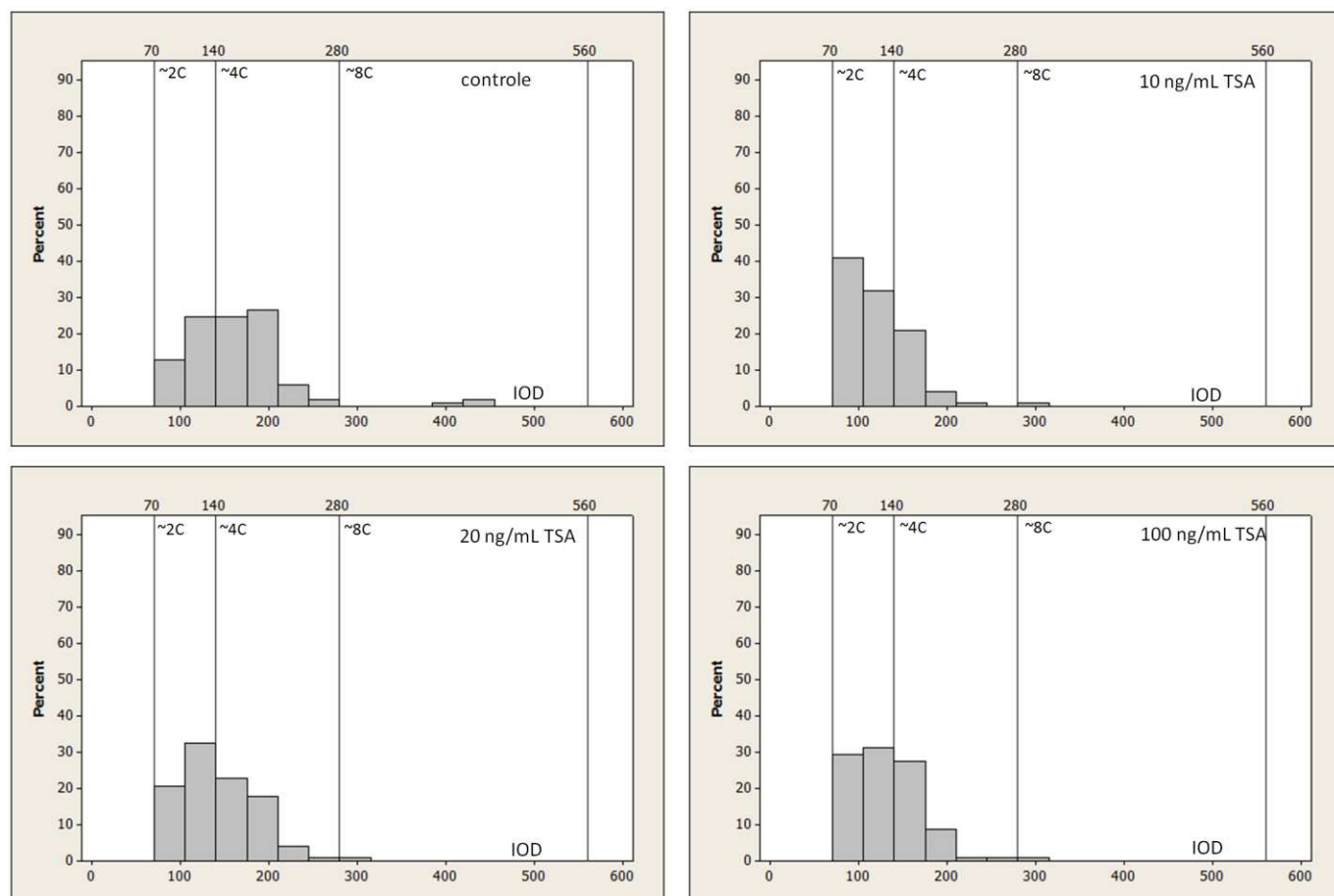


Fig. 20. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH 3T3 tratadas com TSA por 2 h, n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja a figura 19.

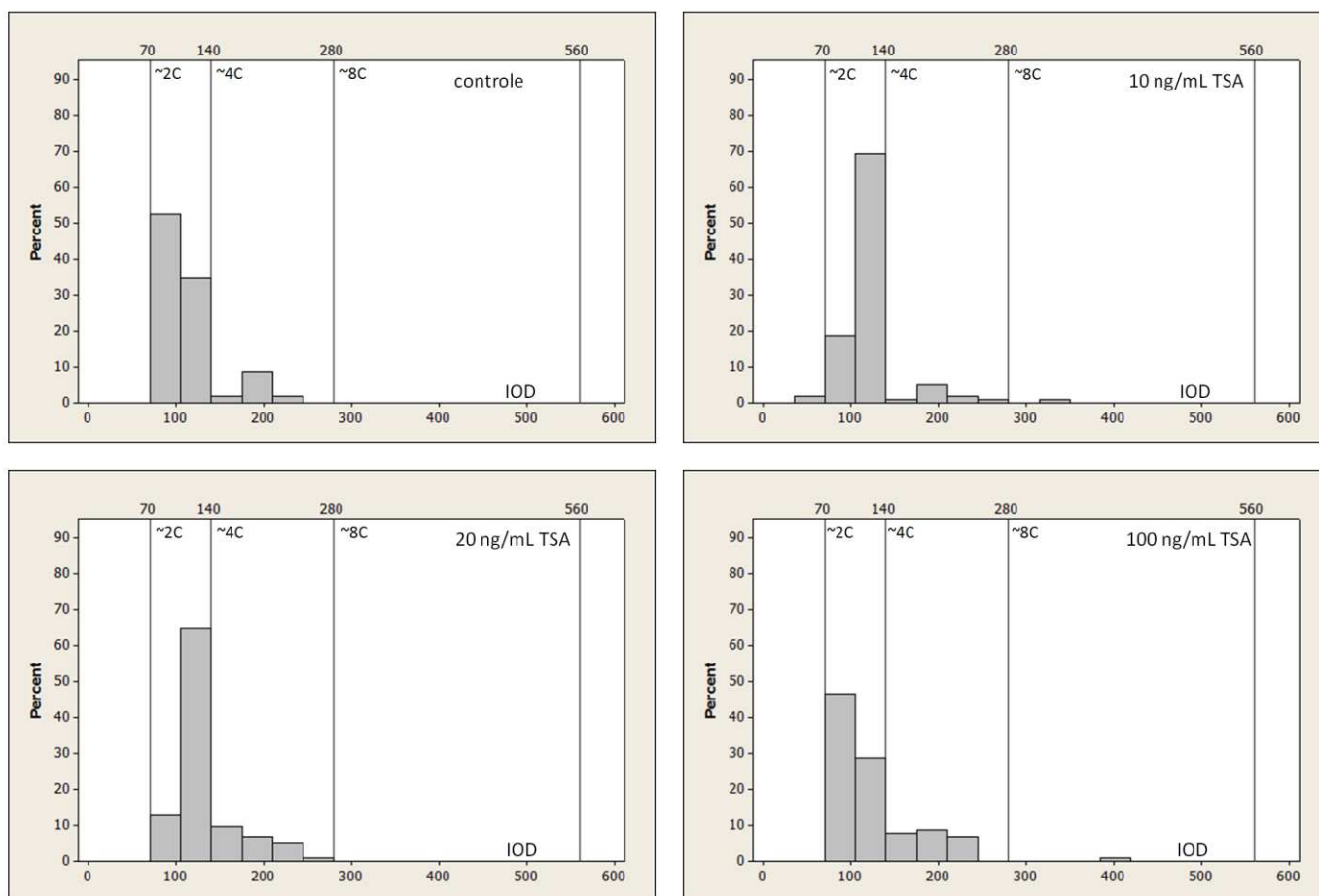


Fig. 21. Histograma de frequência de valores Feulgen-DNA em células NIH3T3 tratadas com TSA por 4 h. n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja a figura 19.

