



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GIOVANA MARIA BRED A VERONEZI

**A METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HELA APÓS TRATAMENTO COM O
ÁCIDO VALPROICO**

**THE DNA METHYLATION IN HELA CELLS AFTER VALPROIC ACID
TREATMENT**

CAMPINAS

2017

GIOVANA MARIA BRED A VERONEZI

**A METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS HELA APÓS TRATAMENTO COM O
ÁCIDO VALPROICO**

**THE DNA METHYLATION IN HELA CELLS AFTER VALPROIC ACID
TREATMENT**

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

Dissertation presented to the Institute of
Biology of the University of Campinas
in partial fulfillment of the requirements
for the degree of Master, in the area of
Cell Biology

Supervisora/Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello
Co-supervisor/Coorientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
GIOVANA MARIA BRED A VERONEZI E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

CAMPINAS

2017

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

V599m Veronezi, Giovana Maria Breda, 1993-
A metilação de DNA em células HeLa após tratamento com o ácido valproico / Giovana Maria Breda Veronezi. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

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

1. Células HeLa. 2. Ácido valproico. 3. Cromatina. 4. Epigenética. 5. Metilação de DNA. I. Mello, Maria Luiza Silveira, 1943-. II. Vidal, Benedicto de Campos, 1930-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The DNA methylation in HeLa cells after valproic acid treatment

Palavras-chave em inglês:

HeLa cells

Valproic acid

Chromatin

Epigenetics

DNA methylation

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Alberto da Silva Moraes

Daniel Pacheco Bruschi

Data de defesa: 24-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 24 de fevereiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

A Ata de Defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora acima se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.” — Marie Curie

Dedicatória

Dedico este trabalho à memória de minha querida avó Maria Nélia do Prado, de quem guardo comigo o amor e ensinamentos que jamais serão esquecidos.

Agradecimentos

Agradeço a meus pais por sempre apoiarem os caminhos que escolho para serem trilhados e por nunca me permitirem recuar. Vocês são meu exemplo e incentivo a ir cada vez mais longe.

À minha grande e sempre presente família: irmã, primos, tios, padrinho, madrinha e avós, que vibram e comemoram a cada nova conquista como se fossem sua própria, e de fato são, pois em mim há muito de todos vocês.

Ao meu namorado Márcio por tantos anos de companheirismo, por estar comigo tanto nos momentos bons quanto naqueles mais difíceis e por ser meu porto-seguro.

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, minha orientadora, por ter me recebido ainda quando graduanda em seu laboratório e ter possibilitado esta experiência de crescimento não apenas profissional mas também pessoal, alimentando mais ainda meu interesse pela ciência.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, meu co-orientador, por aceitar participar deste projeto trazendo contribuições ímpares e por me apresentar um novo e belo mundo no campo da pesquisa do DNA.

À Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, por disponibilizar o espaço de cultura de células em seu laboratório e pelos sábios conselhos e ensinamentos.

À Dra. Marina Barreto Felisbino, pela amizade construída ao longo dos anos de laboratório e seu importante papel na condução deste projeto e em minha formação.

A todos os professores e centros de pesquisa que permitiram o uso de equipamentos, reagentes e realização de experimentos: Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro, Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel, Prof. Dr. Edson Pimentel, Prof. Dr. Mateus Mondin, Profa. Dra. Liana Verinaud, Prof. Dr. Hernandes Carvalho e o Centro de Pesquisa em Obesidades e Comorbidades. Sem suas contribuições, a completa execução deste trabalho não seria possível.

Aos amigos com quem tenho o privilégio de conviver diariamente no laboratório ou fora dele, compartilhando inúmeras experiências, e também àqueles com quem os encontros são menos frequentes mas sempre especiais e recheados de reflexões sobre a vida, ciência e futuro: Maria Eugênia Camargo, Marina Amorim, Carlos Imperador, Camila Borges, Ana Lúcia Soledade, Jéssica Bertol, Bárbara Mota, Laura Dias, Paula Delatti, Aline Mika, Marina Fontoura, Tháles Pereira, Gustavo Davanzo e Rafaela Ribeiro. Em especial ao Eli Heber dos

Anjos pelos valiosos ensinamentos em química, além de ótimas conversas, e ao Thiago Alves da Costa por ser sempre tão prestativo.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Biologia da Unicamp, equipe de segurança e limpeza, sempre muito gentis e que compõem a base fundamental para o funcionamento dos diversos setores como laboratórios, salas de aula, secretarias, biblioteca e departamentos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (2014/23842-0) e ao CNPq e FAEPEX, que contribuíram com auxílios financeiros para o laboratório.

Aos membros desta Banca de defesa do Mestrado, pelo aceite e disponibilidade de participar da avaliação do presente trabalho.

Resumo

O ácido valproico (VPA) é um antiepiléptico de uso bem estabelecido que também é reconhecido como inibidor de deacetilases de histonas (HDAC), induzindo hiperacetilação de histonas H3 e H4. Adicionalmente, tem sido sugerido papel do VPA na demetilação do DNA em diversos tipos celulares, possivelmente de maneira ativa e independente do processo de replicação. O presente trabalho estudou os efeitos do VPA sobre a abundância de 5-metilcitosina (5mC) e elementos das vias de demetilação do DNA em células HeLa, comparado à ação da droga de conhecida ação demetilante, 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-CdR). Foi também investigada a possível contribuição da ação demetiladora do DNA pelo VPA na remodelação da cromatina previamente atribuída à inibição de HDAC neste tipo celular, bem como os impactos de possíveis alterações induzidas pelo VPA nas marcas de 5mC sobre o perfil espectral do DNA ao infravermelho.

Em células tratadas com VPA e 5-aza-CdR, os níveis de metilação do DNA foram avaliados por imunocitoquímica e ELISA. Os derivados da citosina 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxilcitosina (5caC) e 5-formilcitosina (5fC) foram investigados por imunocitoquímica. Em paralelo, PCR quantitativo em tempo real foi realizado para acessar informações a respeito dos níveis de expressão gênica da DNA metiltransferase 1 (DNMT1) e de enzimas da família das *ten-eleven-translocation* (TET), TET1 e TET2, além de Western blotting para medir os níveis proteicos de DNMT1 e TET2. Ensaio ao microespectrofotômetro de varredura foram realizados a fim de constatar alterações na supraorganização cromatínica de células HeLa tratadas com VPA e perfis espectrais do DNA foram obtidos por microespectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).

Foi comprovada a indução de hipometilação do DNA pelo VPA em células HeLa, semelhante ao observado em tratamentos com a 5-aza-CdR. A redução nos níveis de 5mC concomitante a um efeito de descompactação cromatínica pelo VPA nestas células persistiram por 24 h na ausência da droga, porém não por 48 h, demonstrando papel da metilação de DNA em eventos de remodelação da cromatina, com efeitos de longa duração. A demetilação observada em resposta ao VPA também influenciou os perfis espectrais do DNA no infravermelho, afetando mais significativamente os picos relacionados a vibrações de estiramento simétrico e antissimétrico do grupamento metil da 5mC. Tanto os tratamentos com VPA quanto com a 5-aza-CdR não alteraram as marcas de 5caC e 5fC mas foram capazes de aumentar os níveis de 5hmC, enquanto as enzimas estudadas (DNMT1, TET1 e

TET2) apresentaram resposta diferencial a estas drogas. Foi assim reforçada a influência do VPA e da 5-aza-CdR sobre vias ativas de demetilação do DNA e demonstrado que estas drogas atuam por meio de mecanismos distintos.

Em conjunto, foi possível obter maiores informações a respeito da ação do VPA sobre a metilação de DNA em células HeLa, permitindo comparações dos efeitos desta droga sobre outras linhagens tumorais agressivas. Também foi possível estabelecer um paralelo entre a ação epigenética do VPA com a de outro composto, a 5-aza-CdR, e assim ter maior conhecimento dos mecanismos de ação destas drogas amplamente utilizadas.

Abstract

Valproic acid (VPA) is a well-established antiepileptic drug and also an inhibitor of histone deacetylases (HDAC), leading to hyperacetylation of histones H3 and H4. Moreover, VPA has been suggested to induce DNA demethylation in several cell types, possibly through an active and replication-independent way. In the present work, the effects of VPA over the 5-methylcytosine (5mC) abundance and active DNA demethylation elements were studied in HeLa cells, compared to 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR), a known DNA demethylator. In addition, the contribution of the VPA-induced DNA demethylation on the chromatin remodeling, previously attributed to HDAC inhibition, was investigated in this cell type. The effect of VPA on DNA 5mC marks was also studied analyzing DNA infrared spectral profiles.

In both VPA- and 5-aza-CdR treated cells, immunocytochemistry and ELISA techniques were used to evaluate DNA methylation levels. The cytosine derivatives 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), 5-carboxylcytosine (5caC) and 5-formylcytosine (5-fC) were investigated by immunocytochemistry. The gene expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and of enzymes of the ten-eleven translocation family (TET), TET1 and TET2 was assessed by quantitative real time PCR, and protein levels of DNMT1 and TET2 were obtained using Western blotting. Scanning microspectrophotometer assays allowed the analysis of changes in chromatin supraorganization of HeLa cells treated with VPA and spectral profiles of DNA were obtained by Fourier-transform infrared (FT-IR) microspectroscopy.

Induction of DNA hypomethylation was found to be induced by both VPA and 5-aza-CdR treatments. The reduction of 5mC levels concomitant to a chromatin decondensation status induced by VPA in these cells persisted for 24 h in the absence of the drug, although not for 48 h, demonstrating a role of DNA methylation on chromatin remodeling events, with long-standing effects. The demethylation observed in response to VPA also influenced the DNA infrared spectral profiles, affecting more significantly the peaks related to symmetric and antisymmetric stretching vibrations of the methyl group from 5mC. No changes in 5caC and 5fC were observed in VPA- or 5-aza-CdR treatments, although both drugs increased 5hmC levels and differentially affected the enzymes studied here (DNMT1, TET1 and TET2). Thereby, the influence of VPA and 5-aza-CdR on active DNA demethylation pathways was reinforced and it was demonstrated that these drugs act by different mechanisms.

Taken these results together, more information regarding the effects of VPA on DNA methylation in HeLa cells was obtained, allowing further comparisons between the effects of this drug on other tumor cell lines as aggressive as HeLa cells. Furthermore, a parallel was established between the epigenetic action of VPA and that of another compound, 5-aza-CdR, thus contributing with additional and new data on the mechanisms of action of these widely used drugs.

Lista de abreviaturas

5-aza-CR – 5-azacitidina

5-aza-CdR – 5-aza-2'-deoxicitidina

5caC – 5-carboxilcitosina

5fC – 5-formilcitosina

5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5hmU – 5-hidroxiuracil

5mC – 5-metilcitosina

v – frequência vibracional

AID – *activation-induced deaminase*

APOBEC – *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*

BER – reparo por excisão de base

CpG – citosina-fosfato-guanina

DNMT1 – DNA metiltransferase 1

DNMT – DNA metiltransferase

DNMT3A – DNA metiltransferase 3A

DNMT3B – DNA metiltransferase 3B

DNMT3L – *DNMT3-like*

FDA – *Food and Drug Administration*

FT-IR – *Fourier transform-infrared*

H3Ac – acetilação da histona H3

HAT – acetiltransferase de histona

HCC – carcinoma hepatocelular

HDAC – deacetilase de histona

HDACi – inibidor de deacetilase de histona

IR – infravermelho

MBD – *methyl binding domain*

MDS – síndrome mielodisplásica

NCP – partícula do *core* nucleossomal

NuRD – *nucleosome remodeling and histone deacetylase*

PTM – modificação pós-traducional

SAHA - *suberoylanilide hydroxamic acid*

SMUG1 – *single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1*

TSA – tricostatina A

TET – *ten-eleven translocation*

TET1 – *ten-eleven translocation 1*

TET2 – *ten-eleven translocation 2*

TET3 – *ten-eleven translocation 3*

TDG - *thymidine DNA glycosilase*

UHRF1 – *ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*

VPA – ácido valproico

Sumário

Introdução

1. Epigenética.....	16
<i>A cromatina, palco de atuação dos mecanismos epigenéticos.....</i>	<i>16</i>
<i>Modificações pós-traducionais de histonas.....</i>	<i>18</i>
<i>Metilação da citosina.....</i>	<i>20</i>
<i>Derivados oxidativos da 5mC e processos demetilantes.....</i>	<i>23</i>
2. Modulação das marcas epigenéticas.....	24
<i>Drogas desenvolvidas para funções epigenéticas.....</i>	<i>25</i>
<i>Drogas com potencial epigenético não descrito originalmente: o ácido valproico.....</i>	<i>27</i>
3. Evidências do VPA e outros HDACis como demetiladores do DNA.....	28
4. Células HeLa como modelo de estudo.....	30
Objetivos.....	32
Capítulo I.....	33
Capítulo II.....	48
Discussão geral.....	69
Conclusões gerais.....	72
Referências bibliográficas.....	73
Anexos.....	84

Introdução

1. Epigenética

Até meados da década de 40, estudos no campo da genética assumiam que alterações no genótipo desencadeariam mudanças correlatas no fenótipo sem, no entanto, se preocupar com os caminhos que interligam estes dois processos. Neste contexto surgiu pela primeira vez o termo epigenética, cunhado pelo embriologista e geneticista Conrad Waddington em 1942 para referir-se aos mecanismos pelos quais os genes trazem à tona efeitos fenotípicos (Waddington, 1942). Conforme a necessidade de se investigar e compreender tais mecanismos passou a ser reconhecida e evidências mostraram que fatores não genéticos podem influenciar no produto final de um locus gênico, foi definida uma nova área de conhecimento que segue até os dias atuais em contínua ascensão.

Ao longo dos anos, o conceito de epigenética passou por variadas definições até se atingir um consenso, estabelecido em 2008 no Cold Spring Harbor Laboratory, que afirma: “Um traço epigenético é um fenótipo herdável e estável resultante de mudanças em um cromossomo sem alterações na sequência de DNA” (Berger et al., 2009). Se o DNA contém a informação genética que determina a sequência de bases na molécula de RNA e, consequentemente, dos aminoácidos em uma proteína, a epigenética, a partir da modulação da cromatina, dirá quando, onde e a que nível os genes deverão ser acessados para que essa informação seja lida (Wang et al., 2004).

Diversos processos biológicos como a inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, formando o corpúsculo de Barr, e o silenciamento dos loci *maternal-type* em leveduras tem como base eventos epigenéticos (Eccleston et al., 2007). Estes também desempenham papel fundamental no desenvolvimento embrionário, além da diferenciação celular e tecidual (Cheung & Lau, 2005; Allis et al., 2007).

Atualmente, muito já se avançou na investigação dos mecanismos moleculares pelos quais a epigenética opera. Entre as principais alterações epigenéticas estão as modificações pós-traducionais (PTMs) de histonas e a metilação de DNA. Também desempenham papel importante os RNAs não codificantes e as histonas variantes. Todas estas marcas alteram, em conjunto, a supraorganização da cromatina.

A cromatina, palco de atuação dos mecanismos epigenéticos

No interior do núcleo, o DNA associa-se a proteínas histônicas e não-histônicas formando um complexo denominado cromatina. Uma antiga e vantajosa aquisição evolutiva, a interação DNA-proteínas desempenha um papel tanto estrutural, importante para o correto acondicionamento do DNA no interior do núcleo, quanto fisiológico, regulando o acesso de maquinarias celulares ao material genético e, com isso, controlando processos celulares fundamentais, como reparo do DNA, transcrição e tradução (Felsenfeld & Groudine, 2003; Budhavarapu et al., 2013; Venkatesh & Workman, 2015).

Um dos principais elementos constituintes da cromatina, as histonas são proteínas básicas com alta afinidade de ligação ao DNA. Altamente conservadas ao longo da evolução, possuem baixo peso molecular e podem ser classificadas de acordo com sua composição, sendo a histona H1 rica em lisina, H2 e H3 moderadamente ricas em lisina e H3 e H4 ricas em arginina. As histonas H2A, H2B, H3 e H4 compartilham um motivo estrutural composto por 3 alfa-hélices conectadas por 2 alças, além de caudas C- e N-terminais, que não apresentam estrutura secundária e são alvo de frequentes modificações químicas (Khorasanizadeh, 2004; Alberts et al., 2015). A partir de uma interação do tipo “aperto de mãos”, são formados heterodímeros entre H2A e H2B e entre H3 e H4. Por sua vez, o complexo H3-H4 forma um tetrâmero e, junto a dois dímeros H2A-H2B, resulta em um octâmero de histonas, estrutura crucial para a base da organização do DNA genômico (Arents et al., 1991).

Ao octâmero de histonas é associada uma quantidade definida de DNA formando unidades repetitivas que constituem o primeiro nível estrutural da cromatina, os nucleossomos. Aproximadamente 147 pares de base de DNA dão 1 e $\frac{3}{4}$ de volta a um octâmero de histonas, formando uma partícula do *core* nucleossomal (NCP). Estes são interligados por um DNA dito espaçador (~57 pares de base), ao qual associa-se uma histona H1 que promove uma maior aproximação entre as NCPs (Li & Zhu, 2015).

Inicialmente, acreditava-se que, uma vez posicionados, os nucleossomos seriam estáticos. No entanto, o DNA enovelado no cerne de histonas fica inacessível a maquinarias de transcrição, comprometendo o acesso apropriado à informação genética (Kornberg & Lorch, 1999). Assim, o modelo acima mostrou-se inadequado e foi derrubado à medida em que estudos cinéticos reportaram a perda de contato temporária, por 10 a 50 milissegundos, entre DNA e histonas, e pela descoberta de complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP, mostrando como a cromatina é um complexo altamente dinâmico (Sif, 2004; Cutter & Hayes, 2015). Tal dinâmica também é contribuída pela adição de grupamentos químicos sobre o DNA e histonas, que influenciam no modo como estes dois elementos se relacionam entre si e, conseqüentemente, no padrão de expressão gênica da célula.

Modificações pós-traducionais de histonas

As histonas podem receber modificações pós-traducionais em sítios específicos localizados predominantemente em suas caudas N- ou C- terminais e, menos recorrente, nos seus domínios globulares. Tais modificações ocasionam tanto alterações na interação histona-DNA quanto a atração de outras proteínas nucleares aos nucleossomos.

Estudos pioneiros de Allfrey et al. na década de 60 sugeriram pela primeira vez a relação entre uma PTM, a acetilação de histonas, e ativação da expressão gênica. A partir da resolução da estrutura do nucleossomo em 1997 e do entendimento de que as caudas de histonas protudem do *core* e promovem a interação entre nucleossomos adjacentes, o papel das PTMs na remodelação da cromatina pôde ser melhor elucidado. Hoje, entende-se que as modificações nas caudas de histonas influenciam as relações inter-nucleossomais e podem, assim, afetar a estrutura cromatínica como um todo (Luger et al., 1997; Bannister & Kouzarides, 2011).

Até o momento, pelo menos 15 PTMs já foram identificadas, sendo algumas delas a metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e glicosilação. Sobre as três primeiras residem uma ampla gama de estudos, tornando-as as mais bem caracterizadas (Sadakierska-Chudy & Filip, 2015).

A metilação de histonas ocorre em resíduos de lisina (K) e arginina (R) principalmente em H3 e H4. É mediada por metiltransferases de histonas que transferem o grupo metil de uma molécula doadora, a S-adenosil metionina ao sítio alvo. Trata-se de uma modificação estável, mas também reversível, e de maior complexidade, com mais de um grupamento metil podendo ser adicionado a um mesmo aminoácido. Lisinas podem ser mono-, di- ou trimetiladas e argininas podem ser mono- ou di-metiladas simétrica ou assimetricamente, sendo a localização e o grau de modificação determinantes dos efeitos da metilação sobre a atividade gênica (Ng et al., 2009; Greer & Shi, 2012).

Diferentemente da metilação, a acetilação e a fosforilação são modificações mais transientes. A fosforilação acontece em resíduos de serinas (S), treoninas (T) e tirosinas (Y) e a acetilação em lisinas das caudas N-terminais, mas sítios disponíveis na região do *core* globular também existem, em ambos os casos. Todas as PTMs são moduladas por enzimas específicas. O grupamento fosfato, na fosforilação, é adicionado por quinases a partir de uma molécula de ATP ao aminoácido alvo e, no sentido inverso, retirado por fosfatases. Já na acetilação, o grupo acetil é transferido de uma acetil-CoA por acetiltransferases de histonas

(HATs) e removido por enzimas denominadas deacetilases de histonas (HDACs) (Sadakierska-Chudy & Filip, 2015).

A família das HATs é muito diversa e se divide em HAT A, encontradas no núcleo, e HAT B, que se localizam no citoplasma. As HATs nucleares são ainda subdivididas baseadas nos domínios catalíticos que apresentam, sendo GNAT e MYST as principais subfamílias (Lee & Workman, 2007; Peserico & Simone, 2011). Em relação às HDACs, 18 tipos diferentes dessa proteína já foram encontrados em mamíferos, que são agrupados em 4 classes de acordo com a similaridade com as HDACs de leveduras, com as quais têm grande homologia. As chamadas HDAC clássicas, dependentes de Zn^{2+} , formam as classes I, II e IV, enquanto a classe III, composta por sete sirtuínas, é dependente de NAD^+ como cofator para sua atividade. A classe I, associada à RPD3 de leveduras, contém as HDACs 1, 2, 3 e 8. A classe II, semelhante à HDA1 de leveduras, é subdividida em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10), enquanto a classe IV inclui apenas a HDAC 11 e apresenta similaridades com as proteínas das classes I e II (Delcuve et al., 2012; Seto & Yoshida, 2014).

As diferentes PTMs podem influenciar na organização cromatínica e expressão gênica por dois mecanismos principais. O primeiro é resultado de uma perturbação estrutural direta pela modificação, como ocorre na acetilação e fosforilação, marcas que alteram a carga final da histona. A incorporação de radicais acetil, grupamentos carregados negativamente, neutraliza as cargas positivas da histona e, conseqüentemente, enfraquece a interação com o DNA nucleossomal. Isto resulta em um estado mais frouxo da cromatina, facilitando o acesso de maquinarias de transcrição aos promotores, estando tal marca relacionada a regiões transcricionalmente ativas. Semelhante à acetilação, a fosforilação também engloba a adição de cargas negativas à histona, mas, contra-intuitivamente ao que se esperaria, esta marca está relacionada à compactação da cromatina e repressão gênica (Bannister & Kouzarides, 2011).

Um segundo mecanismo de ação envolve o recrutamento, pelas PTMs, de diversas proteínas efetoras que apresentam domínios específicos de reconhecimento e ligação às diferentes modificações. A metilação de histonas é uma marca neutra que não altera a carga final da histona, mas que possui mais diversidade de domínios ligantes a ela do que qualquer outra modificação. Entre eles estão os *PHD fingers* e a família ‘real’ de domínios Tudor, que compreendem cromodomínios e os domínios Tudor, PWWP e MBT. Lisinas acetiladas são reconhecidas por bromodomínios e, mais recentemente descoberto, *PHD fingers*, enquanto domínios BRCT reconhecem a fosforilação (Bannister & Kouzarides, 2011; Verdin & Ott, 2015).

