



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

MARINA AMORIM ROCHA

**EFEITOS DO VALPROATO DE SÓDIO NOS NÍVEIS DE
METILAÇÕES DA HISTONA H3, NA INTERAÇÃO VPA-HISTONAS E
NA REGULAÇÃO DOS GENES $p16^{INK4a}$ E $p21^{WAF1/Cip1}$ EM CÉLULAS
HeLa**

**EFFECTS OF SODIUM VALPROATE ON HISTONE H3
METHYLATION LEVELS, VPA-HISTONES INTERACTION AND,
REGULATION OF $p16^{INK4a}$ AND $p21^{WAF1/Cip1}$ GENES IN HeLa CELLS**

Campinas, 2022

MARINA AMORIM ROCHA

**EFEITOS DO VALPROATO DE SÓDIO NOS NÍVEIS DE
METILAÇÕES DA HISTONA H3, NA INTERAÇÃO VPA-HISTONAS E
NA REGULAÇÃO DOS GENES $p16^{INK4a}$ E $p21^{WAF1/Cip1}$ EM CÉLULAS
HeLa**

**EFFECTS OF SODIUM VALPROATE ON HISTONE H3
METHYLATION LEVELS, VPA-HISTONES INTERACTION AND,
REGULATION OF $p16^{INK4a}$ AND $p21^{WAF1/Cip1}$ GENES IN HeLa CELLS**

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

Thesis presented to the Institute of
Biology the University of Campinas in
partial fulfillment of the requirements
for the degree of doctor in Cellular and
Structural Biology, in the area of Cell
Biology

Supervisor/Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Co-supervisor/Coorientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA AMORIM ROCHA, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LUIZA SILVEIRA
MELLO

Campinas, 2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Gustavo Lebre de Marco - CRB 8/7977

R582e Rocha, Marina Amorim, 1992-
Efeitos do Valproato de Sódio nos níveis de metilações da histona H3, na interação VPA-histonas e na regulação dos genes p16ink4a e p21waf1/cip1 em células HeLa / Marina Amorim Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Maria Luiza Silveira Mello.

Coorientador: Benedicto de Campos Vidal.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Epigenômica. 2. Ácido valpróico. 3. Genes p16. I. Mello, Maria Luiza Silveira. II. Vidal, Benedicto de Campos. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Effects of Sodium Valproate on histone H3 methylation levels, VPA-histones interaction and, regulation of p16ink4a and p21waf1/cip1 genes in HeLa cells

Palavras-chave em inglês:

Epigenomics

Valproic acid

Genes, p16

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Cristina Pontes Vicente

Daniel Pacheco Bruschi

Edson Rosa Pimentel

Mateus Mondin

Data de defesa: 02-09-2022

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5812-3482>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8925355923462364>

Campinas, 02 de setembro de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Presidente da comissão examinadora)

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Prof. Dr. Daniel Pacheco Bruschi

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel

Prof. Dr. Mateus Mondin

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que mesmo de longe emanava todo imenso amor. Gratidão por compreender e apoiar os meus sonhos! Meu sincero agradecimento à minha mãe Maricelia Risério Amorim pela confiança, suporte, carinho, e por todo o incentivo que sempre me foi dado. Ao meu pai Marcelino Rocha de Jesus por ser meu exemplo de caráter, disciplina e perseverança. Às minhas queridas irmãs e melhores amigas, Mariane Amorim Rocha e Mayara Amorim Santos pelos conselhos, ensinamentos e por me apoiarem, à minha sobrinha Maya Caires Amorim por toda alegria, aos meus saudosos avós, tios e primos.

Ao meu grande amor e companheiro diário Bruno Luís Gonçalves da Cunha, pela força, otimismo, apoio e principalmente pela sua paciência e amor. Gratidão por tudo, por me ajudar a superar tantos momentos.

Minha gratidão especial à Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, por me receber em seu grupo de pesquisa bem como por acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço por todas as oportunidades durante essa trajetória, além da sua tamanha contribuição científica e empenho ao longo de todos esses anos de trabalho que se iniciaram ainda no mestrado.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelas conversas e importantes conhecimentos compartilhados, pelo exemplo de competência, disciplina e dedicação profissional.

Sou grata também por aqueles com quem troquei vivências de laboratório. À amiga e bióloga Camila Borges M. de Oliveira que além de ter colaborado em procedimentos de rotina de cultura celular, compartilhou momentos de ansiedade, preocupações, aflições e felicidades aos dias de muito trabalho. Ao Dr. Douglas S. dos Santos por incentivar, compartilhar suas inúmeras experiências e pelos momentos descontraídos. Ao Eli Heber dos Anjos pelos ensinamentos em química. Sou muito grata ao amigo Dr. Nilton José dos Santos pela amizade e principalmente pela disponibilidade em ajudar nos momentos que mais precisei. Ao Dr. Adauto Lima Cardoso por aceitar participar, orientar e colaborar com parte dos desafios que envolveram esta pesquisa. À tantos amigos em especial à minha grande amiga Milene Marques pelos incentivos, longas conversas e palavras de conforto.

Aos centros de pesquisas localizados na Universidade Estadual de Campinas, ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LACTAD) pelos auxílios na microscopia confocal, ao Centro de Pesquisa em Obesidades e Comorbidades

e ao Laboratório de Biologia Tecidual que permitiram o uso de equipamentos. À todos os professores que permitiram o uso de equipamentos, reagentes e realização de experimentos: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, Prof. Dr. Cesar Martins, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, Prof. Dr. Edson Pimentel, Prof. Dr. José Luiz Proença Módena, Profa. Dra. Aline M. dos Santos, Profa. Dra. Clarice Weis Arns, Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente, Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, Profa. Dra. Shirlei M. Recco-Pimentel.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, além da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/10356-2), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (421299/2018-5, 304797/2019-7) e ao Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e Extensão (FAEPEX) pelos auxílios financeiros essenciais para a realização desta pesquisa.

À Unicamp e ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia pela oportunidade de realização do curso e por fornecer as condições necessárias para a execução do meu doutoramento.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram participar e contribuir com este trabalho.

RESUMO

Em eucariotos, o estado da cromatina, o empacotamento de DNA com proteínas histônicas, contribui para o controle da expressão gênica. Assim como outras modificações pós-tradução de histonas (PTMs), a metilação de histonas em resíduos de lisina contribui para a regulação de diversos processos biológicos. Famílias de proteínas, como por exemplo, as lisinas metiltransferases (KMTs) e demetilases (KDMs), são responsáveis por controlar os níveis de metilação nos resíduos de lisina da histona. Portanto, um equilíbrio adequado de estabilidade e dinâmica em PTMs de histonas é necessário para a expressão gênica precisa. Apesar disso, aberrações nas regiões regulatórias controladas pela metilação da lisina podem estar associados com o silenciamento de vários genes, incluindo os supressores de tumores, e são frequentemente observados no câncer. Por outro lado, é conhecido que inibidores de histona desacetilase (HDACi) podem induzir mudanças globais na modificação das histonas, podendo então reverter esse processo. O valproato de sódio (VPA), um conhecido agente antiepiléptico, é também caracterizado como HDACi, induzindo hiperacetilação de histonas e desmetilação de DNA em vários tipos de células. Em alguns modelos, também há dados mostrando que o VPA pode afetar a metilação das histonas bem como as enzimas que adicionam e removem essas marcas e pode regular a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. Dessa forma, neste estudo foi investigado por meio de técnicas de imunofluorescência, Western Blot e RT-qPCR a capacidade do VPA em alterar os níveis de metilações das histonas H3 (H3K4me2/3, H3K9me2 e H3K27me3) e das enzimas KMT2D, EZH2 e KDM3A em células HeLa, tratadas com VPA cujas concentrações foram de 0,5 mM e 2 mM por 24 h. Além disso, a expressão do oncogene *p16^{INK4a}* e do gene supressor de tumor *p21^{WAF1/Cip1}* também foram analisados na presença dessa droga. Um estudo também foi conduzido a fim de avaliar a interferência do VPA em histonas totais, através da análise microespectroscópica das histonas totais no infravermelho por FT-IR (“Fourier transform-infrared”), uma vez que há evidências recentes da afinidade do VPA ligando-se à histonas H1 e H3. Com base no conjunto de dados, os resultados sugerem que o VPA promoveu hipermetilação em marcas associadas à transcrição ativa de genes, H3K4me2/3 e H3K9me, e conferiu um estado hipometilado para a marca associada ao silenciamento, H3K9me2. Apesar de observar o aumento nos níveis globais de H3K27me3, nenhuma conexão causal para essas marcas com a expressão gênica pode ser concluída até o momento, uma vez que elas foram identificadas na literatura com consequências regulatórias distintas. O VPA alterou os níveis dessas marcas epigenéticas possivelmente por

participação das metiltransferases *KMT2D*, *EZH2* e demetilase *KDM3A*. Nessas condições o VPA também induziu a ativação da proteína supressora de tumor p21^{WAF1/Cip1} e reprimiu a ação de *p16^{INK4a}* nessas células. Além disso, esses resultados indicaram que o VPA possa promover parada na fase G1 do ciclo celular por indução de p21^{WAF1/Cip1}. Quanto a análise da possível interação do VPA com as histonas, não foi observado nenhuma modificação conformacional dessas proteínas ao longo do espectro. No entanto, notou-se um ligeiro aumento na absorbância na região de frequência dos grupos CH₃ e CH₂ nos espectros de FT-IR, que pode ser justificado pela intensificação das metilações em alguns dos resíduos de lisina na histona H3. Até o momento foi possível notar que o VPA altera o epigenoma na linhagem celular tumoral estudada, por meio das alterações das metilações nos resíduos de lisina 4, 9 e 27 da histona H3. Entretanto, o VPA promoveu aumento em marcas associadas à transcrição ativa de genes e diminuiu aquelas relacionadas ao silenciamento, sendo consistentes com uma possível intensificação da expressão gênica global induzida por esta droga. Portanto, o VPA pode oferecer uma estratégia potencial para reverter mudanças epigenéticas, principalmente associadas a doenças como o câncer. No entanto, quanto à expressão dos genes *p16^{INK4a}* e p21^{WAF1/Cip1} eles podem ser regulados em células HeLa por HDACi que atuam sobre marcas epigenéticas ao nível de DNA e histonas.

ABSTRACT

In eukaryotes, the state of chromatin, the DNA packaging with histone proteins, contributes to the control of gene expression. Like other post-translational histone modifications (PTMs), histone methylation at lysine residues contributes to the regulation of several biological processes. Protein families, such as lysine methyltransferases (KMTs) and demethylases (KDMs), are responsible for controlling methylation levels at histone lysine residues. Therefore, a proper balance of stability and dynamics in histone PTMs is necessary for accurate gene expression. Despite this, aberrations in regulatory regions controlled by lysine methylation may be associated with the silencing of several genes, including tumor suppressors, and are frequently observed in cancer. On the other hand, it is known that histone deacetylase inhibitor (HDACi) can induce global changes in histone modification, thus being able to reverse this process. Sodium valproate (VPA), a well-known antiepileptic agent, is also characterized as HDACi, inducing histone hyperacetylation and DNA demethylation in various cell types. In some models, there are also data showing that VPA can affect histone methylation as well as the enzymes that add and remove these tags, and can regulate the expression of proteins involved in cell cycle control. Thus, in this study, the ability of VPA to alter the methylation levels of histone H3 (H3K4me2/3, H3K9me2 and H3K27me3) and of the enzymes KMT2D, EZH2 and KDM3A was investigated using immunofluorescence, Western Blot and RT-qPCR techniques in HeLa cells, treated with VPA whose concentrations were 0.5 mM and 2 mM for 24 h. In addition, the expression of *p16^{INK4a}* oncogene and *p21^{WAF1/Cip1}* tumor suppressor gene were also analyzed in the presence of this drug. A study was also carried out in order to evaluate the interference of VPA in total histones, through the microspectroscopic analysis of total histones in the infrared by FT-IR ("Fourier transform-infrared"), since there is recent evidence of the affinity of VPA binding up to histones H1 and H3. Based on the dataset, the results suggest that VPA promoted hypermethylation in markers associated with active gene transcription, H3K4me2/3 and H3K9me, and conferred a hypomethylated state on the marker associated with silencing, H3K9me2. Despite observing the increase in global levels of H3K27me3, no causal connection for these marks with gene expression can be concluded to date, as they have been identified in the literature with distinct regulatory consequences. VPA altered the levels of these epigenetic marks possibly through the participation of methyltransferases KMT2D, EZH2 and demethylase KDM3A. Under these conditions, VPA also induced the activation of the tumor suppressor protein p21^{WAF1/Cip1} and repressed the action of *p16^{INK4a}* in these cells. Furthermore, these results indicated that VPA can promote arrest in

the G1 phase of the cell cycle by inducing p21^{WAF1/Cip1}. Regarding the analysis of the possible interaction of VPA with histones, no conformational modification of these proteins was observed along the spectrum. However, a slight increase in absorbance was observed in the frequency region of the CH₃ and CH₂ groups in the FT-IR spectra, which can be explained by the intensification of methylations in some of the lysine residues in histone H3. So far, it has been possible to notice that VPA alters the epigenome in the studied tumor cell line, through alterations in methylations in lysine residues 4, 9 and 27 of histone H3. However, VPA promoted an increase in markers associated with active transcription of genes and decreased those related to silencing, being consistent with a possible enhancement of global gene expression induced by this drug. Therefore, VPA may offer a potential strategy to reverse epigenetic changes, mainly associated with diseases such as cancer. However, regarding the expression of *p16^{INK4a}* and *p21^{WAF1/Cip1}* genes, they can be regulated in HeLa cells by HDACi that act on epigenetic marks at the DNA and histone levels.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5caC - 5-carboxilcitosina

5fC - 5-formilcitosina

5hmC - 5-hidroximetilcitosina

5mC - 5-metilcitosina

AED - droga antiepilética

Arg - arginina

BSA - albumina sérica bovina

CDK - cinases dependentes de ciclina

DMEM - *Dulbecco's modified eagle's médium*

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNMT1/3A/3B - DNA metiltransferase 1/3A/3B

DOT1L - disruptor do silenciamento telomérico tipo 1

EED - desenvolvimento de ectoderma embrionário

ESC - células-tronco embrionárias

EZ - *enhancer of Zeste*

EZH - *enhancer of Zeste Homolog*

FAD - flavina adenina dinucleotídeo

FCS - soro fetal bovino

FDA - *Food and Drug Administration*

FT-IR - infravermelho por transformada de Fourier

GABA - ácido gama aminobutírico

H3K4,9,27,36,79 - lisina 4,9,27,36,79 da histona H3

H3K4me/me2/me3 - mono, di e trimetilação na lisina 4 da histona H3

H3K9me/me2/me3 - mono, di e tri metilação na lisina 9 da histona H3

H3K27me/me3 - mono, trimetilação na lisina 27 da histona H3

H4K20 - lisina 20 da histona H4

HATs - histona acetiltransferases

HDAC - deacetilase de histona

HDACi - inibidor de HDACs

HEK293 - células derivada de rim humano embrionário

HeLa - linhagem celular de câncer cervical humano

HP1 - *heterochromatin protein 1*

IF - intensidade da fluorescência

K - lisina

K79 - lisina 79

KDMs - lisina demetilases

KMTs - lisina metiltransferases

Lys - lisina

MCF-7 - células de adenocarcinoma mamário

MML - *mixed lineage leucemia*

MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]

O.D - densidade óptica

PBS - tampão fosfato-*salino*

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PRC - *polycomb repressive complex*

PTMs - modificações pós-traducionais

R - arginina

SAM - S-adenosilmetionina

SDS - PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil- sulfato de sódio (SDS)

SEM - erro padrão da média

Su (var) 3-9 - *suppressor of position-effect variegation*

TCA - ácido tricloroacético

TETs - *ten-eleven translocation*

TRX - *homeobox gene regulator trithorax*

TSA - tricostatina A

TSS - *transcriptional start sites*

VPA - ácido valproico/ valproato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Cromatina e Epigenética	15
1.2. Modificações de histonas	16
1.2.1. Enzimas metiltransferases e demetilases.....	18
1.3. O ácido valproico/valproato de sódio e sua atuação sobre a cromatina.....	22
2. OBJETIVOS	27
3. CAPÍTULO I.....	28
1. INTRODUCTION.....	31
2. MATERIALS AND METHODS	33
3. RESULTS	36
4. DISCUSSION	38
5. CONCLUSION	41
6. REFERENCES.....	42
4. CAPÍTULO II	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
3. RESULTADOS.....	66
4. DISCUSSÃO.....	67
5. REFERÊNCIAS.....	70
ARQUIVO SUPLEMENTAR	82
5. DISCUSSÃO GERAL	83
6. CONCLUSÕES GERAIS	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
8. ANEXOS.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cromatina e Epigenética

O DNA nuclear integra um complexo nucleoproteico, compondo a cromatina. Ao DNA se associam proteínas histônicas e não histônicas, podendo também se associar moléculas de RNA. A cromatina é a principal forma de armazenamento, transmissão e expressão das informações genéticas em todas as células vivas (Mello & Vidal 2013). Nas células eucarióticas o complexo nucleoproteico, em torno de 200 pares de bases de DNA, que estão envolvidos ao redor de um octâmero de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) ou suas variantes, formam os nucleossomos, que são as unidades elementares da estrutura nuclear denominada cromatina (Kornberg 1974, Luger et al. 1997, Kornberg & Lorch 1999, Robinson et al. 2006, Mello & Vidal 2013).

As histonas são proteínas básicas classificadas em cinco tipos principais (H1, H2A, H2B, H3 e H4) que apresentam massa molecular baixa, sendo as histonas H3 e H4 altamente conservadas entre as várias espécies eucarióticas. As moléculas das histonas são compostas por um domínio C-terminal, outro globular e um domínio de “cauda” N-terminal. Os domínios de dobra do tetrâmero de histonas centrais no nucleossomo medeiam as interações histona-histona e histona-DNA. Uma quinta classe de histonas, as histonas H1 ou histonas ligantes, ligam-se ao DNA ligante e às histonas do nucleóide do nucleossomo (Elgin & Weintraub 1975, Cutter & Hayes 2015).

As caudas N-terminais das histonas H3 e H4 se estendem das porções centrais estruturadas do nucleóide do nucleossomo, em todas as direções, de forma a liberá-las para interação com o DNA ou com outras proteínas e são essenciais para a condensação da cromatina. Os domínios da região N-terminal dessas histonas contêm uma preponderância de resíduos de arginina e lisina, além de glicina, alanina e treonina (Allan et al. 1982, Spencer & Davie 1999).

As caudas N-terminais das histonas H3 e H4, que se projetam do nucleossomo, são suscetíveis a uma diversidade de modificações pós-traducionais (PTMs). As modificações covalentes mais comuns incluem acetilação, fosforilação, metilação, ubiquitinação, glicosilação e adenosina difosfato (ADP) - ribosilação, importantes para a sinalização epigenética. Essas modificações das histonas têm um papel fundamental na alteração da estrutura e da função da cromatina (Luger et al. 1997, Gilbert et al. 2005, Kouzarides 2007, Burgess & Zhang 2010).

Desde a primeira definição sobre epigenética, proposta por Conrad Waddington, determinando ser mudanças no fenótipo sem alterações no genótipo, várias outras passaram a ser fornecidas. No entanto, não existe consenso sobre como e o que pode (e deve) ser considerado para estudar e definir os processos epigenéticos e sua herança (Waddington 1942, Lacal & Ventura 2018). Em termos gerais, sabe-se que a epigenética envolve alterações no perfil de expressão gênica que não são causadas por alterações na sequência do DNA, enquanto a herança epigenética refere-se à transmissão de certas marcas epigenéticas aos descendentes (Peschansky & Wahlestedt 2014, Allis & Jenuwein 2016, Pang et al. 2017). Também há discussão sobre quão estável e hereditário deve ser um mecanismo para ser classificado como “epigenético” e se é aceitável incluir não apenas as marcas retidas ao longo de gerações de organismos, mas também aquelas transmitidas durante as divisões celulares (Peschansky & Wahlestedt 2014).

A efetivação funcional do programa genético codificado no DNA é controlada principalmente por regulação epigenética, incluindo a metilação do DNA, PTMs das histonas e RNAs reguladores (Davey et al. 2002, Pan et al. 2018). A metilação do DNA em mamíferos ocorre principalmente nos resíduos de citosina dos dinucleotídeos CpG (citosina-fosfato-guanina) levando a formação da 5-metilcitosina (5mC). As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção do padrão de metilação, envolvendo a DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Dupont et al. 2009, Moore et al. 2013, Allis & Jenuwein 2016, Lyko 2018). 5mC é uma marca associada ao silenciamento gênico, seja por interferência na ligação do fator de transcrição ou pelo recrutamento de repressores. Além disso, é fundamental para diversos processos biológicos tais como estabilidade do genoma, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, desenvolvimento embrionário, diferenciação celular além de exercer papéis importantes no desenvolvimento de muitas doenças humanas (Bird 2007, Kulis & Esteller 2010, Wu & Zhang 2014, Duan et al. 2016). Comparada à metilação do DNA, a modificação das histonas é mais complexa e o seu impacto é baseado em vários fatores como tipos de modificação, posição e graus de modificação (Rice et al. 2003, Wang & Liu 2019).