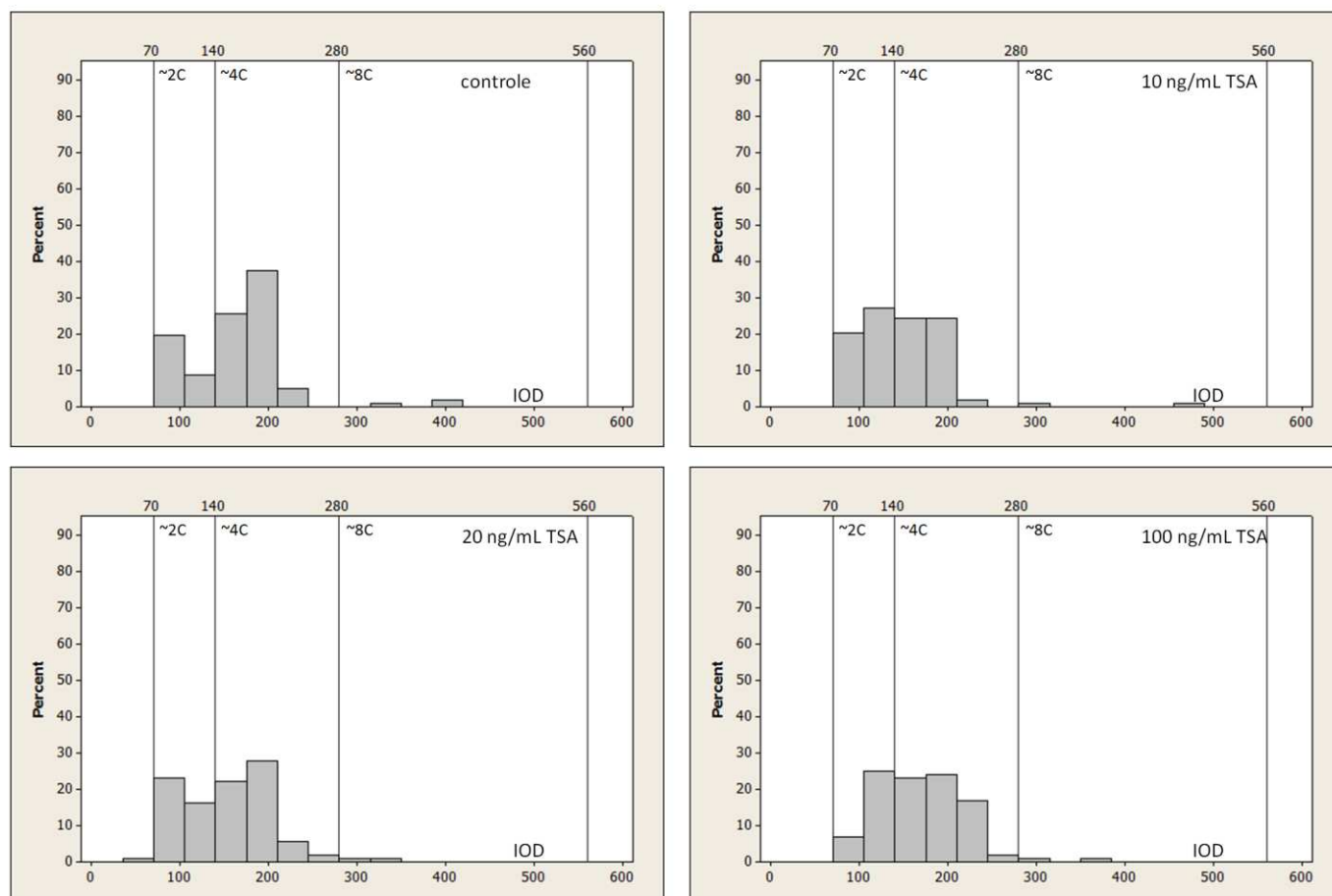


Fig. 22. Histogramas de frequência de valores Feulgen-DNA em células 3T3 tratadas com TSA por 24 h. n, 200. Para referência dos linfócitos de camundongos Balb-c, veja a figura 19.

Tabela 8. Comparação do conteúdo Feulgen-DNA nuclear e área nuclear em células NIH 3T3 tratadas com VPA

Tratamento		A _T (unidades arbitrárias)			S _T (μm ²)		
Tempo (h)	VPA (mM)	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	151,09	65,14	144,34 ^a	165,60	54,73	159,00 ^a
	0,05	156,62	57,77	136,37 ^a	184,42	51,42	175,25 ^b
	0,5	150,82	46,00	141,70 ^a	209,10	58,85	204,14 ^b
	1,0	180,83	63,67	165,84 ^b	265,28	79,84	262,88 ^c
2	zero	164,02	62,30	158,71 ^a	163,97	54,43	151,50 ^d
	0,05	150,16	42,30	135,28 ^a	210,86	59,84	201,50 ^b
	0,5	147,42	40,15	141,82 ^a	236,06	64,23	231,63 ^c
	1,0	136,83	37,47	124,97 ^b	204,38	59,34	196,38 ^b
4	zero	163,91	56,21	170,02 ^a	156,00	64,81	153,75 ^a
	0,05	160,27	53,85	158,43 ^a	174,65	54,15	162,50 ^b
	0,5	166,24	48,69	163,84 ^a	243,51	73,00	234,50 ^c
	1,0	158,59	57,50	149,06 ^a	189,46	54,62	176,50 ^d
24	zero	115,45	31,93	103,97 ^a	153,30	40,93	141,50 ^a
	0,05	120,61	38,49	108,47 ^a	206,86	61,08	199,00 ^b
	0,5	157,69	66,43	129,19 ^b	263,00	102,50	237,30 ^c
	1,0	133,98	42,94	115,01 ^c	227,77	75,88	206,75 ^d

Letras diferentes para comparações Controle X VPA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); A_T, DNA nuclear total; Md, mediana; S, desvio padrão; S_T, área nuclear; X, média aritmética; VPA, ácido valproico.

Tabela 9. Comparação do conteúdo Feulgen-DNA nuclear e área nuclear em células NIH 3T3 tratadas com TSA

Tratamento		A _T (unidades arbitrárias)			S _T (µm ²)		
Tempo (h)	TSA (ng/mL)	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	151,09	65,14	144,34 ^a	165,60	54,73	159,00 ^a
	10	97,40	33,51	88,88 ^b	169,73	46,23	159,00 ^a
	20	125,16	39,79	119,48 ^c	165,08	40,25	154,50 ^a
	100	111,42	36,96	99,92 ^d	167,57	52,95	153,38 ^a
2	zero	164,02	62,30	158,71 ^a	163,97	54,43	151,50 ^a
	10	121,40	35,98	110,68 ^b	176,70	58,82	167,38 ^b
	20	142,72	42,46	137,48 ^c	222,56	56,31	220,25 ^c
	100	133,22	40,23	130,77 ^c	191,37	57,53	176,75 ^d
4	zero	163,91	56,21	170,02 ^a	156,00	64,81	153,75 ^a
	10	148,68	51,42	144,06 ^b	177,17	57,34	163,50 ^b
	20	153,75	52,67	154,38 ^{a,b}	171,73	52,59	160,88 ^b
	100	170,79	48,21	168,03 ^a	249,51	65,79	240,25 ^c
24	zero	115,45	31,93	103,97 ^a	153,30	40,93	141,50 ^a
	10	121,67	35,55	113,68 ^b	176,87	42,28	173,25 ^b
	20	132,32	34,90	122,00 ^c	229,63	68,73	219,13 ^c
	100	125,18	48,16	105,96 ^a	205,03	66,31	191,50 ^d

Letras diferentes para comparações Controle X VPA significam diferenças significativas a p 0,05 (Mann-Whitney); A_T, DNA nuclear total; Md, mediana; S, desvio padrão; S_T, área nuclear; X, média aritmética; TSA, tricotatina A