Apesar de descritas e estudadas inicialmente independentes umas das outras, as modificações pós-traducionais de histonas não ocorrem isoladas, sendo as caudas de histonas passíveis de receber diversas modificações ao mesmo tempo. Com isso, diferentes interações, ou *cross-talk*, podem acontecer, como a competição direta pelo mesmo resíduo de aminoácido (quando este pode receber mais de um tipo de modificação), a dependência de pré-existência de uma marca para outra ocorrer ou até mesmo a inibição da ligação de uma proteína efetora a um determinado sítio devido à presença de outra marcação adjacente (Fischle et al., 2003).

O grande número de PTMs e as possibilidades de *cross-talk* entre elas levaram à proposição por Strahl & Allis, em 2000, da existência de um ‘código de histonas’. Tal teoria considera a ideia de que conjuntos característicos de modificações de histonas levariam a efeitos biológicos determinados, a partir da ligação a eles de complexos de proteínas efetoras. No entanto, estudos posteriores questionaram a terminologia por considerarem que essa relação não atenderia aos pré-requisitos de um código verdadeiro. Além disso, a descoberta da ocorrência de interação entre as modificações de histona e a metilação de DNA sugeriu que em vez de apenas histonas, deveria se falar em um ‘código epigenético’, sendo necessárias investigações adicionais para esclarecer esta questão ainda controversa (Schreiber & Bernstein, 2002; Allis & Jenuwein, 2016).

Metilação da citosina

Assim como as histonas, o DNA também é passível de receber diferentes modificações que, por sua vez, ocorrem nas bases nitrogenadas dos nucleotídeos. A mais clássica e bem estudada é a metilação do carbono 5 da citosina, formando a chamada quinta base do DNA, a 5-metilcitosina (5mC). Tal modificação se encontra presente tanto em plantas quanto animais, além de algumas espécies de fungos, protistas e bactérias, mas seus níveis e padrões são altamente variáveis entre os diferentes grupos de organismos nos quais ocorre (Breiling & Lyko, 2015).

O genoma de vertebrados é o que contém a maior quantidade de 5mC dentre o reino animal. Em mamíferos, o grupamento metil é adicionado a resíduos de citosina que estão contidos nos dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG). Nas células somáticas, cerca de 70-80% de todos os dinucleotídeos CpG encontram-se metilados, sendo estes distribuídos ao longo do corpo de genes, regiões intergênicas, elementos repetitivos e retrotransposons endógenos (Ehrlich et al., 1982; Rountree et al., 2001; Bird, 2002; Marchal & Miotto, 2015). Regiões de alta concentração dos dinucleotídeos CpG, denominadas ilhas CpG, ocorrem em

diversos promotores e reguladores gênicos e permanecem livre de metilação por mecanismos finamente regulados, embora uma pequena porcentagem possa ser metilada de maneira tecido-específica ao longo do desenvolvimento ou diferenciação tecidual (Shen et al., 2007; Portela et al., 2013).

A metilação da citosina é feita de forma simétrica, ou seja, é adicionada em ambas as fitas de DNA, formando sequências que podem ser transmitidas ao longo da replicação. Sua manutenção ao longo das sucessivas divisões celulares é feita pela enzima DNA metiltransferase 1 (DNMT1), que possui afinidade por fitas hemimetiladas de DNA e reproduz a sequência de 5mC da fita parental na fita recém-sintetizada (Rose & Klose, 2014). A DNMT1 não atua sozinha, mas interage com proteínas acessórias ligantes da cromatina, como a UHRF1 (*ubiquitin like with PHD and ring finger domains 1*). Esta possui domínios SRA (*SET- and Ring- associated*) que interagem com dinucleotídeos CpG hemimetilados e, uma vez localizada, recruta a DNMT1 para os sítios onde deve atuar para que o processo ocorra apropriadamente. Paradoxalmente, a UHRF1 também marca a DNMT1 para degradação mediada por ubiquitinação, contribuindo para a regulação dos níveis desta proteína no interior nuclear (Bronner et al., 2013; Mudbhary et al., 2014). A DNMT1 apresenta importância fundamental para a manutenção da integridade do genoma. Sua depleção induzida em modelo de células tumorais resulta em acúmulo de diversos defeitos mitóticos, como quebras e pontes cromossômicas, culminando na ocorrência de mitoses catastróficas, um tipo específico de morte celular que ocorre durante a divisão, induzida por danos na célula e falhas dos *checkpoints* do ciclo celular (Castedo et al., 2004; Chen et al., 2007).

O padrão de metilação propagado pela DNMT1 é estabelecido nos estágios iniciais da embriogênese em um processo denominado metilação *de novo*. Logo após a fertilização, diversas sequências gênicas que encontravam-se metiladas no gameta maduro perdem esta marcação, concomitante à aquisição de pluripotência pelo zigoto. Já no estágio de blastocisto, a metilação é então reestabelecida por outras duas DNA metiltransferases (DNMTs), as DNMTs 3A e 3B. Estas não necessitam de um molde hemimetilado para atuar, podendo então converter a citosina em 5mC em regiões anteriormente não modificadas (Reik, 2007; Breiling & Lyko, 2015; Duan et al., 2016). Ao longo do desenvolvimento embrionário, uma segunda onda de demetilação global do genoma ainda ocorre, na maturação das células germinativas primordiais, sendo os níveis de 5mC reestabelecidos pela DNMT3A e um parálogo não catalítico, a DNMT3-like (DNMT3L) (Law & Jacobsen, 2010).

Os efeitos biológicos da metilação da citosina estão intimamente relacionados ao silenciamento gênico, sendo a base de diversos eventos epigenéticos como *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e formação de heterocromatina (Berdasco & Esteller, 2010). Menos frequente, mas também possível, é a associação dessa marca com ativação transcricional, descrito para a metilação do corpo de genes, onde possivelmente atue facilitando a elongação (Portela & Esteller, 2010). Padrões aberrantes de metilação do DNA podem também acontecer, levando ao desenvolvimento de patologias. Em células tumorais, uma demetilação global é observada, que pode ocasionar reversão do *imprinting* sobre alguns loci, além de instabilidade cromossômica e outras consequências resultantes da perda de metilação em sequências repetitivas. Paralelamente, a hipermetilação de ilhas CpG associadas a promotores gênicos também é induzida durante a tumorigênese, envolvendo principalmente genes supressores de tumor, que ficarão inativados (Jones & Baylin, 2002; Robertson, 2005; Jones & Baylin, 2007; Portela & Esteller, 2010).

Apesar de todo o impacto sobre a fisiologia nuclear e organização da cromatina, as consequências diretas da adição de um grupo metil à estrutura da molécula de DNA em si são variáveis e não completamente elucidadas. É reportado que a presença de 5mC possui a capacidade de reduzir a flexibilidade do DNA, influenciando na sua organização e dinâmica *in vivo* (Ngo et al., 2016). Além disso, a metilação da citosina pode favorecer a alteração conformacional do DNA de B- para Z-DNA pela diminuição da diferença de energia livre entre estas duas formas, enquanto outros estudos não observaram grandes mudanças estruturais em resposta a essa marca epigenética (Banyay & Gräslund, 2002; Temiz et al., 2012).

Nesse campo, maiores informações que ajudem a investigar os efeitos da metilação sobre as características do DNA podem ser obtidas pela técnica de microespectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR). Esta consiste na incidência de um feixe de luz infravermelha (IR) em todos seus comprimentos de onda sobre a amostra, atravessando-a e revelando picos específicos de absorção, enquanto dados brutos são convertidos em um espectro pela transformada de Fourier, uma função matemática (Vidal et al., 2014). O FT-IR se trata de uma metodologia vantajosa por ser rápida, não-destrutiva e requerer poucas quantidades de amostras. Em relação aos estudos do DNA, é capaz de fornecer informações desta molécula como um todo em um único espectro, incluindo composição de bases, ocorrência de fitas simples e também abundância de 5mC, entre muitos outros elementos (Banyay & Gräslund, 2002; Mello & Vidal, 2012; Vidal et al., 2014).

Derivados oxidativos da 5mC e processos demetilantes

Uma questão muito investigada a respeito da metilação da citosina sempre foi a sua reversibilidade. Mesmo considerada a princípio como uma marca estática, a ocorrência de grandes perdas de metilação no desenvolvimento embrionário citadas acima já indicavam a ocorrência de processos demetiladores *in vivo* (Wu & Zhang, 2010; Piccolo & Fisher, 2014; Wu & Zhang, 2014). Na ausência de identificação de uma enzima responsável pela retirada do grupamento metil, a primeira forma proposta e observada de perda da metilação foi a partir da inibição da DNMTs, principalmente a DNMT1. Sem a sua atuação, as novas fitas de DNA não recebem o padrão de metilação da fita parental, resultando em um mecanismo passivo de diminuição dos níveis de 5mC e dependente da replicação do DNA (Schuermann et al., 2016).

Em 1999, um grupo de pesquisa publicou a identificação de uma proteína com atividade específica de demetilase, mas nenhuma confirmação independente por outros laboratórios foi obtida até o momento (Bhattacharya et al., 1999; Guo et al., 2011). A (re)descoberta em 2009 da ocorrência de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) no genoma de mamíferos e das enzimas da família *ten-eleven translocation* (TET) trouxeram novas perspectivas para o campo da demetilação do DNA (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009).

A família das TETs apresenta três membros – TET 1, 2 e 3 – e seu nome vem de uma rara translocação que acontece em casos de leucemia mieloide aguda e linfocítica, fundindo o gene da MLL1 (*mixed lineage leukemia protein-1*), localizado no cromossomo 10 humano, com o gene da TET1, presente no cromossomo 11 humano (Lorsbach et al., 2003). As TETs 1 e 2 são encontradas em abundância em células-tronco embrionárias e neurônios de Purkinje, enquanto alta expressão gênica de TET3 é encontrada nos zigotos, onde irá atuar na demetilação do DNA paternal (Zhang et al., 2014). Por outro lado, essas enzimas são pouco expressas em diversos tipos de câncer, sua depleção é associada à tumorigenese. A perda de TET1, por exemplo, correlaciona com a aquisição de características invasivas em tumores e ocorrência de metástase, enquanto TET2 encontra-se mutada em 15% das malignidades mieloides (Hsu et al., 2012; Sun et al., 2013; Neri et al., 2014).

Todas as três TETs são dioxigenases dependentes de Fe^{2+} e 2-oxoglutarato e retêm a capacidade de oxidar a 5mC, gerando modificações químicas distintas da citosina. Estas compreendem a 5hmC, a 5-carboxilcitosina (5caC) e a 5-formilcitosina (5fC) (Ito et al., 2010; 2011; Blaschke et al., 2013). Assim como a citosina, a 5hmC, 5caC e 5fC apresentam pareamento normal com a guanina e suas quantidades variam de acordo com os tipos

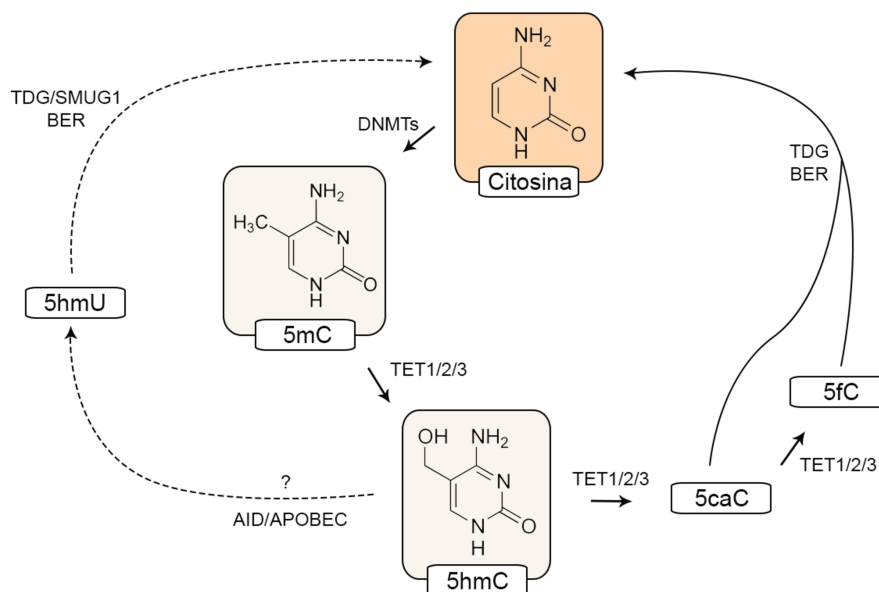
celulares e tecidos onde são encontradas. Células tronco embrionárias apresentam níveis relativamente altos de 5hmC, mas os níveis mais altos desta já encontrados foram no tecido cerebral. A 5caC e 5fC estão presentes em quantidades muito menores que a 5hmC, provavelmente porque existem mecanismos enzimáticos para sua remoção direta. As funções biológicas destas marcas, no entanto, ainda não se encontram totalmente esclarecidas (Pastor et al., 2013; Schuermann et al., 2016).

O maior interesse nestas modificações está no fato de que elas representam intermediários de um processo de demetilação ativa do DNA. Mecanismos de reparo do DNA por excisão de base (BER) foram descritos como capazes de reestabelecer a citosina não modificada a partir de duas vias principais, resumidas na Figura 1. A primeira, amplamente aceita, consiste na retirada de 5caC e 5fC pela enzima *thymidine DNA glycosilase* (TDG) seguida pela adição de uma citosina no sítio abásico, completando o processo de demetilação (He et al., 2011; Maiti & Drohat, 2011). Foi descrito recentemente que a TDG liga-se com mais afinidade ao *mismatch* 5caC:G do que ao T:G, seu substrato convencional, em mais uma demonstração da grande importância desta enzima na demetilação de DNA (Zhang et al., 2012). A segunda via ainda apresenta-se controversa e é caracterizada pela deaminação da 5hmC em 5-hidroxiuracil (5hmU) por enzimas da família AID (*activation-induced deaminase*) e APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*). A 5hmU, por sua vez, é removida pela *single-strand-selective monofunctional uracil DNA glycosylase 1* (SMUG1) ou por TDGs para a incorporação, em seguida, da citosina. Apesar de descrita em células HEK 293 e neurônios de camundongos, confirmações adicionais são necessárias a respeito desse mecanismo (Guo et al., 2011; Pastor et al., 2013).

A divisão dos processos de demetilação em ativo ou passivo não exclui que interações de uma via possam ocorrer sobre a outra. Um exemplo muito interessante é o fato de a associação de UHRF1 ao DNA ser prejudicada pela presença de 5hmC, uma vez que esta enzima possui afinidade muito menor a sítios hemi-hidroximetilados do que hemi-metilados. O resultado é uma facilitação da demetilação passiva em resposta à presença de 5hmC pelo menor recrutamento de DNMT1 durante a replicação. Por outro lado, a capacidade de deshidroximetilação por DNMTs foi reportada *in vitro*, ocasionando a reversão direta da 5hmC em citosina (Pastor et al., 2013).

2. Modulação das marcas epigenéticas

As diferentes modificações epigenéticas podem ser influenciadas por muitos fatores e



*Figura 1. Vias ativas de demetilação do DNA envolvendo reparo por excisão de base (BER). A citosina não modificada é convertida em 5-metilcitosina (5mC) por ação de DNA metiltransferases (DNMTs). Enzimas da família *ten-eleven-translocation* (TET) alteram a 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e nos derivados 5-carboxilcitosina (5caC) e 5-formilcitosina (5fC). 5caC e 5fC podem ser removidos pela *thymidine DNA glycosilase* (TDG), gerando um sítio abásico onde será incorporada uma citosina pelo mecanismo de BER. Uma via alternativa consiste na conversão de 5hmC em 5-hidroxiuracil (5hmU) e posterior remoção desta por TDG ou SMUG1 (*single-strand-selective monofunctional uracil DNA glicosilase 1*), seguido reposição da citosina via BER. Confirmações adicionais deste mecanismo, no entanto, são necessárias (linha tracejada).*

entre eles estão diversos compostos químicos que são amplamente utilizados como fármacos. Alguns destes foram especialmente desenvolvidos para cumprir tal função, dado que alterações nos padrões epigenéticos podem estar envolvidos em uma variedade de doenças, enquanto outros já eram amplamente utilizados quando se descobriu que possuíam também efeito modulador da epigenética (Lötsch et al., 2013).

Dois grandes exemplos do primeiro grupo são a 5-azacitidina (5-aza-CR) e a 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-CdR), em contraposição ao ácido valproico (VPA), que se encaixa na segunda definição. Maiores detalhes sobre estas drogas e seus mecanismos de ação serão descritos abaixo.

Drogas desenvolvidas para desempenhar funções epigenéticas

Na década de 60, um grupo de pesquisadores da então Tchecoslováquia sintetizaram pela primeira vez os análogos de citosina 5-aza-CR e 5-aza-CdR (Čihák et al., 1963; Piskala & Šorm, 1964; Šorm et al., 1964). Pouco tempo depois foi descoberto que no interior celular estes análogos poderiam ser ativados em nucleosídeos tri-fosfato, o que permitiria sua incorporação à estrutura dos ácidos nucleicos. Enquanto a 5-aza-CdR é incorporada apenas ao DNA, a 5-aza-CR pode ser adicionada também aos diferentes tipos de RNA e, com isso, interfere na síntese proteica. Ambas podem causar citotoxicidade, sendo o potencial citotóxico da 5-aza-CdR cerca de 10 vezes maior do que o da 5-aza-CR (Christman et al., 2002).

Em dosagens suficientemente baixas para não causar morte celular, foi observado que a incorporação de 5-aza-CR e 5-aza-CdR ao DNA resultava em redução dos níveis de metilação deste (Christman et al., 2002). Posteriormente, com avanços no estudo destas drogas, foi descoberto que a DNMT1 liga-se irreversivelmente a estes compostos, perdendo sua atividade catalítica e podendo ser inclusive direcionada para degradação proteossomal (Ghoshal et al., 2005; Datta et al., 2009). Isso faz da 5-aza-CR e 5-aza-CdR clássicos agentes demetilantes passivos do DNA.

Com a descoberta do papel importante que padrões aberrantes de metilação podem desempenhar sobre o câncer, estas drogas – que inicialmente já haviam sido propostas como potentes anti-tumorais – ganharam força novamente nesse ramo de pesquisa, sendo conduzidas para ensaios clínicos em uma variedade de tipos de câncer. Os resultados mais bem-sucedidos foram obtidos em resposta ao tratamento de síndromes mielodisplásicas (MDS). Em pacientes com essa síndrome, a 5-aza-CR e 5-aza-CdR se mostraram capazes de interferir sobre a metilação e, conseqüentemente, expressão de genes responsáveis pela transformação das MDS em leucemias, barrando este processo (Kim et al., 2016).

Atualmente, ambas são drogas amplamente utilizadas no tratamento de MDS e outras leucemias, tendo sido a 5-aza-CR e a 5-aza-CdR aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como terapêuticos nestas patologias, em 2004 e 2006, respectivamente (Kuendgen et al., 2011; Derissen et al., 2013; Kim et al., 2016). Com grande surpresa e euforia, a comunidade científica vem recebendo evidências de atuação destes fármacos em vias de demetilação ativa do DNA, além do seu já estabelecido papel em mecanismos passivos. Estudos pioneiros conduzidos em carcinoma hepatocelular (HCC) reportaram o aumento dos níveis de 5hmC de forma dependente de TET2 pela 5-aza-CR (Sajadian et al., 2015). Já em linhagens primárias de fibroblastos, a perda de metilação do DNA em resposta a tratamentos com esta mesma droga foi acompanhada de aumento dos

intermediários 5caC e 5fC, novamente com participação da TET2 neste processo (Manzoni et al., 2016).

Em relação à 5-aza-CdR, sua adição a células de leucemia humana induziu um aumento considerado paradoxal de 5hmC, 5caC e 5fC. Ao mesmo tempo, não foram identificadas quaisquer alterações nos níveis de expressão gênica de TET1, 2 ou 3, sendo sugerido, então, que esta droga seria capaz de gerar condições para o maior recrutamento de enzimas TET para o DNA, em vez de influenciá-las em abundância (Chowdhury et al., 2015). Analisando estes dados em conjunto, observa-se uma tendência de que a 5-aza-CR e 5-aza-CdR exerçam influências semelhantes sobre os intermediários da demetilação ativa do DNA, mas por mecanismos de ação diferentes. Novos estudos são necessários para clarificar esta função recém-descoberta de tais drogas, podendo resultar inclusive em novas aplicações terapêuticas.

Drogas com potencial epigenético não descrito originalmente: o ácido valproico

O VPA é um ácido graxo simples de cadeia curta que foi produzido e primariamente introduzido como solvente orgânico por Burton em 1882. Apesar de ser um anti-epiléptico bem estabelecido, sua aplicação terapêutica foi descoberta por acaso, na década de 60, em estudos que buscavam por anticonvulsivos e usavam o VPA apenas como solvente. Após testes clínicos, o VPA foi então aprovado para uso em tratamentos de epilepsia na França e Estados Unidos, em 1967 e 1978, respectivamente (Lagace et al., 2004).

Além de seu direcionamento para a epilepsia, o VPA também é um terapêutico para enxaquecas e distúrbios humorais, como a bipolaridade. As vantagens de sua utilização comumente referem-se à ocorrência de efeitos colaterais brandos sobre os pacientes, mas reações mais graves podem ocorrer, principalmente em relação à administração durante a gravidez (Chateauvieux et al., 2010). Nesse caso, o VPA está relacionado à indução de anormalidades craniofaciais, deficiências em membros, esqueleto e coração, comprometimento das funções cognitivas, além de um aumento de 1–2% nos casos de defeitos do tubo neural, como a espinha bífida (Robert & Guibaud, 1982; Clayton-Smith et al., 1995; Ornoy, 2009).

Com efeitos biológicos tão variados e indução de teratogenicidade, os mecanismos de ação desta droga sempre foram alvo de investigação. A atividade anti-epiléptica do VPA é atribuída principalmente a modificações da atividade do neurotransmissor inibitório GABA

(*Gamma Amino Butyrate*), e bloqueio dos canais de sódio e de cálcio do tipo-T (Perucca, 2002; Chateauvieux et al., 2010).

Adicionalmente a esse efeito, dois grupos independentes reportaram o achado de que, quando administrado nas doses terapêuticas para epilepsia (0,3 – 1,0 mM), o VPA também atuaria como inibidor de HDACs (HDACi) de classe I, com consequente hiperacetilação de histonas H3 e H4 (Göttlicher et al., 2001, Phiel et al., 2001). Sua ação como HDACi mostrou-se intimamente relacionada com a teratogenicidade mas parece não impactar a atividade anticonvulsiva, pois análogos do VPA incapazes de induzir inibição de HDAC também não apresentaram ação teratogênica, mas mantiveram as propriedades de proteção contra epilepsia (Phiel et al., 2001; Tung & Winn, 2010). O VPA também tem efeito inibitório sobre as HDACs de classe II, mas não nas HDACs 6 e 10, o que o diferencia de outros HDACi como a tricostatina A (TSA) e SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) (Lagace et al., 2004).

A indução de hiperacetilação de histonas pelo VPA foi o primeiro indício de que esta droga atua diretamente sobre a transcrição gênica, levantando a possibilidade de seu uso como antitumoral. Outras características que colocaram o VPA como possível agente para o tratamento do câncer foram suas habilidades de inibir a proliferação celular e induzir diferenciação, testados inicialmente em modelos de neuroblastoma e gliomas (Blaheta & Cinatl, 2002). Neste campo, há registros do VPA bem como outros HDACis em testes clínicos de fase I e II individualmente ou em combinação com outros compostos (Gurvich et al., 2004; Münster et al., 2007; Sharma et al., 2008; Rocca et al., 2009).