1.2. Modificações de histonas

Desde a descoberta das PTMs nas décadas de 1960 e 1970, muitas evidências se acumularam apontando papéis para modificações específicas nos mecanismos de regulação das informações armazenadas no DNA (Allfrey et al. 1964, Murray 1964, Shilatifard 2006). Essas

modificações não apenas regulam a estrutura da cromatina por estarem lá, mas também recrutam enzimas de remodelação para reposicionar os nucleossomos (Kouzarides 2007, Bannister & Kouzarides 2011).

A acetilação na cauda N-terminal das histonas é evento reversível e acontece principalmente em resíduos de lisina. A acetilação da cromatina neutraliza parte da carga positiva da região da cauda da histona e diminui a interação histona-DNA, ou nucleossomo-nucleossomo e/ou pode sinalizar uma mudança conformacional, mantendo a estrutura do nucleossomo transcrito desdobrada, promovendo a interação dos fatores de transcrição com o DNA nucleossômico, além de promover o recrutamento de outras proteínas. De acordo com isso, a cromatina acetilada é amplamente correlacionada com a ativação transcricional (Tse et al. 1998, Spencer & Davie 1999, Sterner & Berger 2000).

A dinâmica da acetilação nos resíduos de lisina é regulada pela ação oposta de duas classes de enzimas: As acetiltransferases de histonas (HATs), que catalisam a transferência de um grupo acetil do doador acetil-CoA para cadeias laterais de lisina; e as deacetilases de histonas, que catalisam a remoção desses grupos (HDACs) (Sterner & Berger 2000, Khorasanizadeh 2004, Kouzarides 2007).

Em humanos, existem 18 HDACs divididas em quatro classes: a classe I (HDAC1,2,3,8) contém enzimas com semelhança à proteína scRpd3 de levedura; a classe II (HDAC4,5,6,7,9 e 10) com semelhança à proteína scHda1; a classe III, referida como sirtuínas (SirT1-7), que são homólogas às proteínas Sir2; e a classe IV com apenas um único membro, HDAC11 (Bannister & Kouzarides 2011, Seto & Yoshida 2014).

A modificação pós-traducional de histonas por metilação é um tipo importante e generalizado de modificação que é conhecido por influenciar muitos processos fisiológicos como desenvolvimento, respostas celulares, formação de heterocromatina, inativação do cromossomo X, impressão genômica e regulação transcricional, além de participar de condições fisiopatológicas (Feinberg & Tycko 2004, Völkel & Angrand 2007, Greer & Shi 2014).

Diferentemente de algumas modificações de histonas, como a acetilação, que podem afetar a função da cromatina, alterando a carga da histona e as interações estruturais no nucleossomo, a metilação de histonas funciona como um local de nucleação para proteínas que recrutam outras moléculas, alterando assim a conformação da cromatina e/ou a sua transcrição, sem alterar a carga dessa proteína (Berger 2002, Bannister & Kouzarides 2011, Lanouette et al. 2014, Swygert & Peterson 2014). A metilação das histonas envolve a ligação do grupo metil a átomos de nitrogênio nas suas caudas N-terminais dessas proteínas. Entre estas ligações, os resíduos de lisina (Lys ou K) e arginina (Arg ou R) servem como os locais mais comuns de

marcas de metilação descritas (McGrath & Trojer 2015). Dada a sua abundância e a facilidade de preparação, as histonas foram uma das primeiras proteínas caracterizadas com metil-lisina (Murray 1964).

Apesar da sutil natureza físico-química da metilação na lisina, seu potencial regulador é amplo. O número de resíduos modificados, o grau de metilação e o contexto genômico dão origem a um repertório altamente complexo de possíveis saídas funcionais. Além disso, outros níveis de complexidade se acham presentes pelo fato de que essas marcas não funcionam isoladamente, mas cooperativamente com outros tipos de modificação de histonas, bem como com a metilação de DNA para regular precisamente a expressão gênica (McGrath & Trojer 2015, Hyun et al. 2017).

Em geral, como já mencionado, a acetilação de histonas está associada à ativação gênica. Por outro lado, a metilação em um resíduo específico de K está correlacionada com um estado ativo ou silencioso da expressão gênica, dependendo dos resíduos metabolizados (Lanouette et al. 2014). A histona H3 é o principal local de metilação da histona, embora as outras histonas possam também apresentar metilação (Jambhekar et al. 2019). Os locais de metilação de histonas mais amplamente estudados incluem a H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 e H4K20 (Greer & Shi 2014).

De fato, a metilação em diferentes resíduos de lisina nas histonas demonstrou taxas de rotatividade diferencial. Dependendo do contexto biológico, alguns eventos de metilação podem precisar ser mantidos de forma estável (metilação envolvida na herança por mitose de um estado de heterocromatina silenciado), enquanto outros são passíveis de alteração (quando as células se diferenciam ou respondem a sugestões ambientais) (Greer & Shi 2014).

1.2.1. Enzimas metiltransferases e demetilases

Seguindo a nomenclatura mais atual, as enzimas que adicionam ou removem a marca de metilação nos resíduos de lisina são denominadas lisina metiltransferases (KMTs) e lisina demetilases (KDMs), respectivamente, tornando-a dinâmica e reversível (Zhang et al. 2012, Lund et al. 2019). As KMTs utilizam a S-adenosilmetionina (SAM) como doador do grupo metil para transferir um a três grupos metil para os resíduos de lisina. Então, essa reação catalítica resulta em lisina mono-, di- e tri-metilada (Kouzarides 2007, Bannister & Kouzarides 2011, McGrath & Trojer 2015, Lund et al. 2019). Os estados de modificação podem ter resultados funcionais distintos, dependendo do recrutamento de proteínas de ligação que exibem especificidades do estado de metilação (Wu et al. 2017).

A maioria das KMTs é altamente seletiva no que diz respeito ao resíduo de lisina no qual elas operam, bem como ao grau de metilação que elas catalisam (McGrath & Trojer 2015). A metilação pode ocorrer em locais diferentes na mesma histona, mas algumas marcas de histonas são mutuamente exclusivas (Greer & Shi 2014).

Até o momento, as KMTs são divididas em duas famílias, com base na similaridade da sequência do domínio catalítico e na organização estrutural. Uma delas é o disruptor do silenciamento telomérico tipo 1 (DOT1L), que estruturalmente não está relacionado às proteínas do domínio SET e metila K79 na região global da histona H3 (Herz et al. 2013, Allis & Jenuwein 2016, Wang & Liu 2019). Já a outra, é a família de proteínas SET que contêm um domínio SET catalítico, apresentando cerca de 130 aminoácidos. O domínio SET foi originalmente identificado como uma sequência conservada em três proteínas de *Drosophila* envolvidos em processos epigenéticos, o supressor da variegação de efeito de posição 3-9, Su (var) 3-9, um intensificador da cor dos olhos (Enhancer de Zeste), EZ, e o regulador gênico homeótico Trithorax, TRX (Alvarez-Venegas & Avramova 2002, Cheng & Zhang 2007, Lund et al. 2019). Foi demonstrado que muitas proteínas contendo domínio SET exibem atividade catalítica em relação a determinados resíduos de lisina nas histonas, mas evidências emergentes também indicam que várias proteínas não-histonas são especificamente direcionadas por essas enzimas (Herz et al. 2013). Além do domínio SET, essa família de proteína também contém outro domínio proteico definido ou sequência homóloga que é usado para classificar essas proteínas em subfamílias distintas (Zhang et al. 2012, Herz et al. 2013).

Entre as diferentes modificações pós-traducionais das histonas, a metilação em H3K9 e H3K27 é uma das principais modificações covalentes que se correlacionam com a repressão gênica ao nível cromossômico (Pan et al. 2018). Em mamíferos, a subfamília SUV39, que inclui 6 membros (SUV39H1, SUV39H2, G9a, GLP, SETDB1 e SETDB2), metila H3K9 e demonstrou ser o principal determinante da heterocromatina constitutiva, reprimindo a transcrição através do recrutamento da proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Völkel & Angrand 2007, Zhang et al. 2012). A SUV39H1 foi a primeira proteína contendo domínio SET relatada a conter especificidade de metiltransferase em geral e em relação à H3K9. SETDB2 e as enzimas relacionadas, SUV39H1 e SUV39H2, contribuem por sua vez para H3K9me2 e H3K9me3 em heterocromatina pericêntrica e em outras regiões que contêm elementos repetitivos do DNA, como os telômeros, enquanto GLP e G9a catalisam H3K9me1 e H3K9me2 em regiões eucromáticas (Lehnertz et al. 2003, Peters et al. 2003, Krouwels et al. 2005, Herz et al. 2013, Liu et al. 2015, Allis & Jenuwein 2016, Becker et al. 2016, Jambhekar et al. 2019). À SETDB1 foi atribuída a atividade de H3K9me2 e H3K9me3 que direcionaria a repressão de

genes eucromáticos, auxiliando na conversão do estado H3K9 di-metilado para o estado tri-metilado (Herz et al. 2013).

Foi demonstrado que a subfamília *Enhancer of Zeste Homolog* (EZH), que contém EZH1 e EZH2, um componente do complexo PRC2 (Polycomb repressive complex 2) de mamífero, juntamente com outras três subunidades (supressor de Zeste 12 - SUZ12, desenvolvimento de ectoderma embrionário - EED e a proteína associada à RbAp46/48 do retinoblastoma) é membro da família de proteínas do domínio SET e responsável por catalisar a metilação da H3K27 (Pan et al. 2018). Como subunidade catalítica do PRC2, o EZH participa da manutenção do estado repressivo transcricional da cromatina. O EZH2 é responsável pela di- e trimetilação de H3K27 em mamíferos. O EZH1 é uma di- e trimetiltransferase H3K27 mais fraca e é mais altamente expresso em células não proliferativas. Portanto, EZH1/2 funcionam de forma redundante para implementar todos os três estados de metilação de H3K27 (Herz et al. 2013, Allis & Jenuwein 2016, Chen et al. 2016, Hyun et al. 2017). A monometilação de H3K27 tende a ser associada à heterocromatina constitutiva (juntamente com H3K9me3) e aos intensificadores inativos, enquanto H3K27me2/3 ocorrem em grande parte na heterocromatina facultativa (Herz et al. 2013). A H3K27me2 desempenha um papel no controle da fidelidade do intensificador, evitando a ativação não programada de intensificadores específicos (Zhang et al. 2012, Pan et al. 2018).

A metilação de K na histona também está envolvida na ativação transcricional, mas, nesse caso, os principais locais de metilação incluem H3K4. Essa marca encontra-se enriquecida na região promotora e no local inicial da transcrição (Hyun et al. 2017). H3K4me1/2/3 foram mostradas por marcar diferencialmente genes de transcrição ativa. Em geral, a monometilação de H3K4 é uma marca ativadora exclusiva dos intensificadores relatada em vários tipos celulares (Heintzman et al. 2007, Roh et al. 2007, Völkel & Angrand 2007, Shinsky et al. 2015). No entanto, H3K4me2 encontra-se nos locais de início da transcrição e H3K4me3 é uma marca registrada dos promotores da transcrição ativa (Bernstein et al. 2002, 2005, Santos-Rosa et al. 2002, Barski et al. 2007, Greer & Shi 2014, Hyun et al. 2017). Nos humanos, a subfamília SET1 que inclui MLL 1-4 (*Mixed Lineage Leukemia*) e SET 1A / B, possui uma atividade metiltransferase específica para H3K4 (Shilatifard 2012, Shinsky et al. 2015). De fato, os complexos MLL2/3 estão ligados à monometilação de H3K4 em potenciadores ativos. O complexo central MLL1 possui predominantemente atividade mono- e di-metiltransferase *in vitro*. Por outro lado, foi sugerido que os complexos SETd1A / B catalisam a maior parte da trimetilação de H3K4 nas células, embora dependam de outros fatores exclusivos dos complexos (Shinsky et al. 2015).

Pesquisas mapearam vários resíduos de metil-lisina nas proteínas histonas e relacionaram essas modificações a sinais biológicos específicos, como os evidenciados acima. Entretanto, essa visão aumentou de complexidade uma vez que há casos em que as mesmas modificações podem ser associadas a atividades opostas, como ativação e repressão transcricional. H3K4me2 e H3K4me3 são exemplos ilustrativos deste ponto; geralmente estas marcas estão associadas à ativação transcricional, mas também podem ser associadas à repressão (Greer & Shi 2014, Lanouette et al. 2014). Outro exemplo, acontece com a H3K27me3 que geralmente é encontrada em genes repressos, porém tendo sido identificados em um conjunto de genes que carregam essa marca em seus promotores e que estão associados à transcrição ativa (Young et al. 2011). Além disso, alguns estudos também evidenciam que mono-metilações de H3K27 e H3K9 estão ligadas à ativação de genes, uma vez que níveis mais altos dessas modificações foram detectados em promotores mais ativos ao redor dos sítios de início da transcrição (TSS), podendo levar à alta mobilidade de histonas e nucleossomos com estrutura de cromatina frouxa para iniciação e alongamento da transcrição (Fig. 1) (Barski et al. 2007, Pan et al. 2018).

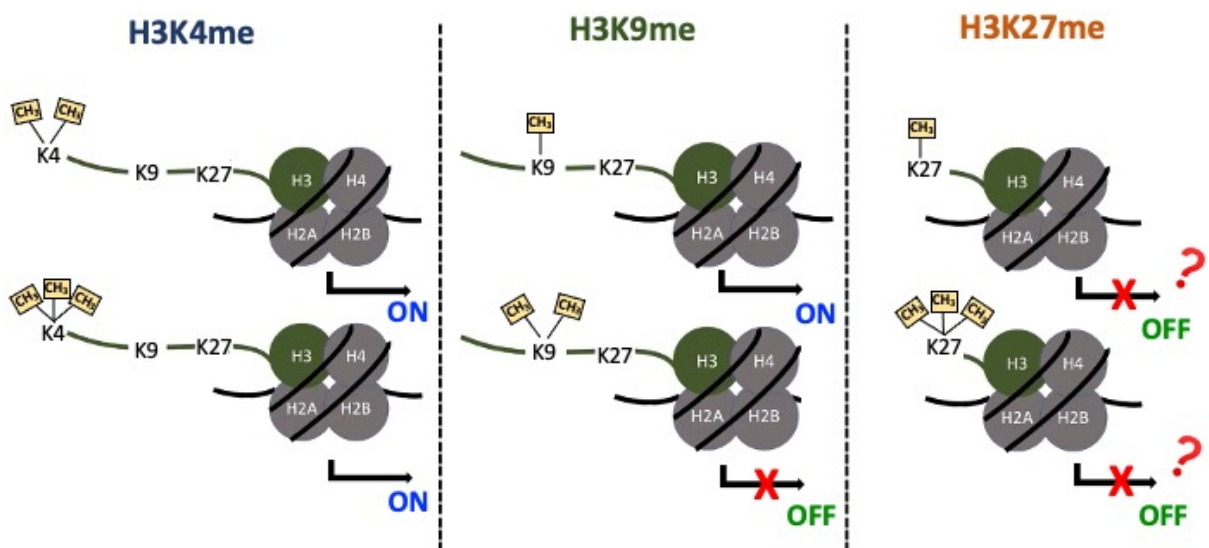


Figura 1. As marcas H3K4me2/3 e H3K9me estão presentes em regiões de cromatina transcionalmente ativa, enquanto os níveis de H3K9me2 e H3K27me/3 estão associados ao silenciamento gênico. No entanto, as mesmas modificações, H3K27me/3, podem ser associadas a atividades opostas, como ativação e repressão transcricional a depender do contexto biológico. Esquema modificado de Susan Strome apresentado na Conferência de Epigenética & Cromatina 2020.

Vem sendo sugerido que tais mudanças na atividade transcricional possam estar ocorrendo devido à participação de diferentes proteínas efetoras. Relatos científicos propõem

que elas reconheçam modificações específicas de histonas, sendo assim componentes importantes na determinação da função das modificações. Marcas combinadas em PTMs de histonas também podem ter funções diferentes para as mesmas quando aparecem isoladamente. Além disso, modificações combinatórias em histonas são eficientemente reconhecidas por proteínas com múltiplos domínios, afetando assim os resultados específicos (Greer & Shi 2014, Lanouette et al. 2014).

O grupo metil incorporado na lisina pode ser removido pelas lisina-demetilases (KDMs). Em humanos, esse processo é catalisado por duas subfamílias distintas KDMs, que são classificadas com base na organização de seus domínios catalíticos e no tipo de mecanismo oxidativo. Os membros da subfamília KDM1 ou demetilases específicas de lisina (LSDs), LSD1 e LSD2, requerem a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) durante a catálise de desmetilação, enquanto os da subfamília KDMs JmjC que contêm o domínio Jumonji (JmjC), removem os grupos metil da lisina de uma forma dependente de ferro e α -cetoglutarato (Thinnes et al. 2014, Wang & Liu 2019). Semelhante ao caso das KMTs, as KDMs geralmente são seletivas para um determinado resíduo de lisina e as KDMs individuais catalisam especificamente a remoção de grupos metil das lisinas mono, di e tri- metiladas (McGrath & Trojer 2015).

A regulação incorreta de metilação de lisina numa histona tem sido implicada em vários tipos de tumores. No entanto, a metilação de lisina em histona é um tipo de PTM reversível, oferecendo uma promessa considerável para terapias baseadas na natureza adaptativa do controle epigenético (Feinberg & Tycko 2004, Greer & Shi 2014, McGrath & Trojer 2015, Allis & Jenuwein 2016, Hyun et al. 2017).

1.3. O ácido valproico/valproato de sódio e sua atuação sobre a cromatina

O ácido valproico sintetizado por Burton em 1882, é um ácido graxo de cadeia curta e ramificada com oito carbonos (Fig. 2). As propriedades anticonvulsivas do ácido valproico foram reconhecidas pela primeira vez em 1963, enquanto Meunier e colaboradores estudavam os efeitos antiepiléticos de novas moléculas. Ao utilizarem esse agente como solvente orgânico para outros compostos, ficaram surpresos com a capacidade do mesmo em proteger animais experimentais contra convulsões. Após ensaios clínicos, o ácido valproico foi então aprovado em 1978 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA como uma droga antiepilética (AED) (Silva et al. 2008, Tolou-Ghamari & Palizban 2015, Pitetzis et al. 2017, Lipska et al. 2020).

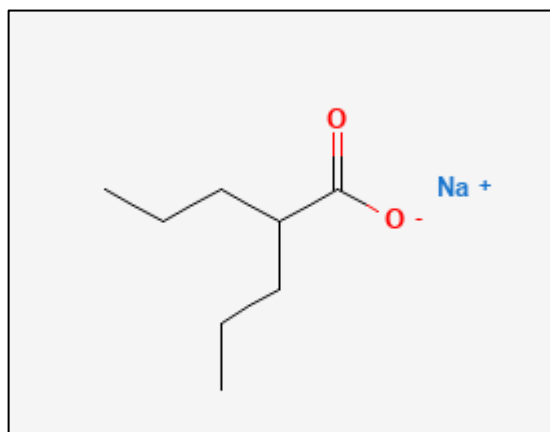


Figura 2. Estrutura química do VPA. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-valproate>.

Desde então, o ácido valproico associado à sua forma salina, valproato de sódio (VPA), tornou-se um dos medicamentos anticonvulsivos mais frequentemente usado. De fato, ele também é indicado para tratar outras doenças, incluindo distúrbios psicológicos, como esquizofrenia, abstinência e dependência de cocaína, além de distúrbios neurológicos, como por exemplo, enxaqueca e doença de Alzheimer (Peterson & Naunton 2005, Terbach & Williams 2009, Tomson et al. 2016). Apesar de sua eficácia médica, complicações graves, incluindo teratogenicidade, foram relatadas após sua administração. Elas acontecem em exposição pré-natal, aumentando o risco durante o desenvolvimento embrionário de malformação congênita, abrangendo problemas cardiovasculares e craniofaciais, além de doenças neurológicas e defeitos no tubo neural do feto (Ahir & Pratten 2014, Chanda et al. 2019).