Tabela 10. Frequências relativas de classes Feulgen-DNA para células NIH 3T3 tratadas com VPA em relação ao controle não tratado

Células	Tratamento		Frequências relativas (%) de classes Feulgen-DNA			
	Tempo (h)	VPA (mM)	<2C	2C	4C	8C
Linfócitos*	zero	zero		100		
NIH 3T3	1	zero	3,00	44,00	47,00	6,00
		0,05		53,28	44,76	1,86
		0,5		47,00	52,00	1,00
		1,0	0,98	22,54	71,58	4,90
	2	zero		37,66	59,37	2,97
		0,05		58,41	40,60	0,99
		0,5	0,96	46,15	52,89	
		1,0		62,74	37,26	
	4	zero		28,71	68,32	2,97
		0,05		41,41	56,57	2,02
		0,5		34,65	64,36	0,99
		1,0		42,57	52,48	2,47
	24	zero		87,10	12,90	
		0,05		76,23	23,77	
		0,5		66,66	31,38	1,96
		1,0		74,25	25,75	

* Controle de classe de DNA 2C

Tabela 11. Frequências relativas de classes Feulgen-DNA para células NIH 3T3 tratadas com TSA em relação ao controle não tratado

Células	Tratamento		Frequências relativas (%) de classes Feulgen-DNA			
	Tempo (h)	TSA (ng/mL)	<2C	2C	4C	8C
Linfócitos*	zero	zero		100		
NIH 3T3	1	zero	3,00	44,00	47,00	6,00
		10	16,32	72,47	11,21	
		20	4,60	65,13	29,62	0,65
		100	5,21	73,96	20,37	
	2	zero		37,66	59,37	2,97
		10		73,00	26,00	1,00
		20		52,46	45,55	0,99
		100		60,78	38,24	0,98
	4	zero		28,71	68,32	2,97
		10		47,56	50,50	1,94
		20	0,96	39,41	57,71	1,92
		100		32,00	66,00	2,00
	24	zero		87,10	12,90	
		10	1,98	88,12	9,90	
		20		77,44	22,56	
		100		75,24	23,77	0,99

* Controle de classe de DNA 2C

Índices mitóticos, anomalias mitóticas, micronúcleos e morte celular

Em todas as condições experimentais foram observadas mitoses anormais como pontes cromossômicas e cromossomos “lagging”, bem como outras anomalias nucleares como núcleos gigantes, micronúcleos e brotamentos nucleares (Fig. 23). Não se constatou diferença significativa na frequência dessas anomalias nos preparados

tratados com VPA ou TSA em relação ao controle (Tabelas 12 e 13). Da mesma forma, o índice mitótico e a taxa de morte celular apoptótica ou precedida por multinucleação não sofreram alterações após tratamento com VPA e TSA (Tabela 12 e 13). Nas tabelas o valor de mitose anormal para o controle 24 h encontra-se nulo, em função da sua mediana ser zero, uma vez que das três medidas realizadas, em duas obteve-se porcentagem zero.

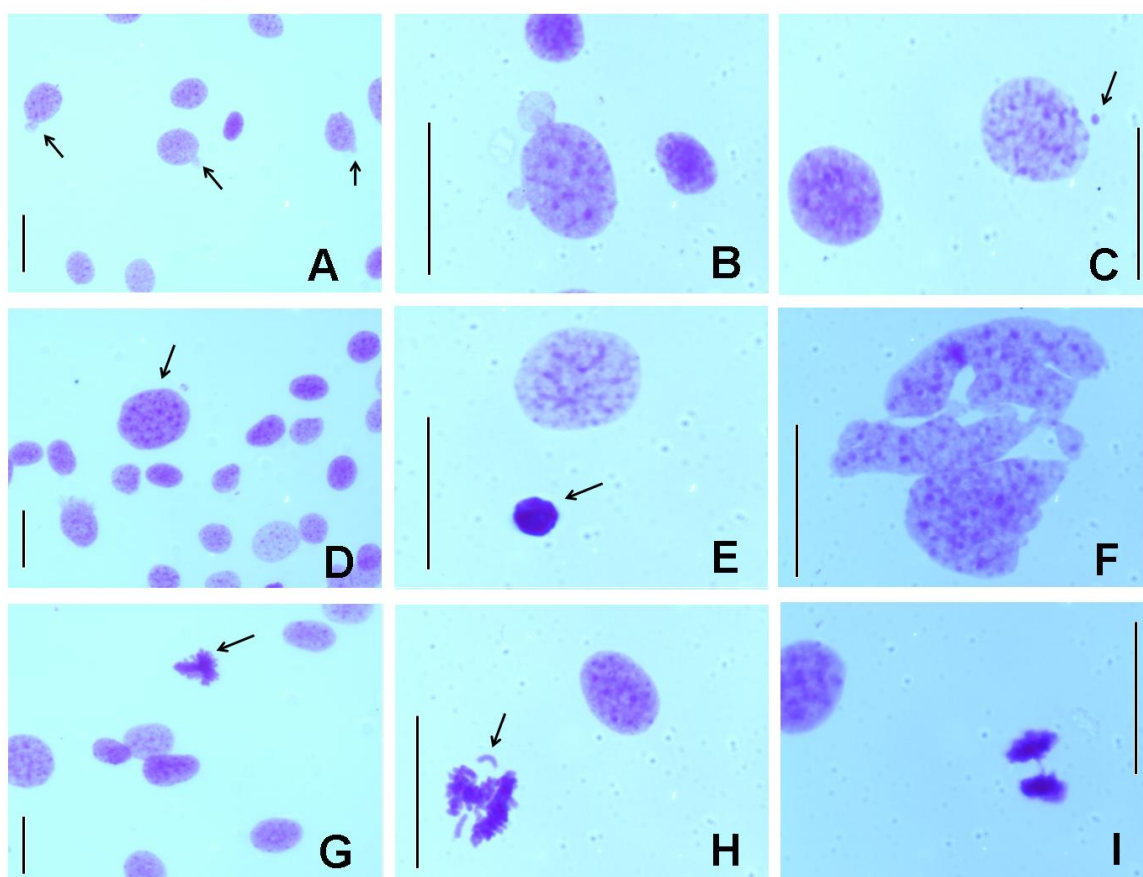


Fig. 23. Imagens de anomalias mitóticas, micronúcleo e morte celular em células 3T3 coradas com Feulgen. Brotamentos (A-setas, B), micronúcleo (C-seta), núcleo gigante (D-seta), apoptose (E-seta), morte celular precedida por multinucleação (F), fuso tripolar (G-seta), *lagging* cromossômico (H-seta) e ponte cromossômica (I). Barra de escala, 10 µm.

Tabela 12. Índice mitótico, anormalidades nucleares e morte celular em células 3T3 tratadas com VPA