O aumento dos níveis de histonas acetiladas em resposta ao VPA foi observado em diversos outros tipos celulares, como adipócitos 3T3-L1, células HeLa e NIH 3T3. Nestas duas últimas, também foi observada descompactação cromatínica em resposta a esta droga, fenômeno esperado dado que a acetilação de histonas é uma marca associada à indução de um estado da cromatina mais aberto e, consequentemente, mais acessível a fatores de transcrição gênica (Eyal et al., 2004; Lagace & Nachtigal, 2004; Felisbino et al., 2011; 2014). Uma questão em aberto, no entanto, seria se a remodelação cromatínica observada pelo VPA em HeLa não estaria sendo contribuída também pela demetilação de DNA, frente a achados apresentados na seção seguinte de que HDACis podem influenciar também os níveis de 5mC.

3. Evidências do VPA e outros HDACis como demetiladores do DNA

A interferência sobre a ação das HDACs pode afetar também outras marcas epigenéticas além de apenas a acetilação de histonas. É conhecido que as HDACs podem

compor o *core* catalítico de complexos repressores da cromatina juntamente com diversas outras proteínas efetoras. Um destes complexos, o NuRD (*nucleosome remodeling and histone deacetylase*) apresenta em sua composição tanto as HDACs 1 e 2 quanto proteínas com domínios de ligação em grupos metil (MDBs) como a MBD3 (*methyl binding domain protein 3*). O NuRD pode ser recrutado à regiões de dinucleotídeos CpG metilados por outras MBDs e ocasionar, adicionalmente à metilação de DNA já presente, hipoacetilação de histonas devido à ação de suas HDACs. Tal evento contribui, dessa forma, para uma compactação ainda maior da cromatina e consequente repressão da expressão gênica (Zhang et al., 1999; Jones & Baylin, 2002; Hake et al., 2004; Crook et al., 2006).

Dada a ocorrência de uma relação dinâmica entre acetilação de histonas e metilação de DNA, foi sugerido então que drogas com ação inibidora de HDACs pudessem induzir também a demetilação do DNA (Cervoni & Szyf, 2001). De fato, tal propriedade foi observada para o VPA e outros HDACi, como a TSA. A identificação de similaridades entre o perfil de expressão gênica de células tratadas com VPA e TSA com o de células expostas à droga de conhecida ação demetilante corroboraram a influência destes fármacos sobre processos de demetilação do DNA (Gius et al., 2004; Milutinovic et al., 2007). Isso impacta o modo como os HDACis são utilizados nos testes clínicos, pois antes efeitos sobre a metilação de DNA não eram considerados (Ou et al., 2007).

Evidências também foram encontradas de que o mecanismo por trás da influência do VPA tanto quanto o TSA sobre a demetilação do DNA esteja relacionado a vias ativas. Estudos envolvendo a transfecção transiente de plasmídeos metilados no interior celular demonstraram a independência da replicação de DNA para a demetilação observada em tratamentos com VPA e TSA, uma vez que tais plasmídeos não foram replicados mas tiveram seus níveis de 5mC reduzidos após tratamento com as drogas (Cervoni & Szyf, 2001; Detich et al., 2003). Tal achado foi confirmado pela observação de um aumento de 20% da fração de citosinas não metiladas após tratamento com TSA em células T24 cultivadas na presença do bloqueador de síntese de DNA hidroxureia (Ou et al., 2007). Um aumento da expressão e nível proteico de TET1 foi identificado em células epiteliais do cristalino humano tratadas com VPA (Palsamy et al., 2014). Contudo, pouco ainda é conhecido a respeito da relação entre esta droga e as proteínas TETs, além dos intermediários da demetilação do DNA 5hmC, 5caC e 5fC. Por outro lado, interferência do VPA em elementos da via passiva de demetilação, por diminuição da expressão de DNMT1, também foi encontrada em células de câncer de mama, MCF-7, embora os níveis de metilação nesse caso não tenham sido analisados (Marchion et al., 2005).

Apesar da pouca elucidação a respeito de como esse processo ocorre, a indução de hipometilação do DNA pelo VPA traria consequências mais duradouras para o programa de regulação do genoma, em contraste com a alta dinamicidade da acetilação de histonas, que é rapidamente reversível e apresenta menor estabilidade que outras marcas epigenéticas (Milutinovic et al., 2007; Lee et al., 2010; Perisic et al., 2010). Com isso, a metilação de DNA também poderia também estar contribuindo para a situação de descompactação cromatínica observada em células HeLa tratadas com a droga (Felisbino et al., 2011).

No entanto, os relatos ainda são contraditórios em relação à ação do VPA sobre a metilação do DNA. Alguns autores afirmam a promoção, por esta droga, de demetilação global do DNA além de hiperacetilação de histonas em células HEK 293, tecido cerebral de ratos e camundongos e em linfomonócitos de pacientes epiléticos (Detich et al., 2003; Milutinovic et al., 2007; Dong et al., 2010; Wang et al., 2010; Tremolizzo et al., 2012). Em contraste, outros reportaram que este fenômeno não foi observado em linhagens celulares linfoblastoides FXS nem em embriões de camundongo ou até mesmo a situação oposta ocorreu, como em células de neuroblastoma, nas quais o VPA tendeu a aumentar os níveis globais de metilação (Tabolacci et al., 2008; Tung & Winn, 2010; Gu et al., 2012; Asai et al., 2013). Com isso, estudos adicionais e em diferentes modelos são necessários para compreender melhor o papel desta droga sobre a metilação de DNA.

4. Células HeLa como modelo de estudo

As células HeLa constituem a primeira linhagem em cultura estabelecida e comumente são chamadas de “células imortais”. A cultura foi estabelecida em 1951 a partir de um tumor cervical da paciente Henrietta Lacks, sem, no entanto qualquer registro de esclarecimento ou consentimento da paciente, nem conhecimento da família por anos, em uma história permeada por polêmicas reveladas apenas recentemente (Skloot, 2010).

São as células mais usadas nas pesquisas de biologia celular e molecular até os dias de hoje. Muitos avanços no campo da biologia foram obtidos tendo as células HeLa como base. Os de maior destaque incluem o desenvolvimento de vacina contra a pólio e estabelecimento da relação entre o vírus papiloma humano e o câncer cervical, este último laureado com o prêmio Nobel em 2008 (Scherer et al., 1953; Boshart et al., 1984). A identificação em células humanas da telomerase, enzima descoberta pelos trabalhos de E. H. Blackburn, C. W. Greider e J. W. Szostak, também laureados com o Nobel (2011), foi feita pela primeira vez em células HeLa e abriu novas perspectivas para o estudo de tumores (Morin, 1989). Ao longo dos anos,

as aplicações destas células não foram restritas apenas ao estudo de câncer, mas estenderam-se para a descoberta de diversos processos biológicos e bioquímicos referentes a células tumorais ou não (Masters, 2002).

No entanto, por ser uma linhagem tumoral, diferenças entre células HeLa e células não transformadas eram esperadas. Alguns estudos envolvendo métodos citogenéticos já haviam reportado alterações cromossômicas nesse tipo celular, mas a maior contribuição veio do primeiro estudo a mapear o genoma e transcriptoma de HeLa, a partir da linhagem “Kyoto”. O resultado mostrou inúmeras alterações, entre elas diversos rearranjos do cromossomo 11 e múltiplas cópias de alguns cromossomos, podendo chegar a até 5 em vez de duas, como encontrado em uma célula normal (Landry et al., 2013).

A importância de estudos como este acima reportado reside no fato que, na ausência do mapeamento genômico destas células, muitas pesquisas baseavam seus resultados obtidos em linhagens de HeLa com o genoma humano de referência (Landry et al., 2013). Com estas novas evidências, o uso da HeLa como modelo biológico geral vem sendo repensado. Contudo, estas células ainda preservam seu potencial para uso no entendimento da biologia de tumores e resposta a drogas com possível ação antitumoral, uma vez que o sequenciamento de outros modelos de câncer cervical estão sendo realizados e permitem a comparação com o obtido para HeLa (Callaway, 2013).

Frente a este contexto, o estudo da capacidade do VPA em induzir demetilação de DNA em células HeLa pode contribuir para o melhor entendimento da ação desta droga, uma vez que esta vem sendo proposta para o tratamento de alguns tipos de tumores. Comprovada a ação demetiladora de DNA pelo VPA, seria importante também que se determinasse o seu mecanismo de atuação, se semelhante ou diferente daquele constatado em outras linhagens tumorais agressivas, como por exemplo, células MCF-7 (Marchion et al., 2005).

Adicionalmente, a ocorrência de demetilação do VPA, se comprovada em células HeLa, poderia ampliar conclusões previamente reportadas sobre o efeito do VPA na remodelação cromatínica, explicados predominantemente pela indução de acetilação nas histonas H3 e H4 (Felisbino et al., 2011).

Objetivos

1. Avaliar a atuação do VPA num processo de demetilação de DNA em células HeLa;
2. Se alterada a metilação do DNA por ação do VPA, determinar sua consequência sobre a supraorganização global da cromatina;
3. Constatado o efeito de demetilação do DNA pelo VPA, determinar o seu mecanismo de ação, comparado ao de um tratamento com 5-aza-CdR, para se conhecer se o mesmo ocorreria de forma passiva, com inatividade ou decréscimo de participação de DNMT1, ou por via ativa, com participação das enzimas da família TET.

Para o cumprimento destes objetivos, foram utilizados métodos citoquímicos e imunocitoquímicos, análise de imagem, microespectroscopia no infra-vermelho e métodos de biologia molecular. Os resultados acham-se apresentados na forma de dois artigos que se seguem.

Artigo:

DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy.

Publicado em PLoS One, 12(1):e0170740, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0170740

RESEARCH ARTICLE

DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy

Giovana M. B. Veronezi¹, Marina Barreto Felisbino¹, Maria Sílvia V. Gatti², Maria Luiza S. Mello^{1‡*}, Benedicto de Campos Vidal^{1‡}

1 Department of Structural and Functional Biology and, 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

‡ These authors are shared senior authors on this work.

* mlsmello@unicamp.br



OPEN ACCESS

Citation: Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, Vidal BdC (2017) DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. PLoS ONE 12 (1): e0170740. doi:10.1371/journal.pone.0170740

Editor: Wei-Guo Zhu, Peking University Health Science Centre, CHINA

Received: June 24, 2016

Accepted: January 10, 2017

Published: January 23, 2017

Copyright: © 2017 Veronezi et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): grants no. 2007/58251-8 (recipient: BCV) and 2014/23842-0 (recipient: GMBV); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): grant no. 304668/2014-1 (recipient: MLSM). The funders had no role in

Abstract

Valproic acid (VPA), a well-known histone deacetylase inhibitor, has been reported to affect the DNA methylation status in addition to inducing histone hyperacetylation in several cell types. In HeLa cells, VPA promotes histone acetylation and chromatin remodeling. However, DNA demethylation was not checked in this cell model for standing effects longer than those provided by histone acetylation, which is a rapid and transient phenomenon. Demonstration of VPA-induced DNA demethylation in HeLa cells would contribute to understanding the effect of VPA on an aggressive tumor cell line. In the present work, DNA demethylation in VPA-treated HeLa cells was assessed by image analysis of chromatin texture, the abundance of 5-methylcytosine (5mC) immunofluorescence signals and Fourier transform-infrared (FT-IR) microspectroscopy centered on spectral regions related to the vibration of $-\text{CH}_3$ groups. Image analysis indicated that increased chromatin unpacking promoted by a 4-h-treatment with 1.0 mM VPA persisted for 24 h in the absence of the drug, suggesting the occurrence of DNA demethylation that was confirmed by decreased 5mC immunofluorescence signals. FT-IR spectra of DNA samples from 1 mM or 20 mM VPA-treated cells subjected to a peak fitting analysis of the spectral window for $-\text{CH}_3$ stretching vibrations showed decreased vibrations and energy of these groups as a function of the decreased abundance of 5mC induced by increased VPA concentrations. Only the 20 mM-VPA treatment caused an increase in the ratio of $-\text{CH}_3$ bending vibrations evaluated at 1375 cm^{-1} in relation to in-plane vibrations of overall cytosines evaluated at 1492 cm^{-1} . CH_3 stretching vibrations showed to be more sensitive than $-\text{CH}_3$ bending vibrations, as detected with FT-IR microspectroscopy, for studies aiming to associate vibrational spectroscopy and changes in DNA 5mC abundance.

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.

Introduction

Valproic acid (VPA), a potent anti-convulsive drug and a well-known histone deacetylase inhibitor, has been reported to induce histone hyperacetylation accompanying the decreased levels of histone deacetylases in several cell systems. Particularly in HeLa cells, an increased level of acetylation of histones H4 and H3 occurs as a function of the VPA dose or exposure period and is accompanied by chromatin remodeling [1–3].

However, the consequences of VPA treatment are not limited to changes in histone acetylation, but may also cause changes in the state of DNA methylation. A dynamic interplay between the acetylation of histone tails and changes in the abundance of DNA methylation is promoted by VPA treatment in certain cell lines such as MCF-7 human breast tumor cells, adenovirus 5 DNA-transformed HEK cells, neuroblastoma cells, lymphomonocytes, rat primary astrocytes, and lung cancer cells [4–9]. In addition, there are cell types like mouse embryonic cells and FXS lymphoblastoid cell lines in which DNA methylation levels are not affected by VPA treatment [10, 11].

When induction of chromatin unpacking was demonstrated in VPA-treated HeLa cells, effects due to DNA demethylation were not considered in addition to those concerned with histone acetylation [3]. In contrast with the relatively rapid and transient process of histone acetylation, changes in DNA methylation have a longer-standing effect [7, 12, 13]. The detection of VPA-induced DNA demethylation in HeLa cells would thus contribute to the understanding of the effect of VPA on an aggressive tumor cell line and might even inspire further studies on the mechanisms of DNA demethylation, and possible effects on promoters of tumor suppressor genes.

In the present study, our goal was to investigate whether a DNA demethylation process occurs in VPA-treated HeLa cells, as reflected by chromatin remodeling in the absence of the drug, and changes in the abundance of 5mC and in DNA infrared spectral profiles. Fourier transform-infrared (FT-IR) microspectroscopy, an analytical method that detects vibration characteristics of chemical functional groups in a sample, has been used to identify differences in DNA spectral profiles. DNA base composition and conformation, the abundance of cytosine methylation and histone binding have been associated with specific FT-IR spectral signatures [14–19]. For example, changes in the FT-IR spectral characteristics of DNA from the liver cells of non-obese diabetic mice reflect the changes in DNA methylation levels that are associated in these cells with decreased chromatin compactness and increased chromatin accessibility to MNase digestion [19]. Thus, the FT-IR spectral signature of DNA from HeLa cells should reflect changes in 5-methylcytosine (5mC) levels, if they were affected by VPA treatment. Particularly, changes should occur in the infrared spectral regions that identify the stretching and bending vibrations of -CH_3 groups [20–24].

Materials and Methods

Cells

HeLa cells at passages 207/277 were incubated in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C and cultured in Dulbecco's modified essential medium (DMEM, Sigma[®], St. Louis, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Cultilab[®], Campinas, Brazil) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma[®], 100 IU/mL and 100 $\mu\text{g/mL}$ final concentrations). The cells were originally provided by the Institute Adolfo Lutz (São Paulo, Brazil) at passage 126, which had acquired them from the ATCC CCL-2 (Manassas, USA). Cells were grown in 24-well plates over round glass coverslips at a concentration of 5.0×10^4 cells/mL and maintained in complete medium for 24 h. For image analysis, the cells were treated with VPA (Sigma[®]) dissolved in DMEM supplemented

with 1% serum and diluted in PBS to 1 mM for 4 h and then cultivated for 24 h and 48 h in the absence of the drug. For immunofluorescence, the cells were treated with 1 mM and 20 mM VPA for 4 h. Cells cultivated in the absence of VPA were used as a control. For DNA extraction, cells were seeded for 24 h into 6-well plates at a concentration of 1.0×10^5 cells/mL in complete medium, and subjected to the VPA treatments for 4 h.

Image analysis

The cells were fixed in a mixture of absolute ethanol-glacial acetic acid (3:1, v/v) for 1 min, rinsed in 70% ethanol, air dried at room temperature, and subjected to the Feulgen reaction, specific for DNA [25], with hydrolysis conducted in 4 M HCl for 60 min at 25°C [3]. Images of the Feulgen-stained cells were obtained with a Carl Zeiss automatic scanning microspectrophotometer (Oberkochen, Germany) interfaced to a personal computer as previously described. Briefly, the operating conditions for microspectrophotometry were as follows: Planapo objective 63/0.90, optovar 2.0, measuring diaphragm diameter of 0.25 mm, field diaphragm diameter of 0.20 mm, LD-Epiplan 16/0.30 condenser, scanning spot of $0.5 \mu\text{m} \times 0.5 \mu\text{m}$, 100-W/12-V halogen lamp, stabilized electronic power supply, Zeiss light modulator, $\lambda = 565 \text{ nm}$ obtained with a Schott monochromator filter ruler, R-928 photomultiplier, and a personal computer. Individual measuring points showing ≤ 0.020 absorbance were automatically removed from the digitized nuclear image. The cutoff point of 0.100 was selected to discriminate areas covered with condensed chromatin in agreement with a previous report for HeLa cells [3]. A variable number of nuclei, dependent on the experimental conditions, was chosen at random and measured individually. The image analysis parameters used to predict the condensation profile of the chromatin were area covered with condensed chromatin relative to the nuclear area (S_C %) and the contrast between the average absorbance of the condensed chromatin and that of the whole chromatin (AAR, average absorption ratio) [26]. The AAR is obtained by the formula $(A_C/S_C)/A_T/S_T$, where A_C = integrated absorbance over a pre-selected absorbance (cutoff point); A_T = total integrated absorbance per nucleus; S_C = area in μm^2 of the absorbing image discriminated after using the cutoff point; S_T = total nuclear area [26]. When the S_C % values are plotted against AAR values, the resulting scatter diagram reveals the position of the points that correspond to specific nuclear images [27]. Decreased S_C % values accompanied by increased AAR values are associated with nuclear phenotypes characterized by chromatin decondensation [3, 27–30].

5-methylcytosine (5mC) immunofluorescence

Cells were fixed in absolute methanol for 10 min at -20°C , washed in PBS and treated with 2 N HCl for 1 h at 37°C . The material was then washed twice in borate buffer (100 mM boric acid, 75 mM NaCl and 25 mM sodium tetraborate, pH 8.5) and blocked with 1% BSA in PBS for 1 h. Next, the cells were incubated with mouse anti-5-methylcytosine primary antibody (Sigma[®], 1:100 diluted in 1% BSA) for 1 h at room temperature in the dark, followed by treatment with goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (Sigma, 1:50 diluted in 1% BSA) for 1 h in the dark.

Image capture was performed using an Olympus BX60F5 microscope, QCapture and Image Pro-Plus software, and the same exposure times. ImageJ (NIH, Bethesda, USA) software was used for image analysis.

Sample preparation for FT-IR analysis

DNA extraction was performed as previously described [31], with minor modifications. Control and VPA-treated cells were collected (for each condition, cells were pooled from three

wells of a 6-well plate), centrifuged and re-suspended in cold cell lysis buffer (0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM EDTA, pH 8.0). The samples were treated with proteinase K (Sigma[®], 100 µg/mL) for 3 h at 55°C and DNase-free RNase (Thermo Scientific[®], Waltham, USA, 33 µg/mL) for 1 h at 37°C. Proteins were precipitated by the addition of 4 M sodium acetate solution, followed by centrifugation at the maximum speed for 3 min at 4°C. The supernatant was transferred to a microcentrifuge tube containing isopropanol for DNA precipitation. The solution was centrifuged at maximum speed for 1 min at room temperature, the DNA pellet was washed three times in 70% ethanol, air dried and suspended in 0.9% NaCl solution. Approximately 12 µg of DNA was obtained for each sample, as quantified by the Qubit fluorimeter (Life Technologies[®], Carlsbad, USA). The Thermo Scientific Nano-Drop 2000 spectrophotometer was used to assess the 260/280 absorbance ratio (~1.8), which indicates the purity of the extracted DNA. The samples were diluted to a final concentration of 364 ng/µL and were stored at -20°C until use.

Prior to the analysis of DNA preparations using FT-IR microspectroscopy, 10 µL drops of the samples dripped on slides were examined using a BX51 Olympus polarizing microscope (Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a differential interference contrast (DIC) system and Berek's U-CBE compensator to determine whether the extracted DNA maintained a negative birefringence and helical double-stranded conformation. This analysis was performed at the periphery of the drying drop of sample, where pure DNA crystalizes. NaCl crystals are verified only at the center of the dried drop [32]. The ambient relative humidity at which the samples were examined for optical anisotropy and FT-IR was less than 75% at 27°C. The same ambient relative humidity and room temperature were used while examining all of the DNA samples.

FT-IR equipment/software

The FT-IR spectral acquisition of the DNA samples was performed using the Illuminat IR II[™] microspectroscope (Smiths Detection, Danbury, CT, USA) equipped with a liquid nitrogen-cooled mercury-cadmium-telluride detector, an Olympus microscope (Olympus America) and Grams /AI 8.0 spectroscopy software (Thermo Electron Co., Waltham, MA, USA). The performance validation of the equipment was indicated by a low signal-to-noise ratio of 7929:1 [33].

The measurement site was a square of 25 µm per side. Absorbances for samples and background were obtained using 64 scans for each individual spectral profile. Absorption spectral signatures in the 3600–800 cm⁻¹ wavenumber range were obtained with a resolution of 4 cm⁻¹ as per the instructions from the equipment supplier. DNA samples were spread on gold-recovered slides to obtain information on DNA vibrational properties especially in the 3000–2800 cm⁻¹ spectral range using an all-reflecting objective (ARO) [18, 19]. Thirteen and nine spectral profiles were obtained for the DNA from 1 mM and 20 mM VPA-treated cells, respectively, and six spectral profiles were obtained for the untreated control. Each spectral profile was subjected to baseline and level-plus-zero correction using four fitting points as provided by the OFF SET.AB application of the Grams/AI software (S1 Fig). Average spectra were then obtained for DNA from the VPA-treated and untreated control samples, followed by normalization with respect to their highest absorption peak as per the instructions provided by the Function. AB application of the Grams/AI software. Moreover, as per the Grams/AI software instructions, peak-fitting using a Gaussian function at a low sensitivity level was applied to the 2992–2850 cm⁻¹ spectral window, the region assigned to ν_{as} and ν_s C-H stretching vibrations [24].