O VPA possui diferentes mecanismos de ação. A atividade antiepiléptica está associada, principalmente, a modificações do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) e a bloqueio dos canais de sódio e de cálcio do tipo-T (Phiel et al. 2001, Perucca 2002, Lagace et al. 2004, Chateaufvieux et al. 2010, Scialdone et al. 2017).

Foi também demonstrado que o VPA pode inibir a proliferação celular e o índice mitótico, induzindo parada no ciclo celular e apoptose em células de carcinoma, como proposto para neuroblastomas e gliomas (Blaheta & Cinatl 2002, Das et al. 2007, Fang et al. 2018). Além disso, sozinho ou combinado com outras drogas, o VPA tem sido extensivamente estudado como um agente antitumoral promissor em vários ensaios e estudos clínicos para uma variedade de cânceres afetando pâncreas, pulmão, próstata, mama, glia, tireóide e em leucemia mieloide

aguda e carcinoma endometrial (Das et al. 2007, Yang et al. 2007, Duenas-Gonzalez et al. 2008, Batty et al. 2009, Venkataramani et al. 2010, Heers et al. 2018, Li et al. 2019, Tran et al. 2019). No entanto, ele não é ainda indicado pela FDA para o tratamento de nenhum câncer, embora já tenha sido aprovado em testes clínicos dos tipos I e II (Heers et al. 2018).

Com um crescente interesse em se conhecer como se procedia a atividade do VPA, descobriu-se que em doses terapêuticas para o tratamento contra a epilepsia (0,3-1,0 mM) o mesmo atuaria como HDACi, inibidor de HDAC de classes I e II, levando a um aumento na acetilação de histonas H3 e H4 em vários tipos celulares (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Lagace et al. 2004, Eyal et al. 2005, Chateauvieux et al. 2010, Sun & Coy 2014, Aztopal et al. 2018, Ibrahim et al. 2020). Este foi um forte indício de que o VPA atuaria diretamente sobre marcas epigenéticas na cromatina e, portanto, sobre a transcrição gênica através da remodelação da cromatina.

Outra via de atuação do VPA passou então a ser descrita, com consequências regulatórias de mais longo termo para a expressão gênica do que a acetilação de histonas, que é um fenômeno mais facilmente reversível e de menor estabilidade. Esta via consiste na demetilação do DNA (Milutinovic et al. 2007, Lee et al. 2010, Perisic et al. 2010, Jiang et al. 2012, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019). Descobriu-se também que a demetilação do DNA pelo VPA poderia ser induzida em simultaneidade à inibição de HDAC (Detich et al. 2003, Milutinovic et al. 2007, Wang et al. 2009, Dong et al. 2010). Foi, por outro lado, constatado que a via de demetilação do DNA por efeito do VPA possa variar conforme o tipo celular considerado. Pode ser passiva, por diminuição na expressão da DNA metiltransferase 1 (DNMT1) (Schuermann et al. 2016) ou ativa, por atuação de enzimas dioxigenases da família das *ten-eleven translocation* (TETs), que oxidam a 5-metilcitosina (5mC) nos intermediários 5-hidroximetilcitosina (5hmC), 5-carboxicitosina (5caC), 5-formilcitosina (5fC) e finalmente citosina C (Ito et al. 2010, Blaschke et al. 2013, Rocha et al. 2019). Também foi relatado ocorrer uma interação entre essas duas vias metabólicas (Pastor et al. 2013). A via de demetilação do DNA pelo VPA pode igualmente diferir em diferentes tipos de células tumorais agressivas, sendo, por exemplo, passiva em células de adenocarcinoma mamário MCF-7 (Marchion et al. 2005) e predominantemente ativa em células HeLa (Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019).

Entre os efeitos exercidos pelo VPA sobre marcas epigenéticas na cromatina, descobriu-se em alguns tipos celulares que esta droga também atua sobre a metilação de histonas. Há relatos de que HDACi, incluindo o VPA, podem desencadear aumentos na metilação de H3K4 *in vitro* (Nightingale et al. 2007, Tung & Winn 2010). Esses aumentos foram observados em células-tronco embrionárias (ESC) de camundongos, neurônios corticais

de ratos e astrócitos (Marinova et al. 2011, Boudadi et al. 2013). Foi encontrado mais recentemente que, em células renais embrionárias humanas HEK293, o VPA induz hipermetilação de H3K4 em consonância com o estado hipometilado de H3K27 e inibição de HDAC (Ganai et al. 2015).

Além de todos os efeitos constatados por ação do VPA, acima mencionados, de natureza epigenética, o VPA pode também apresentar afinidade de ligação à histona H1 (Sargolzaei et al. 2017, Vidal & Mello 2020) ou seja, ter ainda um outro alvo potencial até então desconhecido. Essa constatação foi obtida por análise de denaturação térmica, espectro de absorção no ultravioleta e intensidade de emissão fluorescente em H1 isolada de fígado de rato e dialisada contra VPA, e espectroscopia no infravermelho. A investigação de anisotropias ópticas e da espectroscopia no infravermelho realizada em nosso laboratório mostrou a interferência do VPA em concentrações elevadas no padrão de cristalização do DNA previamente descrito (Vidal & Mello 2017) e no próprio perfil espectral do DNA (Vidal & Mello 2020). Por outro lado, foi também encontrado que o VPA afeta a conformação das histonas H1 e H3, expandindo-se assim o conhecimento sobre a ação potencial do VPA (Vidal & Mello 2020).

Conclui-se, assim, que o VPA possa atuar segundo diferentes vias, sobre diferentes alvos e com diferentes e amplas consequências. É importante, pois, que se dê continuidade à avaliação dos efeitos do VPA em diferentes tipos celulares e diferentes condições experimentais, pois muito ainda se desconhece nesse campo e um conhecimento científico básico nesse sentido é primordial, para que avanços quanto a propostas terapêuticas futuras que venham a utilizar o VPA ou drogas símile possam ser desenvolvidos.

Particularmente em células tumorais humanas HeLa, linhagem celular de câncer cervical, tanto os efeitos de inibição de HDAC como de demetilação do DNA pelo VPA, acompanhados por remodelação textural da cromatina, já foram demonstrados (Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019). No que se refere à demetilação do DNA, este fenômeno tem se revelado complexo, e com predominância da via ativa (Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019) diferindo daquela via reportada para outro tipo de linhagem tumoral, como a das células humanas mamárias MCF-7 (via passiva) (Marchion et al. 2005). Pouco, porém, se conhece ainda nas células HeLa sobre efeitos do VPA ao nível de metilações nas histonas H3, ao lado da conhecida inibição de HDAC e de aumento global de acetilação de H3, e muito menos ainda sobre uma possível interação da droga a histonas e ao DNA, nas células HeLa, o que seria matéria de interesse para o conhecimento do potencial de ação dessa droga.

Ainda, tem sido revelado que em células HeLa as proteínas p16 e p21, usualmente atuantes no ciclo celular como inibidoras dos complexos CDK-ciclinas, têm uma regulação aberrante condicionada a modificações de histonas (Chen et al. 2004, Lin et al. 2005, McLaughlin-Dublin et al. 2011, Fang et al. 2014, Beyer et al. 2017). A investigação da expressão dos genes *p16* e *p21* e da abundância das proteínas por eles codificadas nas condições epigenéticas de alteração nos padrões de metilação de histonas sob a ação do VPA seria igualmente matéria relevante de investigação.

2. OBJETIVOS

1. Determinar se o padrão de marcas epigenéticas, H3K4me2/me3, H3K9me/me2, H3K27me/me3 e o de enzimas envolvidas nas vias de metilação de histonas (KMT2D e EZH2) e demetilação (KMD3A) se tornam afetados em resposta ao VPA, em células HeLa.

2. Conhecer se o tratamento de células HeLa pelo VPA induz a formação de complexos VPA–histonas como os já descritos em preparações *in vitro*.

3. Investigar se os níveis de expressão dos genes *p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}* e a abundância das proteínas por eles codificadas, bem como os níveis de acetilação da histona H3 em células HeLa possam estar associados a alterações nas modificações em histonas promovidas pelo VPA.

3. CAPÍTULO I

Artigo:

Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells

Publicado em Current Molecular Pharmacology. 2022

doi: 10.2174/1874467215666220316110405

Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells

Marina Amorim Rocha, Benedicto de Campos Vidal, Maria Luiza Silveira Mello*

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

*E-mail address: mlsmello@unicamp.br; Phone: +55 19 3521-6122

Running title: VPA effects on histone methylation of HeLa cells

Abstract

Valproic acid/sodium valproate (VPA), a well-known anti-epileptic agent, inhibits histone deacetylases, induces histone hyperacetylation, and promotes DNA demethylation in several cell types, including HeLa cells. It also affects the histone methylation status in some cell models. Global levels of H3K4me2/me3, H3K9me/me2, and H3K27me/me3 have been described as potential markers for cancer prognosis. However, these markers have not been studied in VPA-treated tumor HeLa cells. In this study, the effect of 0.5 mM and 2.0 mM VPA for 24 h on H3K4me2/me3, H3K9me/me2 and H3K27me/me3 signals as well as on *KMT2D*, *EZH2*, and *KDM3A* gene expression was investigated using confocal microscopy, Western blotting, and RT-PCR. Histone methylation changes were also investigated by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR). We found that VPA induces increased levels of H3K4me2/me3 and H3K9me, which are indicative of chromatin activation. Particularly, H3K4me2 markers appeared intensified close to the nuclear periphery, which may suggest their implication in increased transcriptional memory. The abundance of H3K4me2/me3 in the presence of VPA was associated with increased methyltransferase *KMT2D* gene expression. VPA induced hypomethylation of H3K9me2, which is associated with gene silencing, and concomitant with the demethylase *KDM3A*, it increased gene expression. Although VPA induces increased H3K27me/me3 levels, probably regulated by the methyltransferase *EZH2*, no causal connection between these markers and gene expression could be suggested. Histone FTIR spectra were not affected by VPA under the present experimental conditions. Whether our epigenetic results are consistent with VPA affecting the aggressive tumoral state of HeLa cells, further investigation is required.

Keywords: Epigenetics; HeLa cells; histone methylation; histone demethylase; methyltransferases and VPA.

1. INTRODUCTION

Valproic acid is a short-chain branched fatty acid that, in association with its sodium salt (sodium valproate) (VPA), is widely prescribed for the treatment of seizure disorders, inhibiting the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) and blocking T-type calcium and voltage-gated sodium channels [1, 2]. With a growing interest in understanding the mechanism of VPA action, it was discovered that under therapeutic doses for the treatment of epilepsy (0.3–1.0 mM), it acts on epigenetic markers by inhibiting class I histone deacetylases (HDACs), favoring the acetylation of histones H3 and H4 [2-9] and affecting gene transcription through chromatin remodeling [10].

VPA inhibits cell proliferation, affects mitotic indices, promotes cell cycle arrest, and elicits intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in carcinoma cells, as demonstrated for neuroblastomas, gliomas and cervical cancer [11-14]. In addition, it alone or synergistically combined with other drugs has been extensively studied as a promising antitumor agent in several trials and clinical studies for a variety of tumors affecting the pancreas, lung, prostate, breast, glia, and thyroid as well as in acute myeloid leukemia and endometrial carcinoma [12, 15-21].

Another VPA action, which is more stable than the induction of histone acetylation changes, consists of DNA demethylation [22-27]. The DNA demethylation process induced as a VPA effect, which leads to conversion of 5-methylcytosine to cytosine, occurs through an active or a passive pathway, which varies according to the cell type considered. While the passive pathway involves a decrease in the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1), as demonstrated in MCF-7 human mammary tumor cells [28, 29], the active pathway occurs through the action of dioxygenase enzymes of the *ten-eleven translocation* (TET) family, which oxidize 5-methylcytosine in the intermediates 5-hydroxymethylcytosine, 5-carboxycytosine, 5-formylcytosine and finally cytosine [27, 30, 31]. An interaction between these two metabolic pathways has also been reported [32]. In HeLa cells, VPA-induced DNA methylation acts predominantly through the active pathway, although a passive pathway may also be involved [27, 33].

Other epigenetic effects exerted by VPA consist of the methylation and demethylation of histones. Methylation at a specific K residue has been correlated with an active or silent state of gene expression depending on the metabolized residues [34]. Histone H3 contains the

most widely studied methylation sites, which include lysine residues 4, 9, 27, 36, and 79; lysine residue 20 is also an important target of epigenetic modification in histone H4 [35].

Mono-, di- and trimethylated H3K4 (H3K4me/me2/me3) differentially label active transcription genes. In general, H3K4me is a unique activator marker of enhancers reported in several cell types [36-39]. H3K4me2 is found at the start of transcription, and H3K4me3 is a registered trademark of the promoters of active transcription [35, 40-44]. Monomethylation of H3K9 and H3K27 is linked to gene activation because higher levels of this marker have been detected in more active promoters around transcription initiation sites, which may lead to the high mobility of histones and nucleosomes with a loose chromatin structure for the initiation and elongation of transcription [43, 45]. On the other hand, H3K27 monomethylation (H3K27me) along with H3K9 trimethylation (H3K9me3) tend to be associated with constitutive heterochromatin and inactive enhancers, while H3K27 di- and trimethylation (H3K27me2/me3) occur largely in facultative heterochromatin [46]. However, H3K27me3 has also been identified in a set of genes that carry this marker in their promoters and that are associated with active transcription [47].

It has been reported that HDAC inhibitors (HDACis), including VPA, can trigger increases in H3K4 methylation *in vitro* in mouse embryonic stem cells and rat cortical neurons and astrocytes [48-51]. More recently, VPA has been found to induce the hypermethylation of H3K4 in line with the hypomethylated state of H3K27 and inhibition of HDAC in HEK293 human embryonic kidney 293 cells [52]. In addition to these effects on epigenetic markers, VPA may have a binding affinity for chromatin components [10, 53, 54]. The results obtained using high-performance polarizing microscopy and Fourier-transform infrared microspectroscopy (FTIR) have indicated that VPA has the potential to interact with DNA and histones *in vitro* [10]. This finding raises the question of whether such a drug would interact with histones in chromatin, which could be determined in histones extracted from cells cultivated in the presence of VPA. Since VPA can act following different pathways, on different targets and with different and wide consequences, it is thus important to continue evaluating the effects of VPA in different cell types and under different experimental conditions to contribute to a fuller understanding of this drug's targets and metabolic pathways, especially because of its potential for therapeutic proposals.

Regarding HeLa tumor cells, the effects of VPA on HDAC inhibition, histone acetylation, and DNA demethylation, accompanied by the textural remodeling of chromatin, have already been demonstrated [10, 26, 27, 55, 56]. However, no report exists on the effects

of VPA at the level of the methylation status of histones H3 and H4 and on a possible VPA-histone interaction. In the present study, using immunofluorescence, WB, quantitative real-time PCR (RT-PCR) for key enzymes involved in histone methylation (KMT2D and EZH2) and demethylation (KMD3A) pathways and FTIR assays, we investigated whether VPA affects the H3K4me2/me3, H3K9me/me2, and H3K27me/me3 methylation levels and interacts with histone molecules in HeLa cells.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Cell culture and VPA treatments

HeLa cells (ATCC:CCL-2) acquired at passage 10 from the **Emerging Virus Studies Laboratory** (LEVE) at UNICAMP and validated at the Technical Directorate for Teaching and Research Support (DTAPEP) of the Faculty of Medicine Foundation (University of São Paulo, USP) were used at passages 11/45 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) supplemented with fetal bovine serum (FCS) (Nutricell Cellular Nutrients, Campinas, SP, Brazil) and penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich®, 100 IU/mL and 100 µg/mL, respectively) at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere.

For all assays, cells were initially cultivated in complete medium for 24 h in the absence of the drug. Then, when treating them with VPA, 1% FCS was used in this medium. Cells grown in the absence of VPA were used as controls.

For immunocytochemistry/immunofluorescence tests, cells were seeded in 24-well plates onto round coverslips at 5×10^4 cells/mL and treated with 2 mM VPA for 24 h. For the extraction of histones, cells were cultured at a concentration of 1.0×10^5 cells/mL in 6-well plates and treated with 0.5 mM and 2 mM VPA for 24 h. A MTT assay showed that VPA did not reduce cell viability under these VPA treatment conditions [57]. For this assay, cell culture was performed in 96-well plates at a concentration of 2×10^5 cells/mL under treatment with 1, 2, 4, 6, 20, and 40 mM VPA for 24 h.

2.2. Immunocytochemistry/Immunofluorescence assays

VPA-treated HeLa cells grown on coverslips, as described above, were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer at a pH of 7.4 for 10 min, washed with PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) for 10 min and blocked with 10%

BSA in PBS for 30 min. Then, the cells were incubated overnight with rabbit anti-H3K4me2 (1: 1600 dilution), anti-H3K4me3 (1: 2000 dilution), anti-H3K9me2 (1: 200 dilution), anti-H3K27me3 (1: 1600 dilution) (Cell Signaling Technology®, Danvers, USA), anti-H3K9me (1: 1000 dilution), and anti-H3K27me (1: 1000 dilution) (Abcam, Cambridge, USA) primary antibodies in blocking solution at 4 °C and protected from light, followed by extensive PBS washes. To detect the primary antibodies, a goat anti-rabbit antibody conjugated to fluorochrome Alexa-Fluor 488 (1:1000 dilution) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA) was used for 1 h in the dark, followed by nuclear counterstaining with DAPI for 1 h. The preparations were washed again and mounted in VECTASHIELD (Vector, USA). The images were captured using a Leica TCS SP5 II f confocal microscope at the Central Laboratory of High-Performance Technologies in Life Sciences (LaCTAD) at Unicamp.

2.3. Histone acid extraction

Total histones were extracted following the description by Shechter and coworkers [58], with minor modifications. Briefly, VPA-treated cells were centrifuged and resuspended in hypotonic lysis buffer (10 mM Tris-Cl (pH = 8.0), 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with stirring for at least 30 min at 4 °C to promote hypotonic swelling and cell lysis. To obtain the aggregated cores, the samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C, the supernatant was discarded, and the cores were resuspended in 400 µL of 0.4 N H₂SO₄. To obtain histones and remove nuclear debris, the samples were centrifuged at 16,000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was transferred to a microcentrifuge tube, and histones were precipitated by adding 33% trichloroacetic acid (TCA) (Labsynth®, Diadema, SP). Subsequently, the material was incubated overnight at 4 °C, followed by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was removed. The histone pellet was washed with cold acetone without disturbing it, and after centrifugation at 16,000 g for 5 min at 4 °C, the supernatant was carefully removed, and the histones were air-dried for 20 min at room temperature. The histone pellet was dissolved in 100 µL of deionized water (ddH₂O).

The Bradford assay (Sigma–Aldrich®) was used to determine protein concentrations using BSA as a standard. The absorbance values of all samples were measured after incubation for 1 h at room temperature at $\lambda = 595$ nm in a Multiskan™ FC microplate photometer (Thermo Scientific®).

2.4. Western Blot

Histone samples (5 µg) were separated by SDS–PAGE on 15% polyacrylamide gels, followed by transfer to nitrocellulose membranes (Thermo Scientific®). The membranes were blocked in 4% BSA for 2 h and incubated separately with the corresponding rabbit anti-H3K4me2 (1:1000 dilution), anti-H3K4me3 (1:1000 dilution), anti-H3K9me2 (1:1000 dilution), anti-H3K27me3 (1:1000 dilution) (Cell Signaling Technology®), anti-H3K9me (1:1000 dilution), and anti-H3K27me (1:1000 dilution) (Abcam) primary antibodies overnight in blocking solution at 4 °C. After extensive washes, the membranes were incubated with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to peroxidase (1:5000 dilution) (Chemicon®) in blocking solution for 2 h, followed by several washes. Protein blots were captured by WB ECL transfer detection (Amersham®, Pittsburgh, PA, USA) and visualized by chemiluminescence with the Alliance 6.7 imaging system (UVITEC, Cambridge, UK) at the Research Center at Obesity and Comorbidities (University of Campinas, Brazil). As a protein loading control, the membranes were incubated with histone H4 (1:1000 dilution) (Abcam). The ratios for histone modifications were obtained using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

2.5. RT–PCR

For gene expression analysis, VPA-treated cells were subjected to total RNA isolation using a RNeasy mini kit (Qiagen®, Hilden, Germany) followed by cDNA production using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems®, Hilden, Germany). RT–PCR plates were prepared using TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®), the produced cDNA and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems®) for *KMT2D* (Hs00912419_m1), *KMD3A* (Hs00218331_m1) and *EZH2* (Hs00544830_m1), with GAPDH (Hs02758991_g1) as the endogenous control. RT–PCR was conducted on a StepOnePlus™ System (Applied Biosystems®). Relative quantification was achieved in three independent experiments with the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

2.6. FTIR spectral profiles

2.6.1. Materials

Total histones were extracted from HeLa cells cultivated for 24 h in the presence of 2 mM VPA. Histones from untreated cells were used as controls.