Tratamento		Índice Mitótico (%)			Mitose Anormal (%)			Núcleo Gigante (%)			Micronúcleo (%)			Índice Apoptótico (%)			MCPM (%)		
Tempo (h)	VPA (mM)	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	2,18	0,48	2,30	23,05	16,16	15,00	0,03	0,06	0,00	0,47	0,15	0,50	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	2,55	0,38	2,60	11,56	5,06	13,64	0,03	0,06	0,00	0,43	0,21	0,50	0,11	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	2,40	0,26	2,30	16,08	8,27	19,35	0,03	0,06	0,00	0,60	0,10	0,60	0,13	0,15	0,10	0,10	0,17	0,00
	1,0	1,78	0,58	1,70	12,21	16,33	5,88	0,05	0,05	0,05	0,43	0,21	0,50	0,10	0,10	0,10	0,03	0,06	0,00
2	zero	3,36	0,60	3,30	15,70	4,36	17,64	0,12	0,08	0,10	0,45	0,31	0,55	0,03	0,06	0,00	0,03	0,06	0,00
	0,05	2,52	0,76	2,65	10,10	5,40	10,00	0,10	0,10	0,10	0,53	0,25	0,50	0,05	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,5	2,50	0,36	2,40	11,69	5,62	8,57	0,07	0,11	0,00	0,35	0,13	0,40	0,50	0,11	0,00	0,07	0,11	0,00
	1,0	1,73	0,61	1,60	8,52	10,32	5,55	0,02	0,03	0,00	0,62	0,25	0,50	0,08	0,08	0,10	0,00	0,00	0,00
4	zero	4,82	1,06	4,50	19,75	3,21	19,51	0,00	0,00	0,00	0,48	0,22	0,50	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,05	4,78	0,18	4,80	13,73	6,91	16,00	0,08	0,03	0,10	0,55	0,31	0,45	0,03	0,06	0,00	0,03	0,06	0,00
	0,5	4,68	1,18	5,10	20,12	8,90	16,28	0,20	0,13	0,15	0,38	0,08	0,40	0,02	0,03	0,00	0,02	0,03	0,00
	1,0	3,58	0,35	3,60	18,35	1,13	18,75	0,00	0,00	0,00	0,58	0,27	0,45	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
24	zero	2,50	0,56	2,40	8,82	15,28	—	0,00	0,00	0,00	0,78	0,36	0,60	0,35	0,05	0,35	0,00	0,00	0,00
	0,05	2,27	0,57	2,10	21,54	14,04	16,00	0,10	0,00	0,10	1,18	0,19	1,10	0,20	0,10	0,20	0,13	0,15	0,10
	0,5	2,57	0,90	2,10	18,15	7,88	16,67	0,00	0,00	0,00	1,78	0,45	1,60	0,28	0,20	0,25	0,02	0,03	0,00
	1,0	2,10	0,56	2,20	27,78	11,11	27,78	0,05	0,05	0,05	2,48	0,19	2,40	0,40	0,20	0,40	0,33	0,24	0,44

MCPM, morte celular precedida por multinucleação; Md, mediana; S, desvio padrão; VPA, ácido valproico; X, média aritmética; n = 2000 por condição experimental; n° de lamínulas por condição experimental = 3.

Tabela 13. Índice mitótico, anormalidades nucleares e morte celular em células 3T3 tratadas com TSA

Tratamento		Índice Mitótico (%)			Mitose Anormal (%)			Núcleo Gigante (%)			Micronúcleo (%)			Índice Apoptótico (%)			MCPM (%)		
Tempo (h)	TSA (ng/mL)	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md
1	zero	2,18	0,48	2,30	23,05	16,16	15,00	0,03	0,06	0,00	0,47	0,15	0,50	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	3,10	1,10	3,30	14,69	0,99	14,81	0,05	0,07	0,10	0,52	0,10	0,55	0,03	0,06	0,00	0,10	0,10	0,10
	20	2,05	0,15	2,05	11,25	4,72	9,09	0,05	0,09	0,00	0,70	0,30	0,70	0,03	0,06	0,00	0,07	0,06	0,10
	100	2,18	0,91	2,35	13,80	14,92	11,76	0,02	0,03	0,00	0,68	0,30	0,65	0,10	0,00	0,10	0,07	0,06	0,10
2	zero	3,36	0,60	3,30	15,70	4,36	17,64	0,12	0,08	0,10	0,45	0,31	0,55	0,03	0,06	0,00	0,03	0,06	0,00
	10	3,07	1,40	2,60	18,21	6,10	20,00	0,07	0,06	0,10	0,57	0,11	0,50	0,10	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
	20	3,65	1,62	4,10	17,68	6,94	20,00	0,07	0,12	0,13	0,43	0,11	0,50	0,12	0,08	0,10	0,00	0,00	0,00
	100	3,20	1,30	2,90	13,29	1,82	12,50	0,02	0,03	0,00	0,35	0,09	0,30	0,17	0,11	0,10	0,07	0,11	0,00
4	zero	4,82	1,06	4,50	19,75	3,21	19,51	0,00	0,00	0,00	0,48	0,22	0,50	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	4,03	0,58	3,70	8,32	7,24	11,76	0,03	0,06	0,00	0,53	0,23	0,40	0,20	0,00	0,20	0,07	0,11	0,00
	20	4,95	0,92	4,90	16,54	2,46	16,98	0,07	0,06	0,10	0,65	0,22	0,75	0,05	0,09	0,00	0,03	0,06	0,00
	100	3,40	0,85	3,50	10,33	10,24	10,52	0,02	0,03	0,00	0,38	0,24	0,30	0,05	0,09	0,00	0,03	0,06	0,00
24	zero	2,50	0,56	2,40	8,82	15,28	—	0,00	0,00	0,00	0,78	0,36	0,60	0,35	0,05	0,35	0,00	0,00	0,00
	10	2,32	0,62	2,35	11,77	10,21	17,14	0,03	0,06	0,00	1,50	0,17	1,60	0,47	0,15	0,50	0,08	0,10	0,05
	20	2,80	0,75	2,70	22,71	14,90	24,14	0,03	0,06	0,00	0,95	0,13	0,90	0,23	0,21	0,30	0,10	0,10	0,10
	100	2,93	0,81	2,80	14,69	3,33	13,04	0,03	0,06	0,00	2,00	0,40	2,00	0,32	0,26	0,25	0,05	0,05	0,05

MCPM, morte celular precedida por multinucleação; Md, mediana; S, desvio padrão; TSA, trichostatina A; X, média aritmética; n = 2000 por condição experimental; n° de lâminulas por condição experimental = 3

Atividade de HDACs e acetilação de histonas H3

O ensaio enzimático para HDACs revelou diminuição significativa na atividade dessas enzimas em relação ao controle com o tratamento por VPA nas concentrações de 0,5 e 1,0 mM por 1 h e nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1,0 mM por 2 h e 24 h (Fig. 24). Da mesma forma, houve diminuição significativa de atividade de HDACs para células tratadas em todas as concentrações de TSA por 1 e 2 h e tratadas com 10 e 100 ng/mL de TSA por 24 h, em relação ao controle não tratado (Fig. 25).

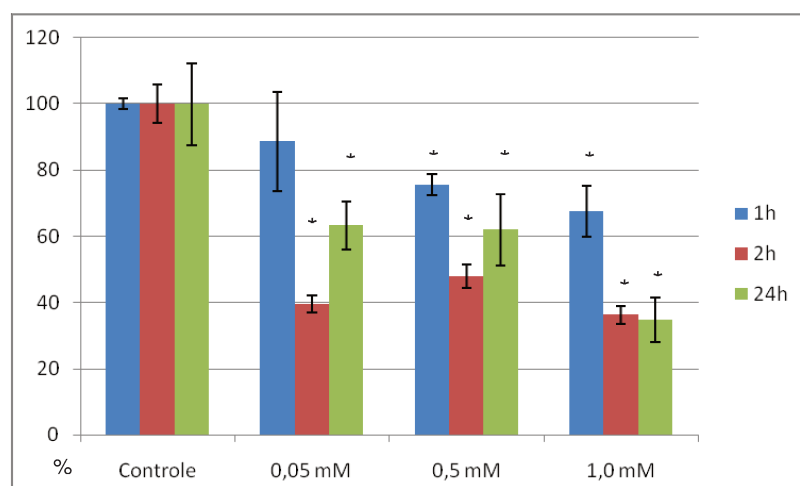


Fig. 24. Atividade relativa de HDACs em células 3T3 tratadas com VPA. * = Diferenças significativas em relação ao controle não tratado ao nível P 0,05 (Mann-Whitney)