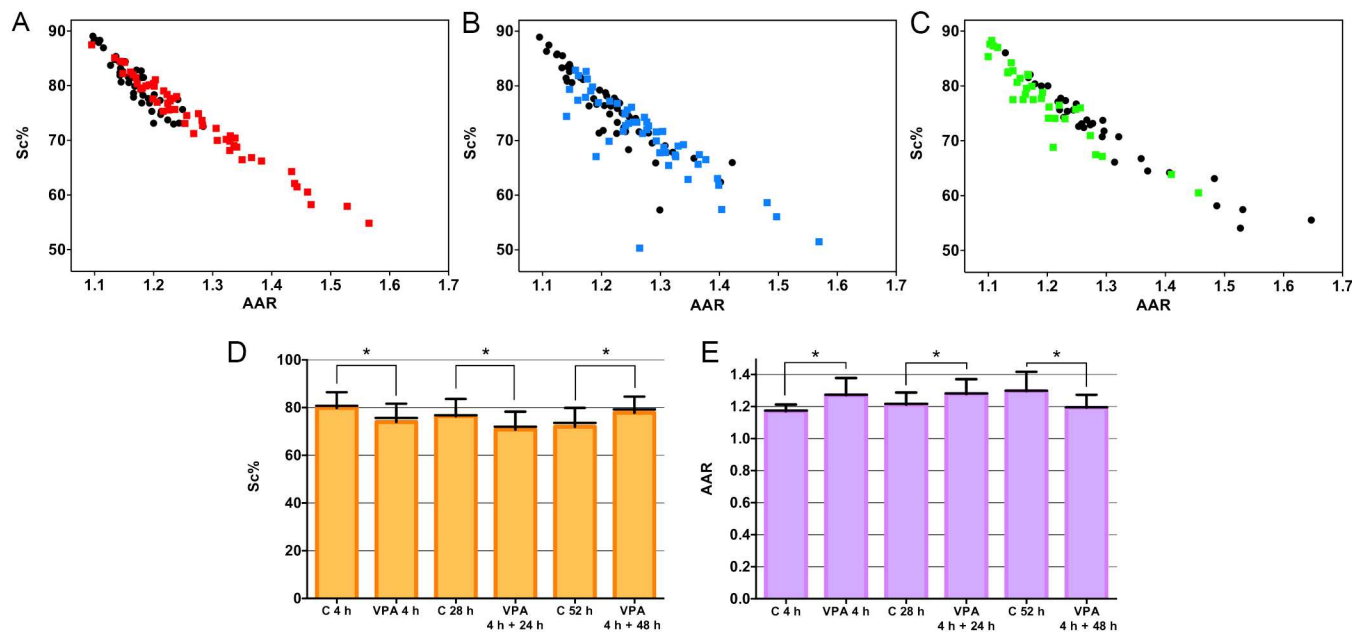


Fig 1. Nuclear phenotypes appear to be altered in HeLa cells in response to VPA treatment. Scatter diagrams relating of the condensed chromatin area (S_C %) and chromatin textural contrast (AAR) of Feulgen-stained cells. A decrease in S_C % values concomitant with an increase in AAR values occurred in the nuclei of cells treated with 1 mM VPA for 4 h (A, red dots). This event was maintained under conditions in which the cells were additionally cultivated in the absence of the drug for 24 h (B, blue dots) but not for 48 h (C, green dots). Black dots represent respective untreated controls. The asterisks indicate differences that are significant at $P_{0.05}$ for comparisons of S_C % (D) and AAR values (E) between VPA-treated cells and respective untreated controls using the Mann-Whitney test. Error bars indicate standard deviation. The horizontal black lines of the bars represent median values. $n = 50$ (A, B); $n = 30$ (C).

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g001

Results and Discussion

VPA induces chromatin remodeling that lasts beyond the time assigned to histone acetylation effects

Exposure of HeLa cells to 1.0 mM VPA for 4 h induced chromatin de-condensation as detected by image analysis. Scatter diagrams relating S_C % and AAR values showed decreased S_C % values with increasing AAR values in VPA-treated HeLa cells (Fig 1A), similar to a previous report that associated an increased level of histone acetylation with chromatin remodeling [3]. This situation persisted for 24 h (Fig 1B) after the cessation of VPA treatment but could not be sustained after a 48-h period, when chromatin packaging increased (Fig 1C). Statistical analysis confirmed the descriptive images (Fig 1D and 1E). Considering that histone acetylation is a transient mark that is rapidly reversed in the absence of a class I HDAC inducing agent like [7, 12, 13], the maintenance of textural chromatin changes in HeLa cells in the absence of the drug treatment even for 24 h suggests that another epigenetic factor such as DNA demethylation may be occurring in these cells. Even DNA demethylation, which has a longer lasting effect than histone acetylation, has been reported to be reversible in other cell systems [7], thus supporting our findings.

VPA-induced chromatin remodeling is accompanied by a decreased abundance of DNA methylation

The immunofluorescence assay for 5mC demonstrated that VPA treatment drastically decreased the abundance of DNA methylation in HeLa cells (Fig 2A and 2B). In all cases,

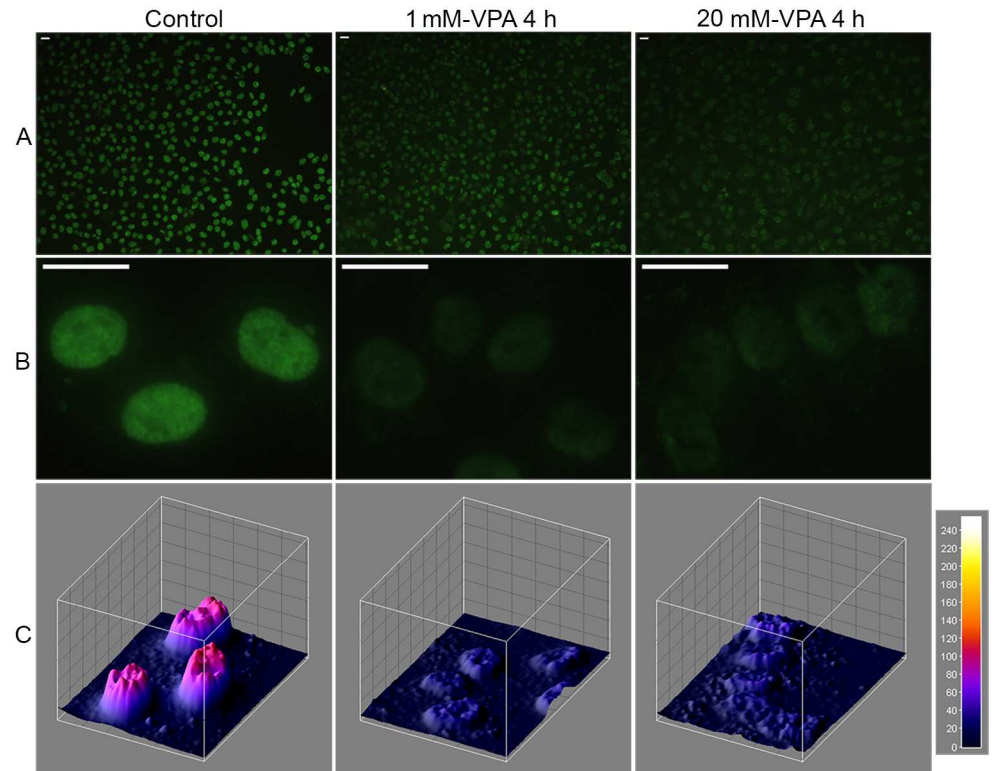


Fig 2. Immunofluorescence signals for DNA 5mC in VPA-treated HeLa cells. A reduction in the DNA 5mC fluorescence signals occurred with the VPA treatment (A, B). The intensity of the fluorescence signals was higher in the 20 mM-VPA-treated cells compared with the 1 mM-VPA-treated cells (A, B). Image fluorescence intensity is also shown using the ImageJ 3D plugin software (C). Arbitrary units are based on the 8-bit intensity scale (0–255). The bars equal 20 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g002

photographs were obtained using the same exposure conditions so that comparisons between samples could be made. The intensity of the signal loss was greater with the higher VPA concentration (Fig 2A and 2B), suggesting that VPA elicits a dose-dependent response [4, 7, 34]. Representative images analyzed using the ImageJ 3D plugin [35] reinforced the progressive loss of fluorescence intensity for 5mC as the VPA concentration increased compared with the untreated control (Fig 2B and 2C).

Changes promoted by VPA in the DNA methylation status of HeLa cells affect their FT-IR spectral profiles

Quality attributes of the DNA samples used for the FT-IR study. The integrity of the double-stranded DNA studied here using FT-IR analysis was demonstrated by optical anisotropic data (negative birefringence) (Fig 3) and by the presence of an FT-IR spectral band peak at 1232–1225 cm^{-1} (Fig 4A–4D) and a shoulder at 1707 cm^{-1} (Fig 4A and 4C). The band peak at 1232–1225 cm^{-1} is not only associated with the DNA PO_2^- antisymmetric stretching vibration (ν_{as}) but it is also sensitive to the DNA molecular geometry [Taillandier *et al.* 1985 –*apud* 22] and a mark of the DNA B-form [36, 37]. The absorption shoulder at 1707 cm^{-1} suggests that the DNA extracted from VPA-treated and untreated cells was not denatured [22, 38]. In addition, band peaks at 1080 cm^{-1} , 1084 cm^{-1} and 1097–1095 cm^{-1} for the untreated control, 1 mM and 20 mM VPA-treated cell samples, respectively, is probably related to PO_2^- symmetric vibration (ν_{s}), although the absorption peak for the DNA from the 20 mM VPA-treated cells

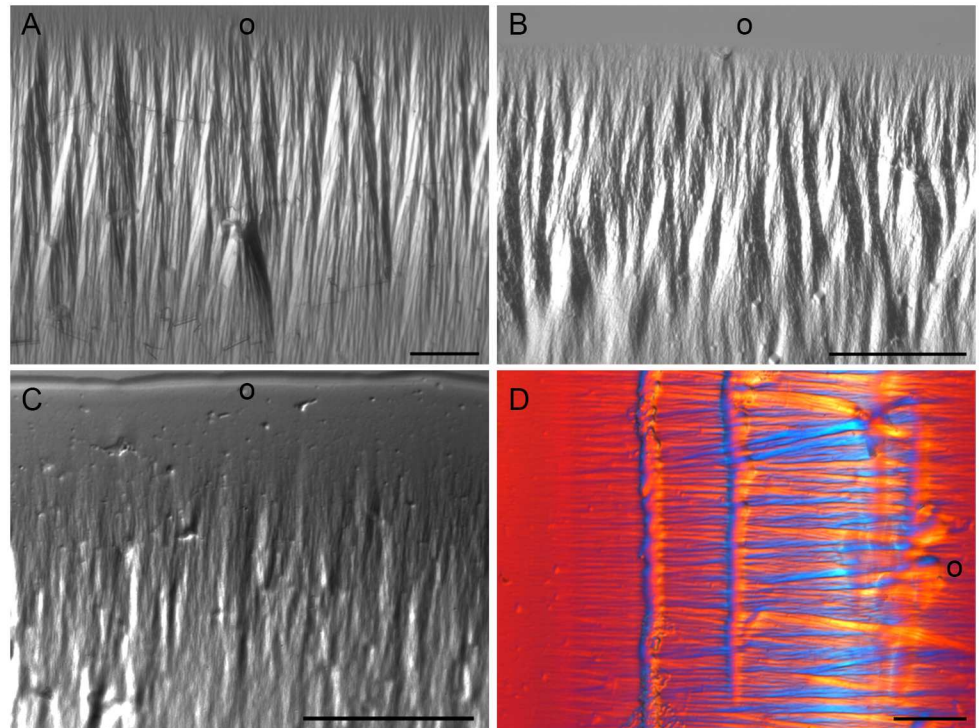


Fig 3. Optical anisotropy of DNA samples extracted from HeLa cells for FT-IR analysis as observed using polarization microscopy. Birefringence images of DNA from untreated control (A) and 1 mM VPA- (B) and 20 mM VPA-treated cells (C). An example of images obtained using a differential interference contrast (DIC) system is also shown for DNA from 1 mM VPA-treated cells (D). Blue and yellow interference colors against a red background (D) resulted from the orientation of the DNA fibers in relation to the gamma axis of Berek's U-CBE compensator inserted into the microscope. This procedure was used to validate that the negative sign of the birefringence, typical of double-stranded B-DNA, was achieved. The outer edge of the DNA drops dried on slides is indicated (o). The bars equal 50 μm .

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g003

was shifted to a lower frequency (Fig 4B and 4D). This band peak was also always lower than the peak corresponding to $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^-$ (Fig 4B and 4D), which is in agreement with a $\nu_{\text{as}} \text{PO}_2^- / \nu_{\text{s}} \text{PO}_2^-$ ratio < 1.0 that is expected for pure DNA samples [17, 22].

VPA-induced changes in the DNA methylation status of HeLa cells affect their FT-IR band peaks associated with $-\text{CH}_3$ stretching vibrations. In the $\sim 2992\text{--}2850 \text{ cm}^{-1}$ spectral region, the peak assigned to the ν_{as} and ν_{s} C-H stretching vibrations in 5mC methyl groups [19] was evident in all cases (Figs 4A and 4C and 5A–5D) but was less elevated in the DNA spectrum from VPA-treated cells (Fig 5A). When a peak fitting procedure was applied to this spectral window, the band peak was resolved into different peaks (Fig 5B–5D; Table 1). The most prominent peak for the DNA from VPA-treated cells appeared slightly shifted to longer frequencies compared with the untreated control, although practically no difference occurred as a function of the VPA treatment dose used (Table 1). However, it is evident that the total area of the band peak, as well as the area of the main fitted peak, decreased with increasing VPA concentrations (Table 1). The total band area decrease was verified even when non-normalized spectral curves were compared (control, 1.5235 units; 1 mM VPA-treated cells, 1.2453 units; 20 mM VPA-treated cells, 1.1572 units). In IR spectroscopy, a decrease in area under an absorption band peak has been related to a decrease in absorbed energy [18, 39, 40]. In the present case, this decrease was probably associated with the lower abundance of cytosine methylation induced by VPA treatment (Fig 2) similar to data from hyperglycemic non-obese

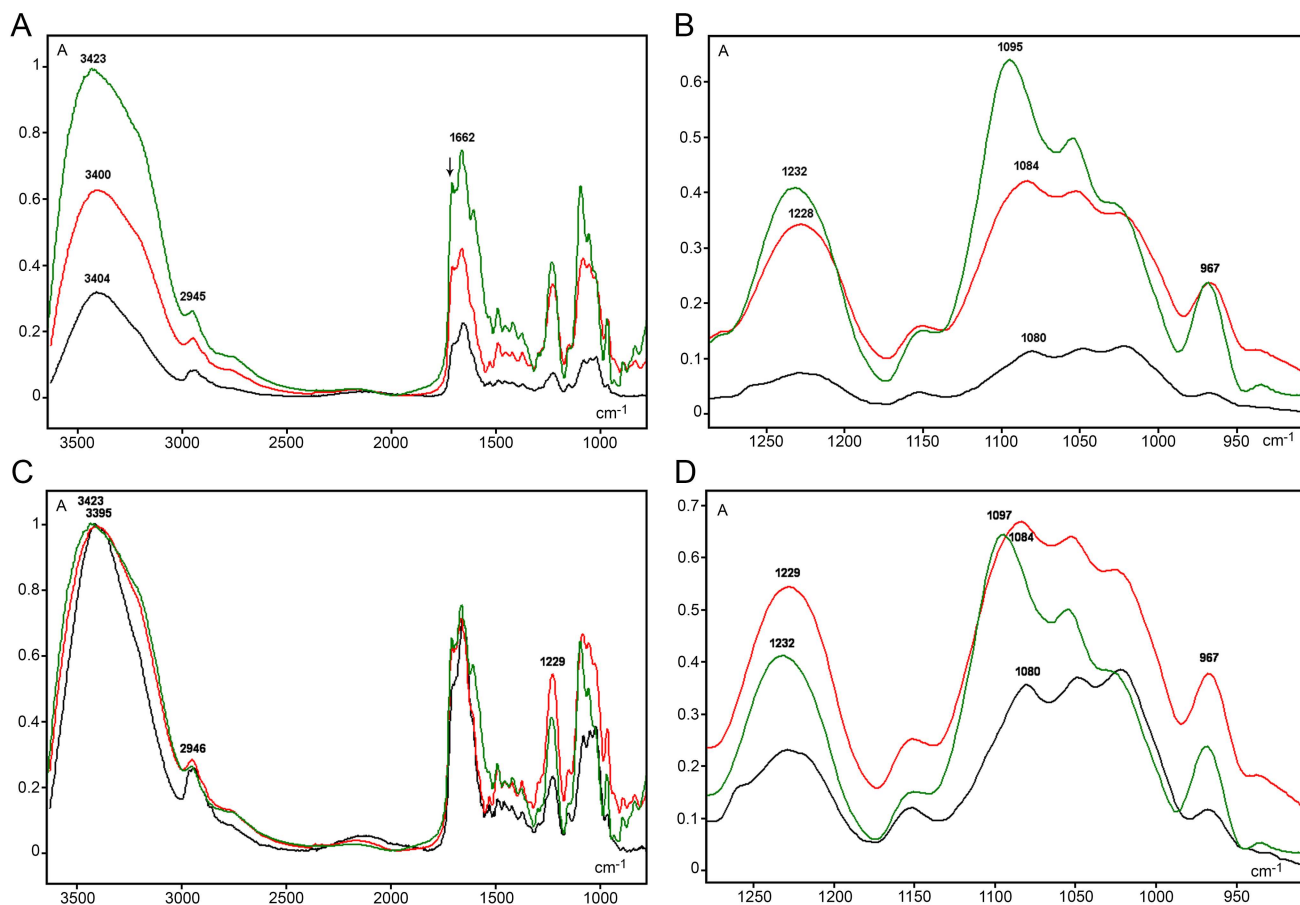


Fig 4. FT-IR average spectral profiles for DNA from 1 mM VPA-treated (red line), 20 mM VPA-treated (olive line), and untreated (black line) HeLa cells. Non-normalized spectra (A, B) and spectra normalized with respect to the highest band peak (C, D) are shown. (B) and (D) are spectral details from (A) and (C), respectively. The arrow in (A) indicates ~ 1707 cm^{-1} wavenumber position. Small A, absorbances.

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g004

diabetic mice [19]. Differences in the number of peaks provided by the peak fitting process suggest that changes in the chemical environment at the level of stretching vibrations of $-\text{CH}_3$ groups occurred with changes in DNA methylation levels [19].

As expected from the analysis of DNA FT-IR spectral profiles using the ARO objective [18, 19], the most elevated band peaks in the 3600 – 800 cm^{-1} spectral range were verified at the 3425 – 3395 cm^{-1} wavenumber region for VPA-treated and untreated cells (Fig 4A and 4C). This region has been assigned to $-\text{NH}$ and $-\text{NH}_2$ group stretching vibrations and hydrogen bonding [21, 23, 24, 41].

Although the PO_2^- symmetric vibration at the 1080 cm^{-1} wavenumber is important to differentiate stem cells in human intestinal crypts of tissue preparations, assuming an association with DNA conformational changes and chromatin remodeling [42], extrapolation of this report to interpretation of the present spectra obtained for isolated DNA preparations from HeLa cells could not be currently established.

IR spectral regions corresponding to overall cytosine in-plane vibrations and $-\text{CH}_3$ bending vibrations are less sensitive at reflecting DNA methylation changes in HeLa cells. In the fingerprint spectral region, peak absorbances were observed at 1492 cm^{-1} and 1375 cm^{-1} frequencies (Fig 6), which may be due to the contribution of overall cytosine in-plane vibrations [22, 37, 43, 44] and $-\text{CH}_3$ bending vibrations [24], respectively. However, the

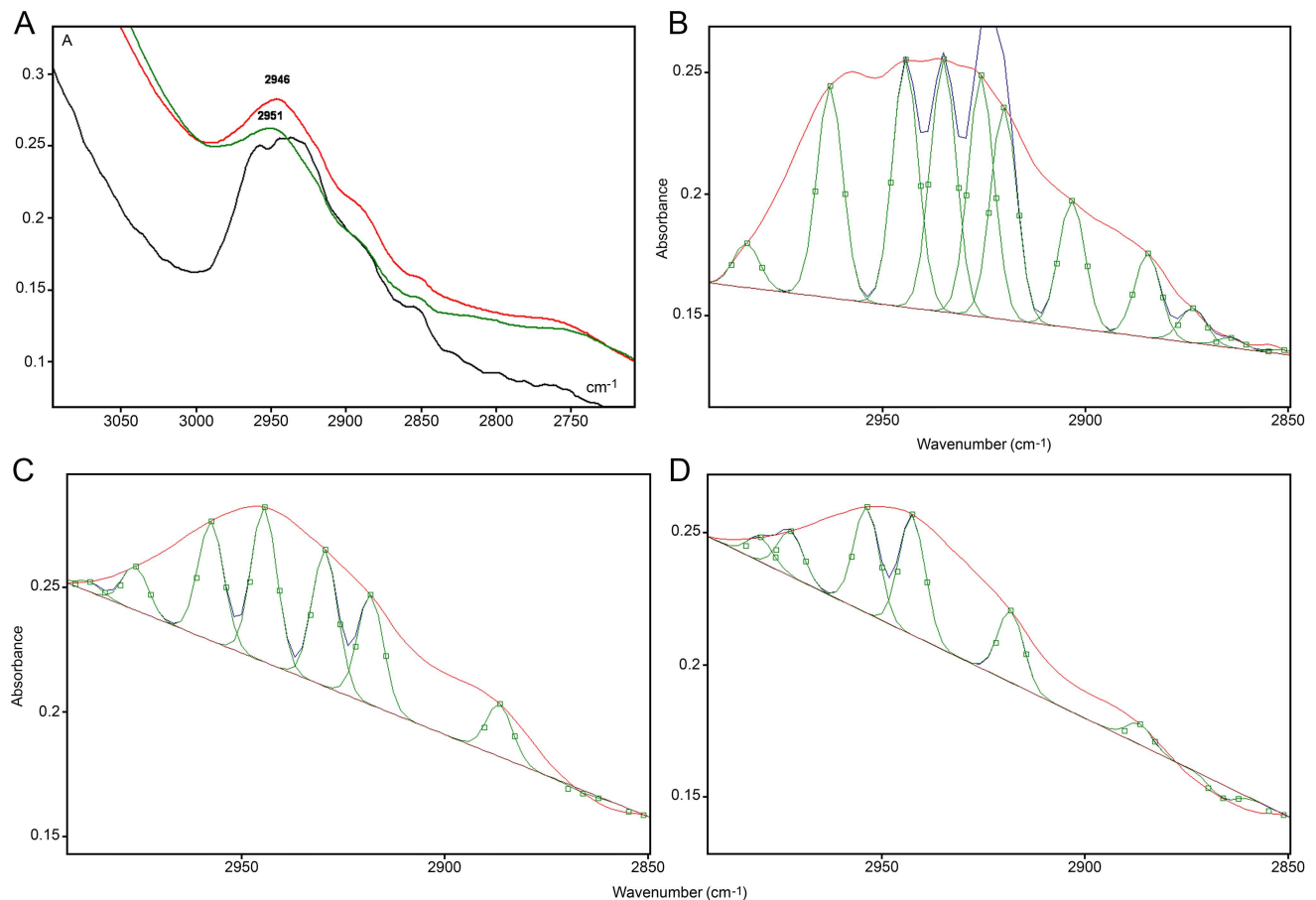


Fig 5. Details of the IR spectral window in the 2990–2850 cm^{-1} wavenumber range. The band peak in (A) is shown as originally obtained from normalized spectra for DNA from 1 mM VPA-treated (red line), 20 mM VPA-treated (olive line) and untreated (black line) cells. The same FT-IR spectral profiles after peak fitting using Grams/AI 8.0 software, Gaussian function and low sensitivity level are shown for the untreated sample (B), the 1 mM VPA-treated cells (C), and the 20 mM VPA-treated cells (D). Original traces appear as red lines, and fitted peaks are represented as green lines (B-D). Small A, absorbances.