Ten-microliter drops of histone solutions dissolved in 100 µL of deionized water were dripped perpendicular to strain-free glass slides and left in the refrigerator overnight for

preliminary drying. These drop-casting preparations, which occupied a 4–5 mm hemisphere diameter, were air-dried at 37 °C, rinsed in 80% ethanol, and air-dried again at 37 °C for 1 h before examination at an ambient relative humidity < 70% at 27 °C.

2.6.2. Equipment/software

An Illuminat IR II™ microspectroscope (Smiths Detection, Danbury, CT, USA) equipped with a liquid-nitrogen cooled mercury-cadmium-telluride detector and connected to an Olympus BMX-51 microscope (Olympus America, Center Valley, PA, USA) with an attenuated total reflection (ATR) diamond objective (magnification 36x) was used for the acquisition of the FTIR spectra of the samples. Grams/AI 8.0 software for spectroscopy (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) was used.

2.6.3. Procedures

Absorbance values for the histone samples and the corresponding background were estimated using 64 scans for each spectral profile in the 4000–650 cm⁻¹ wavenumber range, with a resolution of 4 cm⁻¹ as per the instructions furnished by the equipment supplier. The measurement site was equal to square of 25 µm per side. A signal-to-noise ratio of > 50 was the performance validation criteria of the equipment. Smoothing and baseline correction using four fitting points and level-plus-zero were applied to each raw spectrum using Grams/AI 8.0 software. Average spectra were then obtained for treated and untreated samples.

2.7. Statistical analysis

For MTT, immunofluorescence, RT–PCR and WB tests, the Shapiro–Wilk test was used to assess the normality of the data before choosing the statistical test. The significance of the immunofluorescence results was assessed using the Mann–Whitney nonparametric test. RT–PCR, WB results and infrared absorbance values were evaluated using ANOVA, and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. At least three independent experiments were performed. The analyses were carried out using GraphPad Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

3. RESULTS

3.1. VPA induces global di- and trimethylation of K4 in histone H3 of HeLa cells

Immunofluorescence and WB assays demonstrated that the treatment of HeLa cells with VPA for 24 h promoted a significant increase in the intensity of fluorescence signals and in the protein abundance of H3K4me2/me3 (Fig. 1A, B). The effects involving H3K4me2 were observed in the cells treated with 2 mM VPA when analyzing the immunofluorescence signals (Fig. 1A [a-d]) and with 0.5 mM and 2 mM VPA when analyzing the levels of protein expression (Fig. 1A [e, f]). A selectively more intense response regarding H3K4me2 was observed at the nuclear periphery after 2 mM VPA treatment (Fig. 1A [a - c]). Treatment with VPA increased the intensity of fluorescence signals (Fig. 1B [a-d]) and the protein levels of H3K4me3 (Fig. 1B [e, f]) only in the cells treated with 2 mM VPA. The increase in the expression of both modified histones was greater with the highest concentration of VPA (Fig. 1 Af, Bf), suggesting that VPA provokes a dose-dependent response to these histones.

3.2. VPA induces changes in mono- and dimethylation of K9 in histone H3 of HeLa cells

While an increase in the intensity of the fluorescence signals relative to the H3K9me marker was detected after the 2 mM VPA treatment (Fig. 2 A [a-d]), an increase in the abundance of this modified histone was detected even after treatment with the 0.5 mM VPA dose (Fig. 2 A [e, f]). On the other hand, regarding H3K9me2, no change in the immunofluorescence response was observed following VPA treatment (Fig. 2 B [a-d]), although a significant decrease in the abundance of the modified histone occurred after treatment with 2 mM VPA (Fig. 2 B [e, f]).

3.3. VPA induces an increase in mono- and trimethylation of K27 in histone H3 of HeLa cells

An increased intensity of the fluorescence signals after the 2 mM treatment occurred for the H3K27me marker but not for the H3K27me3 marker (Fig. 3 A [a-d], 3 B [a-d]). Nevertheless, after VPA treatment, the fluorescence signals for H3K27me3 appeared more intensely concentrated at the nuclear periphery (Fig. 3 B [a-c]). While the abundance of the modified histone H3K27me was not affected by 0.5 mM or 2 mM VPA (Fig. 3 A [e, f]), the abundance of H3K27me3 increased significantly only after the 2 mM VPA treatment (Fig. 3 B [e, f]).

3.4. VPA affects the expression of genes related to key proteins involved in histone methylation and demethylation pathways in HeLa cells

When using RT-PCR, we observed that VPA induces an upregulation of the genes *KMT2D*, *KMD3A* and *EZH2* (Fig. 4 a-c). To define the increase in H3K4me2/me3 markers,

we assessed the mRNA expression levels of *KMT2D*, which is responsible for a major mammalian mono-, di- and trimethyltransferase acting on H3K4. Significantly increased responses to treatment with 0.5 and 2 mM VPA in HeLa cells were then observed (Fig. 4 a). To investigate the molecular mechanism involved in the global increase in H3K27me/me3 induced by VPA, *EZH2* gene expression levels were estimated. EZH2 is the catalytic subunit that regulates epigenetic H3K27me/me3 modifications. We found that only the 2 mM VPA dose induced the expression of *EZH2* (Fig. 4 b). Furthermore, we found that the expression of the *KMD3A* gene, related to a histone demethylase that is required for inducing H3K9me2 demethylation, was also increased after treatment with 2 mM VPA (Fig. 4 c).

3.5. Epigenetic changes in histone methyl groups do not significantly affect the FTIR spectra of the 2 mM VPA-treated HeLa cells

The FTIR spectral profiles for total histones isolated from the HeLa cells that were cultivated in the presence of 2 mM VPA for 24 h did not reveal drastic changes in comparison to the histone global profiles from untreated cells (Fig. 5 a-c). The peaks of the main bands typical of protein molecules with respect to amides A, I and II (Table 1) were evident at the same frequency intervals in the histones provided by both treated and untreated cells (Fig. 5 a-c). The absorbance intensity in the amide I and amide II band peaks did not decrease with VPA treatment (Fig. 5 c, Table 2).

Regarding the contribution of the histone -CH₃ and -CH₂ groups to the FTIR spectra, the absorbances in the 2966–2871 cm⁻¹ spectral window in response to VPA treatment appeared to be slightly higher than those of the untreated control (Fig. 5 c, Table 2). The same applies to the small band peak at 1330 cm⁻¹, which may correspond to vibrations assigned to -CH₃ group deformation [66] (Tables 1 and 2). However, these tendencies were not statistically significant at the $P < 0.05$ level.

4. DISCUSSION

The present results demonstrated that VPA can affect the H3K4me2/me3, H3K9me/me2 and H3K27me/me3 methylation markers in HeLa cells. Generally, the 2 mM VPA concentration chosen for treatment of the cells for 24 h was more effective in inducing significant changes in these markers than the 0.5 mM dose. Cytotoxic effects have not been

previously demonstrated when treating HeLa cells for 24 h with VPA concentrations lower than 4 mM [57].

We found that VPA induces increased levels of H3K4me2/me3 and H3K9me markers, which are associated with active gene transcription and have been previously reported after treatment with HDAC inhibitors, including VPA, in HL60 cells, mouse embryonic stem cells, primary blast cells of patients with acute myeloid leukemia, rat astrocytes and cortical neurons, fibroblasts, human breast cancer cells, pig embryos, rat hippocampus and a human leukemia cell line [20, 48-50, 67-71]. The abundance of H3K4me2/me3 in the presence of VPA in HeLa cells was associated with increased gene expression of the methyltransferase KMT2D.

H3K4me2 is associated with a small subset of genes that become prepared for rapid activation upon stimulation [72]. Our confocal microscopy images permitted us to visualize that the H3K4me2 markers appeared intensified close to the nuclear periphery after VPA treatment. The accumulation of acetylated histones at the nuclear periphery has been described in human cells after their treatment with the HDAC inhibitors TSA and sodium butyrate [73-75]. This event has been suggested to be implicated in generating a state of transcriptional memory that could last for several days [76, 77]. Based on these reports, VPA may have the ability to enhance transcriptional memory in HeLa cells.

Our findings demonstrated that with VPA treatment, H3K9me levels increased, H3K9me2 levels decreased, and the intensification of H3K4me/me2 markers was consistent with an intensification of global gene expression induced by this drug in HeLa cells [55]. It is generally accepted that while H3K9 monomethylation is associated with gene activation, H3K9 dimethylation is generally linked to gene silencing and constitutive heterochromatin formation [78-80]. High levels of H3K9me have already been found in active promoters around the transcription initiation site [43, 45]. There are reports that HDAC inhibitors induce an overall decrease in H3K9me2 in rat astrocytes and cortical neurons, HepG2 human hepatocellular carcinoma cells, and changes in specific gene regions in the promoters of bovine neural stem cells and fetal fibroblasts [20, 50, 81, 82]. For H3K9me2, although changes in the intensity of its immunofluorescence signals following VPA treatment were not detected in HeLa cells, a reduction in its protein level and an increase in gene expression of the demethylase KDM3A were demonstrated after 2 mM VPA treatment.

Although VPA induces an increase in the overall levels of H3K27me immunofluorescence signals and H3K27me3 protein levels, probably regulated by the

increased methyltransferase *EZH2* gene expression, no causal connection between these markers and chromatin physiology could be suggested. Generally, H3K27me tends to be associated with constitutive heterochromatin and inactive intensifiers, while H3K27me₃ occurs largely in facultative heterochromatin [46, 83] and in chromatin regions where transcription is suppressed [84]. However, there are also reports describing that modifications of H3K27me₃ may occur in transcriptionally active chromatin regions [43, 46, 85-87]. Genes exhibiting strongly increased transcription have relatively high H3K27me₃ levels after VPA treatment of human lymphoblastoid cells and mouse embryonic stem cells [51, 86]. Increased H3K27me₃ protein levels as analyzed by WB in chronic lymphocytic leukemia patients and cell lines have also been reported after exposure to VPA [87]. The enrichment of H3K27me₃ in the main body of the genes seems to indicate transcriptional inhibition; in contrast, when this marker is present in gene promoters, it could be associated with transcription activation [47]. Therefore, although this marker has been widely studied, the precise relationship between its local pattern of gene enrichment and the regulation of gene expression is still unclear. A more detailed study of the abundance of a target gene in histone H3 and its expression is still needed.

The abovementioned histone methylation changes elicited through VPA action did not appear to be expressed on the FTIR signature of total histones from HeLa cells under the present experimental conditions. Additionally, a VPA-histone interaction promoting histone conformational alterations, such as those obtained at 20 mM and 40 mM concentrations for *in vitro* mixtures of VPA-histone H1 and VPA-histone H1 [54, 88], was not detected. Elevated VPA concentrations were not used in the present investigation because of the indication provided by the MTT assay of reduced cell viability when treating HeLa cells with VPA doses over 4 mM for 24 h [57].

To elucidate the conclusions obtained thus far and complement the identification of the potential of VPA to induce changes in other epigenetic markers, further investigations are still needed, mainly aimed at a selected group of genes, such as p16 suppressors, since H3K4me₃ and H3K27me₃ are hypomethylated in this gene in cervical tumor lines [89-91].

To determine whether the present epigenetic results are consistent with VPA affecting the aggressive tumoral state of HeLa cells, further investigation is still required, particularly addressing a selected group of genes, such as suppressor genes.

5. CONCLUSION

Our data are particularly relevant for identifying changes in histone methylation patterns in response to the administration of a potent HDAC inhibitor. In addition to previous discoveries, our findings on histone modifications also support the understanding that VPA can alter the epigenetic landscape of HeLa cells, modulating the expression of their genes. Furthermore, it is known that K methylation in histone H3 is generally a more stable modification than acetylation and that changes in these markers may persist longer after reduction of the inhibitor levels that promote them [67]. Thus, modulation of methylation levels of histones may represent an important therapeutic strategy.

To elucidate the conclusions obtained thus far and complement the identification of the potential of VPA to induce changes in other epigenetic markers, further investigations are still needed, mainly aimed at a selected group of genes, such as p16 suppressors, since H3K4me3 and H3K27me3 are hypomethylated in this gene in cervical tumor lines [89-91].

To determine whether the present epigenetic results are consistent with VPA affecting the aggressive tumoral state of HeLa cells, further investigation is still required, particularly addressing a selected group of genes, such as suppressor genes.

LIST OF ABBREVIATIONS

BSA - bovine serum albumin

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

FTIR – Fourier-transform infrared

H3K4me/me2/me3 – mono-, di- and trimethylation in lysine 4 of histone H3

H3K9me/me2/me3 – mono-, di- and trimethylation in lysine 9 of histone H3

H3K27me/me3 – mono- and trimethylation in lysine 27 of histone H3

HDAC - histone deacetylase

HeLa - human cervical cancer cell line

IF - fluorescence intensity

K - lysine

MCF-7 - breast cancer cells

MTT - (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

PBS - phosphate buffered saline

SDS-PAGE – polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate

TSS - transcriptional start sites

WB – Western blotting

FUNDING

This work was supported by the São Paulo state Research Foundation FAPESP Brazil (Grants No. 2015/10356-2) and the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq) (grant no. 421299/2018-5). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. M.A.R received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) (Finance code 001). M.L.S.M. received a fellowship from CNPq (grant no. 304797/2019-7).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are thankful to Drs. C. W. Arns, C. P. Vicente, E.R. Pimentel, H.F. Carvalho, J.L. Proença-Módena, M. S. Viccari Gatti and S. M. Recco-Pimentel (Institute of Biology, Unicamp) for equipment facilities and assistance at their laboratories. The authors thank Camila B.M. de Oliveira for technical assistance in cell culture, and the Obesity and Comorbidities Research Center (Institute of Biology, Unicamp) and Central Laboratory for High Performance Technologies in Life Sciences (LACTAD) for availability of the chemiluminescence imaging equipment.

6. REFERENCES

- [1] Perucca, E. Overtreatment in epilepsy: Adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res.*, **2002**, 52, 25–33.
- [2] Chateauvieux, S.; Morceau, F.; Dicato, M.; Diederich, M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 2010, 479364.
- [3] Göttlicher, M.; Minucci, S.; Zhu, P.; Krämer, O.H.; Schimpf, A.; Giavara, S. et al.

- Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.*, **2001**, 20, 6969–6978.
- [4] Phiel, C.J.; Zhang, F.; Huang, E.Y.; Guenther, M.G.; Lazar, M.A.; Klein, P.S. Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 36734–36741.
- [5] Lagace, D.C.; O'Brien, W.T.; Gurvich, N.; Nachtigal, M.W.; Klein, P.S. Valproic acid: How it works. Or not. *Clin Neurosci. Res.*, **2004**, 4, 215–225.
- [6] Eyal, S.; Yagen, B.; Shimshoni, J.; Bialer, M. Histone deacetylases inhibition and tumor cells cytotoxicity by CNS-active VPA constitutional isomers and derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, 69, 1501–1508.
- [7] Sun, L.; Coy, D.H.C. Anti-convulsant drug valproic acid in cancers and in combination anti-cancer therapeutics. *Mod. Chem Appl.*, **2014**, 02, 1–5.
- [8] Aztopal, N.; Erkisa, M.; Erturk, E.; Ulukaya, E.; Tokullugil, A.H.; Ari, F. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chem. Biol. Interact.*, **2018**, 280, 51–58.
- [9] Ibrahim, T.S.; Sheha, T.A.; Abo-Dya, N.E.; AlAwadh, M.A.; Alhakamy, N.A.; Abdel-Samii, Z.K. et al. Design, synthesis and anticancer activity of novel valproic acid conjugates with improved histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity. *Bioorg. Chem.*, **2020**, 99, 1–17.
- [10] Mello, M.L.S. Sodium valproate-induced chromatin remodeling. *Front. Cell Dev. Biol.*, **2021**, 9, 645518.
- [11] Blaheta, R.A.; Cinatl, J. Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. *Med. Res. Rev.*, **2002**, 22, 492–511.
- [12] Das, C.M.; Aguilera, D.; Vasquez, H.; Prasad, P.; Zhang, M.; Wolff, J.E. et al. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J. Neurooncol.*, **2007**, 85, 159–170.
- [13] Sami, S.; Höti, N.; Xu, H.M.; Shen, Z.; Huang, X. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *J. Biochem.*, **2008**, 144, 357–362.
- [14] Fang, E.; Wang, J.; Hong, M.; Zheng, L.; Tong, Q. Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2018**, 508, 9–16.
- [15] Yang, Q.; Tian, Y.; Liu, S.; Zeine, R.; Chlenski, A.; Salwen, H.R. et al. Thrombospondin-1 peptide ABT-510 combined with valproic acid is an effective

- antiangiogenesis strategy in neuroblastoma. *Cancer Res.*, **2007**, 67, 1716–1724.
- [16] Duenas-Gonzalez, A.; Candelaria, M.; Perez-Plascencia, C.; Perez-Cardenas, E.; de la Cruz-Hernandez, E.; Herrera, L.A. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat. Rev.*, **2008**, 34, 206–222.
- [17] Batty, N.; Malouf, G.G.; Issa, J.P.J. Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Lett.*, **2009**, 280, 192–200.
- [18] Venkataramani, V.; Rossner, C.; Iffland, L.; Schweyer, S.; Tamboli, I.Y.; Walter, J. et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the Alzheimer amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 10678–10689.
- [19] Heers, H.; Stanislaw, J.; Harrelson, J.; Lee, M.W. Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer. *Eur. J. Pharmacol.*, **2018**, 835, 61–74.
- [20] Li, H.; Zhang, Z.; Gao, C.; Wu, S.; Duan, Q.; Wu, H. et al. Combination chemotherapy of valproic acid (VPA) and gemcitabine regulates STAT3/Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell Biosci.*, **2019**, 9, 1–15.
- [21] Tran, L.N.K.; Kichenadasse, G.; Morel, K.L.; Lavranos, T.C.; Klebe, S.; Lower, K.M. et al. The combination of metformin and valproic acid has a greater anti-tumoral effect on prostate cancer growth in vivo than either drug alone. *In Vivo (Brooklyn)*, **2019**, 33, 99–108.
- [22] Milutinovic, S.; Detich, N.; Szyf, M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, **2007**, 28, 560–571.
- [23] Lee, J.H.; Choy, M.L.; Ngo, L.; Foster, S.S.; Marks, P.A. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2010**, 107, 14639–14644.
- [24] Perisic, T.; Zimmermann, N.; Kirmeier, T.; Asmus, M.; Tuorto, F.; Uhr, M. et al. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology*, **2010**, 35, 792–805.
- [25] Jiang, J.; Lu, J.; Lu, D.; Liang, Z.; Li, L.; Ouyang, S. et al. Investigation of the acetylation mechanism by GCN5 histone acetyltransferase. *PLoS One*, **2012**, 7, 1–13.

- [26] Veronezi, G.M.B.; Felisbino, M.B.; Gatti, M.S. V.; Mello, M.L.S.; Vidal, B.C. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS One*, **2017**, 12, e0170740.
- [27] Rocha, M.A.; Veronezi, G.M.B.; Felisbino, M.B.; Gatti, M.S.V.; Tamashiro, W.M.S.C.; Mello, M.L.S. Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Sci. Rep.*, **2019**, 9, 18236.
- [28] Marchion, D.C.; Bicaku, E.; Daud, A.I.; Sullivan, D.M.; Munster, P.N. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res.*, **2005**, 65, 3815–3822.
- [29] Schuermann, D.; Weber, A.R.; Schär, P. Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair (Amst)*, **2016**, 44, 92–102.
- [30] Ito, S.; Dalessio, A.C.; Taranova, O. V.; Hong, K.; Sowers, L.C.; Zhang, Y. Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.*, **2010**, 466, 1129–1133.
- [31] Blaschke, K.; Ebata, K.T.; Karimi, M.M.; Zepeda-Martínez, J.A.; Goyal, P.; Mahapatra, S. et al. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, **2013**, 500, 222–226.
- [32] Pastor, W.A.; Aravind, L.; Rao, A. TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2013**, 14, 341–356.
- [33] Palsamy, P.; Bidasee, K.R.; Shinohara, T. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res.*, **2014**, 121, 26–34.
- [34] Lanouette, S.; Mongeon, V.; Figeys, D.; Couture, J.F. The functional diversity of protein lysine methylation. *Mol. Syst. Biol.*, **2014**, 10, 1–26.
- [35] Greer, E.L.; Shi, Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat. Rev. Genet.*, **2014**, 13, 343–357.
- [36] Heintzman, N.D.; Stuart, R.K.; Hon, G.; Fu, Y.; Ching, C.W.; Hawkins, R.D. et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.*, **2007**, 39, 311–318.
- [37] Roh, T.Y.; Wei, G.; Farrell, C.M.; Zhao, K. Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns. *Genome Res.*, **2007**, 17, 74–81.