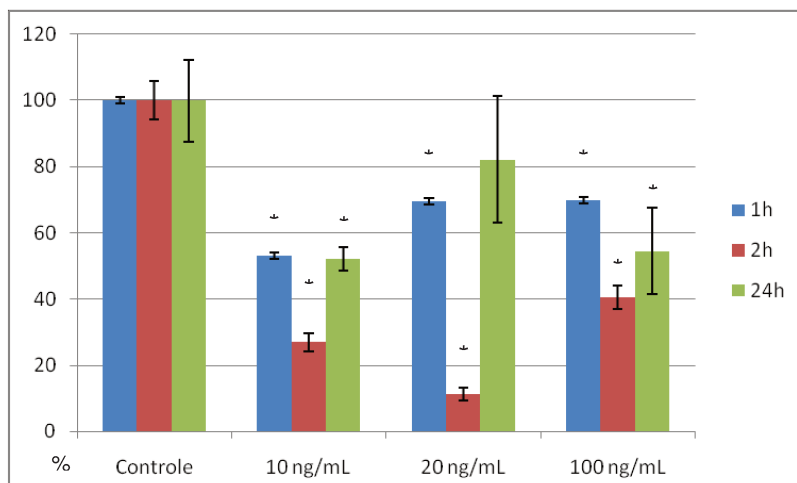


Fig 25. Atividade relativa de HDACs em células 3T3 tratadas com TSA. * = Diferenças significativas em relação ao controle não tratado ao nível de P 0,05 (Mann-Whitney)

Western blots para histona H3 acetilada, tendo como controle de carga histona H4 (Dovey et al. 2010) (Fig. 26 A), permitiram constatar geralmente aumento na acetilação de H3 em células tratadas com todas as concentrações de VPA e TSA (Fig. 26 B).

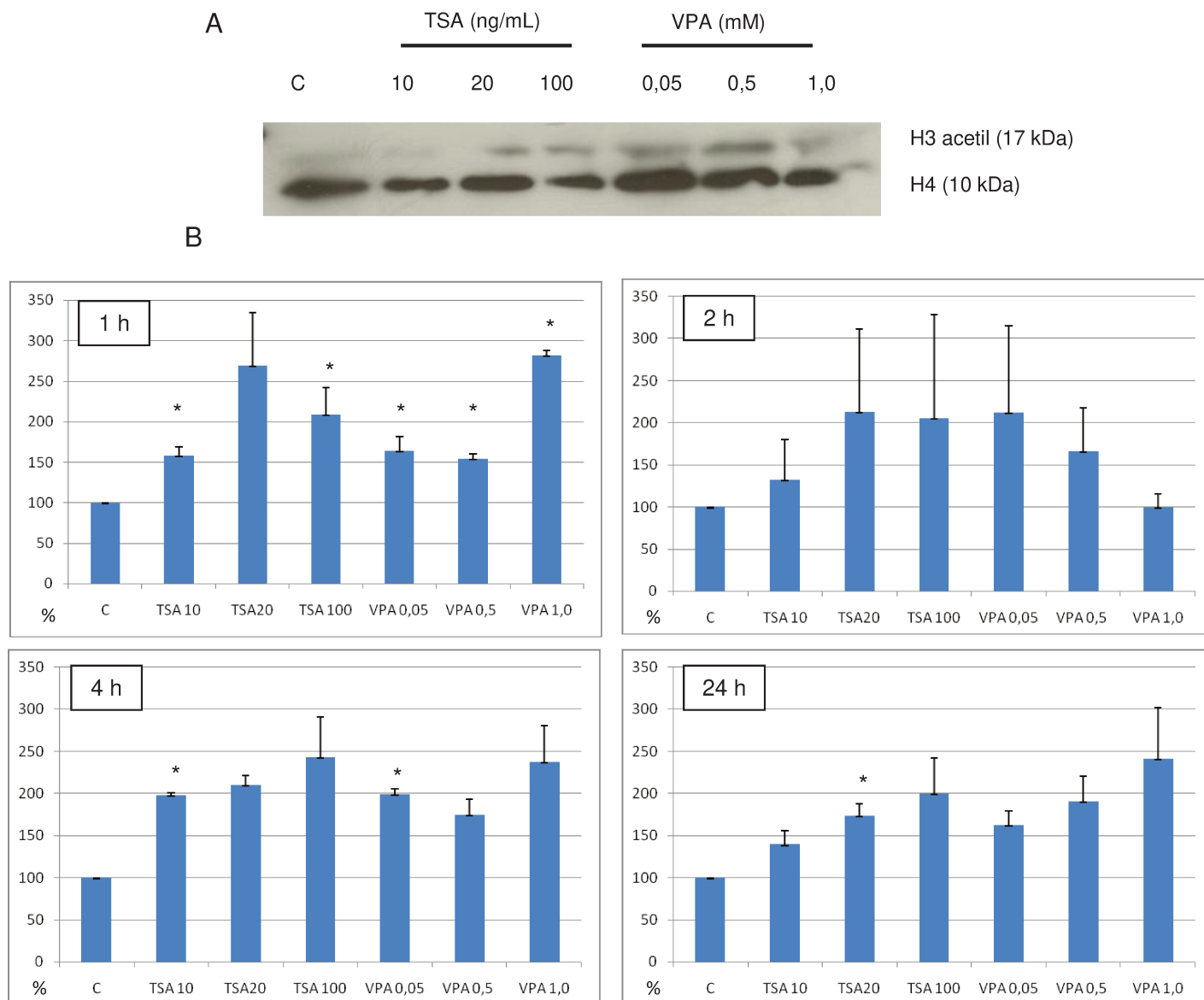


Fig. 26. Acetilação de histona H3 em células tratadas com TSA e VPA. A. Exemplo de Western blot tendo como controle de carga histona H4. B. Acetilação relativa da histona H3 em comparação ao controle (C). As concentrações de TSA e VPA acham-se indicadas. * = Diferenças significativas em relação ao C ao nível de $P_{0,05}$ (Mann-Whitney)

Discussão

Os presentes resultados indicam que à semelhança do que acontece em células HeLa (Felisbino et al. 2011), nas células NIH 3T3 o VPA induz descondensação cromatínica, estimada quanto a alterações em sua supraorganização após estudo por análise de imagem. A descondensação cromatínica verificada mostrou não ser um efeito seletivo ou direto do VPA, por acontecer também sob a ação da TSA (Marchion et al. 2005, Felisbino et al. 2011). A citometria por análise de imagem tem possibilitado inúmeras constatações de remodelação cromatínica em vários tipos celulares sob diferentes condições fisiológicas e patológicas (Vidal 1984, Mello & Russo 1990, Mello et al. 1992, 1995, Vidal et al. 1998, Moraes et al. 2005, 2007, Tóth et al. 2004, Felisbino et al. 2011, entre muitos).

As alterações texturais da cromatina, nas presentes condições testadas, aconteceram em simultaneidade com a inibição de HDAC e hiperacetilação de histonas H3, conhecida em células HeLa por relatos prévios (Eyal et al. 2004, Tóth et al. 2004) e em células NIH 3T3 por resultados obtidos neste trabalho. O mesmo fenômeno foi observado quando a TSA foi usada como inibidor de HDAC, estando de acordo com dados da literatura para células 3T3 (Catania et al. 2006).

Há relatos de que o VPA, além de causar hiperacetilação de histonas, possa induzir demetilação de DNA em genes específicos, fato reconhecido em células HEK293 (Detich et al. 2003, Milutinovic et al. 2007), porém não em linhagens celulares linfoblastóides FXS (síndrome do cromossomo X frágil) (Tabolacci et al. 2008) e de

embriões de camundongos (Tung & Winn 2010). A inibição de HDAC por VPA e TSA tem sido também relacionada com indução de metilação de histonas em astrócitos e neurônios corticais de ratos com aumento de di- e trimetilação de H3K4 (Marinova et al. 2011) e em embriões de camundongos com aumento de H3K4me e diminuição de H3K9me (Tung & Winn 2010). Essas alterações epigenéticas sabidamente promovem descompactação cromatínica, podendo estar contribuindo para a remodelação cromatínica observada em nosso modelos. Porém, como não foram investigadas nenhuma dessas modificações no presente trabalho, não podemos afirmar sobre a sua participação nas alterações texturais cromatínicas determinadas nas células NIH 3T3.