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g005

intensity of these peaks appears increased in the DNA spectra from VPA-treated cells even after normalization of the spectral curves (Fig 6). On the other hand, if a ratio is calculated for absorbances at 1375 cm^{-1} in relation to the absorbances obtained at 1492 cm^{-1} , its value is higher for 20 mM VPA-treated cells (1.3799) than for the 1 mM VPA-treated cells (1.2034) and the untreated control cells (1.3224). Moreover, these data were compatible with the decreased abundance of 5-methylcytosine revealed in the immunofluorescent images (Fig 2). However, this rationale did not apply to the comparison of ratios between the 1 mM VPA-

Table 1. Statistics for the FT-IR band peak related to CH_3 stretching vibrations.

Cell treatments	Number of peaks	Main peak frequency (cm^{-1})	Main peak area units	Total area units
Untreated control	11	2935	0.8255	4.8044
1 mM VPA	8	2944	0.4880	1.9798
20 mM VPA	6	2942	0.3623	1.1720

Peak fitting provided by Grams/AI 8.0 software (function: Gaussian; sensitivity: low).

Wavenumber edges: 2992 and 2850 cm^{-1}

doi:10.1371/journal.pone.0170740.t001

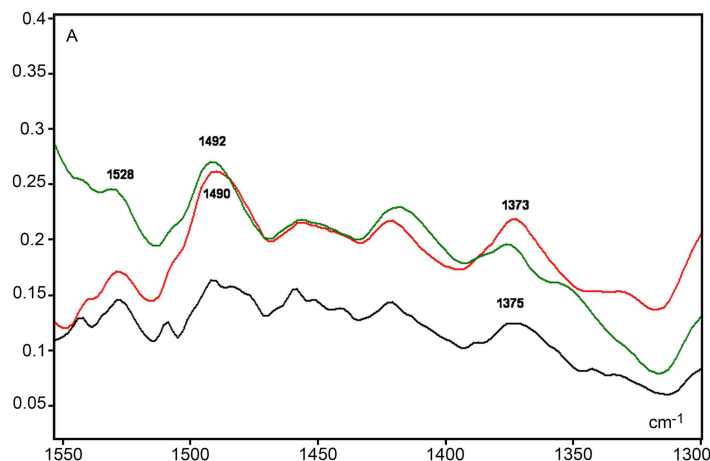


Fig 6. Details of the IR spectral window in the 1530–1350 cm^{-1} range. Spectral profiles are shown for DNA from 1 mM VPA-treated (red line), 20 mM VPA-treated (olive line) treated and untreated (black line) cells. A, absorbances.

doi:10.1371/journal.pone.0170740.g006

treated cells and the untreated cells. Considering that at this spectral region absorptions of different chemical groups and bending vibrational motion types may overlap [24], it is not recommended for the association of DNA 5mC abundance and VPA demethylation effects at least in HeLa cells.

A band peak at 1662–1661 cm^{-1} , which has been attributed to the contribution of thymine and adenine bases [18, 22, 37], was evident and similar among all of the spectra we compared (Fig 4A and 4C)

Conclusions

1. Changes in the DNA methylation status of HeLa cells induced by VPA were suggested by the results of image analysis of chromatin texture and confirmed by decreased 5mC immunofluorescence signals. These changes also affected the FT-IR spectral profiles of the DNA. In particular, the intensities and frequencies corresponding to ν_{as} and ν_{s} -CH₃ stretching vibrations decreased as the concentration of VPA increased, in agreement with a decrease in abundance of 5mC. The FT-IR results are supported by previously reported changes in FT-IR spectra for non-obese diabetic mice displaying decreased levels of DNA methylation under hyperglycemic conditions [19].
2. Based on the calculation of a ratio of absorbances at 1492 cm^{-1} /1375 cm^{-1} (-CH₃ group bending vibrations in relation to the contribution of overall cytosine in-plane vibrations), the increased value for the 20 mM VPA-treated sample-DNA agreed with the decreased abundance of methylated cytosine. However, this association did not apply to the DNA obtained from cells treated with 1 mM VPA, possibly because of the interference of the vibrational effects of other functional groups at this spectral region.
3. For further studies that aim to associate vibrational spectroscopy and changes in DNA 5mC abundance, analysis of the IR spectral region concerned with the frequency of -CH₃ stretching vibrations is more indicated than that assigned to -CH₃ bending and cytosine in-plane vibrations.

Supporting Information

S1 Fig. Baseline-corrected raw FT-IR spectral profiles for DNA from untreated (A), 1 mM VPA-treated (B) and 20 mM VPA-treated (C) HeLa cells. X axis, absorbances (A); Y axis, wavenumbers in cm^{-1} .
(TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Shirlei M. Recco-Pimentel (Institute of Biology, Unicamp, Campinas, Brazil) for the use of facilities related to the capture and analysis of the fluorescent images.

Author Contributions

Conceptualization: MLSM BCV GMBV.

Data curation: MLSM BCV.

Formal analysis: MLSM BCV GMBV.

Funding acquisition: BCV GMBV MLSM.

Investigation: BCV GMBV MLSM.

Methodology: BCV MLSM GMBV.

Project administration: MLSM.

Resources: MLSM MSVG BCV.

Supervision: MLSM.

Validation: BCV MLSM.

Visualization: MLSM GMBV BCV.

Writing – original draft: MLSM BCV.

Writing – review & editing: MLSM GMBV MBF BCV MSVG.

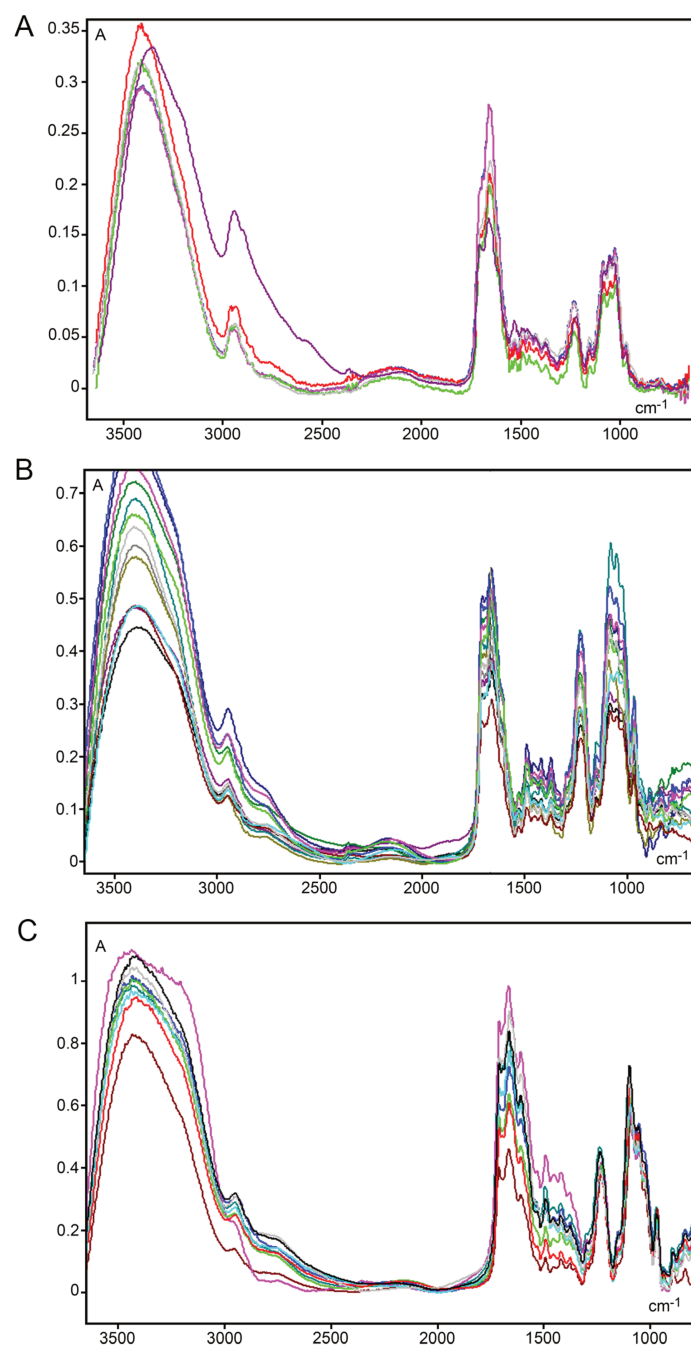
References

1. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S et al. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20, 6969–6978. doi: [10.1093/emboj/20.24.6969](https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969) PMID: [11742974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11742974/)
2. Sami S, Hoti 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. doi: [10.1093/jb/mvn074](https://doi.org/10.1093/jb/mvn074) PMID: [18515856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18515856/)
3. Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS (2011). Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS ONE* 6, e29144. doi: [10.1371/journal.pone.0029144](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029144) PMID: [22206001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22206001/)
4. Detich N, Bovenzi V, Szyf M (2003). Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278, 27586–27592. doi: [10.1074/jbc.M303740200](https://doi.org/10.1074/jbc.M303740200) PMID: [12748177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12748177/)
5. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65, 3815–3822. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-04-2478](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2478) PMID: [15867379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15867379/)
6. 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. doi: [10.1093/carcin/bgl167](https://doi.org/10.1093/carcin/bgl167) PMID: [17012225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17012225/)

7. Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M et al. (2010). Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacol* 35, 792–805.
8. Gu S, Tian Y, Chlenski A, Salwen HR, Lu Z, Raj JU, et al. (2012). Valproic acid shows potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs* 23, 1054–1066. doi: [10.1097/CAD.0b013e32835739dd](https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32835739dd) PMID: [22863973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22863973/)
9. Brodie SA, Li G, El-Kommos A, Kang H, Ramalingam SS, Behera M et al. (2014). Class I HDACs are mediators of smoke carcinogen-induced stabilization of DNMT1 and serve as promising targets for chemoprevention of lung cancer. *Cancer Prev Res* 7, 351–361.
10. Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, Chiurazzi P 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. doi: [10.1097/FPC.0b013e32830500a1](https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32830500a1) PMID: [18622267](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18622267/)
11. Tung EWY, Winn LM (2010). Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248, 201–209. doi: [10.1016/j.taap.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.001) PMID: [20705080](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20705080/)
12. Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster LL, Marks PA (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci, Washington* 107, 14639–14644.
13. Boudadi E, Stower H, Halsall JA, Rutledge CE, Leeb M, Wutz A et al. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated *Hoxb* silencing. *Epigenetics & Chromatin* 6, 11.
14. Banyay M, Gräslund A (2002). Structural effects of cytosine methylation on DNA sugar pucker studied by FTIR. *J Mol Biol* 324: 667–676. PMID: [12460569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12460569/)
15. Kelly JG, Martin-Hirsch PL, Martin FL (2009). Discrimination of base differences in oligonucleotides using mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Anal Chem* 81, 5314–5319. doi: [10.1021/ac900546m](https://doi.org/10.1021/ac900546m) PMID: [19499925](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19499925/)
16. Kelly JG, Najand GM, Martin FL (2011). Characterisation of DNA methylation status using spectroscopy (mid-IR) versus Raman with multivariate analysis. *J Biophoton* 4, 345–354.
17. Mello MLS, Vidal BC (2012). Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. *PLoS ONE* 7, e43169. doi: [10.1371/journal.pone.0043169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043169) PMID: [22937023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22937023/)
18. Mello MLS, Vidal BC (2014). Analysis of the DNA Fourier transform-infrared microspectroscopic signature using an all-reflecting objective. *Micron* 61, 49–52. doi: [10.1016/j.micron.2014.02.003](https://doi.org/10.1016/j.micron.2014.02.003) PMID: [24792446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24792446/)
19. Vidal BC, Ghiraldini FG, Mello MLS (2014). Changes in liver cell DNA methylation status in diabetic mice affect its FT-IR characteristics. *PLoS ONE* 9, e102295. doi: [10.1371/journal.pone.0102295](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102295) PMID: [25019512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25019512/)
20. Fox JJ, Martin AE (1940). Investigations of infra-red spectra. Determination of C-H frequencies ($\sim 3000\text{ cm}^{-1}$) in paraffins and olefins, with some observations on “polythenes”. *Proc R Soc London A* 175, 208–233.
21. Flett MSC (1970). The theoretical basis of infrared spectroscopy. In: *An Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds*, ed. Scheinmann F, Vol. 1, Oxford: Pergamon Press, 109–122.
22. Alex S, Dupuis P (1989). FT-IR and Raman investigation of cadmium binding by DNA. *Inorg Chim Acta* 157, 271–281.
23. Mohan S, Madivanane R (1993). Laser Raman and infrared spectroscopic studies on 5-methyl cytosine. *Asian J Chem* 5, 243–246.
24. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR (2009). *Introduction to Spectroscopy*, 4th ed., Belmont: Brooks/Cole Cengage Learning.
25. Mello MLS (1997). Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet* 20, 257–264.
26. Vidal BC, Schlüter G, Moore GW (1973). Cell nucleus pattern recognition: influence of staining. *Acta Cytol* 17, 510–521. PMID: [4127772](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4127772/)
27. Vidal BC (1984). Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. *Biol Cell* 50, 137–146. PMID: [6204703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6204703/)
28. 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.

29. 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.
30. Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS (2014). Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem* 115, 1937–1947. doi: [10.1002/jcb.24865](https://doi.org/10.1002/jcb.24865) PMID: [24913611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24913611/)
31. Sambrook J, Russell DW (2006). Rapid isolation of mammalian DNA. *Cold Spring Harbor Protoc*
32. Vidal BC (2016). DNA crystals exhibit a twisted-grain-boundary-columnar (TGBC) texture. *Cytogenet Genome Res* (21st ICC Abstracts 2016) 148, 149.
33. Vidal BC, Mello MLS (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron* 42, 283–289. doi: [10.1016/j.micron.2010.09.010](https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010) PMID: [21134761](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21134761/)
34. Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T (2014). Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Expt Eye Res* 121, 26–34.
35. Cui Y, Cho IH, Chowdhury B, Irudayaraj J (2013). Real-time dynamics of methyl-CpG-binding domain protein 3 and its role in DNA demethylation by fluorescence correlation spectroscopy. *Epigenetics* 8, 1089–1100. doi: [10.4161/epi.25958](https://doi.org/10.4161/epi.25958) PMID: [23974971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23974971/)
36. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A (2003). A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys Chem* 104, 477–488. PMID: [12878315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12878315/)
37. Hembram KPSS, Rao GM (2009). Studies on CNTs/DNA composites. *Mat Sci Engin C* 29, 1093–1097.
38. Shimanouchi T, Tsuboi M, Kyogoku Y (1964). Infrared spectra of nucleic acids and related compounds. In: *Advances in Chemical Physics*, vol. 7, ed. Duchesne J, London: John Wiley & Sons Inc, 435–498.
39. Eglinton G (1970). Application of infrared spectroscopy to organic chemistry. In: *An Introduction to Spectroscopy Methods for the Identification of Organic Compounds*, ed. Scheinmann F., vol 1, Oxford: Pergamon Press, 129, 139.
40. Yugami H, Shibayama Y, Matsuo S, Ishigame M, Shin S (1996). Proton sites and defect-interactions in SrZrO₃ single crystals studied by infrared absorption spectroscopy. *Solid Sta Ionics* 85, 319–322.
41. Mathlouthi M, Seuvre AM, Koenig JL (1986). F.T.-I.R. and laser-Raman spectra of cytosine and cytidine. *Carbohydr Res* 146, 1–13. PMID: [3955567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3955567/)
42. Walsh MJ, Fellous TG, Hammiche A, Lin WR, Fullwood NJ, Grude O et al. (2008). Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO₂- modifications as a marker of the putative stem cell region of human intestinal crypts. *Stem Cells* 26, 108–118. doi: [10.1634/stemcells.2007-0196](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0196) PMID: [17901405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17901405/)
43. Nafisi S, Sobhanmanesh A, Alimoghaddam K, Ghavamzodeh A, Tajmir-Riahi HA (2005). Interaction of arsenic trioxide As₂O₃ with DNA and RNA. *DNA and Cell Biol* 24, 634–640.
44. Tajmir-Riahi HA, Ouameur AA, Hasni I, Bourassa P, Thomas TJ (2012). Probing DNA and RNA interactions with biogenic and synthetic polyamines. In: *Methods for Studying Nucleic Acid/Drug Interactions*, ed. Wanunu M., Tor Y., Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Supporting Information



S1 Fig. Baseline-corrected raw FT-IR spectral profiles for DNA from untreated (A), 1 mM VPA-treated (B) and 20 mM VPA-treated (C) HeLa cells. X axis, wavenumbers in cm^{-1} ; Y axis, absorbances (A).

Manuscrito em preparação:

Valproic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate active DNA demethylation elements in HeLa cells

Giovana Maria Breda Veronezi¹, Marina Barreto Felisbino¹, Maria Silvia Viccari Gatti², Wirla M. S. C. Tamashiro², Maria Luiza Silveira Mello¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brazil

²Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author: Maria Luiza Silveira Mello, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), 13083-862, Campinas, SP, Brazil. E-mail: mlsmello@unicamp.br

Abstract

Valproic acid (VPA), a histone deacetylase inhibitor, and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR), a DNA methyltransferase 1 (DNMT1) inhibitor, have been recently described to promote active DNA demethylation in several cell types. Decrease in 5-methylcytosine (5mC) levels was detected in VPA-treated HeLa cells, influencing its chromatin remodeling. In this work, we investigated the extensions of epigenetic changes induced by VPA on this cell type and whether or not VPA and 5-aza-CdR treatments would affect key components of the active DNA demethylation in it. Analysis of 5mC and histone H3 acetylation (H3Ac) abundance revealed that, after VPA withdrawal, the DNA hypomethylation caused by this drug persisted for a longer time period than that required for H3 hyperacetylation before it became fully reversed. Increase in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) marks was found in both VPA and 5-aza-CdR treated cells concomitant to 5mC decrease, although no changes were detected in other cytosine derivatives like 5-carboxylcytosine (5caC) and 5-formylcytosine (5fC). Additionally, profound changes were detected in the gene expression and protein levels of DNMT1 and the ten-eleven-translocation proteins (TET) 1 and 2 although not in a similar way. TET2 seems to play an important role in VPA-induced 5hmC increase, while 5-aza-CdR treatment led to down-regulation of this protein. Mitotic catastrophe evaluation was also performed to corroborate the results on effects of these drugs upon DNMT1. Present findings demonstrated that VPA may elicit long-standing epigenetic effects in HeLa cells and trigger changes upon 5mC and 5hmC levels similarly to 5-aza-CdR, although by influencing divergent pathways.

Introduction

The methylation of cytosine on its carbon 5, forming the 5th DNA base, 5-methylcytosine (5mC), is among the most studied epigenetic modifications (Widschwendter, 2007; Kulis & Esteller, 2010). In mammals, this process is mediated by the maintenance DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and *de novo* DNMTs 3A and 3B. DNA methylation displays an important role in diverse processes such as genomic imprinting, chromosome X inactivation and heterochromatin formation (Law & Jacobsen, 2010; Rountree & Selker, 2010). It is also deeply altered in human cancers, where, among possible changes, aberrant hypermethylation of some tumor suppressor gene promoters may be triggered, leading to these genes' silencing (Jones & Baylin, 2002; 2007).

For a long period of time, DNA methylation was considered an epigenetic mark of high stability (Piccolo & Fisher, 2014). Changes on its levels were mainly explained by passive process dependent on DNA replication, due to inhibition of DNMTs. However, events that could not be explained by this model, such as waves of global 5mC loss during the early stages of embryonic development, already suggested that additional demethylating mechanisms might exist (Wu & Zhang, 2010; 2014).

The discovery of the 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) in mammalian genomes and the ten-eleven-translocation (TET) enzymes opened a new chapter in DNA methylation history (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani et al., 2009; Guo et al., 2011). The TET family, which comprises TET1, TET2 and TET3, has the ability of oxidizing 5mC into the cytosine derivatives 5-carboxylcytosine (5caC) and 5-formylcytosine (5fC), besides 5hmC (Ito et al., 2010; 2011). DNA-repair machineries can act upon these derivatives, restoring the unmodified cytosine and completing the so-called process of active DNA demethylation (Pastor et al., 2013; Schuermann et al., 2016).

There are drugs with the ability to directly or indirectly inducing DNA demethylation. The cytosine analogs 5-azacytidine (5-aza-CR) and 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR) are classical inductors of passive DNA demethylation that act by inhibiting DNMT1 activity and reducing its protein levels (Ghoshal et al., 2005; Datta et al., 2009). Due to their epigenetic action, 5-aza-CR and 5-aza-CdR are FDA-approved drugs for the treatment of myelodysplastic syndroms (MDS) in humans and show potential to be used therapeutically in several leukemias but not in solid tumors (Ghoshal & Bai, 2007).

Other components found capable to influence DNA methylation are histone deacetylase inhibitors (HDACi), including valproic acid (VPA). VPA is a short chain fatty acid primarily used as organic solvent and later on as a well-established antiepileptic drug (Burton, 1882; Perucca, 2002; Chateauvieux et al., 2010). In therapeutic dosages indicated for epilepsy (0.3 – 0.7 mM), VPA also acts as inhibitor of class I histone deacetylases (HDACs) (Göttlicher et al., 2001; Lagace & Nachtigal, 2004; Felisbino et al., 2011, 2014). In some cell types it promotes DNA demethylation (Detich et al., 2003; Dong et al., 2010; Tabolacci et al., 2008; Tung & Winn, 2010; Veronezi et al., 2017).

The great novelty regarding functions of both HDAC and DNMT inhibitors was the discovery that, besides their consolidated mechanisms of action, these drugs may also act upon active DNA demethylation pathways. Identification of changes in cytosine derivatives levels in response to 5-aza-CR and 5-aza-CdR have already been described, while for VPA and for another HDACi, trichostatin A (TSA), studies were focused on the DNA replication-

independence of the drug-induced DNA demethylation (Cervoni & Szyf, 2001; Detich et al., 2003; Ou et al., 2007; Chowdhury et al., 2015; Sajadian et al., 2015; Manzoni et al., 2016).

In HeLa cells, in which VPA effects have been extensively studied by our research group, occurrence of DNA demethylation in response to VPA treatment has been identified, and shown to contribute to the chromatin remodeling previously reported (Felisbino et al., 2011; Veronezi et al., 2017). Moreover, besides alterations in DNA methylation are reversible, they are more stable than histone acetylation effects, and long-term consequences to the cellular programs could be induced by VPA exposure (Milutinovic et al., 2007).

In this study, the amplitude of VPA-induced epigenetic changes, as well as the influence of VPA and 5-aza-CdR treatments on active DNA demethylation elements were investigated in HeLa cells. Our objective was to obtain a better understanding on how these drugs may elicit alterations in the dynamic and intricate DNA methylation regulatory pathways of this aggressive tumor cell line.

Results

In addition to short-termed histone hyperacetylation, VPA induces long-standing epigenetic alterations involving DNA methylation

The exposure of HeLa cells to 1 mM and 20 mM VPA concentrations for a period of 4 h promoted a progressive and drastic increase in histone H3 acetylation in comparison to the untreated control (Fig 1A, B). Concomitantly, a reduction in global DNA methylation was observed in amounts comparable to those promoted by 5-aza-CdR (Fig 1C).