- [38] Völkel, P.; Angrand, P.O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie.*, **2007**, 89, 1–20.
- [39] Shinsky, S.A.; Monteith, K.E.; Viggiano, S.; Cosgrove, M.S. Biochemical reconstitution and phylogenetic comparison of human SET1 family core complexes involved in histone methylation. *J Biol Chem.*, **2015**, 290, 6361–6375.
- [40] Bernstein, B.E.; Humphrey, E.L.; Erlich, R.L.; Schneider, R.; Bouman, P.; Liu, J.S. et al. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **2002**, 99, 8695–8700.
- [41] Bernstein, B.E.; Kamal, M.; Lindblad-Toh, K.; Bekiranov, S.; Bailey, D.K.; Huebert, D.J. et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, **2005**, 120, 169–181.
- [42] Santos-Rosa, H.; Schneider, R.; Bannister, A.J.; Sherriff, J.; Bernstein, B.E.; Emre, N.C.T. et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **2002**, 419, 407–411.
- [43] Barski, A.; Cuddapah, S.; Cui, K.; Roh, T.Y.; Schones, D.E.; Wang, Z. et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, **2007**, 129, 823–837.
- [44] Hyun, K.; Jeon, J.; Park, K.; Kim, J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp. Mol. Med.*, **2017**, 49, e324-22.
- [45] Pan, M.R.; Hsu, M.C.; Chen, L.T.; Hung, W.C. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cell Mol. Life Sci.*, **2018**, 75, 209–223.
- [46] Herz, H.M.; Garruss, A.; Shilatifard, A. SET for life: Biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends Biochem. Sci.*, **2013**, 38, 621–639.
- [47] Young, M.D.; Willson, T.A.; Wakefield, M.J.; Trounson, E.; Hilton, D.J.; Blewitt, M.E. et al. ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 7415–7427.
- [48] Nightingale, K.P.; Gendreizig, S.; White, D.A.; Bradbury, C.; Hollfelder, F.; Turner, B.M. Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *J. Biol. Chem.*, **2007**, 282, 4408–4416.
- [49] Tung, E.W.Y.; Winn, L.M. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**, 248, 201–209.
- [50] Marinova, Z.; Leng, Y.; Leeds, P.; Chuang, D.M. Histone deacetylase inhibition alters

- histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacology*, **2011**, 60, 1109–1115.
- [51] Boudadi, E.; Stower, H.; Halsall, J.A.; Rutledge, C.E.; Leeb, M.; Wutz, A. et al. The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenet. and Chromatin*, **2013**, 6, 1–16.
- [52] Ganai, S.A.; Malli Kalladi, S.; Mahadevan, V. HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2015**, 33, 1185–1197.
- [53] Sargolzaei, J.; Rabbani-Chadegani, A.; Mollaei, H.; Deezagi, A. Spectroscopic analysis of the interaction of valproic acid with histone H1 in solution and in chromatin structure. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, 99, 427–432.
- [54] Vidal, B.C.; Mello, M.L.S. Sodium valproate (VPA) interactions with DNA and histones. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2020**, 163, 219–231.
- [55] Dejligbjerg, M.; Grauslund, M.; Litman, T.; Collins, L.; Qian, X.; Jeffers, M. et al. Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol. Cancer*, **2008**, 7, 1–12.
- [56] Felisbino, M.B.; Tamashiro, W.M.S.C.; Mello, M.L.S. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One*, **2011**, 6, e29144.
- [57] Rocha, M.A.; Oliveira, C.B.M.; Mello, M.L.S. Sodium valproate cytotoxicity effects as assessed by the MTT assay. In Repository of Research Data of Unicamp; **2021**.
- [58] Shechter, D.; Dormann, H.L.; Allis, C.D.; Hake, S.B. Extraction, purification and analysis of histones. *Nat. Protoc.*, **2007**, 2, 1445–1457.
- [59] Fabian, H.; Mäntele, W. Infrared spectroscopy of proteins. In: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; J.M. Chalmers.; P.R. Griffiths, Ed.; Wiley: Chichester, **2002**; pp. 3399–3425.
- [60] Vidal, B.C. Fluorescence, aggregation properties and FT-IR microspectroscopy of elastin and collagen fibers. *Acta Histochem.*, **2014**, 116, 1359–1366.
- [61] Pavia, D.L.; Lampman, G.M.; Kriz, G.S.; Vyvyan, J.R. *Introduction to Spectroscopy*, 4th ed.; Belmont: Brooks/Cole, **2009**.
- [62] Polyanichko, A.M.; Romanov, N.M.; Starkova, T.Y.; Kostyleva, E.I.; Chikhirzhina, E. V. Analysis of the secondary structure of linker histone H1 based on IR absorption spectra. *Cell Tissue Biol.*, **2014**, 8, 352–358.

- [63] Vidal, B.C.; Mello, M.L.S. Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, **2011**, 42, 283–289.
- [64] Singh, B.; Gautam, R.; Kumar, S.; Vinay Kumar, B.N.; Nongthomba, U.; Nandi, D. et al. Application of vibrational microspectroscopy to biology and medicine. *Curr. Sci.*, **2012**, 102, 232–244.
- [65] Zelig, U.; Mordechai, S.; Shubinsky, G.; Sahu, R.K.; Huleihel, M.; Leibovitz, E. et al. Pre-screening and follow-up of childhood acute leukemia using biochemical infrared analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen Subj.*, **2011**, 1810, 827–835.
- [66] Petruševski, G.; Naumov, P.; Jovanovski, G.; Bogoeva-Gaceva, G.; Seik, W.N. Solid-state forms of sodium valproate, active component of the anticonvulsant drug epilim. *ChemMedChem*, **2008**, 3, 1377–1386.
- [67] Bradbury, C.A.; Khanim, F.L.; Hayden, R.; Bunce, C.M.; White, D.A.; Drayson, M.T. et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, **2005**, 19, 1751–1759.
- [68] Huang, Y.; Vasilatos, S.N.; Boric, L.; Shaw, P.G.; Davidson, N.E. Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **2012**, 131, 777–789.
- [69] Huang, Y.; Yuan, L.; Li, T.; Wang, A.; Li, Z.; Pang, D. et al. Valproic acid improves porcine parthenogenetic embryo development through transient remodeling of histone modifiers. *Cell Physiol. Biochem.*, **2015**, 37, 1463–1473.
- [70] Downing, T.L.; Soto, J.; Morez, C.; Houssin, T.; Fritz, A.; Yuan, F. et al. Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming. *Nat. Mater.*, **2013**, 12, 1154–1162.
- [71] Lee, R.S.; Pirooznia, M.; Guintivano, J.; Ly, M.; Ewald, E.R.; Tamashiro, K.L. et al. Search for common targets of lithium and valproic acid identifies novel epigenetic effects of lithium on the rat leptin receptor gene. *Transl. Psychiatry*, **2015**, 5, 1–10.
- [72] Russ, B.E.; Olshanksy, M.; Smallwood, H.S.; Li, J.; Alice, E.; Prier, J.E. et al. Mapping histone methylation dynamics during virus-specific CD8⁺ T cell differentiation in response to infection. *Immunity*, **2014**, 41, 853–865.
- [73] Taddei, A.; Maison, C.; Roche, D.; Almouzni, G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.*,

- 2001, 3, 114–120.
- [74] Bártová, E.; Pacherník, J.; Harničarová, A.; Kovařík, A.; Kovaříková, M.; Hofmanová, J. et al. Nuclear levels and patterns of histone H3 modification and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J. Cell Sci.*, **2005**, 118, 5035–5046.
- [75] Rada-Iglesias, A.; Enroth, S.; Ameer, A.; Koch, C.M.; Clelland, G.K.; Respuela-Alonso, P. et al. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res.*, **2007**, 17, 708–719.
- [76] Light, W.H.; Brickner, J.H. Nuclear pore proteins regulate chromatin structure and transcriptional memory by a conserved mechanism. *Nucl (United States)*., **2013**, 4, 357–360.
- [77] Fišerová, J.; Efenberková, M.; Sieger, T.; Maninová, M.; Uhlířová, J.; Hozák, P. Chromatin organization at the nuclear periphery as revealed by image analysis of structured illumination microscopy data. *J. Cell Sci.*, **2017**, 130, 2066–2077.
- [78] Rice, J.C.; Briggs, S.D.; Ueberheide, B.; Barber, C.M.; Shabanowitz, J.; Hunt, D.F. et al. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Biol. Cell*, **2003**, 12, 1591–1598.
- [79] Wu, R.; Terry, A. V.; Singh, P.B.; Gilbert, D.M. Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol. Biol. Cell*, **2005**, 16, 2872–2881.
- [80] Mehedint, M.G.; Niculescu, M.D.; Craciunescu, C.N.; Zeisel, S.H. Choline deficiency alters global histone methylation and epigenetic marking at the Rel site of the calbindin 1 gene. *FASEB J.*, **2010**, 24, 184–195.
- [81] Felisbino, M.B.; Alves da Costa, T.; Gatti, M.S.V.; Mello, M.L.S. Differential response of human hepatocyte chromatin to HDAC inhibitors as a function of microenvironmental glucose level. *J. Cell. Physiol.*, **2016**, 231, 2257–2265.
- [82] Zhang, X.; He, X.; Li, Q.; Kong, X.; Ou, Z.; Zhang, L. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling mediates valproic acid-induced neuronal differentiation of neural stem cells through epigenetic modifications. *Stem Cell Reports*, **2017**, 8, 1256–1269.
- [83] Margueron, R.; Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, **2011**, 469, 343–349.
- [84] Barth, T.K.; Imhof, A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem. Sci.*, **2010**, 35, 618–626.
- [85] Cui, K.; Zang, C.; Roh, T.Y.; Schones, D.E.; Childs, R.W.; Peng, W. et al. Chromatin

- Signatures in Multipotent Human Hematopoietic Stem Cells Indicate the Fate of Bivalent Genes during Differentiation. *Cell Stem Cell.*, **2009**, 4, 80–93.
- [86] Halsall, J.A.; Turan, N.; Wiersma, M.; Turner, B.M. Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response. *Epigenet. and Chromatin.*, **2015**, 8, 1–16.
- [87] Scialdone, A.; Hasni, M.S.; Damm, J.K.; Lennartsson, A.; Gullberg, U.; Drott, K. The HDAC inhibitor valproate induces a bivalent status of the CD20 promoter in CLL patients suggesting distinct epigenetic regulation of CD20 expression in CLL in vivo. *Oncotarget*, **2017**, 8, 37409–37422.
- [88] Mello, M.L.S.; Vidal, B.C. Infrared data of sodium valproate (VPA), histones and VPA-histone mixtures. In Repository of Research Data of Unicamp; **2021**.
- [89] Beyer, S.; Zhu, J.; Mayr, D.; Kuhn, C.; Schulze, S.; Hofmann, S. et al. Histone H3 acetyl K9 and histone H3 tri methyl K4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18, 1–14.
- [90] Fang, J.; Zhang, H.; Jin, S. Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. *Tumor Biol.*, **2014**, 35, 5083–5093.
- [91] McLaughlin-Drubin, M.E.; Crum, C.P.; Münger, K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2011**, 108, 2130–2135

Table 1. Band absorption peaks in the FT-IR spectra of histones isolated from HeLa cells.

Wavenumbers (cm ⁻¹)	Assignments	References (apud Vidal and Mello [54])
3274-3269	Amide A – N-H stretching	[59, 60]
2966-2871	CH ₃ and CH ₂ groups – symmetrical and antisymmetric stretching	[26, 61]
1645-1626	Amide I – C-N stretching; C = O bending	[59, 62, 63]
1542-1531	Amide II – C-N and C-C stretching; N-H bending	[59, 62, 64, 65]
1330	CH ₃ deformation	[66]

Table 2. Comparison of FTIR signals between the spectra provided by total histones extracted from VPA-treated HeLa cells and respective control.

Band peak absorbances													
Histone s	N	Wn: 2965 cm ⁻¹			Wn: 1330 cm ⁻¹			Wn: 1645 cm ⁻¹ (amide I)			Wn: 1542 cm ⁻¹ (amide II)		
		X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md	X	S	Md
VPA	3	0.09	0.01	0.08	0.14	0.05	0.15	0.38	0.07	0.39	0.21	0.04	0.21
	2			9	6	0	5	5	0	7	7	5	5
CT	6	0.07	0.01	0.08	0.09	0.05	0.19	0.42	0.07	0.44	0.25	0.06	0.26
	6	6	7	0	8	2	4	9	1	5	4	8	6

CT, untreated control; Md, Median; N, number of spectra; S, standard deviation; VPA, VPA-treated cells; X, arithmetic means; Wn, wavenumber

Legends of Figures

Fig. (1). H3K4me2 (A) and H3K4me3 (B) methylation levels in VPA-treated HeLa cells analyzed using confocal microscopy and WB. Confocal microscopy identifies intensity changes in immunofluorescence signals (FI) in response to VPA treatment for 24 h (a-d). The confocal images are representative of three independent experiments comprising a total number of nuclei equal to 80. Scale bars represent 10 μ m. The Mann–Whitney test was used for the FI analysis. Significant differences between VPA treatment and the respective control at $P < 0.05$ are indicated (*) (d). WB data and respective densitometric analysis demonstrate changes in H3K4me2/me3 protein expression after VPA treatment (e, f). WB data are representative of eight independent experiments with blots being processed in parallel. Significant differences between VPA treatments and the respective controls at the $P < 0.05$ level using ANOVA test are indicated (*) (f). Histone H4 was used as a loading control (e, f). The vertical lines over the graphic columns represent the standard error of the mean.

Fig. (2). Changes in monomethylation (A) and dimethylation (B) of H3K9 in VPA-treated HeLa cells as detected using confocal microscopy and WB. Confocal microscopy identifies intensity changes in immunofluorescence signals (FI) in response to VPA treatment for 24 h (a-d). The confocal images are representative of three independent experiments comprising a total number of nuclei equal to 80. Scale bars represent 10 μ m. The Mann–Whitney test was used for the FI analysis. Significant differences between VPA treatment and the respective control at $P < 0.05$ are indicated (*) (d). WB data and respective densitometric analysis demonstrate changes in H3K9me/me2 protein expression after VPA treatment (e, f). WB data are representative of eight independent experiments with blots being processed in parallel. Significant differences between VPA treatments and respective controls at the $P < 0.05$ level using ANOVA test are indicated (*) (f). Histone H4 was used as a loading control (e, f). The vertical lines over the graphic columns represent the standard error of the mean.

Fig. (3). H3K27me (A) and H3K27me3 (B) methylation levels in VPA-treated HeLa cells analyzed using confocal microscopy and WB. Confocal microscopy identifies intensity changes in immunofluorescence signals (FI) of H3K27me in response to VPA treatment for 24 h (A [a-d]). The confocal images are representative of three independent experiments

comprising a total number of nuclei equal to 80. Scale bars represent 10 μm . The Mann–Whitney test was used for the FI analysis. Significant differences between VPA treatment and the respective control at $P < 0.05$ are indicated (*) (A [d]). WB data and respective densitometric analysis demonstrate changes in H3K27me3 protein expression after VPA treatment (e, f). WB data are representative of eight independent experiments with blots being processed in parallel. Significant differences between the 2 mM VPA treatment and the respective control at the $P < 0.05$ level using ANOVA are indicated (*) (B [f]). Histone H4 levels were used as a loading control (e, f). The vertical lines over the graphic columns represent the standard error of the mean.

Fig. (4). Gene expression of *KMT2D*, *EZH2* and *KDM3A* in VPA-treated HeLa cells. VPA induced increased *KMT2D*, *EZH2* and *KDM3A* gene expression levels (a-c). *KMT2D* gene expression was altered under both 0.5 and 2 mM VPA treatments (a), whereas *EZH2* and *KDM3A* gene expression levels increased only after 2 mM VPA treatment (b, c). Data obtained from RT–PCR analyses were normalized to endogenous GAPDH controls. Using one-way ANOVA, significant differences at $P < 0.05$ between the treatments and respective controls are indicated (*). Data are representative of three independent experiments.

Fig. (5). Raw FTIR spectral curves for total histones extracted from untreated (A) and 2 mM VPA-treated (B) HeLa cells. Averaged spectral curves are also presented (C), in which the red line refers to VPA-treated cells and the black line refers to the respective control. cm^{-1} , wavenumbers.