Por outro lado, foi possível verificar em células NIH 3T3 que o fenômeno de descompactação da cromatina também afeta áreas de heterocromatina. Achados semelhantes foram verificados sob ação de TSA em outro tipo celular, com extensa área heterocromática, como é o caso de células poliplóides de Triatoma infestans (Alvarenga 2011). As áreas heterocromáticas dos cromocentros de células somáticas de camundongo, como acontece nas células 3T3, são contribuídas pelas regiões centroméricas de todos os cromossomos, à exceção do cromossomo Y (Hsu et al. 1971, Prusov & Zatsepina 2002) e apresentam DNA rico em AT (Cerdeira et al. 1999). Nas células 3T3 o número de cromocentros varia de 7 a 37 (Cerdeira et al. 1999). As áreas heterocromáticas dos cromocentros de células de Triatoma infestans são contribuídas pelos três maiores pares de autossomos e pelos cromossomos sexuais (Schreiber et al. 1972). Também neste caso os cromocentros (um ou vários) contêm DNA rico em bases AT (Alvarenga et al. 2011). Dessa forma, parece interessante ter sido comprovado que

áreas heterocromáticas em grande parte não codificadoras e contendo DNA rico em AT nesses materiais possam se descompactar sob a ação de inibidores de HDAC. Em fibroblastos deficientes em laminas A e C, que apresentam condensação de territórios cromossômicos e reorganização da heterocromatina centromérica, foi também relatado que a TSA promove descondensação desses territórios e redução no conteúdo de heterocromatina (Galiova et al. 2008).

Mais do que se atribuir a descompactação de áreas heterocromáticas unicamente a uma atividade de inibição de deacetilases de histonas é, no entanto, para ser considerado aqui. Tanto o VPA quanto a TSA poderiam ter induzido redução na expressão de proteínas que regulam ou mantêm a estrutura das áreas heterocromáticas das células NIH 3T3, como proposto por Marchion et al. (2005) para células MCF-7. Entre essas proteínas estariam as SMC (proteínas não-histônicas envolvidas na estrutura da cromatina), a DNA metiltransferase I e a HP1 (Marchion et al. 2005, Zhou et al. 2007). Assim, embora a acetilação e a deacetilação de histonas sejam cruciais na regulação da expressão gênica, alterações dinâmicas na expressão gênica podem afetar a estrutura da cromatina e a interação desta com fatores regulatórios (Marchion et al. 2005, Galiova et al. 2008 - dentre muitos).

Não houve alteração significativa na frequências de morte celular e de anomalias cromossômicas em células 3T3 tratadas com VPA e TSA em relação ao controle não tratado. No que se refere ao achado de que índices mitóticos não apareceram afetados com o tratamento por VPA e TSA, possivelmente tempos mais longos de tratamento ou concentrações mais elevadas das drogas fossem requeridos para constatação dessas

alterações (Elknerova et al. 2011). Tal suposição encontra suporte em recentes achados de que a inibição de proliferação celular em células HeLa requer tratamento com VPA 5,0 mM por 48 h (Felisbino et al. 2011).

O aumento do parâmetro S_T na maioria das células tratadas por VPA e TSA em relação ao controle não tratado contribui para os achados de descompactação cromatínica, uma vez que essa alteração textural é normalmente acompanhada de aumento da área nuclear. O aumento na frequência de núcleos contidos na classe Feulgen-DNA subdiploide, ou mesmo de valores menores nas classes 2 C e 4 C, sem ser acompanhado por aumento de índice apoptótico, provavelmente se deva a uma solubilização mais acelerada do ácido apurínico durante a hidrólise ácida da reação de Feulgen, facilitada pela descompactação cromatínica induzida principalmente pela TSA. Este fenômeno, embora de modo mais pronunciado, foi igualmente reportado para as células HeLa tratadas por VPA (Felisbino et al. 2011) e não significa decréscimo em proliferação celular, pois não se detectou alteração em índices mitóticos com os tratamentos utilizados seja por VPA seja por TSA.

Agradecimentos

Agradecemos à Profa. Dra. Maria Cristina C. Gomes Marcondes e à Profa. Dra. Liana Verinaud, por permitir a utilização dos equipamentos Fusion™ e leitora de absorbância de microplaca VersaMax™, respectivamente, de seus laboratórios (Departamento de

Genética, Evolução e Bioagentes e Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Unicamp). À Sra. Ana Lúcia Soledade, pela assistência técnica na cultura celular e a Camila Dias Lourenço dos Santos, pela assistência na utilização do microespectrofotômetro de varredura.

Referências

- Alvarenga EM. Territórios heterocromáticos em *Triatoma infestans* Klug e *Panstrongylus megistus* (Burmeister): composição, identificação de marcadores epigenéticos e resposta a inibidores de deacetilases de histonas. Dissert. Mestrado Unicamp, 2011.
- Alvarenga EM, Mondin M, Martins JA, Rodrigues VLCC, Vidal BC, Rincones J, Carazzolle M, Andrade LM, Mello MLS. Spatial distribution of AT- and GC-rich DNA within interphase cell nuclei of *Triatoma infestans* Klug. *Micron* 42: 568-78, 2011.
- Catania A, Lavarone C, Carlomagno SM, Chiariello M. Selective transcription and cellular proliferation induced by PDGF require histone deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 544-54, 2006.
- Cerda MC, Berrios S, Fernandez-Donoso R, Garcyna S, Redi C. Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells. *Biol Cell* 91: 55-65, 1999.
- 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* 89: 271-7, 1986.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278: 27586–92, 2003.
- Dovey, OM; Foster, CT; Cowley, SM. Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *PNAS* 107: 8242-47, 2010.

- Elknerova K, Myslivcova D, Lacinova Z, Marinov I, Uherkova L, Stöckbauer P. Epigenetic modulation of gene expression of human leukemia cell lines - induction of cell death and senescence. *Neoplasma* 58: 35-44, 2011.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of anti-epileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737-44, 2004.
- Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One*. 6(12):e29144, 2011.
- Frazee LA, Foraker KC. Use of intravenous valproic acid for acute migraine. *Ann Pharmacother* 42: 403-7, 2008.
- Galiova G, Bartova E, Raska I, Krejci J, Kozubek S. Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Eur J Cell Biol* 87: 291-303, 2008.
- Gavin D, Kartan S, Chase K, Jayaraman S, Sharma RP. Histone deacetylase inhibitors and candidate gene expression: An in vivo and in vitro approach to studying chromatin remodeling in a clinical population. *Psych Res* 43: 870–6, 2009.
- 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: 6969-78, 2001.
- Hsu TC, Cooper JEK, Mace ML, Brinkley BR. Arrangement of centromeres in mouse cells. *Chromosoma* 34: 73-87, 1971.
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M. Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* 409: 581–9, 2008.

- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nuñez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16: 3 –11, 2009.
- Kurien BT, Scofield RH. Western Blotting. *Methods* 38: 283 – 93, 2006.
- Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 279: 18851-60, 2004.
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 59: 3815-22, 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: 1109–15, 2011.
- Mello MLS. Cytochemistry of DNA, RNA, and nuclear proteins. *Braz J Genet* 20: 257-64, 1997.
- Mello MLS, Russo J. Image analysis of Feulgen-stained c-H-*ras*-transformed NIH/3T3 cells. *Biochem Cell Biol* 68: 1026-31, 1990.
- Mello MLS, Vidal BC. A reação de Feulgen. *Ciênc Cult* 30: 665-76, 1978.
- Mello MLS, Vidal BC, Golembieski W, Russo J. Image analysis of Feulgen-stained NIH/3T3 cells transformed with DNA of 4-nitroquinoline 1-oxide treated human breast epithelial cells. *Biochem Cell Biol* 70: 109-16, 1992.
- Mello MLS, Contente S, Vidal BC, Planding W, Schenck U. Modulation of *ras* transformation affecting chromatin supra-organization as assessed by image analysis. *Exptl Cell Res* 220: 374-82, 1995.

- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28: 560–71, 2007.
- Moraes AS, Guaraldo AM, Mello MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. *Cytometry Part A* 71: 28-37, 2007.
- Moraes AS, Vidal BC, Guaraldo AM, Mello MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes following starvation and refeeding. *Cytometry Part A* 63: 94-107, 2005.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogene. *J Biol Chem* 276: 36734-41, 2001.
- Prusov AN, Zatsepina OV. Isolation of the chromocenter fraction from mouse liver nuclei. *Biochem (Moscow)* 67: 423-31, 2002.
- Qiao L, Schaack J, Shao J. Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Endocrinology* 147: 865-74, 2006.
- Rao J, Bhattacharya D, Banerjee B, Sarin A, Shivashankar GV Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 263-8, 2007.
- Roy S, Shor AC, Bagui TK, Seto E, Pledger WJ. Histone deacetylase 5 represses the transcription of cyclin D3. *J Cell Biochem* 104: 2143-54, 2008.
- Schreiber G, Bogliolo AR, Pinto AC. Cytogenetics of Triatominae: caryotype, DNA content, nuclear size and heteroropyknosis of autosomes. *Braz J Biol* 32: 255-63, 1972.

- Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin AF, Westendorf JJ. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics* 8: 2164-8, 2007.
- Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, Chiurazzi P, Neri G. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics* 18: 738–41, 2008.
- Tóth K F, Knoch T A, Wachsmuth M, Frank-Stöhr M, Stöhr M, Bacher CP, Müller G, Rippe K. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117: 4277-87, 2004.
- Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 201–9, 2010.
- Vidal BC. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. *Biol Cell* 50: 137-46, 1984.
- Vidal BC, Russo J, Mello MLS. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. *Exptl Cell Res* 244: 77-82, 1998.
- Zhou Q, Atadja P, Davidson NE. Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. *Cancer Biol Ther* 6: 64-9, 2007.

Conclusões

- Por meio de procedimentos de análise de imagem, foi possível detectar remodelação cromatínica (descompactação) em células tratadas com VPA nas concentrações de 0,05, 0,5 e 1,0 mM (HeLa e NIH 3T3) e TSA nas concentrações de 10, 20 e 100 ng/mL (NIH 3T3) nos tempos de 1, 2, 4 e 24 h.
- Nas condições de tratamento não se constatou citotoxicidade por VPA ou TSA nas células NIH 3T3 com o ensaio MTT. Para as células HeLa isso já havia sido relatado na literatura.
- O aumento do número de núcleos com conteúdo Feulgen-DNA de classe subdiploide em células HeLa sob tratamento com VPA, por não ser acompanhado por aumento em morte celular, provavelmente indique um aumento na solubilização do ácido apurínico durante a de hidrólise ácida da reação de Feulgen. Essa solubilização seria devida a uma diminuição na resistência do DNA ao processo de hidrólise em função da descondensação cromatínica promovida pelo HDACi.
- A diminuição significativa no índice mitótico de células HeLa observado apenas com um tratamento com VPA 5,0 mM por 48 h indica que períodos relativamente longos de tratamento e/ou maiores doses dessa droga sejam requeridos para redução na proliferação celular em dessas células
- A fragmentação de DNA, identificada como resposta positiva ao ensaio TUNEL nas células HeLa, foi aumentada apenas a partir de 24 h de tratamento com VPA e a partir de 4 h com TSA nas concentrações testadas. Por outro lado, nenhum

efeito foi verificado na frequência de morte celular, determinada morfológicamente em preparações coradas por Feulgen nessas células ou nas células NIH 3T3. Uma exposição por maiores tempos e/ou em concentrações mais elevadas de VPA possivelmente seja requerida para que as células Hela tenham a sua via de fragmentação do DNA seguida por condensação cromatínica e liberação de corpos apoptóticos.

- As mudanças texturais cromatínicas são acompanhadas por diminuição na atividade de HDAC e aumento na acetilação de histonas H3 em células NIH 3T3. O mesmo já havia sido relatado na literatura para as células HeLa.
- Nas células NIH 3T3 o fenômeno de descompactação da cromatina pelo VPA e pela TSA atinge também áreas heterocromáticas.

Referências

- Akilov OE & Geskin L. Therapeutic advances in cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Therapy Lett* 16:1-5, 2011.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. DNA, chromosomes and genomes. In: *Molecular biology of cell* 5th ed. Garland science, Taylor & Francis Group. Nova York, 2008.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *PNAS*, Washington 51: 786-94, 1964.
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML. A Brief History of Epigenetics. In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nova York, 2007a.
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML. Overview and Concepts. In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nova York, 2007b.
- Allis CD & Muir TW. Spreading chromatin into chemical biology. *ChemBioChem*, 12: 264-79, 2011.
- Ances BM, Letendre SL, Alexander T, Ellis RJ. Role of psychiatric medications as adjunct therapy in the treatment of HIV associated neurocognitive disorders. *Int Rev Psychiatry* 20: 89-93, 2008.
- Ballif BA, Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ* 12: 397–408, 2001.
- Banaszynski LA, Allis CD, Lewis PW. Histone variants in metazoan development. *Dev Cell* 19: 662-74, 2010.

- Berger SL. Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12: 142-8, 2002.
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120: 169-81, 2005.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Rev Drug Discov* 5: 769-84, 2006.
- Bonner J, Huang RC, Gilden RY. Chromosomally directed protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 50: 893-900, 1963.
- Boyarchuk E, Oca RM, Almouzni G. Cell cycle dynamics of histone variants at the centromere, a model for chromosomal landmarks. *Curr Opin in Cell Biol* 23: 266-76, 2011.
- Burgess RJ, Zhang Z. Histones, histone chaperones and nucleosome assembly. *Protein Cell* 1: 607-12, 2010.
- Catania A, Iavarone C, Carlomagno SM, Chiariello M. Selective transcription and cellular proliferation induced by PDGF require histone deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Comm* 343: 544-54, 2006.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* pii 479364, 2010.
- Chen J, Ghazawi FM, Bakkar W, Li Q. Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B. *Mol Cancer* 5: 71, 2006.
- Clark RJ, Felsenfeld G. Structure of chromatin. *Nat New Biol* 229: 101-6, 1971.

- Clarkson A, Choonara I. Surveillance for fatal suspected adverse drug reactions in the UK. *Arch Dis Child* 87: 462-6, 2002.
- Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* 65: 1023-31, 1991.
- Eikel D, Lampen A, Nau H. Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. *Chem Res Toxicol* 19: 272-8, 2006.
- Elgin SCR, Weintraub H. Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann Rev Biochem* 44: 725-74, 1975.
- Elgin SC, Grewal SI. Heterochromatin: silence is golden. *Curr Biol* 13: R895-8, 2003.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of anti-epileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737-44, 2004.
- Fagundes NS, Michalczechen-Lacerda VA, Caixeta ES, Machado GM, Rodrigues FC, Melo EO, Dode MA, Franco MM. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the GF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Mol Hum Reprod* 17: 85-91, 2011.
- Fedorova E, Zink D. Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim Biophys Acta* 1783: 2174–84, 2008.
- Finnegan DJ. Oogenesis: active heterochromatin. *Curr Biol* 21: R630-2, 2011.
- Frazee LA, Foraker KC. Use of intravenous valproic acid for acute migraine. *Ann Pharmacother* 42: 403-7, 2008.
- Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280: 125-33, 2009.

- Gardner KE, Allis CD, Strahl BD. OPERating ON Chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol* 409: 36–46, 2011.
- Gavin D, Kartan S, Chase K, Jayaraman S, Sharma RP. Histone deacetylase inhibitors and candidate gene expression: An in vivo and in vitro approach to studying chromatin remodeling in a clinical population. *Psych Res* 43: 870–6, 2009.
- Gilbert N, Boyle S, Fiegler H, Woodfine K, Carter NP, Bickmore WA. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118: 555-66, 2004.
- Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA. Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol* 242: 283-336, 2005.
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15–23, 2005.
- Goldberg AD, Allis DC, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128: 635-8, 2007.
- 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: 6969-78, 2001.
- Grewal SI, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301:798-802, 2003.
- Grewal ISS, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev* 8: 35-46, 2007.
- Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. Chromatin challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* 128: 721-33, 2007.

- Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science* 297: 2232-7, 2002.
- Han Y, Jeong HM, YH Jin YH, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, Lee KY . Acetylation of histone deacetylase 6 by p300 attenuates its deacetylase activity. *Bioch Biophys Res Comm* 383: 88–92, 2009.
- Hayakawa F, Abe A, Kitabayashi I, Pandolfi PP, Naoe T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediator apoptosis. *J Biol Chem* 283: 24420-25, 2008.
- Heitz, E. Das Heterochromatin der Moose. *I Jahrb Wiss Botanik* 69: 762–818, 1928 (in German).
- Henikoff, S. Heterochromatin function in complex genomes. *Biochim Biophys Acta* 1470: 1–8, 2000.
- Junttila, MR, Li, SP, Westermarck, J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22: 954–65, 2008.
- Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270: 24674-7, 1995.
- Kornberg RD. Structure of chromatin. *Ann Rev Biochem* 46: 931-54, 1977.
- Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184: 865-8, 1974.
- Kortenhorst MSQ, Isharwal S, van Diest P, Chowdury WH, Marlow C, Carducci MA, Rodriguez R, Veltri RW. Valproic acid causes dose- and time-dependent changes in nuclear structure in prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 8: 802-8, 2009.
- Kuo WN, Ivy D, Robinson MJ. N-nitrosation and denitrosation on lysine residues of histones. *Front Biosci* 9: 187-91, 2004.

- Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 279:18851-60, 2004.
- Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. Valproic acid: how it works. Or not. *Clin Neurosc Res* 4: 215-25, 2004.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Gen Rev* 8: 104-15, 2007.
- Latham JA, Dent SYR. Cross-regulation of histone modifications. *Nature Struct and Mol Biol* 14: 1017-24, 2007.
- Li XN, Shu Q, Su JMF, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Therap* 4: 1912-22, 2005.
- Lippman Z, Gendre AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430: 471-6, 2004.
- Litt MD, Simpson M, Gaszner M, Allis CD, Felsenfeld G. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science* 293: 2453-5, 2001.
- Liu PY, Chan JYH, Lin HC, Wang SL, Liu ST, Ho CL, Chang LC, Huang SM. Modulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{WAF1/Cip1} gene by Zac1 through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase 1 in HeLa cells. *Mol Cancer Res* 6: 1204-14, 2008.

- Lu BY, Emtage PC, Duyf BJ, Hilliker AJ, Eissenberg JC. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics* 155: 699–708, 2000.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389: 251-60, 1997.
- Marks, PA. Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* 26: 1351-6, 2007.
- Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1497–511, 2005.
- Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, Jenuwein T. The promise of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO* 24: 800-12, 2005.
- Mello MLS. Heterocromatina. *Ciênc Cult* 30: 290-303, 1978.
- Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 38–51, 2006.
- Noh EJ, Lim DS, Jeong G, Lee JS. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G₂/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 378 : 326-31, 2009.
- Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotech* 2011: 1-10, 2010.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogene. *J Biol Chem* 276: 36734-41, 2001.

- Polo SE, Almouzni G. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16: 104-11, 2006.
- Qiao L, Schaack J, Shao J. Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Endocrinology* 147: 865-74, 2006.
- Rao J, Bhattacharya D, Banerjee B, Sarin A, Shivashankar GV. Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 263-8, 2007.
- Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604-10, 1980.
- Ringrose L, Ehret H, Paro R. Distinct contributions of histone H3 lysine 9 and 27 methylation to locus-specific stability of polycomb complexes. *Mol Cell* 16: 641-53, 2004.
- Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert Opin Ther Targets* 9: 809–24, 2005.
- Roy S, Shor AC, Bagui TK, Seto E, Pledger WJ. Histone deacetylase 5 represses the transcription of cyclin D3. *J Cell Biochem* 104: 2143-54, 2008.
- Sami S, Höti N, Xu HM, Shen Z, Huang X. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *J Biochem* 144: 357-62, 2008.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor T, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419: 407-11, 2002.
- Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin AF, Westendorf JJ. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics* 8: 2164-8, 2007.

- Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiter JP, Lijst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I. Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inher Metab Dis* 31: 205-16, 2008.
- Sharma D, Blue J, Yang XW, Beaulieu N, Macleod AR, Davidson NE. Release of methyl CpG binding proteins and histone deacetylase 1 from the estrogen receptor alpha (ER) promoter upon reactivation in ER-negative human breast cancer cells. *Mol Endocrin* 19: 1740-51, 2005.
- Shin HJ, Baek KH, Jeon AH, Kim SJ, Jang KL, Sung YC, Kim CM, Lee CW. Inhibition of histone deacetylase activity increases chromosomal instability by the aberrant regulation of mitotic checkpoint activation. *Oncogene* 22: 3853-58, 2003.
- Shinkai Y. Regulation and function of H3K9 methylation. *Subcell Biochem* 41: 337-50, 2007.
- Stedman E, Stedman E. Cell specificity of histones. *Nature* 166: 780-781, 1950.
- Stephan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL, Thompson LM. Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-43, 2001.
- Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD. Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci* 96: 14967-72, 1999.
- Strahl BD & Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-5, 2000.
- Takai N, Narahara H. Human endometrial and ovarian cancer cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity, potently induce cell cycle arrest, and stimulate apoptosis. *Curr Med Chem* 14: 2548-53, 2007.

- Tóth K F, Knoch T A, Wachsmuth M, Frank-Stöhr M, Stöhr M, Bacher CP, Müller G, Rippe K. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117: 4277-87, 2004.
- Urban MK, Franklin SG, Zweidler A. *Biochemistry* 18: 3952-60, 1979.
- Waddington, C.H. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20, 1942.
- Wallis JW, Hereford L, Grunstein M. Histone H2B genes of yeast encode two different proteins. *Cell* 22: 799-805, 1980.
- Wanczyk M, Roszczenko K, Marcinkiewicz K, Bojarczuk K, Kowara M, Winiarska M. HDACi--going through the mechanisms. *Front Biosci* 16:340-59, 2011.
- Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, Zhao K. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 138: 1019–31, 2009.
- Wu P, Tian Y, Chen G, Wang B, Gui L, Xi L, Ma X, Fang Y, Zhu T, Wang D, Meng L, Xu G, Wang S, Ma D, Zhou J. Ubiquitin B: an essential mediator of trichostatin A-induced tumor-selective killing in human cancer cells. *Cell Death Diff* 17: 109-18, 2010.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26: 5541–52, 2007.
- Yang PK, Kuroda MI. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128: 777-86, 2007.
- Yasuhara JC, Wakimoto BT. Oxymoron no more: the expanding world of heterochromatic genes. *Trends Genet* 22: 330–8, 2006.
- Yoshida M, Horinouchi S. Trichostatin and leptomycin inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* 886: 23-6, 1999.

- DCYoshikawa M, Hishikawa K, Idei M, Fujita T. Trichostatin a prevents TGF- β 1-induced apoptosis by inhibiting ERK activation in human renal tubular epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 642: 28–36, 2010.
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 128: 763-76, 2007.
- Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 44: 14-27, 2012.
- Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15: 2343-60, 2001.
- Zhang Y, Yu G, Wang D, Hu Y, Lei W. ERK1/2 activation plays important roles in the opposite effects of Trichostatin A in non-cancer and cancer cells. *Toxicon* 57: 932–7, 2011.
- Zilberman D, Henikoff S. Epigenetic inheritance in *Arabidopsis*: selective silence. *Curr Op Genetics Dev* 15: 557-62, 2005.