Aiming to investigate the durability of the VPA-induced alterations, cells treated with the lower drug concentration were returned to a culture medium without VPA and analyzed for the same parameters as the 4 h-treated cells. Interestingly, the abundance of the H3Ac marks was totally reversed in the first 24 h under this treatment, while the 5mC levels still remained decreased. In turn, a 48-h-period in the absence of the drug was enough to bring methylation to levels similar to those of the untreated control (Fig 1B, C).

Increase in abundance of the active DNA demethylation intermediate 5hmC occurred after VPA or 5-aza-CdR treatment

Given that the above-mentioned 5mC loss was induced by VPA in a short time

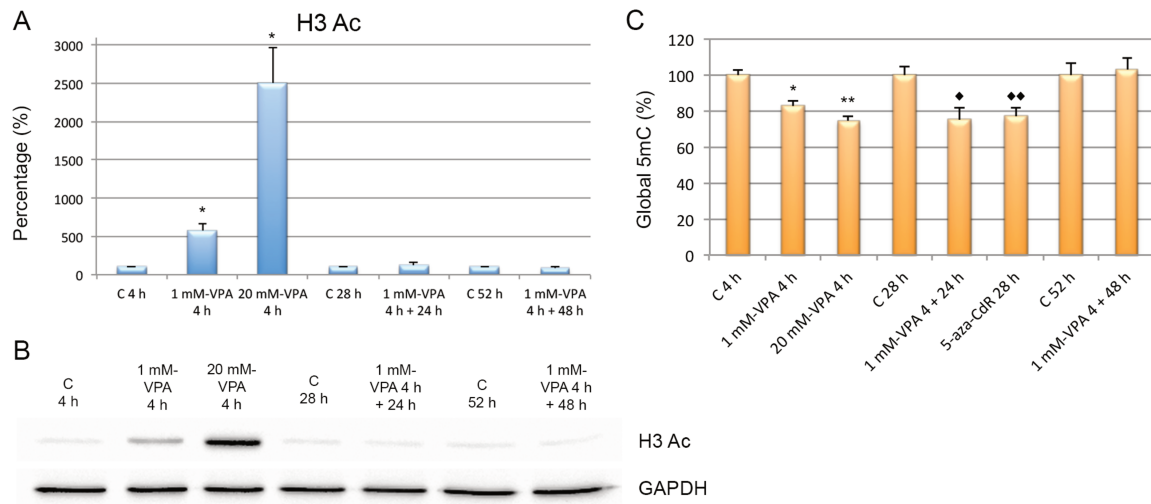


Figure 1. Histone H3 acetylation and DNA methylation in HeLa cells. Increase in H3Ac abundance was induced by 4 h-VPA treatments compared to control and rapidly reversed after drug withdraw, as revealed by Western blotting analysis (A, B). Histone acetylation values were normalized in relation to GAPDH (endogenous control). Global 5mC levels were reduced after 4 h-VPA and 28 h-5-aza-CdR exposures (C). Decrease in 5mC amounts after treatment with 1 mM VPA for 4 h was maintained after another 24-h-treatment in the absence of the drug but not after 48 h, when it became similar to the 52-h-untreated control (C). Student's t-test indicated significant difference at $P < 0.05$ (*) or ♦) and at $P < 0.01$ (**) or ♦♦) for treatments compared to 4 h (*) or 28 h (♦) controls.

period (4 h), it was next investigated whether this drug could affect the 5hmC global levels, which are related to active demethylation pathways, in parallel to the 5-aza-CdR action. Using confocal microscopy, signals revealing this mark appeared as a grainy distribution all over the cell nucleus, except in the nucleolar regions (Fig 2A, B). A higher coverage of the nuclear area by 5hmC signals and increase on its fluorescence intensity were detected after 4 h-VPA and 28 h-5-aza-CdR treatments, compared to their respective controls (Fig 2A, B). Image capture was performed under the same exposure conditions for all treatments, allowing a better comparison between them. 3D graphs from representative images were plotted using the Image J software to demonstrate the changes seen in the 5hmC profile (Fig 2A, B).

Drug exposure did not elicit visually detectable changes on 5caC and 5fC abundance or distribution.

The 5mC derivatives 5caC and 5fC were also investigated using immunofluorescence

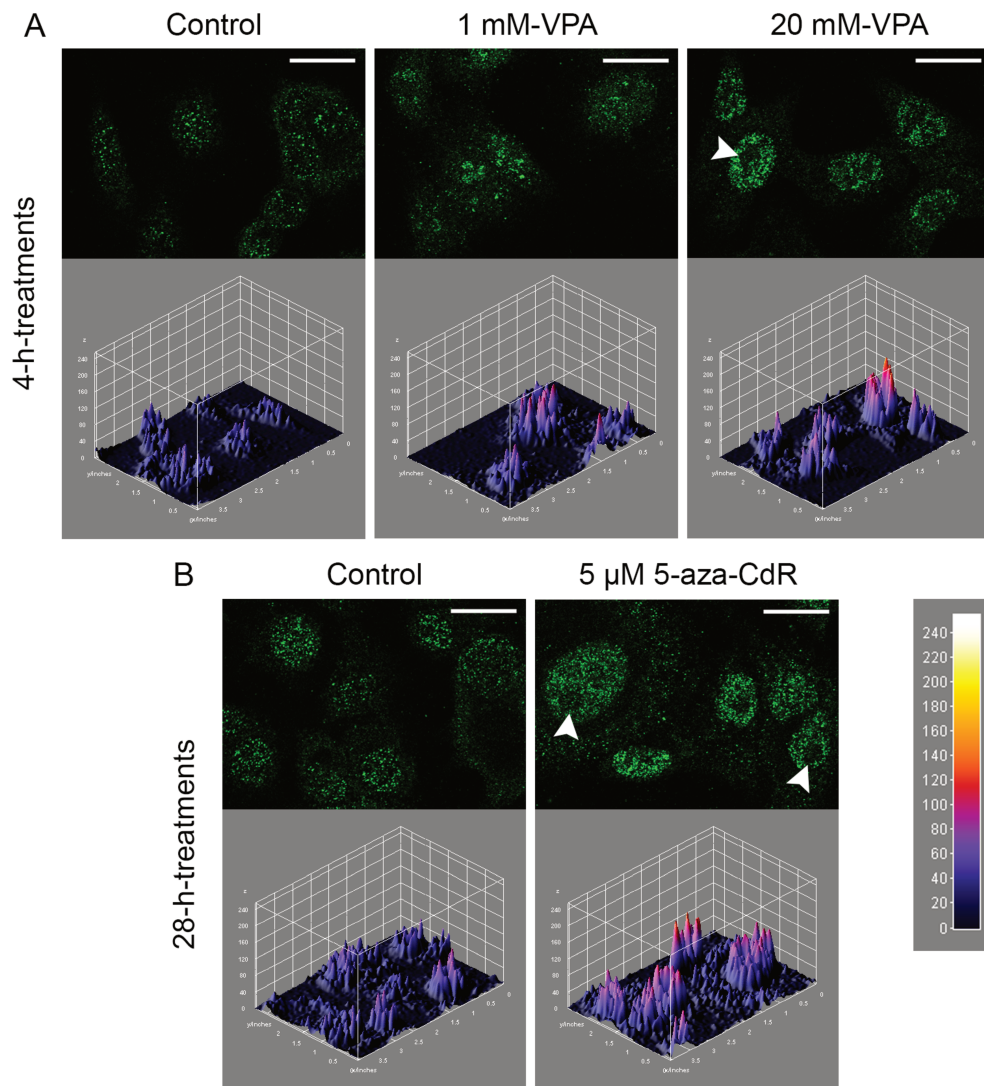


Figure 2. 5hmC signals for HeLa cells after VPA and 5-aza-CdR treatments. Both 4-h-VPA and 28-h-5-aza-CdR treatments induced increased 5hmC abundance in HeLa nuclei compared to 4-h and 28-h untreated controls, respectively (A, B). Absence of 5hmC marks was observed in nucleolar regions (arrows). 3D graphs plotted from the respective representative images revealed fluorescence intensity based on an 8-bit intensity scale (0–255). Scale bars correspond to 20 μ m.

approaches. Since 5hmC was found altered after VPA and 5-aza-CdR exposure, it was suspected that 5caC and 5fC marks could be affected as well. In both control and treated cells, 5caC and 5fC signals were found homogeneously distributed all over the nuclei (Fig 3A, B). Regarding fluorescence intensity, no differences in relation to the untreated control were observed upon drug treatments, when comparable representative images (captured under the same parameters, independent on each modification) were 3D-analysed (Fig 3A, B).

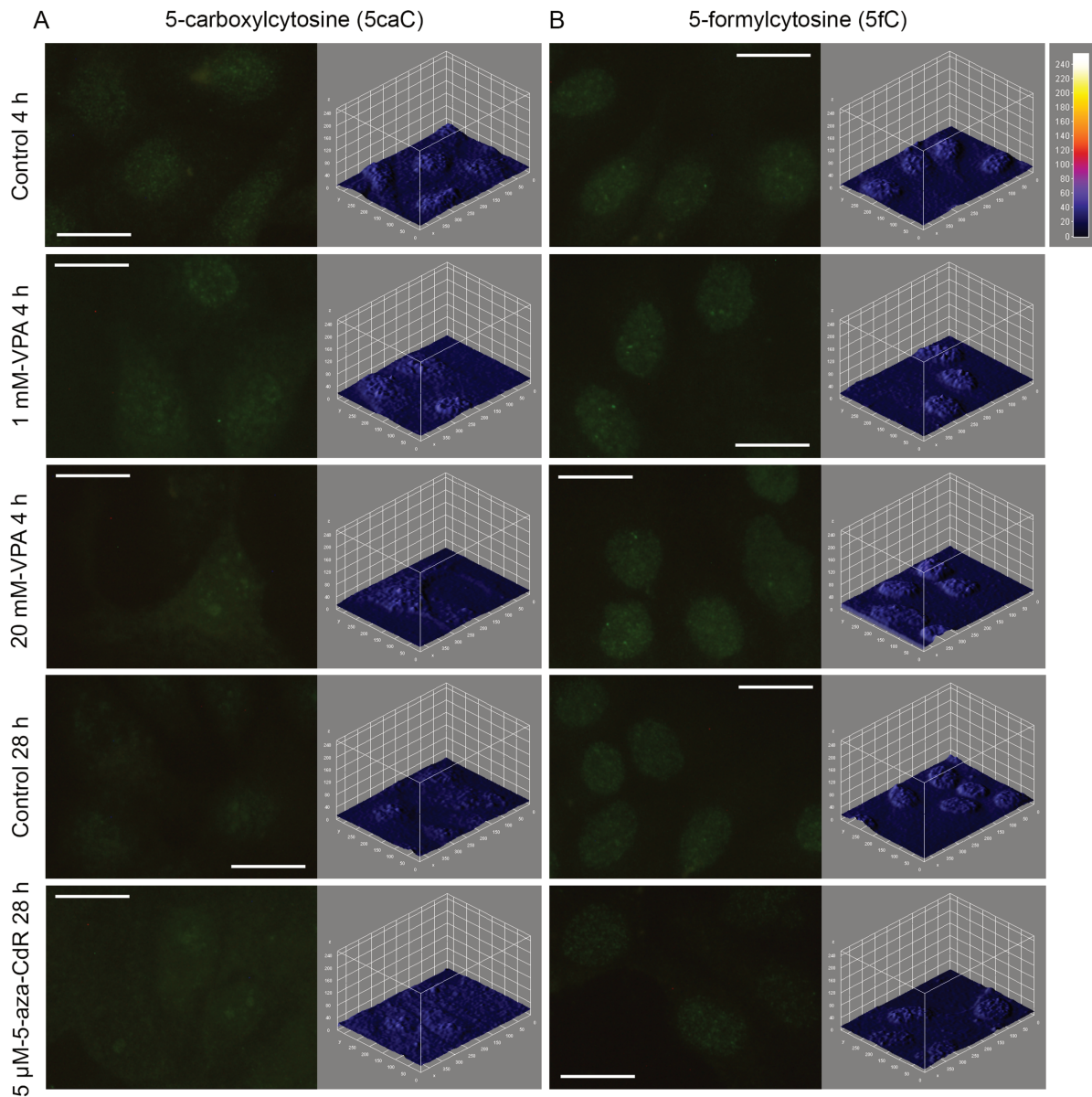


Figure 3. 5caC and 5fC abundance in HeLa cells treated with VPA and 5-aza-CdR. No change in the abundance of the cytosine derivatives 5caC and 5fC were noticed for VPA- and 5-aza-CdR-treated cells in comparison to respective control. For each representative image, a 3D graph was plotted representing fluorescence intensity, with values according to an 8-bit intensity scale (0–255). Scale bars equal 20 μm .

The gene expression of key proteins from the cytosine methylation and demethylation pathways was affected by VPA and 5-aza-CdR

The results presented so far pointed out a role for the HDAC inhibitor VPA and the classic passive demethylator 5-aza-CdR on inducing active DNA demethylation processes in HeLa cells. Supporting this assumption, these drugs were found to modulate the gene

expression of three enzymes directly involved in cytosine derivatives dynamics, DNMT1, TET1 and TET2.

The mRNA expression of the protein DNMT1, which is involved in DNA methylation maintenance, was significantly reduced after lower and higher VPA dosages of 4-h-treatments but not by 5-aza-CdR, compared to control (Fig 4A). All the analyzed treatments led to a significant decrease in TET1 mRNA levels in comparison to untreated cells (Fig 4B). This finding was unexpected since TET1 gene is already very low expressed in tumor cells (Yang et al., 2013). On the other hand, it was found a clear increase in TET2 gene expression after a 20 mM 4-h-VPA treatment, in contrast to an also significant decrease of the mRNA levels of this enzyme induced by 5-aza-CdR, relative to their respective controls (Fig 4C). Considering the results for the cells treated with 1 mM VPA for 4 h, the TET2 mRNA expression remained unchanged (Fig 4C).

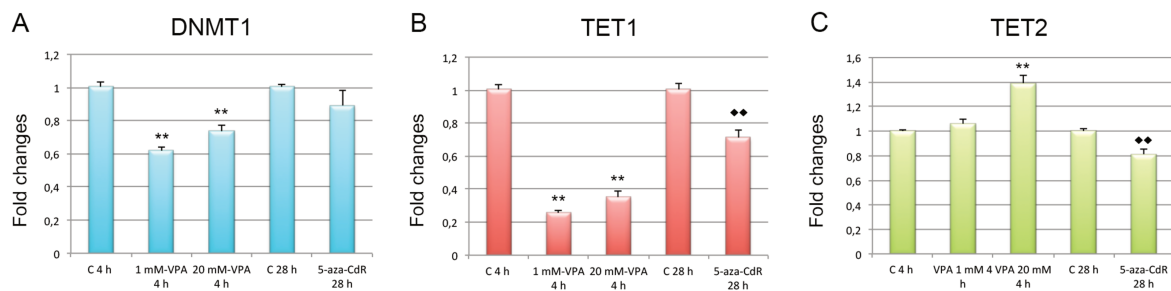


Figure 4. Gene expression of DNMT1, TET1 and TET2 in HeLa cells after drug exposures. DNMT1 gene expression in comparison with the respective control decreased after 4 h-VPA treatments but was not affected by 5-aza-CdR (A), while TET1 gene was downregulated in response to both VPA and 5-aza-CdR treatments (B). Regarding TET 2, gene expression was unaltered after a 1 mM-VPA treatment for 4 h, but highly increased after a 20 mM-VPA treatment for the same time period and decreased in response to 5-aza-CdR, compared to the untreated controls (C). Data were obtained from RT-PCR analysis and normalized to H3F3A endogenous control. Differences significant at $P < 0.01$ (** or ♦♦) for treatments in comparison to 4 h (*) or 28 h (♦) controls were assessed by Student's t-test.

VPA and 5-aza-CdR differentially impacted the protein levels of DNMT1 and TET2

Determination of the DNMT1 and TET2 abundance was carried out by Western blotting to complement their gene expression analysis. 5-aza-CdR treatment significantly reduced the amounts of DNMT1 protein in relation to the untreated control (Fig 5A, C). No

significant changes, however, were found for DNMT1 protein abundance after 4 h-VPA exposures compared to the untreated cell condition (Fig 5A), thus contrasting with the gene expression data obtained for this enzyme (Fig 4A). Moreover, in cells treated for 4 h with the 20 mM VPA dosage, a tendency of DNMT1 amounts to be even increased in comparison to the control was shown, although not supported statistically at $P_{0.05}$ level (Fig 5A).

Concerning TET2 enzyme, despite no statistical significance was obtained for comparison of any of the analyzed conditions, a strong tendency of its protein levels to be progressively increased after 4 h-VPA treatments and decreased upon 5-aza-CdR exposure was observed (Fig 5B, D). This finding is in agreement with mRNA expression pattern described in the previous section.

An increase in mitotic catastrophe rate occurred in 5-aza-CdR- but not in VPA-treated cells.

Because mitotic catastrophe is intimately related to depletion of DNMT1 in tumor cells (Chen et al., 2007), this phenomenon was evaluated in both treated and untreated cells. 5-aza-CdR exposure led to a higher frequency of mitotic catastrophe than its respective control. However, the same was not observed after the 4 h-VPA treatments, when the mitotic catastrophe indices remained very similar to those observed for untreated cells (Fig 5E).

Additional mitotic figures were also analyzed (Fig S1). Mitotic ratio and abnormalities were not affected by any of the drugs treatments. Compared to control cells, apoptotic ratios and the nuclear instability ratio (NIR), which was considered as the summation of apoptosis, mitotic catastrophe, giant nuclei and abnormal mitosis, were found significantly increased only in 1 mM 4 h-VPA treatment and 5-aza-CdR treatment, respectively (Fig S1, S2).

Discussion

Several studies have proposed that VPA could affect DNA methylation in addition to its well-established HDACi action (Detich et al., 2003; Milutinovic et al., 2007; Dong et al., 2010; Wang et al., 2010; Tremolizzo et al., 2012). In HeLa cells, global DNA demethylation in response to VPA has already been identified, influencing the DNA FT-IR spectral signature and contributing to chromatin remodeling processes (Felisbino et al., 2011; Veronezi et al., 2017). The present work extended these data by demonstrating that the 5mC loss induced by VPA is maintained for a longer period of time than that required for histone H3

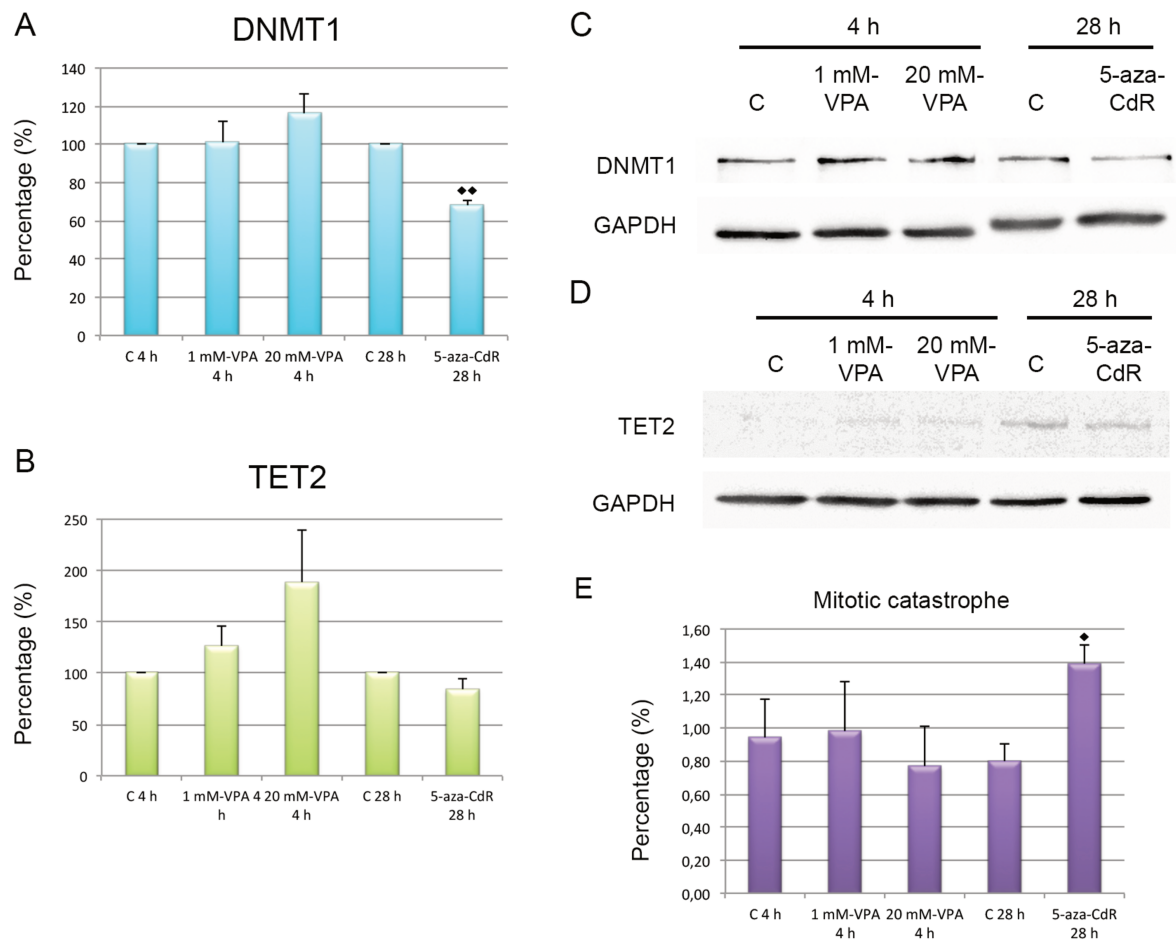


Figure 5. DNMT1 and TET2 protein abundance and mitotic catastrophe ratio in VPA- and 5-aza-CdR-treated HeLa cells. Western blot analysis showed DNMT1 protein levels altered only by 5-aza-CdR treatment, which decreased in comparison to untreated control (A, C). No significant differences were observed for TET2 protein levels in any of the treatments, although a strong tendency to increase was showed in response to a 4 h-VPA exposure at 1 mM and 20 mM concentrations (B, D). GAPDH was used as the loading control. Mitotic catastrophe ratio was found significantly increased after 5-aza-CdR treatment but unaltered after VPA treatment when compared to untreated controls (E). Differences significant at $P < 0.05$ (* or ♦) and $P < 0.01$ (** or ♦♦) for treatments in relation to 4 h (*) or 28 h (♦) controls were detected. Student's t test was performed for Western blotting analysis and Anova was used for comparison of mitotic ratio.

hyperacetylation and persisted for at least 24 h in the absence of the drug. This is in accordance with the prediction that the influence of VPA over DNA methylation could bring about long-term consequences to the gene expression program besides those initially and transiently induced by changes in histone acetylation profile (Milutinovic et al., 2007).

Regarding the DNA demethylation phenomenon, it is of great interest to investigate the mechanisms by which this process occurs. The major mechanisms currently understood are divided into passive or active pathways, which are dependent or not to the DNA-replication, respectively (Piccolo & Fisher, 2014). A role on active DNA demethylation has been suggested for HDACis such as VPA and TSA (Cervoni & Szyf, 2001; Detich et al., 2003; Ou et al., 2007), although little is known about the relation between these drugs and cytosine derivatives (5hmC, 5caC, 5fC) or TET enzymes. Although the nucleoside analogs 5-aza-CR and 5-aza-CdR are classical passive demethylating agents, they have also been newly reported to participate on active DNA demethylation processes. Increase in the cytosine derivative 5hmC concomitant to DNA hypomethylation was detected in hepatocellular cancer cells (HCC) in response to 5-aza-CR treatment and in human leukemia cells exposed to 5-aza-CdR (Chowdhury et al., 2015; Sajadian et al., 2015).