Figure 1

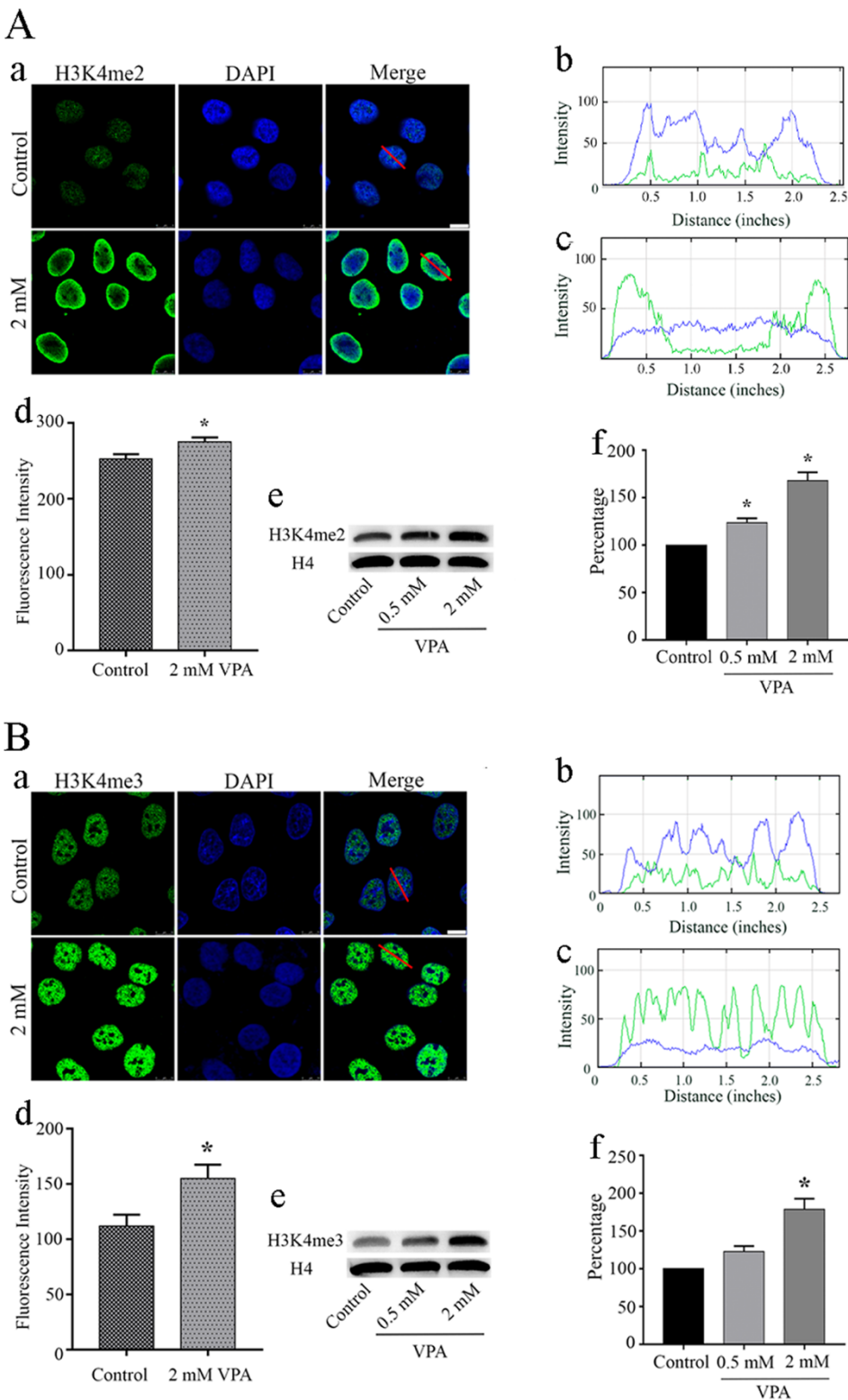


Figure 2

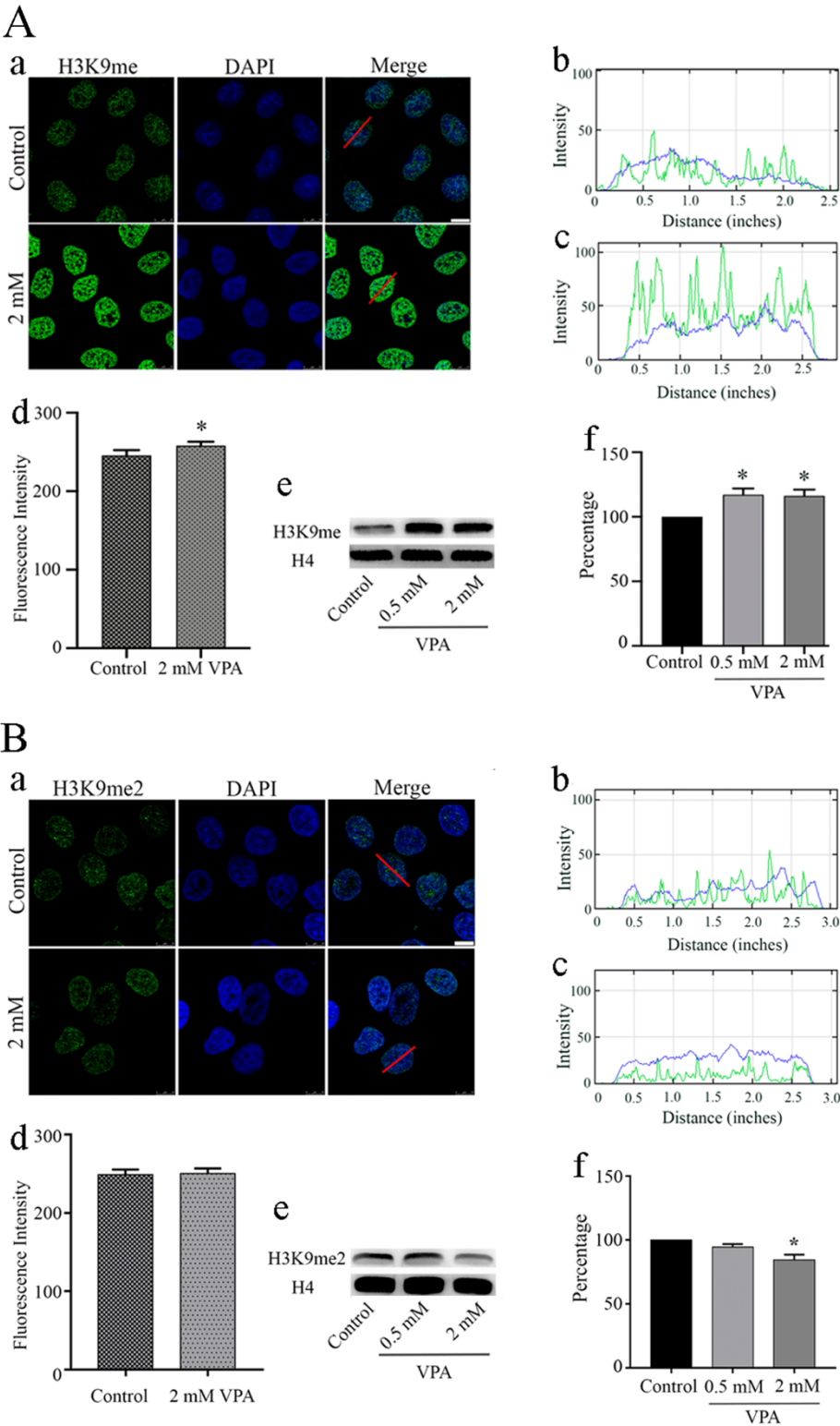


Figure 3

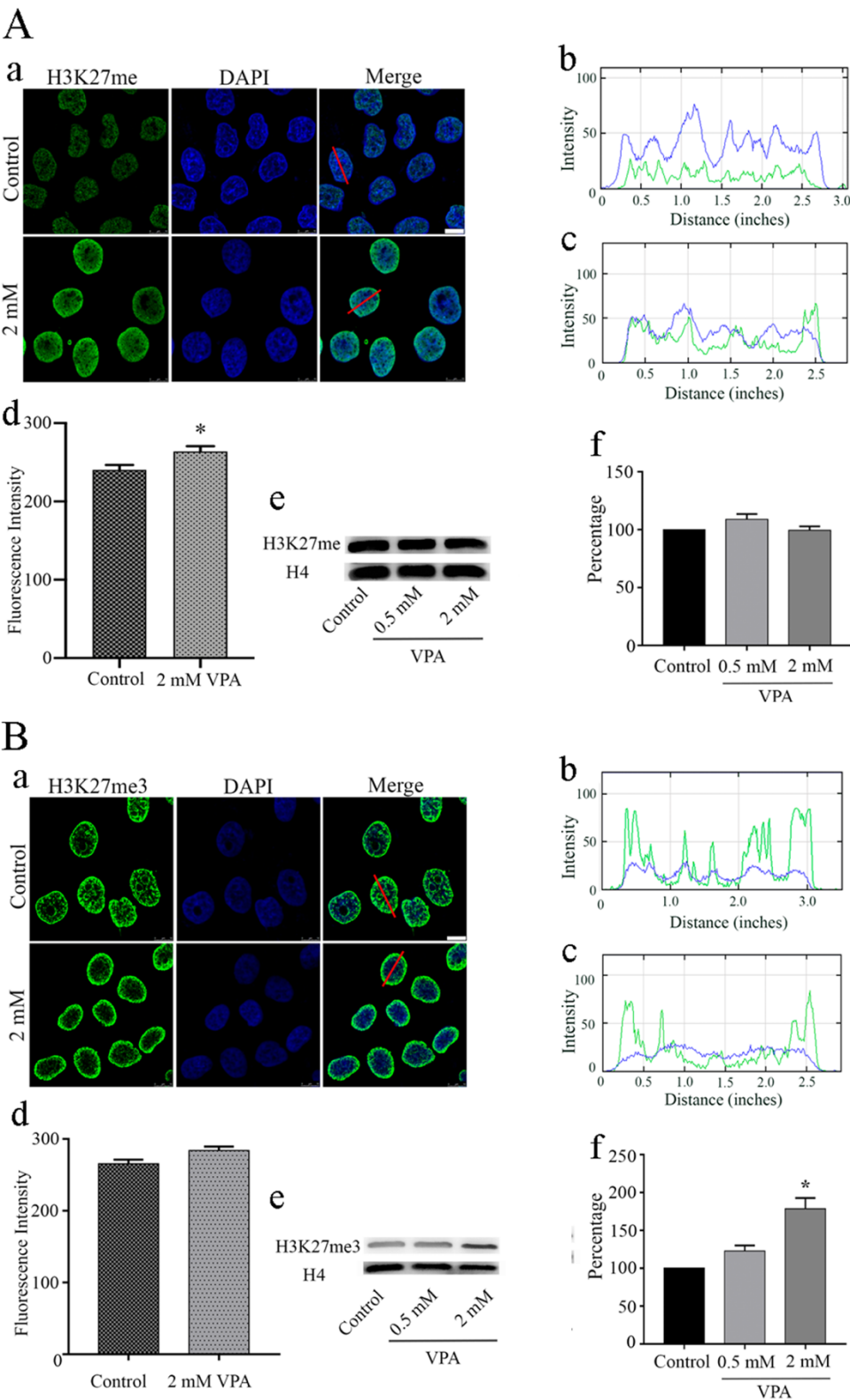


Figure 4

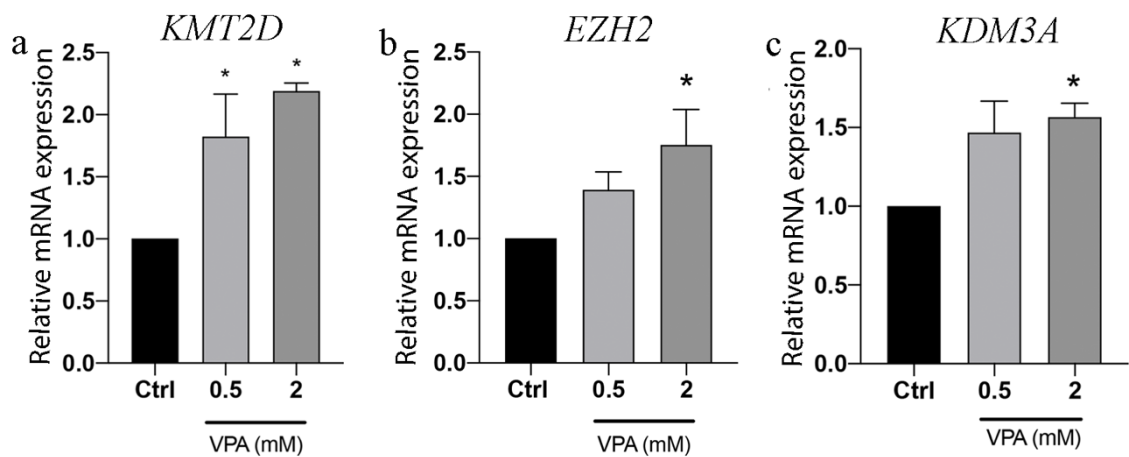
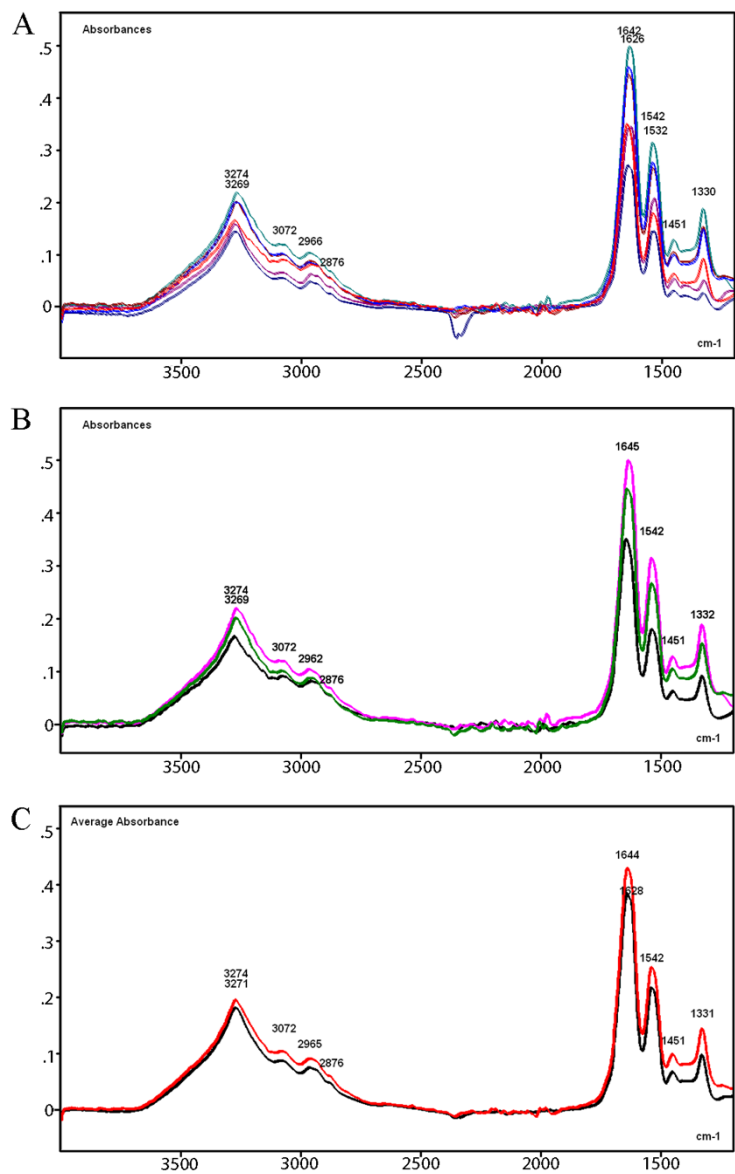


Figure 5



4. CAPÍTULO II

Manuscrito em preparação:***Valproato de sódio afeta a expressão de inibidores de cinases dependentes de ciclina p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} em células HeLa***

Marina Amorim Rocha¹, Aداuto Lima Cardoso², Cesar Martins², Maria Luiza S. Mello¹

¹*Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 13083-862, Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), 18618-689, Botucatu, SP, Brasil*

Resumo

As proteínas p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} são inibidoras de cinases dependentes de ciclina, envolvidas no controle do ciclo celular, que podem funcionar como oncogenes ou supressores de tumor, a depender do contexto de uma variedade de sinais extracelulares e intracelulares e do tipo celular considerado. Em câncer cervical induzido por HPV, p16^{INK4a} apresenta atividade oncogênica atuando como um marcador diagnóstico de neoplasia cervical; já p21^{WAF1/Cip1} funciona como supressor de tumor e encontra-se sub-expresso, condição que está associada à progressão da transformação maligna. Vários inibidores de deacetilases de histonas (HDACi) promovem regulação positiva e negativa de diversos genes, incluindo os genes p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1}, porém se desconhecem os efeitos do valproato de sódio (VPA) sobre tais genes e sobre as proteínas codificadas pelos mesmos em células HeLa, modelo de câncer cervical. Neste trabalho tais efeitos foram investigados em células HeLa tratadas com VPA 0,5 mM e 2 mM por 24 h, usando-se RT-qPCR, microscopia confocal e Western blotting. Nessas condições, a inibição da atividade de HDAC e a hiperacetilação global de H3 induzidas pelo VPA, foram confirmadas. Foi detectada uma diminuição dos níveis de mRNA e da abundância proteica referentes ao gene p16^{INK4a} com o tratamento pelo VPA 2 mM. Já a abundância proteica de p21^{WAF1/Cip1} mostrou-se aumentada após o tratamento com VPA 0,5 mM e 2 mM por 24 h. Esses resultados indicaram que o VPA possa promover parada na fase G1 do ciclo celular por indução de p21^{WAF1/Cip1}. Como o VPA induziu a ativação da proteína supressora de tumor p21 e reprimiu a ação de p16, um gene participante de atividade oncogênica nessas células, conclui-se que esses

resultados venham contribuir para o conhecimento básico voltado à potencialidade antitumoral desse fármaco. No entanto, uma vez que a expressão desses genes possa ser regulada em células HeLa por HDACi que atuam sobre marcas epigenéticas ao nível de DNA e histonas, é ainda necessária a investigação de tais alterações no promotor desses genes.

Palavras-chave: VPA; CDK inhibitors; p16^{INK4a}; p21^{WAF1/Cip1}; HeLa cells.

1. INTRODUÇÃO

As proteínas p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} são inibidoras (CKI) de complexos ciclina-cinases, em que as cinases (CDKs) são dependentes de ciclina. Ambas previnem a progressão do ciclo celular em G1-S, interferindo diretamente na ativação das CDKs e resultando em uma inibição da replicação do DNA. Assim, os genes *p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}* potencialmente atuam como supressores de tumor (Chen et al. 1995, Yang et al. 1995, Kim et al. 1998, Kim & Zhao 2005, Huo et al. 2020). A proteína p16^{INK4a} é uma reguladora do ciclo celular, pertencente a família INK4a, que se liga e inibe especificamente CDK4 e CDK6. Já p21^{WAF1/Cip1} que também participa da regulação do ciclo celular, inibe múltiplas CDKs, incluindo CDK4, CDK2 e CDK1 (Medema et al. 1995, Kim et al. 1998, Sherr & Roberts 1999, Israels & Israels 2001, Pei & Xiong 2005, Kim & Zhao 2005). No entanto, resultados de diversos estudos mostram que uma regulação aberrante envolvendo essas proteínas, as quais apresentam baixo peso molecular, seja característica de carcinomas cervicais que expressam oncogenes e seus precursores (Kim & Zhao 2005, Nehls et al. 2008, Lin et al. 2019).

Embora na maioria dos tumores o gene supressor de tumor, *p16^{INK4a}*, esteja inativado por mutações ou modificações epigenéticas, levando à proliferação celular excessiva, em câncer do colo de útero infectado pelo vírus do papiloma humano (HPV) em que a oncoproteína E7 encontra-se expressa, *p16^{INK4a}* está presente em níveis elevados (Klaes et al. 2001, van de Putte et al. 2003, Tringler et al. 2004, Volgareva et al. 2004, Kim & Zhao 2005, Bahnassy et al. 2006, Yoruker et al. 2012, Fang et al. 2014, Zhang et al. 2014, Wu et al. 2016, Huo et al. 2020). Assim, em câncer cervical transformado por HPV, *p16^{INK4a}* apresenta atividade oncogênica atuando, nesse contexto, como um marcador diagnóstico de neoplasia cervical que apesar de ser encontrado com expressão aumentada, não exerce suas funções fisiológicas na regulação negativa do ciclo celular (Nehls et al. 2008, Li et al. 2020). Ainda,

há relatos de silenciamento de *p16^{INK4a}* não atuando, portanto, em inibir a proliferação celular em linhagens celulares de câncer cervical (Li et al. 2020).

É conhecido que o silenciamento transcricional de *p16^{INK4a}*, em uma variedade de tumores, seja resultado da hipermetilação de DNA presente no seu promotor (Merlo et al. 1995). No entanto, em câncer de colo de útero infectado por HPV, onde a proteína p16^{INK4a} está fortemente expressa, foi encontrada metilação completa no promotor de *p16^{INK4a}* sem qualquer influência na sua expressão, indicando não haver correlação dessa marca epigenética com a redução na expressão de *p16^{INK4a}* (Lin et al. 2005, Nehls et al. 2008). O aumento da expressão de *p16^{INK4a}* pode ser também regulado por modificações de histonas, como a metilação de H3K4me3 e redução nas marcas H3K27me3 na região promotora de *p16^{INK4a}*, essa última com participação da desmetilase de histona, KDM6B (Lin et al. 2005, McLaughlin-Drubin et al. 2011, McLaughlin-Drubin et al. 2013, Fang et al. 2014, Beyer et al. 2017).

Uma subexpressão de *p21^{WAF1/Cip1}* foi relatada em câncer do colo do útero quando comparado ao epitélio normal. Especificamente em células HeLa, foi mostrado que essa proteína está fracamente expressa. Além disso, é sugerido que a expressão reduzida de *p21^{WAF1/Cip1}* possa estar associada à progressão da transformação maligna (Yokoyama et al. 1997, Kim & Zhao 2005). Mecanismos epigenéticos envolvendo metilação de DNA e hipoacetilação de histona H3 associada ao promotor *p21^{WAF1/Cip1}* são eventos chave para a inativação desse gene (Fang & Lu 2002, Chen et al. 2007). Por outro lado, vários agentes anticancerígenos, como os inibidores de deacetilases de histonas (HDACi), incluindo o valproato de sódio (VPA), têm sido relatados como indutores do aumento na expressão de *p21^{WAF1/Cip1}* em diferentes linhagens tumorais como câncer cervical, câncer de mama e leucemia linfocítica crônica (Sami et al. 2008, Tsai et al. 2013, Mawatari et al. 2015, Luna-Palencia 2021, Lipska et al. 2021).

No quesito de regulação epigenética, há relatos de HDACi estimulando a expressão do gene *p21^{WAF1/Cip1}* através do aumento seletivo no grau de acetilação da histona H3 e diminuição da metilação de DNA, ambos associados ao promotor desse gene, constatados em hipocampo de rato, linhagens celulares de câncer de cólon, e carcinoma de pulmão humano, entre outros (Richon et al. 2000, Minucci & Pelicci 2006, Lin et al. 2008, Lee et al. 2009, Aizawa & Yamamuro 2015, Lin et al. 2019). Além disso, o aumento na expressão do gene *p21^{WAF1/Cip1}* também tem sido correlacionado com alterações nos níveis de metilações de histonas (H3K4me2/me3) associadas a genes ativos, além de alterar marcas repressivas, (H3K9me2/me3), em células renais de rato (Guo et al. 2016, Li et al. 2016).

O VPA, um ácido graxo de cadeia curta, é um fármaco antiepiléptico bem estabelecido, também recomendado no tratamento de outros distúrbios neurológicos, e que vem sendo reportado como apresentando efeitos antitumorais em vários tipos de câncer (Phiel et al. 2001, Peterson & Naunton 2005, Sami et al. 2008, Terbach & Williams 2009, Tomson et al. 2016, Makarevic et al. 2019, Romoli et al. 2019, Zhang et al. 2019, Han et al. 2021). O VPA apresenta diferentes mecanismos de ação que envolvem desde modificações do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA) a inúmeros efeitos epigenéticos (Johannessen & Johannessen 2003, Chateauvieux et al. 2010, Romoli et al. 2019). Recentemente, descobriu-se que o VPA possa interagir diretamente com DNA e com as histonas H1 e H3 isolados *in vitro* bem como afetar a estrutura da cromatina ao nível nucleossomal (Sargolzaei et al. 2017, Vidal & Mello 2020, Baumann et al. 2021, Mello 2021, Mello & Vidal 2022).

O VPA atua como clássico HDACi de classes I e II, favorecendo em muitos casos aumento na acetilação de histonas H3 e H4 (Phiel et al. 2001, Gurvich et al. 2004, Sami et al. 2008, Felisbino et al. 2014). Em células HeLa, o VPA promove a demetilação do DNA, com participação de enzimas pertencentes a via ativa e passiva, além de alterar os níveis de metilação em diferentes resíduos de lisina da histona H3 (Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019; 2022). Além disso, o VPA induz uma desregulação gênica demonstrada em células HeLa e HepG2, promovendo regulação positiva e negativa de diversos genes (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2021). É, pois, reconhecido que o VPA altere a paisagem epigenética das células HeLa, linhagem celular modelo de câncer cervical universalmente utilizada, podendo então modular a expressão de seus genes (Dejligbjerg et al. 2008).

Considerando-se que o VPA promove parada na fase G1 do ciclo celular e induz alterações nos níveis de metilação de histonas em células HeLa (Rocha et al. 2019, 2020), além de ativar genes supressores de tumor em outras linhagens celulares, seria importante conhecer se essa droga provocaria em células HeLa alteração na expressão de um dos genes participantes da regulação negativa do ciclo celular, *p21^{WAF1/Cip1}*, além do biomarcador de neoplasia cervical, *p16^{INK4a}*.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo aprofundar a investigação sobre os efeitos do VPA nas mudanças epigenéticas de células HeLa, nomeadamente sobre um grupo selecionado de genes (*p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}*) que podem estar associados à atividade desmetilante do DNA e à modificação de histonas. Considera-se que os resultados aqui obtidos venham demonstrar que em células HeLa o VPA module a expressão do gene supressor de tumor *p21* e do biomarcador de carcinoma cervical *p16*, podendo assim

contribuir para o conhecimento básico voltado a efeitos antitumorais causados por esse fármaco, bem como a somar tais resultados com os conceitos de que na presença de VPA, metilação de DNA e modificação de histonas se alteram nessas células (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, 2022).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cultivo celular e tratamentos com VPA

Células HeLa adquiridas na passagem 10 do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) da UNICAMP e validadas na Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (DTAPEP) da Fundação Faculdade de Medicina (Universidade de São Paulo, USP) foram utilizadas nas passagens 11/45, sendo cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com alto teor de glicose (Sigma–Aldrich®, St. Louis, EUA) suplementado com soro fetal bovino (FCS) (Vitrocell, Campinas, Brasil) a 10% e penicilina-estreptomicina a 1% (Sigma–Aldrich®, 100 UI/mL e 100 µg/mL, respectivamente) a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO₂.

Em todos os ensaios, as células foram inicialmente cultivadas em meio completo por 24 h na ausência do fármaco. Então, ao tratá-las com VPA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) 0,5 mM e 2 mM por 24 h, foi acrescentado FCS a 1% neste meio. Células cultivadas na ausência de VPA foram usadas como controle. Para os testes de imunofluorescência visando identificar a abundância de p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1} e H3ac, as células foram semeadas em placas de 24 poços em lamínulas redondas a 5 x 10⁴ células/mL. Para Western blotting e ensaio da atividade de HDAC, as células foram cultivadas na concentração de 1,0 x 10⁵ células/mL em placas de 6 poços. Para os ensaios de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR) visando identificar a expressão dos genes *p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}*, as células foram cultivadas na concentração de 6 x 10⁴ células/mL em frascos de cultura de 25 cm².

2.2. Imunofluorescência

Para análise de p16^{INK4a}, p21^{WAF1/Cip1} e H3ac foram realizados ensaios imunocitoquímicos. Células HeLa crescidas sobre lamínulas, conforme descrito acima, fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a pH 7,4 por 10 min e lavadas em PBS,

foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2 % por 10 min e bloqueadas com BSA a 10% por 30 min. Como anticorpos primários foram utilizados *mouse* anti-p16^{INK4a} (1:100) e *mouse* anti-p21^{WAF1/Cip1} (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA). Para detecção dos níveis de histona H3 acetilada foi usado anticorpo *rabbit* anti-H3ac (1:1000) (Millipore® Billerica, EUA). Todos anticorpos foram preparados em solução de bloqueio, incubados *overnight* a 4 °C e protegidos da luz, seguido por extensas lavagens com PBS. Como anticorpo secundário para a detecção dos anticorpos anti-p16^{INK4a} e anti-p21^{WAF1/Cip1}, foi usado anticorpo *goat* anti-*mouse* conjugado ao fluorocromo FITC (1:50) (Sigma–Aldrich®) por 1 h no escuro, seguido por contracoloração nuclear com TO-PRO-3 (1:1000) (Life Technologies™) por 1 h. Como anticorpo secundário para a detecção do anticorpo anti-H3ac foi utilizado anticorpo anti-*rabbit* conjugado ao fluorocromo Alexa-Fluor 488 (1:1000) (Life Technologies™) seguido por contracoloração nuclear com DAPI. Os preparados foram novamente lavados e montados em VECTASHIELD (Vector, Califórnia, EUA). As imagens foram captadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Wetzlar, Alemanha), no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LacTAD) da Unicamp.

2.3. Western Blotting

A abundância da ocorrência das proteínas p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} e do grau de acetilação da histona H3 nas células HeLa tratadas com VPA foi investigada procedendo-se com a extração de proteínas totais das células em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100; 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, EGTA 0,5 mM e PMSF 1 mM) por pelo menos 30 min no gelo. Um ensaio de Bradford (Sigma-Aldrich®) foi usado para determinar as concentrações das proteínas usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

Os valores de absorbância de todas as amostras foram medidos após incubação das mesmas por 1 h em temperatura ambiente a $\lambda = 595$ nm em um fotômetro de microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Sessenta microgramas de proteínas foram incubadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -mercaptoetanol, Azul de bromofenol 0,025%) por 5 min em fervura e submetidas à eletroforese vertical em SDS-PAGE. Então, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida a 15%, seguido de transferência para as membranas de

nitrocelulose (Thermo Fisher Scientific). As membranas foram bloqueadas em BSA a 4% por 2 h e incubadas, separadamente, com os anticorpos primários correspondentes *mouse* anti-p16^{INK4a}, *mouse* anti-p21^{WAF1/Cip1} e *rabbit* anti-H3ac, *overnight* em solução de bloqueio a 4 °C. Para detectar os anticorpos primários anti-p16^{INK4a} e anti-p21^{WAF1/Cip1}, as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário *goat* anti-*mouse* (1:2000) (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). Para detectar o anticorpo anti-H3ac foi usado anticorpo *mouse* anti-*rabbit* (1:4000) (Chemicon®, Billerica, EUA) conjugado com peroxidase. Em todas as condições, esses anticorpos foram colocados em solução de bloqueio por 2 h, seguido de várias lavagens. As transferências das proteínas foram captadas através de detecção de transferência de ECL Western blotting (Amersham®, Pittsburgh, EUA) e visualizadas por quimioluminescência com o sistema de imagem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories) no Laboratório de Biologia Tecidual (Universidade Estadual de Campinas, Brasil). Para controlar as diferenças de carga das proteínas, as membranas foram incubadas com anticorpos primários *rabbit* β -actina (1:1000) (Cell Signaling Technology®, Danvers, EUA). As membranas foram incubadas com o anticorpo secundário *mouse* anti-*rabbit* conjugado com peroxidase (1:4000) (Chemicon®) em solução de bloqueio por 2 h, seguido de várias lavagens. As razões de H3ac, p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} foram obtidas usando-se o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

2.4. Ensaio de HDAC

A atividade enzimática de HDACs nas células HeLa tratadas com VPA em relação aos controles foi detectada com o “HDAC assay kit” (Sigma-Aldrich®), seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, as células lisadas com tampão RIPA foram incubadas em placas de 96 poços com o substrato da reação (peptídeo com resíduo de lisina acetilada e grupo fluorescente ligado) por 30 min a 30 °C. Em seguida, foi adicionada na reação a solução reveladora, que promove a quebra do substrato deacetilado pelas HDACs presentes nas amostras, e liberação do grupo fluorescente. Subsequentemente a solução foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Para medir a fluorescência, no comprimento de onda teste de 360 nm e no de referência de 460 nm, foi utilizado o leitor de placas multi-modal, Multiskan™ FC Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific).

2.5. RT-qPCR

Para avaliação dos níveis transcricionais de p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} foi realizada a técnica de transcrição reversa seguida de PCR quantitativo (RT-qPCR). RNA total foi extraído com o kit PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A integridade do RNA (RIN – *RNA Integrity Number*) foi avaliada com o uso do espectrofotômetro NanoVue e gel de agarose 1%. O RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com uso do kit High Capacity (Thermo Fisher Scientific) seguindo as instruções do fabricante. Iniciadores de PCR foram obtidos de trabalhos prévios e estão reportados na Tabela 1. Um microlitro de cDNA (4 ng/μL) foi amplificado usando-se o kit RealQ Plus 2x Master Mix Green, High ROX (Ampliqon, A323402) e 400 nM de cada primer em um volume final de 20 μL. As condições de ciclagem foram: 10 min a 95 °C, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e anelamento e extensão a 60 °C por 1 min. Os níveis de expressão foram detectados no sistema Bio-Rad CFX Maestro. Os níveis transcricionais do gene *GADPH* foram usados como referência. A curva de dissociação foi avaliada para confirmação de amplificação específica (Arquivo Suplementar). Os dados foram normalizados usando-se o programa Q-Gene (Muller et al. 2002, Simon 2003). Para comparação dos grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn com valores de confiança de 95%.

Tabela 1. Iniciadores de PCR usados no presente trabalho.

Identificação	Sequência	Referência
P16-RTF	CAACGCACCGAATAGTTACGG	Kondo et al. 2003
P16-RTR	GCGCAGTTGGGCTCCG	Kondo et al. 2003
P21-RTF	TGATGCGCTAATGGCGGGCT	Tsai et al. 2013
P21-RTR	TGCTGGTCTGCCGCCGTTTT	Tsai et al. 2013
GAPDH FW	GAATGGGCAGCCGTTAGGAA	Sanmukh et al. 2021
GAPDH RW	ATCACCCGGAGGAGAAATCG	Sanmukh et al. 2021

3. RESULTADOS

3.1. VPA diminui os níveis proteicos e gênicos de p16^{INK4a}

O tratamento das células HeLa com VPA na concentração de 2 mM reduziu significativamente os níveis proteicos e de expressão gênica de p16^{INK4a}. Isso foi confirmado

por ensaio de imunofluorescência bem como por ensaio de expressão gênica em células intactas (Fig. 1 a-d). Por outro lado, análises por Western blotting não permitiram detectar essa alteração (Fig. 1 e).

3.2. VPA aumenta os níveis proteicos e diminui os níveis gênicos de p21^{WAF1/Cip1}

Os efeitos do VPA sobre os níveis proteicos e de expressão gênica de p21^{WAF1/Cip1}, analisados através de imunofluorescência e Western blotting revelaram que a droga regula positivamente, principalmente nas frações nucleares, a abundância proteica de p21^{WAF1/Cip1} de uma maneira dose-dependente (Fig. 2 a-c, e). No entanto, resultados obtidos com RT-qPCR mostraram redução nos níveis gênicos quando as células foram tratadas com VPA 2 mM (Fig. 2 d).

3.3. VPA reduz a atividade de HDAC concomitante com o aumento na acetilação da histona H3

O tratamento das células HeLa resultou num aumento de intensidade para H3ac quando a concentração de VPA usada foi de 2 mM (Fig. 3 a-c). Nenhum efeito sobre os sinais fluorescentes foi demonstrado com o tratamento por VPA 0.5 mM. Com o ensaio por Western blotting, o aumento na acetilação de H3 acompanhou o aumento da concentração de VPA utilizada (Fig. 3 d). O aumento na acetilação de H3 com o VPA 2 mM se mostrou correlacionado com a inibição da atividade de HDAC medida por ensaio fluorométrico (Fig. 3 e).

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que, ao lado das ações epigenéticas sobre a indução de acetilação de histonas, demetilação do DNA e metilação/demetilação de histonas promovida pelo VPA em células HeLa (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, 2022), essa droga induziu a ativação de uma proteína supressora de tumor e reprimiu um gene participante de atividade oncogênica nessas células. Esta é uma contribuição ao conhecimento básico da potencialidade de ação farmacológica do VPA.

Embora em muitos casos *p16^{INK4a}* seja considerado um gene supressor de tumor (Medema et al. 1995, Kim & Zhao 2005), em câncer cervical esse gene atua participando da atividade oncogênica (Klaes et al. 2001, Huo et al. 2020, Li et al. 2020). Foi já demonstrado

que com o silenciamento de *p16^{INK4a}* por RNA de interferência pequenos (siRNA) ocorre inibição da proliferação das células tumorais do colo do útero, causando apoptose e parada do ciclo celular na fase G1 (Zhang et al. 2014, Li et al. 2020). Há também o relato de que em fibroblastos humanos, os níveis de *p16^{INK4a}* possam se tornar diminuídos após a exposição dessas células a concentrações relativamente altas de inibidores de HDAC, como a tricostatina A (TSA) e o butirato de sódio (Matheu et al. 2005). Os presentes resultados indicando nas células HeLa uma diminuição dos níveis de mRNA e proteicos referentes ao gene *p16^{INK4a}* com o tratamento pelo VPA 2 mM, também inibidor de HDAC, acham-se, portanto, de acordo com os dados da literatura.

O achado de níveis baixos da proteína p21^{WAF1/Cip1} nas células HeLa, detectado por imunofluorescência, encontra suporte em relatos prévios para a mesma linhagem celular (Yokoyama et al. 1997). Esses níveis mostraram-se ligeiramente aumentados após o tratamento com VPA 2 mM por 24 h. Há relatos de que o VPA, sozinho ou combinado com outros fármacos, promova o aumento na expressão gênica ou proteica de p21^{WAF1/Cip1} em diferentes linhagens tumorais, incluindo células HeLa, porém cultivadas em outras condições experimentais, tratadas com diferentes concentrações de VPA (1,2 mM, 4 mM e 5 mM) por 72h (Sami et al. 2008, Tsai et al. 2013, Mawatari et al. 2015, Lipska et al. 2021). O gene *p21^{WAF1/Cip1}*, responsável pela tradução de uma CKI inibidora de complexos ciclina-cinases, é crucial para o controle da proliferação celular mediada por HDACs, enzimas que se ligam diretamente ao promotor de tal gene, regulando negativamente sua expressão (Zupkovitz et al. 2010). Há relatos de que quando a diminuição na expressão proteica de HDACs ocorre em carcinoma hepatocelular humano, a expressão de inibidores de CDK, como as CKIs, leva a um bloqueio do ciclo celular em G1 (Fan et al. 2014, Chun et al. 2015). No caso das células HeLa, a inibição da atividade de HDACs pelo VPA é conhecida (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011). Essa inibição foi igualmente revelada no presente trabalho, com consequente aumento nos níveis de acetilação da histona H3. Assim, HDACs como o VPA fazem parte de uma classe de agentes antitumorais promissores que através da modulação epigenética, podem regular a expressão de genes supressores de tumor e genes participantes de processo oncogênicos como os aqui reportados (Lin et al. 2008, Chun et al. 2015, Li et al. 2020).

Concluimos então, que o VPA possa promover parada na fase G1 do ciclo celular causada por indução de p21^{WAF1/Cip1} uma vez que essa proteína se liga a CDKs e inibe a progressão do ciclo celular em G1-S, hipótese apoiada por dados de Han et al. (2013) que utilizaram o VPA em concentrações de 1-3 mM. Ainda, há relatos de que células HeLa

transfectadas com p21^{WAF1/Cip1} mostrem um retardo significativo de crescimento pelo acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular (Yokoyama et al. 1997, Kim et al. 1998, Kim & Zhao 2005). Outros estudos demonstraram que em células HeLa tratadas com diferentes HDACis, incluindo VPA, por períodos mais longos de tratamento (48 h), houve aumento dos níveis proteicos ou gênicos de p21^{WAF1/Cip1}, resultando no acúmulo de células na fase G0/G1 e impedindo que as células avançassem para a fase S (Han et al. 2000, Kim et al. 2000, Luna-Palencia et al. 2021).

Considerando que a expressão de p16^{INK4a} e p21^{WAF1/Cip1} possa ser regulada em células HeLa por HDACi que atuam sobre marcas epigenéticas ao nível de DNA e histonas e mesmo sobre outras proteínas, se faz ainda necessária a investigação de tais perfis, no promotor desses genes, uma vez que alterações epigenéticas a níveis globais, na presença do VPA, já foram encontradas para essas mesmas condições experimentais em células HeLa (Richon et al. 2000, Minucci & Pelicci 2006, Lin et al. 2008, Lee et al. 2009, Aizawa & Yamamuro 2015, Guo et al. 2016, Li et al. 2016, Lin et al. 2019, Rocha et al. 2022). Estudos envolvendo o perfil de metilação de DNA além de níveis de H3K4me2/me3, H3K9me2/me3, H3K27me3 e H3ac, nos promotores dos genes *p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}* se analisados por *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction* (MSP) e imunoprecipitação da cromatina (ChIP) certamente trarão informação adicional importante que poderá complementar os resultados apresentados aqui.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD, Unicamp), ao Laboratório de Biologia Tecidual (Instituto de Biologia, Unicamp), pelas facilidades e auxílio laboratorial. Os autores agradecem a Camila B.M. de Oliveira pela assistência técnica em cultura de células. Este trabalho teve o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (grants no. 2015/10356-2; 2015/16661-1) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) (grant no. 421299/2018-5). MAR recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) (código de financiamento 001). ALC recebeu bolsa de Pós-Doc da FAPESP (grant no. 2017/07484-4). MLSM recebeu bolsa de Pesquisa do CNPq (grants no. 304797/2019-7). As agências de financiamento não tiveram papel no desenho do estudo, coleção e análise de dados, decisão para publicar ou preparo do manuscrito.

5. REFERÊNCIAS

- Aizawa S, Yamamuro Y. Valproate administration to mice increases hippocampal p21 expression by altering genomic DNA methylation. *Neuroreport.*, 2015, 26, 915-920. doi.org/10.1097/WNR.0000000000000448.
- Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, Aboubakr AA, Kamel K, El-Sabah MT, Mokhtar NM. The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst.*, 2006, 18, 292-302.
- Baumann C, Zhang X, Zhu L, Fan Y, Fuente, R. Changes in chromatin accessibility landscape and histone H3 core acetylation during valproic acid-induced differentiation of embryonic stem cells. *Epigenetics & Chromatin*, 2021, 14, 58. doi:10.1186/s13072-021-00432-5.
- Beyer S, Zhu J, Mayr D, Kuhn C, Schulze S, Hofmann S, Dannecker C, Jeschke U, Kost BP. Histone H3 Acetyl K9 and Histone H3 Tri Methyl K4 as Prognostic Markers for Patients with Cervical Cancer. *Int J Mol Sci.*, 2017, 18, 477. doi:10.3390/ijms18030477.
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol.*, 2010, 2010, 479364. doi:10.1155/2010/479364.
- Chen YQ, Cipriano SC, Arenkiel JM, Miller FR. Tumor suppression by p21^{WAF1}. *Cancer Res.*, 1995, 55, 4536-4539.
- Chen YX, Fang JY, Lu R, Qiu DK. Expression of p21(WAF1) is related to acetylation of histone H3 in total chromatin in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol.*, 2007, 13, 2209-2213. doi: 10.3748/wjg.v13.i15.2209.
- Chun SM, Lee JY, Choi J, Lee JH, Hwang JJ, Kim CS, Suh YA, Jang SJ. Epigenetic modulation with HDAC inhibitor CG200745 induces anti-proliferation in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*, 2015, 10, e0119379. doi:10.1371/journal.pone.0119379.
- Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, Jeffers M, Lichenstein H, Jensen PB, Sehested M. Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol Cancer.*, 2008, 7, 70. doi:10.1186/1476-4598-7-70.