The increased 5hmC levels detected here in HeLa cells are supported by Chowdhury et al.'s findings (2015) regarding 5-aza-CdR treatment and represent a novelty for VPA action, corroborating its influence on active DNA demethylation pathways. In relation to the other cytosine derivatives analyzed, the fact that global levels of 5caC and 5fC were not found altered after these drugs treatment does not mean that they cannot be affected. Given the naturally low abundance of these marks, more sensitive techniques to detect alterations in-between them may be required (Pastor et al., 2013; Thomson et al., 2013).

The effects of 5-aza-CdR over DNMT1 enzyme are widely studied and understood. The lack of influence of this drug on DNMT1 expression but consequent diminishment of its protein levels as observed here is consistent with the established mechanism of action of this drug. 5-aza-CdR promotes passive DNA demethylation not by reducing DNMT1 gene expression but by irreversibly binding to the DNMT1 protein itself and directing it to proteasome degradation (Datta et al., 2009; Ramos et al., 2015). The increase in mitotic catastrophe ratio with 5-aza-CdR treatment as seen in this study corroborated the DNMT1 protein abundance findings, once it is a phenomenon related to DNMT1 depletion (Chen et al., 2007).

Regarding 4 h-VPA treatments, the fact that mitotic catastrophe was found unchanged in HeLa cells suggests that the DNMT1 protein abundance is indeed maintained similarly to the level detected for the untreated control, despite the decrease on DNMT1 gene expression. The effects of VPA on DNMT1 are very contradictory. In human lens epithelial cells, where VPA-dependent DNA demethylation has also been demonstrated, DNMT1 presented increase in gene expression but decrease in protein amounts (Palsamy et al., 2014). In breast cancer

cells, a depletion of DNMT1 was observed in response to VPA in both mRNA and protein levels (Marchion et al., 2005). All these studies, however, refer to much longer drug treatments, varying from 2 to 3 days long. Perhaps a 4-h treatment was not sufficient to reflect DNMT1 protein alterations or current results are a particular feature of HeLa cells in response to VPA.

TET proteins, as well as 5hmC, are present at very low levels within human tumor cells, with TET1 usually appearing more down-regulated than TET2 and 3 (Yang et al., 2013). Given this information and the fact that 5hmC levels were found here to be increased in treated-HeLa cells, the decrease in TET1 gene expression in response to both VPA and 5-aza-CdR was a completely unexpected finding. However, in a recent study where TET1 depletion was induced in colorectal cancer cells, any significant changes in 5hmC abundance has been reported (Kai et al., 2016). This suggests that non-elucidated compensation mechanisms may be acting in these cases.

On the other hand, our data suggest that TET2 may play an important role in VPA-induced 5hmC increase due to the remarkable up-regulation of the TET2 gene expression after a higher VPA concentration (20 mM) for 4 h. This suggestion was also supported by a strong tendency of protein levels to increase in both 1 mM and 20 mM VPA treatments for 4 h, besides the absence of significant statistical difference. Additional repetitions of Western blotting analysis for TET2 are required to confirm this finding. Up-regulation of TET2 and increase in abundance of cytosine derivatives have also been found in HCC and human skin fibroblasts in response to 5-aza-CR (Sajadian et al., 2015; Manzoni et al., 2016). Interestingly, despite 5-aza-CR sharing many structural and functional similarities with 5-aza-CdR, the latter led to an opposite effect over TET2, which was decreased in terms of gene expression and unaltered in terms of protein levels.

Although the down-regulation of both TET1 and TET2 by 5-aza-CdR concomitant to increase in 5hmC abundance in HeLa cells seems controversial, it may be explained by the recently proposed model that TETs may have higher affinity to hemi-methylated CpG dinucleotides. Thus, by generating hemi-methylated DNA strands due to inhibition of DNMT1, 5-aza-CdR would lead to a higher recruitment of TET enzymes to DNA, allowing it to alter 5hmC, 5scC and 5fC amounts despite any changes in TET protein or mRNA levels (Chowdhury et al, 2015).

In conclusion, this work demonstrated the ability of VPA and 5-aza-CdR to influence active DNA demethylation processes in HeLa cells. Besides both drugs induce increased 5hmC levels, each one seems to trigger it by different mechanisms, which may include

elements of passive DNA demethylation as well. Additional investigations are required to better elucidate the TET2 response to VPA and the effects of these drugs upon 5fC and 5caC, but no doubt remains about the high dynamicity of VPA and 5-aza-CdR actions.

Material and methods

Cell culture

HeLa cells acquired at passage 126 from the Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brazil), which originally purchased them from ATCC CCL-2 (Manassas, USA), were used in passages 205-230. They were kept at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere and grown in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) (Sigma®, St Louis, USA), with addition of 10% bovine calf serum (FCS) (Nutricell®, Campinas, Brazil) and penicillin/streptomycin (Sigma®) (100 UI and 100 µg/mL, respectively).

For mitotic analysis and immunofluorescence, cells were seeded in 24-well plates over round coverslips at the concentration of 5×10^4 cells/mL. For protein, DNA and RNA extraction, the cells were cultured at a concentration of 1.5×10^5 cells/mL in 6-well plates. After a 24-h cultivation in complete medium (10% FCS), treatments were performed in 1% FCS medium. The cells were treated with valproic acid (VPA) (Sigma®) at the concentrations of 1 mM or 20 mM for 4 h, and 5-aza-CdR (Millipore® Billerica, USA) at 5 µM for 28 h. For assessment of 5mC and H3Ac levels, replacement of the medium after 1mM-VPA treatment for a medium without the drug, and maintenance of the cells under this condition for another 24 h (4 h + 24 h) and 48 h (4 h + 48 h) were undertaken. The same processes were performed for controls in the absence of the drugs.

Western blotting

Total protein extraction was performed for cells using RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 1 mM EDTA; 0.5 mM EGTA and 1 mM PMSF) for at least 30 min on ice. The protein amounts of the samples were quantified using the Nanodrop equipment. An amount corresponding to 40 µg of protein was loaded into SDS-PAGE of different percentages, each one for separation of a specific protein of interest (17% for H3Ac, 8% for DNMT1 and a gradient 4 – 10% for TET2), and next transferred to nitrocellulose membrane (Applied Biosystem®). The

membranes were blocked for 2 h and then incubated, separately, with the corresponding primary antibody: anti-H3Ac (Millipore®) (1:1000), anti-DNMT1 (Cell Signaling Technology®, Danvers, USA) (1:1000) and TET2 (Cell signaling®) (1:1000), in blocking solution at 4°C, overnight. After extensive washes, the membranes were incubated with the secondary antibody anti-rabbit conjugated to peroxidase (Chemicon®, Billerica, USA) (1:5000) in blocking solution for 2 h, followed by several washes.

Protein blots were detected using the ECL Western blotting detection system (Amersham®, Pittsburgh, USA) at the Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas (Brazil). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as loading control. The ratios between H3Ac, DNMT1, TET2 and GAPDH were obtained using the ImageJ software.

5-methylcytosine (5mC) quantification

Genomic DNA was extracted from cells using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) and quantified using the Nanodrop 2000 equipment (Thermo Scientific®, Carlsbad, USA). Concomitant to the concentration analysis, a 260/280 nm ratio of approximately 1.8 was found for the samples, indicating extraction purity, according to the manufacturer.

Equal amounts of the extracted DNA (100 ng) were used per sample into the 5-Methylcytosine DNA ELISA Kit (Zymo®, Irvine, USA). The quantification of 5mC amounts was performed according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence assays

Cells adherent to round glass coverslips were fixed in absolute methanol at -20°C for 10 min, rinsed in phosphate saline buffer (PBS) and subjected to a 30 min-acid hydrolysis treatment in 2 M HCl solution at 37°C. After two washes in borate buffer (100 mM boric acid, 75 mM NaCl and 25 mM sodium tetraborate, pH 8.5) the preparations were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for another 30 min. Next, the cells were incubated with primary antibodies anti-5-hmC (Active Motif®, Carlsbad, USA) (1:2000), anti-5caC (Diagenode®, Liege, Belgium) (1:500) or anti-5fC (Active Motif®) (1:500) in blocking solution for 1 h, at room temperature and protected from light, followed by extensive PBS washes and incubation with secondary antibody goat anti-rabbit Alexa 488-conjugated (Life

Technologies® Carlsbad, USA) (1:1000) in the dark. For 5caC and 5fC analysis, nuclei were counterstained with DAPI (Sigma®), while in preparations for 5hmC TOPRO-3 (Life Technologies®) was used.

5hmC samples were analyzed in a Leica TCS SP5 II confocal microscope (Wetzlar, Germany), at the Central Laboratory of High Performance Technologies (LaCTAD) of the University of Campinas (Brazil). For 5caC and 5fC analysis, an Olympus BX60F5 fluorescence microscope (Tokyo, Japan) and QCapture and Image Pro-Plus softwares were used. Images were captured for each condition under identical parameters and analyzed using the Interactive 3D surface plot plugin from ImageJ software (NIH, Bethesda, USA).

Quantitative real-time RT-PCR

For gene expression analysis, the cells were subjected to total RNA isolation using the RNeasy mini kit (Qiagen®) followed by cDNA production using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems®, Carlsbad, USA). Nanodrop equipment assessed the quality of the isolated RNA. The RT-PCR reaction plates were prepared using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), the produced cDNA and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems®) for DNMT1 (Hs00945875_m1), TET1 (Hs00286756_m1), TET2 (Hs00325999_m1) and H3 Histone Family Member 3A, H3F3A, (Hs02598544_g1) as endogenous control. The PCR reaction was conducted on the Applied Biosystems 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems®) and the cycle threshold (Ct) values were calculated based on experiments done in triplicate and normalized with respect to the endogenous control gene H3F3A.

Analysis of mitotic parameters

Mitotic catastrophe indices as well as the frequency of apoptosis, giant nuclei, mitotic ratio and chromosome abnormalities (tripolar spindle, chromosome bridging, lagging chromosomes) were assessed in samples subjected to the Feulgen reaction and counterstained with acid fast green. The Feulgen reaction was performed as previously described for HeLa cells fixed in an absolute ethanol-glacial acetic acid (3:1, v/v) solution for 1 min followed by three washes in 70% ethanol and air-dried (Felisbino et al., 2011). Acid hydrolysis was performed with 4 M HCl for 1 h at 25°C (Mello, 1997). Counterstaining was performed in 3% fast green acetic acid solution, followed by a 3% acetic acid rinsing and air-

drying. The preparations were mounted in Canada balsam. Nearly 2000 cells were analyzed for each sample, in triplicate.

Supporting information

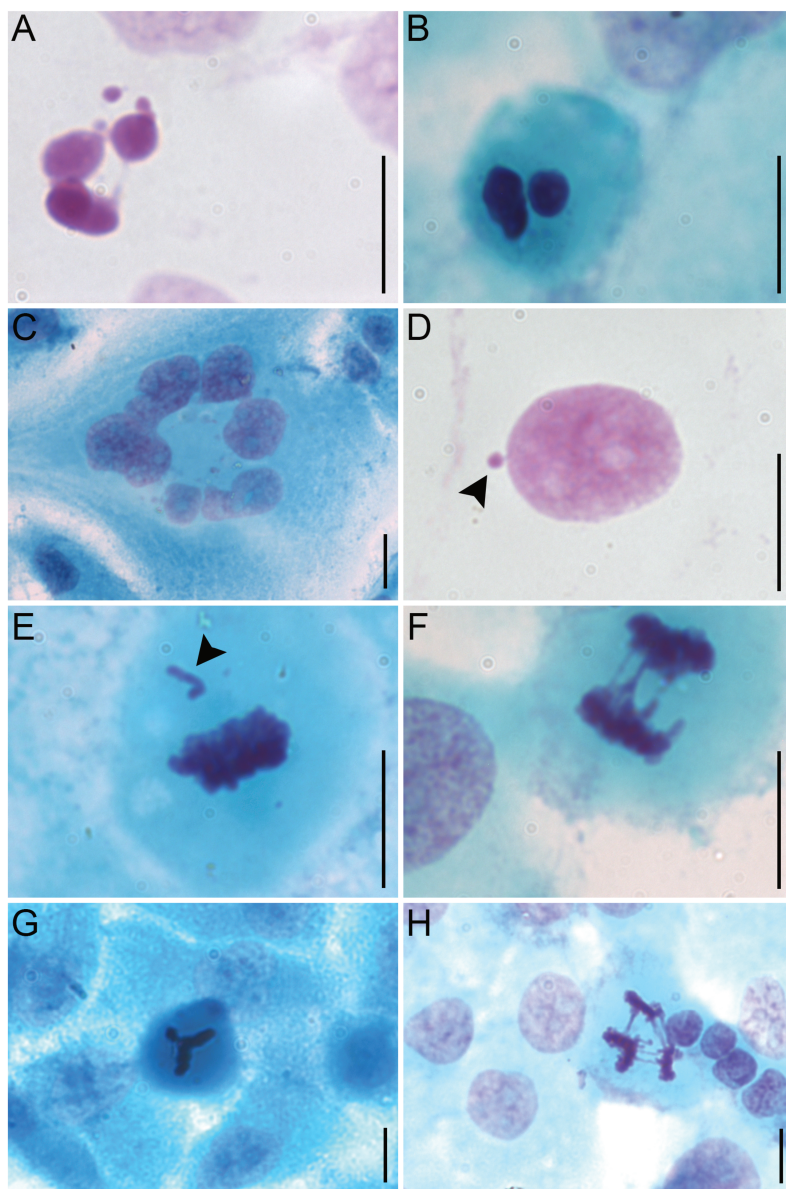


Figure S1. Light microscopy images of cell death, micronucleation and mitotic abnormalities in HeLa cells. Apoptosis (A, B), mitotic catastrophe (C), micronucleus (D – arrow), lagging chromosome (E – arrow), chromosomal bridges (F, H) and tripolar spindles (G, H). The bars equal 10 μm .

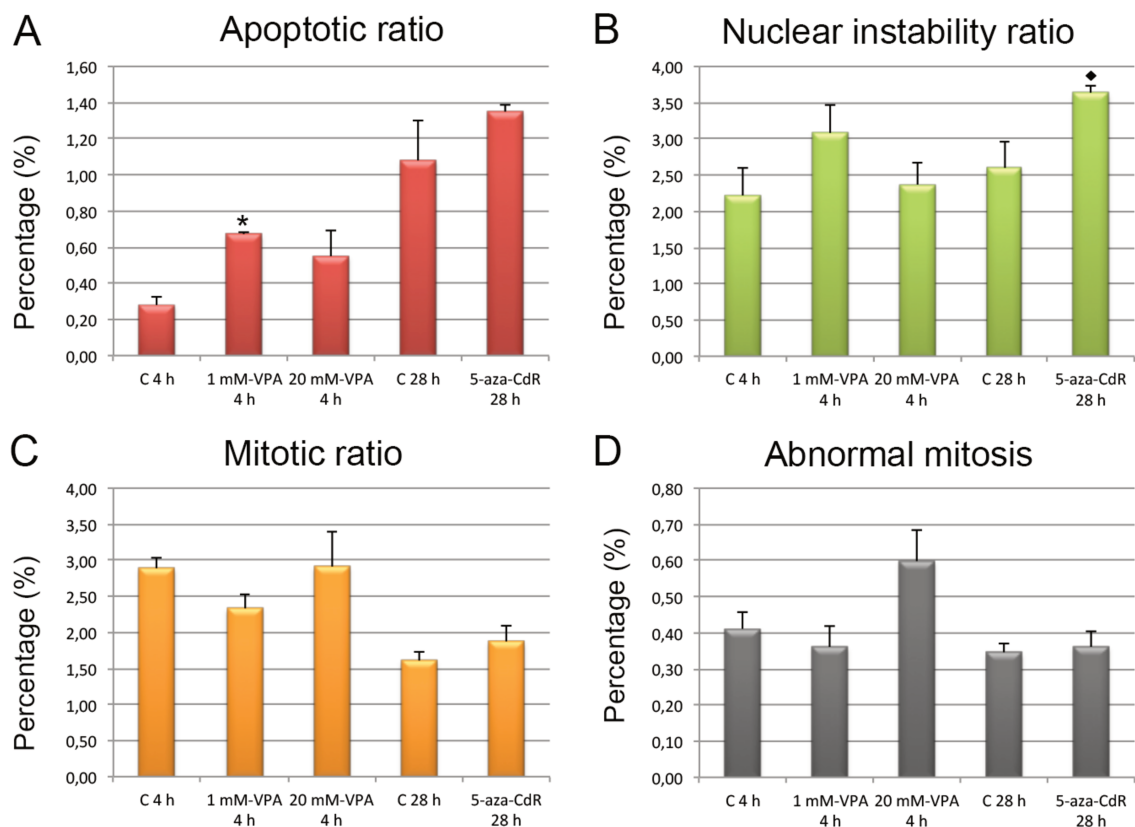


Figure S2. Apoptotic ratio, nuclear instability (NIR), mitotic ratio and abnormal mitosis indices in HeLa cells. Apoptosis was increased only in the 4-h-1 mM-VPA treatment in comparison to control (A). A higher NIR was observed after 5-aza-CdR exposure but remained unaltered for VPA treatments in comparison to untreated controls (B). No changes were observed in mitotic ratio or abnormal mitosis in any of the treatments. Anova test showed difference significant at $P < 0.05$ (*) or ♦) compared to 4-h (*) or 28-h (♦) controls.

Acknowledgements

This work was supported by the São Paulo state Research Foundation (FAPESP) (Proc. 2014/23842-0) and the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq) (Proc. 304668/2014-1). We are thankful to Dr. Shirlei M. Recco-Pimentel (Institute of Biology, Unicamp) for fluorescence image capture facilities at her laboratory, to Dr. Edson R. Pimentel (Institute of Biology, Unicamp) for allowing the use of equipment for making WB gradient gel, to Dr. Liana Verinaud (Institute of Biology, Unicamp) for the disponibility of the ELISA reader and to Dr. Thiago Alves da Costa (Institute of Biology, Unicamp) for assistance in the use of this equipment. We also thank Dr. Mateus Mondin (Department of Genetics, ESALQ/USP) for a generous supply of 5caC and 5fC antibodies, Dr. Hernandes F.

Carvalho (Institute of Biology, Unicamp) for allowing the use of the real-time PCR equipment and the Obesity and Comorbidities Research Center (Institute of Biology, Unicamp) for the availability of the chemiluminescence imaging equipment. We also thank Mrs. Camila B. M. de Oliveira for technical assistance in cell culture. No roles were displayed by the funders in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

References

- Burton B. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Am Chem J* 3: 385–395, 1882.
- Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276 (44): 40778-40787, 2001.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol pii* 479364, 2010.
- Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, Ueda Y, Li E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39 (3): 391-396, 2007.
- Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury S, Cho IH, Cooper B, Chevassut T, Lossie A, Irudayaraj. The hypomethylating agent decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Sci Rep* 5: 9281, 2015.
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob S. A new class of quinolone-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* 69 (10): 4277-4285, 2009.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278: 27586–27592, 2003.
- Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5 (8): 730-735, 2010.
- Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One* 6 (12): e29144, 2011.
- Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem* 115:1937–1947, 2014.

- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 5-aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25 (11): 4727-4741, 2005.
- Ghoshal K & Bai S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. *Drugs Today* 43 (6): 395-422, 2007.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969-6978, 2001.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-Hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 10 (16): 2662-2668, 2011.
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466 (7310): 1129-1133, 2010.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333 (6047):1300-1303, 2011.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3: 415-428, 2002.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128 (4): 683-692, 2007.
- Kai M, Niinuma T, Kitajima H, Yamamoto E, Harada T, Aoki H, Maruyama R, Toyota M, Sasaki Y, Sugai T, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. TET1 depletion induces aberrant CpG methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One* 11 (12): e0168281, 2016.
- Kriaucionis S, Heintz. The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons. *Science*. 324 (5929): 929-930, 2009.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70: 27-56, 2010.
- Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 279: 18851-18860, 2004.
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11 (3): 204-220, 2010.

- Manzoni EFM, Pennarossa G, deEguileor M, Tettamanti G, Gandolfi F, Brevini TAL. 5-azacytidine affects TET2 and histone transcription and reshapes morphology of human skin fibroblasts. *Sci Rep* 6: 37017, 2016.
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 59: 3815-3822, 2005.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinog* 28: 560–571, 2007.
- Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provençal N, Shikimi K, Karimi M, Ekström TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 73 (9): 1297-1307, 2007.
- Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T. Valproic acid supresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap 1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 121: 26-34, 2014.
- Pastor W, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (6): 341–356, 2013.
- Perucca E. Overtreatment in epilepsy: adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res* 52: 25-33, 2002.
- Piccolo FM, Fisher AG. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol* 24 (2): 136-143, 2014.
- Ramos MP, Wijetunga NA, McLellan AS, Suzuki M, Grealley JM. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics Chromatin* 8:11, 2015.
- Rountree MR, Selker EU. DNA methylation and the formation of heterochromatin in *Neurospora crassa*. *Heredity* 105 (1): 38-44, 2010.
- Sajadian SO, Ehnert E, Vakilian H, Koutsouraki E, Damm G, Seehofer D, Thasler W, Dooley S, Baharvand h, Sipos B, Nussler AK. Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma. *Clin Epig* 7 (98): 1-14, 2015.
- Schuermann D, Weber AR, Schär P. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair* 44: 92-102, 2016.

- 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: 738–741, 2008.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324 (5929): 930-935, 2009.
- Thomson JP, Hunter JM, Meehan RR. Deep C diving: mapping the low-abundance modifications of the DNA demethylation pathway. *Genome Biol* 14 (118) 1-4, 2013.
- Tremolizzo L, DiFrancesco JC, Rodriguez-Menendez V, Riva C, Conti E, Galimberti G, Ruffmann C, Ferrarese C. Valproate induces epigenetic modifications in lymphomonocytes from epileptic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39 (1): 47-51, 2012.
- Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 201–209, 2010.
- Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, Vidal BC. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. Accepted for publication in *PLoS One*, 2017.
- Wang Z, Xu L, Zhu X, Cui W, Sun Y, Nishijo H, Peng Y, Li R. Demethylation of specific Wnt/ β -Catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec* 293: 1947–1953, 2010.
- Widschwendter M. 5-methylcytosine – The fifth base of DNA: The fifth wheel on a car or a highly promising diagnostic and therapeutic target in cancer? *Dis Markers* 23 (1-2): 1–3, 2007.
- Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (9): 607-620, 2010.
- Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156 (1-2): 45-68, 2014.
- Yang H, Liu Y, Bai F, Zhang J-Y, Ma S-H, Liu J, Xu Z-D, Zhu H-G, Ling Z-Q, Ye D, Guan K-L, Xiong Y. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene* 32 (5): 663-669, 2013.

Discussão geral

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram um aprofundamento dos conhecimentos sobre a ação epigenética do VPA em células HeLa, com foco na demetilação de DNA, bem como dos efeitos que mudanças nos níveis de 5mC induzidas pelo VPA podem acarretar no perfil espectral do DNA no infravermelho. Foi efetuada também uma comparação entre os mecanismos de ação do VPA com os da 5-aza-CdR, droga de potencial demetilador amplamente conhecido.

Foram tidos como ponto de partida estudos prévios conduzidos em células HeLa por nosso grupo de pesquisa, que reportaram remodelação da cromatina pelo VPA, atribuída principalmente à hiperacetilação de histonas resultante da inibição de HDAC por esta droga (Felisbino et al., 2011). Aqui, dados de análise de imagem para células HeLa tratadas com VPA foram expandidos e demonstraram que o estado de descompactação cromatínica induzido pelo VPA é mantido por 24 h após retirada da droga, mas se reverte à situação semelhante ao controle em 48 h pós-tratamento.

Para maiores esclarecimentos dos mecanismos por trás deste fenômeno, investigações dos níveis de H3Ac e 5mC foram conduzidas nos mesmos tempos de tratamento em que foram realizadas as análises de imagem. Rápida reversão da hiperacetilação de histonas H3 foi então observada por ensaios de Western blotting. Análises de metilação do DNA demonstraram redução da abundância de 5mC, que se estendeu por tempo mais longo (24 h) que o tratamento com VPA. Tais dados foram consistentes com o reportado na literatura de ser a acetilação de histonas uma marca transiente (Lee et al., 2010) e demonstraram a participação da demetilação de DNA na remodelação cromatínica promovida pelo VPA em células HeLa, podendo ocasionar efeitos mais duradouros para os programas de expressão gênica das células, como sugerido por Milutinovic et al. (2007). Foi, assim, reportado pela primeira vez papel do VPA sobre a demetilação do DNA em células HeLa, em similaridade ao observado para tratamentos com esta droga em diferentes tipos celulares como HEK 293, linfomonócitos e outros (Detich et al., 2003; Milutinovic et al., 2007; Dong et al., 2010; Wang et al., 2010; Tremolizzo et al., 2012).

A adição ou remoção de grupamentos metil sobre a molécula de DNA pode alterar suas propriedades físico-químicas. De fato, mudanças no perfil espectral do DNA no infravermelho em resposta à demetilação do DNA já foram reportadas em hepatócitos de camundongos diabéticos não obesos (Vidal et al., 2014). Em concordância com estes resultados, a redução nos níveis de 5mC induzida pelo VPA resultou em alterações no perfil

espectral do DNA de células HeLa por microespectroscopia no FT-IR. Neste caso, maior sensibilidade para explicar alterações nos níveis de 5mC foi obtida nos picos associados a vibrações de estiramento do grupamento $-CH_3$ presente na citosina metilada, com tais resultados publicados no artigo que compõe o capítulo I desta dissertação.

Como segunda etapa do trabalho buscou-se desvendar os mecanismos pelos quais o VPA influencia as marcas de 5mC, em comparação à 5-aza-CdR. Uma vez que a atuação destas duas drogas tem sido proposta em mecanismos ativos da demetilação do DNA (Detich et al., 2003; Chowdhury et al., 2015), a abundância dos derivados da citosina 5hmC, 5caC e 5fC foi analisada em conjunto com o padrão de expressão gênica e de níveis proteicos de enzimas envolvidas nos processos de metilação/demetilação (DNMT1, TET1 e TET2).

Tanto o VPA quanto a 5-aza-CdR ocasionaram aumento das marcas de 5hmC no núcleo de células HeLa mas não impactaram os demais intermediários 5caC e 5fC. O VPA se mostrou capaz de reduzir significativamente a expressão gênica de DNMT1, no entanto não impactou os níveis proteicos desta enzima. Em relação às TETs, houve decréscimo dos níveis de mRNA de TET1 e aumento significativo da expressão de TET2 no tratamento com concentração mais drástica da droga (20 mM por 4 h). Embora não confirmado estatisticamente, tanto na menor quanto na maior concentração de VPA (1 mM e 20 mM por 4 h), os níveis proteicos de TET2 tenderam a aumentar. Estes achados representam uma novidade para o VPA, pois até o momento não há registros de estudos reportando efeitos desta droga sobre a 5hmC, e TET2 aparece como potencial componente da via de demetilação de DNA a ser modulado pelo VPA.

Em relação à 5-aza-CdR, os níveis de mRNA de DNMT1 permaneceram inalterados após o tratamento com 5-aza-CdR, acompanhados de decréscimo dos níveis proteicos desta enzima, consistentes com o mecanismo de ação já estabelecido para esta droga sobre processos de demetilação passiva do DNA (Datta et al., 2009; Ramos et al., 2015). Adicionalmente, houve diminuição da expressão gênica de TET1 e TET2 e tendência à diminuição do nível proteico de TET2, apesar de não suportado estatisticamente. Estes resultados, somados ao aumento de 5hmC provocado pela 5-aza-CdR em células HeLa, podem ser comparados aos de Chowdhury et al. (2015) e se encaixam na proposição de que a indução de 5hmC pela 5-aza-CdR seja resultado de aumento da quantidade de TETs associadas à molécula de DNA, não envolvendo modulação da expressão ou da abundância total destas enzimas (Chowdhury et al., 2015).

Comparando-se os achados para o VPA e 5-aza-CdR, ambas as drogas mostraram interferir em elementos da demetilação ativa de DNA em células HeLa, induzindo aumento de

5hmC em paralelo à diminuição de 5mC neste tipo celular. O fato encontrado de que o VPA e a 5-aza-CdR podem influenciar diferencialmente as enzimas DNMT1, TET1 e TET2 indica que estas drogas possam ter uma atuação mais versátil do que se postulava, sendo tais achados potenciais contribuições às aplicabilidades terapêuticas destas duas drogas. Investigações futuras poderão ser conduzidas no sentido de analisar quais genes estariam sendo afetados pelo tratamento com VPA ou 5-aza-CdR em células HeLa, além de extensão dos tratamentos com estas drogas para outros tipos de tumores agressivos, gerando dados que possam contribuir para se compreender melhor os efeitos antitumorais sugeridos para o VPA e a 5-aza-CdR.

Conclusões gerais

1. O VPA induz demetilação de DNA em células HeLa, em níveis semelhantes aos obtidos para o tratamento com 5-aza-CdR, droga de conhecida ação demetilante.
2. A demetilação do DNA em resposta ao tratamento com VPA contribui para a remodelação cromatínica observada em células HeLa tratadas com esta droga, uma vez que a hipometilação de DNA persiste por 24 h após retirada da exposição das células ao VPA, acompanhada de descompactação da cromatina, enquanto a hiperacetilação de histonas é revertida no mesmo período de tempo, se assemelhando ao controle não tratado. Assim, o VPA também é capaz de promover alterações de longa duração para os programas celulares.
3. Mudanças nos níveis de 5mC em após tratamento com VPA afetam o perfil espectral do DNA ao FT-IR, tanto em relação às vibrações de estiramento simétricas e antissimétricas do grupamento $-\text{CH}_3$ da citosina metilada quanto em relação às vibrações de dobradura do $-\text{CH}_3$ comparadas às vibrações “no plano” do total das citosinas. O primeiro parâmetro, no entanto, é mais sensível a refletir a diminuição da metilação do DNA promovida pelo VPA do que o segundo, em células HeLa.
4. Concomitante à redução dos níveis de 5mC, a exposição de células HeLa ao VPA e à 5-aza-CdR resulta em um aumento da abundância de 5hmC, o que corrobora o papel destas drogas na demetilação do DNA de forma ativa.
5. Embora impactem de forma semelhante os níveis de 5mC e 5hmC, o VPA e a 5-aza-CdR diferem entre si na modulação de elementos da via de demetilação ativa do DNA. Foi sugerido que o VPA atue pela modulação da expressão gênica e níveis proteicos da enzima TET2. Já a 5-aza-CdR parece se encaixar no modelo proposto por Chowdhury et al. (2015), de que esta droga possa agir gerando condições para o maior recrutamento das TETs ao DNA, sem necessariamente interferir nos níveis proteicos ou gênicos destas enzimas.

Referências bibliográficas

(relativas às seções Introdução, Discussão geral e Conclusões gerais)

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. DNA, chromosomes and genomes. In: Molecular biology of cell 6th ed. Garland science, Taylor & Francis Group. New York, 2015.
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. PNAS 51: 786-794, 1964.
- Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D. Overview and Concepts. In: Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 2007.
- Allis CD, Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. Nat Rev Genet 17 (8): 487-500, 2016.
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. Proc Natl Acad Sci USA 88 (22): 10148-10152, 1991.
- Asai T, Bundo M, Sugawara H, Sunaga F, Ueda J, Tanaka G, Ishigooka J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. Int J Neuropsychopharmacol 16 (10): 2285-2294, 2013.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 21 (3): 381-395, 2011.
- Banyay M, Gräslund A. Structural Effects of Cytosine Methylation on DNA Sugar Pucker Studied by FTIR. J Mol Biol 324 (4): 667-676, 2002.
- Berdasco M, Esteller M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. Dev Cell 19 (5): 698-711, 2010.
- Berger SL, Kourizades T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. Genes Dev 23: 781-783, 2009.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. Nature 397 (6720): 579-583, 1999.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev 16 (1): 6-21, 2002.
- Blaheta RA, Cinatl J. Anti-Tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. Med Res Rev 22 (5): 492-511, 2002.
- Blaschke K, Ebata KT, Karimi MM, Zepeda-Martínez JA, Goyal P, Mahapatra S, Tam A, Laird DJ, Hirst M, Rao A, Lorincz MC, Ramalho-Santos M. Vitamin C induces Tet-

- dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500 (7461): 222-226, 2013.
- Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3 (5): 1151–1157, 1984.
- Breiling A, Lyko F. Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin* 8:24, 2015.
- Bronner C, Krifa M, Mousli M. Increasing role of UHRF1 in the reading and inheritance of the epigenetic code as well as in tumorigenesis. *Biochem Pharmacol* 86 (12): 1643-1649, 2013.
- Budhavarapu V, Chavez M, Tyler JK. How is epigenetic information maintained through DNA replication? *Epigenetics Chromatin* 6:32, 2013.
- Callaway E. Most popular human cell in Science gets sequenced. *Nature News* doi:10.1038/nature.2013.12609, 2013.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23 (16): 2825-2837, 2004.
- Cervoni N, Szyf M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276 (44): 40778-40787, 2001.
- Chateaufieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* pii 479364, 2010.
- Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, Ueda Y, Li E. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39 (3): 391-396, 2007.
- Cheung P, Lau P. Epigenetic Regulation by Histone Methylation and Histone Variants. *Mol Endocrinol* 19 (3): 563-573, 2005.
- Christman JK. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21 (35): 5483-5495, 2002.
- Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, Choudhury S, Cho IH, Cooper B, Chevassut T, Lossie A, Irudayaraj. The hypomethylating agent decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Sci Rep* 5: 9281, 2015.

- Čihák A, Škoda J, Šorm F (1963) Inhibition of biosynthesis of the nucleic acid pyrimidine bases by N-formylbiuret, a degradation product of 5-azauracil. *Biochim Biophys Acta* 72: 125–127, 1963.
- Clayton-Smith J, Donnai D. Fetal valproate syndrome. *J Med Genet* 32 (9): 724-727, 1995.
- Crook JM, Dunn NR, Colman A. Repressed by a NuRD. *Nat Cell Biol* 8 (3): 212-214, 2006.
- Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett* 589: 2914–2922, 2015.
- Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob S. A new class of quinolone-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* 69 (10): 4277-4285, 2009.
- Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* 4:5, 2012.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem* 278: 27586–27592, 2003.
- Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist* 18 (5): 619-624, 2013.
- Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5 (8): 730-735, 2010.
- Duan L, Liu Y, Wang J, Liao J, Hu J. The dynamic changes of DNA methylation in primordial germ cell differentiation. *Gene* 591 (2): 305-312, 2016.
- Eccleston A, DeWitt N, Gunter C, Marte B, Nath D. Epigenetics. *Nature* 447: 395, 2007.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10 (8): 2709-2721, 1982.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of anti-epileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737-744, 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.
- Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem* 115: 1937-1947, 2014.
- Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature* 421: 448-453, 2003.

- Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 15 (2): 172-183, 2003.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 5-aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25 (11): 4727-4741, 2005.
- Gius D, Cui H, Bradbury CM, Cook J, Smart DK, Zhao S, Young L, Brandenburg SA, Hu Y, Bisht KS, Ho AS, Mattson D, Sun L, Munson PJ, Chuang EY, Mitchell JB, Feinberg AP. Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. *Cancer Cell* 6 (4): 361-371, 2004.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969-6978, 2001.
- Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13 (5): 343-357, 2012.
- Gu S, Tian Y, Chlenski A, Salwen HR, Lu Z, Raj JU, Yang Q. Valproic acid shows potent antitumor effect with alteration of DNA methylation in neuroblastoma. *Anticancer Drugs* 23 (10): 1054-1066, 2012.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming G, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-Hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 10, (16): 2662-2668, 2011.
- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* 64 (3): 1079-1086, 2004.
- Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *Br J Cancer* 90: 761-769, 2004.
- He YF, Li BZ, Li Z, Liu P, Wang Y, Tang Q, Ding J, Jia Y, Chen Z, Li L, Sun Y, Li X, Dai Q, Song CX, Zhang K, He C, Xu GL. Tet-mediated formation of 5-carboxylecytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333 (6047): 1303-1307, 2011.
- Hsu CH, Peng KL, Kang ML, Chen YR, Yang YC, Tsai CH, Chu CS, Jeng YM, Chen YT, Lin FM, Huang HD, Lu YY, Teng YC, Lin ST, Lin RK, Tang FM, Lee SB, Hsu HM, Yu JC, Hsiao PW, Juan LJ. TET1 suppresses cancer invasion by activating the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Cell Rep* 2 (3): 568-579, 2012.

- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* 466 (7310): 1129-1133, 2010.
- Ito S, Shen L, Dai Q, Wu SC, Collins LB, Swenberg JA, He C, Zhang Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333 (6047):1300-1303, 2011.
- Jones PA & Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev Genet* 3: 415-428, 2002.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128 (4): 683-692, 2007.
- Khorasanizadeh S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116 (2): 259-272, 2004.
- Kim KW, Roh JK, Wee HJ, Kim C. Molecular targeted anticancer drugs. In *Cancer drug discovery - science and history*. Springer. New York, 2016.
- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98 (3): 285-294, 1999.
- Kriaucionis S, Heintz N. The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons. *Science*. 324 (5929): 929-930, 2009.
- Kuendgen A, Bug G, Ottmann OG, Haase D, Schanz J, Hildebrandt B, Nachtkamp K, Neukirchen J, Dienst A, Haas R, Germing U, Gattermann N. Treatment of poor-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with a combination of 5-azacytidine and valproic acid. *Clin Epigenetics* 2 (2): 389–399, 2011.
- Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 279: 18851-18860, 2004.
- Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM. The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3* 3 (8): 1213–1224, 2013.
- Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11 (3): 204–220, 2010.
- Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 107 (33): 14639-14644, 2010.
- Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (4): 284-295, 2007.

- Li G, Zhu P. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett* 589: 2893-2904, 2015.
- Lorsbach RB, Moore J, Mathew S, Raimondi SC, Mukatira ST, Downing JR. TET1, a member of a novel protein family, is fused to MLL in acute myeloid leukemia containing the t(10;11)(q22;q23). *Leukemia* 17 (3): 637-641, 2003.
- Lötsch J, Schneider G, Reker D, Parnham MJ, Schneider P, Geisslinger G, Doeiring A. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol Med* 19 (12): 742-753, 2013.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389 (6648): 251-260.
- Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286 (41): 35334-35338, 2011.
- Manzoni EFM, Pennarossa G, deEguileor M, Tettamanti G, Gandolfi F, Brevini TAL. 5-azacytidine affects TET2 and histone transcription and reshapes morphology of human skin fibroblasts. *Sci Rep* 6: 37017, 2016.
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 59: 3815-3822, 2005.
- Marchal C, Miotto B. Emerging concept in DNA methylation: role of transcription factors in shaping DNA methylation patterns. *J Cell Physiol* 230 (4): 743-751, 2015.
- Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer* 2 (4): 315-319, 2002.
- Mello ML, Vidal BC. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of DNA caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. *PLoS One* 7 (8): e43169, 2012.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinog* 28: 560-571, 2007.
- Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59 (3): 521-529, 1989.
- Mudbhary R, Hoshida Y, Chernyavskaya Y, Jacob V, Villanueva A, Fiel MI, Chen X, Kojima K, Thung S, Bronson RT, Lachenmayer A, Revill K, Alsinet C, Sachidanandam R, Desai A, SenBanerjee S, Ukomadu C, Llovet JM, Sadler KC. UHRF1 overexpression

- drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 25 (2): 196-209, 2014.
- Münster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush R, Sullivan D, Daud A. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol* 25 (15): 1979-1985, 2007.
- Neri F, Dettori D, Incarnato D, Krepelova A, Rapelli S, Maldotti M, Parlato C, Paliogiannis P, Oliviero S. TET1 is a tumor suppressor that inhibits colon cancer growth by derepressing inhibitors of the WNT pathway. *Oncogene* 34 (32): 4168-4176, 2014.
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U, Klose RJ. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci* 66 (3): 407-22, 2009.
- Ngo TTM, Yoo J, Dai Q, Zhang Q, He C, Aksimentiev A, Ha T. Effects of cytosine modifications on DNA flexibility and nucleosome mechanical stability. *Nat Commun* 7: 10813, 2016.
- Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* 28 (1): 1-10, 2009.
- Ou JN, Torrisani J, Unterberger A, Provençal N, Shikimi K, Karimi M, Ekström TJ, Szyf M. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A induces global and gene-specific DNA demethylation in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 73 (9): 1297-1307, 2007.
- Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap 1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res* 121: 26-34, 2014.
- Pastor W, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14 (6): 341–356, 2013.
- Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, Holsboer F, Rein T, Zschocke J. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology* 35 (3): 792-805, 2010.
- Perucca E. Overtreatment in epilepsy: adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res* 52: 25-33, 2002.

- Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011: 371832, 2011.
- 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: 36734-36741, 2001.
- Piccolo FM, Fisher AG. Getting rid of DNA methylation. *Trends Cell Biol* 24 (2): 136-143, 2014.
- Pískala A, Šorm F. Nucleic acids components and their analogues. LI. Synthesis of 1-glycosyl derivatives of 5-azauracil and 5-azacytosine. *Collect. Czech. Chem. Commun* 29: 2060-2076, 1964.
- Portela A, Liz J, Nogales V, Setién F, Villanueva A, Esteller M. DNA methylation determines nucleosome occupancy in the 5'-CpG islands of tumor suppressor genes. *Oncogene* 32 (47): 5421-5428, 2013.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 128 (10): 1057-1068, 2010.
- Ramos MP, Wijetunga NA, McLellan AS, Suzuki M, Grealley JM. DNA demethylation by 5-aza-2-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics Chromatin* 8:11, 2015.
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447 (7143): 425-432, 2007.
- Robert E, Guibaud P. Maternal valproic acid and congenital neural tube defects. *Lancet* 2 (8304): 937, 1982.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6 (8): 597-610, 2005.
- Rocca A, Minucci S, Tosti G, Croci D, Contegno F, Ballarini M, Nolè F, Munzone E, Salmaggi A, Goldhirsch A, Pelicci PG, Testori A. A phase I–II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *Br J Cancer* 100 (1): 28–36, 2009.
- Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 1839 (12): 1362-1372, 2014.
- Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 20 (24): 3156-3165, 2001.

- Sadakierska-Chudy A, Filip M. A comprehensive view of the epigenetic landscape. Part II: Histone post-translational modification, nucleosome level, and chromatin regulation by ncRNAs. *Neurotox Res* (2): 172-197, 2015.
- Sajadian SO, Ehnert E, Vakilian H, Koutsouraki E, Damm G, Seehofer D, Thasler W, Dooley S, Baharvand h, Sipos B, Nussler AK. Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma. *Clin Epig* 7 (98): 1-14, 2015.
- Schreiber SL, Bernstein BE. Signaling network model of chromatin. *Cell* 111 (6): 771-778, 2002.
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97 (5): 695-710, 1953.
- Schuermann D, Weber AR, Schär P. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair* 44: 92-102, 2016.
- Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6 (4): a018713, 2014.
- Sharma S, Symanowski J, Wong B, Dino P, Manno P, Vogelzang N. A Phase II Clinical Trial of Oral Valproic Acid in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancers Using an Intensive Biomarker Sampling Strategy. *Transl Oncol.* 1 (3): 141-147, 2008.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP. Genome-Wide Profiling of DNA Methylation Reveals a Class of Normally Methylated CpG Island Promoters. *PLoS Genet* 3 (10): e181, 2007.
- Sif S. ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin. *J Cell Biochem* 91 (6): 1087-1098, 2004.
- Skloot R. The immortal life of Henrietta Lacks. Crown Publishing Group. New York, 2010.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403 (6765): 41-45, 2000.
- Šorm F, Pískala A, Cihák A, Veselý J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20 (4): 202-203, 1964.
- Sun M, Song CX, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Gomes S, Chen P, Chen J, Chada KK, He C, Rosner MR. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110 (24): 9920–9925, 2013.

- 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: 738–741, 2008.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324 (5929): 930-935, 2009.
- Temiz NA, Donohue DE, Bacolla A, Luke BT, Collins JR. The role of methylation in the intrinsic dynamics of B- and Z-DNA. *PLoS One* 7 (4): e35558, 2012.
- Tremolizzo L, Difrancesco JC, Rodriguez-Menendez V, Riva C, Conti E, Galimberti G, Ruffmann C, Ferrarese C. Valproate induces epigenetic modifications in lymphomonocytes from epileptic patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 39 (1): 47-51, 2012.
- Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 201–209, 2010.
- Venkatesh S, Workman JL. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16 (3): 178-1789, 2015.
- Verdin E, Ott M. 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16 (4): 258–264, 2015.
- Vidal BC, Ghiraldini FG, Mello MLS. Changes in liver cell DNA methylation status in diabetic mice affect its FT-IR characteristics. *PLoS One* 9 (7): e102295, 2014.
- Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20, 1942.
- Wang Y, Fischle W, Cheung W, Jacobs S, Khorasanizadeh S, Allis CD. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp* 259: 3-17; discussion 17-21, 2004.
- Wang Z, Xu L, Zhu X, Cui W, Sun Y, Nishijo H, Peng Y, Li R. Demethylation of specific Wnt/b-Catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec* 293:1947–53, 2010.
- Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 156 (1-2): 45-68, 2014.
- Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 (9): 607-620, 2010.

- Zhang L, Lu X, Lu J, Liang H, Dai Q, Xu GL, Luo C, Jiang H, He1 C. Thymine DNA glycosylase specifically recognizes 5-carboxylcytosine-modified DNA. *Nat Chem Biol* 8 (4): 328–330, 2012.
- Zhang Q, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J, Wong J. Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J Biol Chem* 289 (9): 5986-5996, 2014.
- Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13 (15): 1924-1935, 1999.



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



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "***A metilação de DNA em células HeLa após tratamento com o ácido valproico***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Giovana Maria Breda Veronezi
Nome do(a) aluno(a): Giovana Maria Breda Veronezi

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

Data: Campinas, 13 de janeiro de 2017

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **A metilação de DNA em células HeLa após tratamento com o ácido valproico**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 13 de janeiro de 2017

Assinatura : Giovana Maria Breda Veronezi
Nome do(a) autor(a): **Giovana Maria Breda Veronezi**
RG n.º 49739154-5

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