- Fan J, Lou B, Chen W, Zhang J, Lin S, Lv FF, Chen Y. Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Tumour Biol.*, 2014, 35, 11523-11532. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2358-2>
- Fang J, Zhang H, Jin S. Epigenetics and cervical cancer: from pathogenesis to therapy. *Tumour Biol.*, 2014, 35, 5083-5093. doi:10.1007/s13277-014-1737-z.
- Fang JY, Lu YY. Effects of histone acetylation and DNA methylation on p21 (WAF1) regulation. *World J Gastroenterol.*, 2002, 8, 400-405. doi:10.3748/wjg.v8.i3.400.
- Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem.*, 2014, 115, 1937-1947. doi:10.1002/jcb.24865.
- Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One*, **2011**, 6, e29144.
- Felisbino MB, Ziemann M, Khurana I, Okabe J, Al-Hasani K, Maxwell S, Harikrishnan KN, de Oliveira CBM, Mello MLS, El-Osta A. Valproic acid influences the expression of genes implicated with hyperglycaemia-induced complement and coagulation pathways. *Sci Rep.*, 2021, 11, 2163. doi:10.1038/s41598-021-81794-4.
- Guo Q, Li X, Han H, Li C, Liu S, Gao W, Sun G. Histone Lysine Methylation in TGF- β 1 Mediated p21 Gene Expression in Rat Mesangial Cells. *Biomed Res Int.*, 2016, 2016, 6927234. doi:10.1155/2016/6927234.
- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res.*, 2004, 64, 1079-1086. doi:10.1158/0008-5472.can-03-0799.
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee H W. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer research*, 2000, 60, 6068-6074.
- Han BR, You BR, Park WH. Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncol Rep.*, 2013, 30, 2999-3005. doi:10.3892/or.2013.2747
- Han W, Yu F, Wang R, Guan W, Zhi F. Valproic Acid Sensitizes Glioma Cells to Luteolin Through Induction of Apoptosis and Autophagy via Akt Signaling. *Cell Mol Neurobiol.*, 2021, 41, 1625-1634. doi:10.1007/s10571-020-00930-2.

- Huo W, Zhai S, Wang Y, Qiang X, Na R, Gui H, Wu N, Cao Y, Bai H. Relevance research between the expression of p16^{INK4a}, Notch1, and hTERT genes: The development of HPV16-positive cervical cancer. *J Clin Lab Anal.*, 2020, 34, e23207. doi:10.1002/jcla.23207.
- Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Stem Cells.*, 2001, 19, 88-91.
- Johannessen CU, Johannessen SI. Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.*, 2003, 9, 199-216. doi:10.1111/j.1527-3458.2003.tb00249.x.
- Kim YB, Ki SW, Yoshida M, Horinouchi S. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot (Tokyo).*, 2000, 53, 1191-1200. doi:10.7164/antibiotics.53.1191.
- Kim YT, Cho NH, Park SW, Kim JW. Underexpression of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.*, 1998, 71, 38-45. doi:10.1006/gyno.1998.5134.
- Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J.*, 2005, 46, 597-613. doi:10.3349/ymj.2005.46.5.597.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.*, 2001, 92, 276-284. doi:10.1002/ijc.1174.
- Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol.*, 2003, 23, 206-215. doi:10.1128/MCB.23.1.206-215.2003.
- Lee S, Park JR, Seo MS, Roh KH, Park SB, Hwang JW, Sun B, Seo K, Lee YS, Kang SK, Jung JW, Kang KS. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.*, 2009, 42, 711-720. doi:10.1111/j.1365-2184.2009.00633.x.
- Li M, Yang J, Liu K, Yang J, Zhan X, Wang L, Shen X, Chen J, Mao Z. p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis. *J Cancer.*, 2020, 11, 1457-1467. doi:10.7150/jca.35479.
- Li X, Li C, Li X, Cui P, Li Q, Guo Q, Han H, Liu S, Sun G. Involvement of Histone Lysine Methylation in p21 Gene Expression in Rat Kidney In Vivo and Rat Mesangial Cells In Vitro

under Diabetic Conditions. *J Diabetes Res.*, 2016, 2016, 3853242.
doi:10.1155/2016/3853242.

Lin CK, Liu ST, Chang CC, Huang SM. Regulatory mechanisms of fluvastatin and lovastatin for the p21 induction in human cervical cancer HeLa cells. *PLoS One.*, 2019, 14, e0214408.
doi:10.1371/journal.pone.0214408.

Lin YC, Lin JH, Chou CW, Chang YF, Yeh SH, Chen CC. Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. *Cancer Res.*, 2008, 68, 2375-2383. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5807.

Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, Kim I. The hypermethylation and protein expression of p16 INK4A and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. *J Cancer Res Clin Oncol.*, 2005, 131, 364-370. doi:10.1007/s00432-004-0657-5.

Lipska K, Filip A, Gumieniczek A. The Impact of Chlorambucil and Valproic Acid on Cell Viability, Apoptosis and Expression of *p21*, *HDM2*, *BCL2* and *MCL1* Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cells*, 2021, 10, 1088. doi:10.3390/cells10051088.

Luna-Palencia GR, Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara J, Meraz-Ríos MA, Vásquez-Moctezuma I. Epigenetic Evaluation of N-(2-hydroxyphenyl)-2-Propylpentanamide, a Valproic Acid Aryl Derivative with Activity Against HeLa Cells. *Current molecular pharmacology*, 2021, 14, 570–578. doi:10.2174/1874467213666200730113828.

Makarević J, Rutz J, Juengel E, Maxeiner S, Tsaur I, Chun FK, Bereiter-Hahn J, Blaheta RA. Influence of the HDAC Inhibitor Valproic Acid on the Growth and Proliferation of Temsirolimus-Resistant Prostate Cancer Cells In Vitro. *Cancers (Basel).*, 2019, 11, 566. doi:10.3390/cancers11040566.

Matheu A, Klatt P, Serrano M. Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.*, 2005, 280, 42433-42441. doi:10.1074/jbc.M508270200.

Mawatari T, Ninomiya I, Inokuchi M, Harada S, Hayashi H, Oyama K, Makino I, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T. Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation. *Int J Oncol.*, 2015, 47, 2073-2081.
doi:10.3892/ijo.2015.3213.

McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Münger K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108, 2130-2135.

doi:10.1073/pnas.1009933108.

McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K. Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110, 16175-16180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310432110>

Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1995, 92, 6289-6293.

doi:10.1073/pnas.92.14.6289.

Mello MLS. Sodium Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Front Cell Dev Biol.*, 2021, 9, 645518. doi:10.3389/fcell.2021.645518.

Mello MLS, Vidal BC. Data on FTIR Spectra of Mixtures of Sodium Valproate (VPA) and Histones H1 and H3. *Latin American Data in Science*, 2022, 1, 102-109.

doi.org/10.53805/lads.v1i3.36.

Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.*, 1995, 1, 686-692. doi:10.1038/nm0795-686.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6, 38-51. doi:10.1038/nrc1779.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 2002, 32, 1372-1374.

Nehls K, Vinokurova S, Schmidt D, et al. p16 methylation does not affect protein expression in cervical carcinogenesis. *Eur J Cancer.*, 2008, 44, 2496-2505.

doi:10.1016/j.ejca.2008.07.014.

Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene.*, 2005, 24, 2787-2795. doi:10.1038/sj.onc.1208611.

Peterson GM, Naunton M. Valproate: a simple chemical with so much to offer. *J Clin Pharm Ther.*, 2005, 30, 417-421. doi:10.1111/j.1365-2710.2005.00671.x.

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 teratogen. *J Biol Chem.*, 2001, 28, 36734-36741. doi:10.1074/jbc.M101287200.

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97, 10014-10019. doi:10.1073/pnas.180316197.

Rocha MA, Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Sci Rep.*, 2019, 9, 18236. doi.org/10.1038/s41598-019-54848-x.

Rocha MA, Vidal BC, Mello MLS. Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells. (PRINT). *Curr Mol Pharmacol.*, 2022. doi:10.2174/1874467215666220316110405.

Romoli M, Mazzocchetti P, D'Alonzo R, Siliquini S, Rinaldi VE, Verrotti A, Calabresi P, Costa C. Valproic Acid and Epilepsy: From Molecular Mechanisms to Clinical Evidences. *Curr Neuropharmacol.*, 2019,17, 926-946. doi:10.2174/1570159X17666181227165722.

Sami S, Höti N, Xu HM, Shen Z, Huang X. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *J Biochem.*, 2008, 144, 357-362. doi:10.1093/jb/mvn074.

Sanmukh SG, Dos Santos NJ, Barquilha CN, Cuciolo MS, de Carvalho M, Dos Reis PP, Delella FK, Carvalho HF, Felisbino SL. Bacteriophages M13 and T4 Increase the Expression of Anchorage-Dependent Survival Pathway Genes and Down Regulate Androgen Receptor Expression in LNCaP Prostate Cell Line. *Viruses.*, 2021, 13, 1754. doi:10.3390/v13091754.

Sargolzaei J, Rabbani-Chadegani A, Mollaei H, Deezagi A. Spectroscopic analysis of the interaction of valproic acid with histone H1 in solution and in chromatin structure. *Int J Biol Macromol.*, 2017, 99, 427-432. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.02.098.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 1999, 13, 1501-1512. doi:10.1101/gad.13.12.1501.

Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics*, 2003, 19, 1439-1440. doi:10.1093/bioinformatics/btg157.

Terbach N, Williams RS. Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans.*, 2009, 37, 1126-1132. doi:10.1042/BST0371126.

Tomson T, Battino D, Perucca E. Valproic acid after five decades of use in epilepsy: time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *Lancet Neurol.*, 2016,15, 210-218. doi:10.1016/S1474-4422(15)00314-2.

Tringler B, Gup CJ, Singh M, Groshong S, Shroyer AL, Heinz DE, Shroyer KR. Evaluation of p16INK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. *Hum Pathol.*, 2004, 35, 689-696. doi:10.1016/j.humpath.2004.02.012.

Tsai C, Leslie JS, Franko-Tobin LG, Prasnal MC, Yang T, Vienna Mackey L, Fuselier JA, Coy DH, Liu M, Yu C, Sun L. Valproic acid suppresses cervical cancer tumor progression possibly via activating Notch1 signaling and enhances receptor-targeted cancer chemotherapeutic via activating somatostatin receptor type II. *Arch Gynecol Obstet.*, 2013, 288, 393-400. doi:10.1007/s00404-013-2762-7.

van de Putte G, Holm R, Lie AK, Tropé CG, Kristensen GB. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol.*, 2003, 89, 140-147. doi:10.1016/s0090-8258(03)00010-6.

Veronezi GM, Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML, Vidal BC. DNA Methylation Changes in Valproic Acid-Treated HeLa Cells as Assessed by Image Analysis, Immunofluorescence and Vibrational Microspectroscopy. *PLoS One.*, 2017, 12, e0170740. doi:10.1371/journal.pone.0170740.

Vidal BC, Mello MLS. Sodium valproate (VPA) interactions with DNA and histones. *Int J Biol Macromol.*, 2020, 15, 219-231. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.06.265.

Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, Bliev A, Spitkovsky D, Ermilova V, Kisseljov F. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer.*, 2004, 4, 58. doi:10.1186/1471-2407-4-58.

Wu H, Zhang J, Shi H. Expression of cancer stem markers could be influenced by silencing of p16 gene in HeLa cervical carcinoma cells. *Eur J Gynaecol Oncol.*, 2016, 37, 221-225.

Yang ZY, Perkins ND, Ohno T, Nabel EG, Nabel GJ. The p21 cyclin-dependent kinase inhibitor suppresses tumorigenicity in vivo. *Nat Med.*, 1995, 1, 1052-1056. doi:10.1038/nm1095-1052.

Yokoyama Y, Takahashi Y, Morishita S, Hashimoto M, Tamaya T. Introduction of p21(Waf1/Cip1) gene into a carcinoma cell line of the uterine cervix with inactivated p53. *Cancer Lett.*, 1997, 116, 233-239. doi:10.1016/s0304-3835(97)00193-6.

Yoruker EE, Mert U, Bugra D, Yamaner S, Dalay N: Promoter and histone methylation and p16ink4a gene expression in colon cancer. *Exp Ther Med.*, 2012, 4, 865-870. doi:10.3892/etm.2012.683.

Zhang C, Bao W, Wang L: Downregulation of p16ink4a inhibits cell proliferation and induces G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Int J Mol Med.*, 2014, 33, 1577-1585. doi:10.3892/ijmm.2014.1731.

Zhang Y, Zhang Y, Li M, Meng F, Yu Z, Chen Y, Cui G. Combination of SB431542, CHIR99021 and PD0325901 has a synergic effect on abrogating valproic acid-induced epithelial-mesenchymal transition and stemness in HeLa, 5637 and SCC-15 cells. *Oncol Rep.*, 2019, 41, 3545-3554. doi:10.3892/or.2019.7088.

Zupkovitz G, Grausenburger R, Brunmeir R, Senese S, Tischler J, Jurkin J, Rembold M, Meunier D, Egger G, Lagger S, Chiocca S, Propst F, Weitzer G, Seiser C. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. *Mol Cell Biol.*, 2010, 30, 1171-1181. doi:10.1128/MCB.01500-09.

Legendas das figuras

Fig. 1. Níveis proteicos e de expressão de p16^{INK4A} após tratamento com VPA em células HeLa. Sinais de imunofluorescência para p16^{INK4A} (verde) tendo DNA contracorado com TO-PRO-3 (azul) foram obtidos com o uso de microscopia confocal (a) e respectivos perfis de intensidade (b) construídos ao longo de um eixo de corte estabelecido para uma célula selecionada em (a) (vermelho). Barra de escala, 10 µm. As imagens e os perfis salientam redução nos níveis de intensidade de fluorescência com o tratamento por VPA, o que aparece destacado para a condição de uso da droga na concentração de 2 mM no gráfico resultante de comparação ao respectivo controle não tratado, tendo por base 3 experimentos independentes (n = 60) (*, P<0.05 – teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn's) (c). Os níveis de expressão do gene *p16^{INK4A}* avaliados por RT-PCR e normalizados a um controle GAPDH endógeno salientam uma diminuição significativa após tratamento com VPA 2 mM (*, P<0.05 – teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn's) (d). Dados obtidos com Western Blotting e respectiva densitometria de 5 experimentos independentes não indicaram alteração nos níveis de expressão proteica de p16^{INK4A} (ANOVA) (e). O agrupamento de transferências, incluindo-se

o controle de carregamento e proteínas específicas, foi sempre derivado de um mesmo experimento. Em todos os blots, os níveis de β -actina foram utilizados como controle de carregamento e normalização dos níveis de p16^{INK4A}. Os traços horizontais sobre as colunas em c-e representam o erro padrão da média.

Fig. 2. Níveis de expressão gênica reduzidos, porém, aumento em abundância proteica de p21^{WAF1/Cp1} induzidos por VPA em células HeLa. Sinais de imunofluorescência para p21^{WAF1/Cp1} (verde) tendo DNA contracorado com TO-PRO-3 (azul) foram obtidos com o uso de microscopia confocal (a) e os respectivos perfis de intensidade (b) construídos ao longo de um eixo de corte estabelecido para uma célula selecionada em (a) (vermelho). Barra de escala, 10 μ m. As imagens e os perfis salientam aumento nos níveis de intensidade de fluorescência após tratamento com VPA 0,5 mM e 2 mM corroborado pelo gráfico resultante de comparação entre 3 experimentos independentes ($n = 80$) (*, $P < 0.05$ – teste de Dunnett's) (c). Os níveis de expressão gênica avaliados por RT-PCR e normalizados a um controle GAPDH endógeno demonstram uma diminuição significativa após tratamento com VPA 2 mM (*, $P < 0.05$ – teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn's) (d). Dados obtidos com Western Blotting e respectiva densitometria de 5 experimentos independentes também indicam aumento na abundância da proteína p21^{WAF1/Cp1} (ANOVA) (e). O agrupamento de transferências, incluindo-se o controle de carregamento e proteínas específicas, foi sempre derivado de um mesmo experimento. Em todos os blots, os níveis de β -actina foram utilizados como controle de carregamento e normalização dos níveis de p21^{WAF1/Cp1}. Os traços horizontais sobre as colunas em c-e representam o erro padrão da média.

Fig. 3. Níveis proteicos de acetilação de histona H3 aumentados e atividade de HDACs reduzida em células HeLa tratadas com VPA. Sinais de imunofluorescência para H3ac (verde) tendo DNA contracorado com DAPI (azul) foram obtidos com o uso de microscopia confocal (a) e os respectivos perfis de intensidade (b) construídos ao longo de um eixo de corte estabelecido para uma célula selecionada em (a) (vermelho). Barra de escala, 10 μ m. As imagens e os perfis evidenciam aumento nos níveis de intensidade de fluorescência após tratamento com VPA 2 mM confirmado pelo gráfico resultante de comparação entre 3 experimentos independentes ($n = 30$) (*, $P < 0.05$ – teste de Mann-Whitney) (c). O ensaio com Western Blotting e respectiva densitometria de 5 experimentos independentes também indicam aumento na abundância da proteína H3ac (Dunnett's) (d). A análise do ensaio enzimático de HDACs de 5 experimentos independentes mostra redução na atividade dessas enzimas após tratamento com VPA 2 mM (*, $P < 0.05$ – o teste de Dunnett's) (e). O agrupamento de transferências, incluindo-se o controle de carregamento e proteínas específicas, foi sempre derivado de um mesmo experimento. Em todos os blots, os níveis de β -actina foram utilizados como controle de carregamento e normalização dos níveis de H3ac. Os traços horizontais sobre as colunas em c-e representam o erro padrão da média.

Figura 1

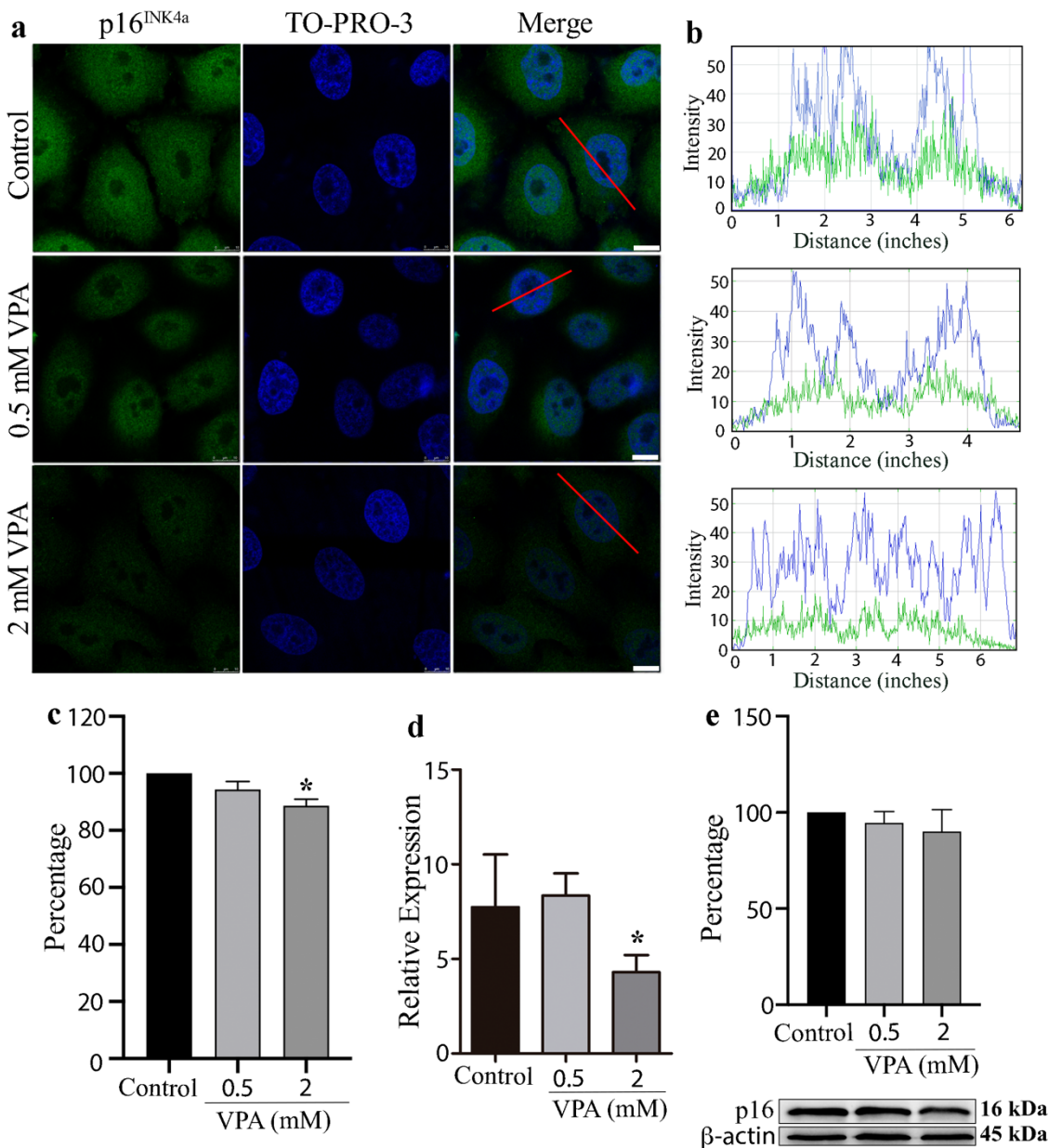


Figura 2

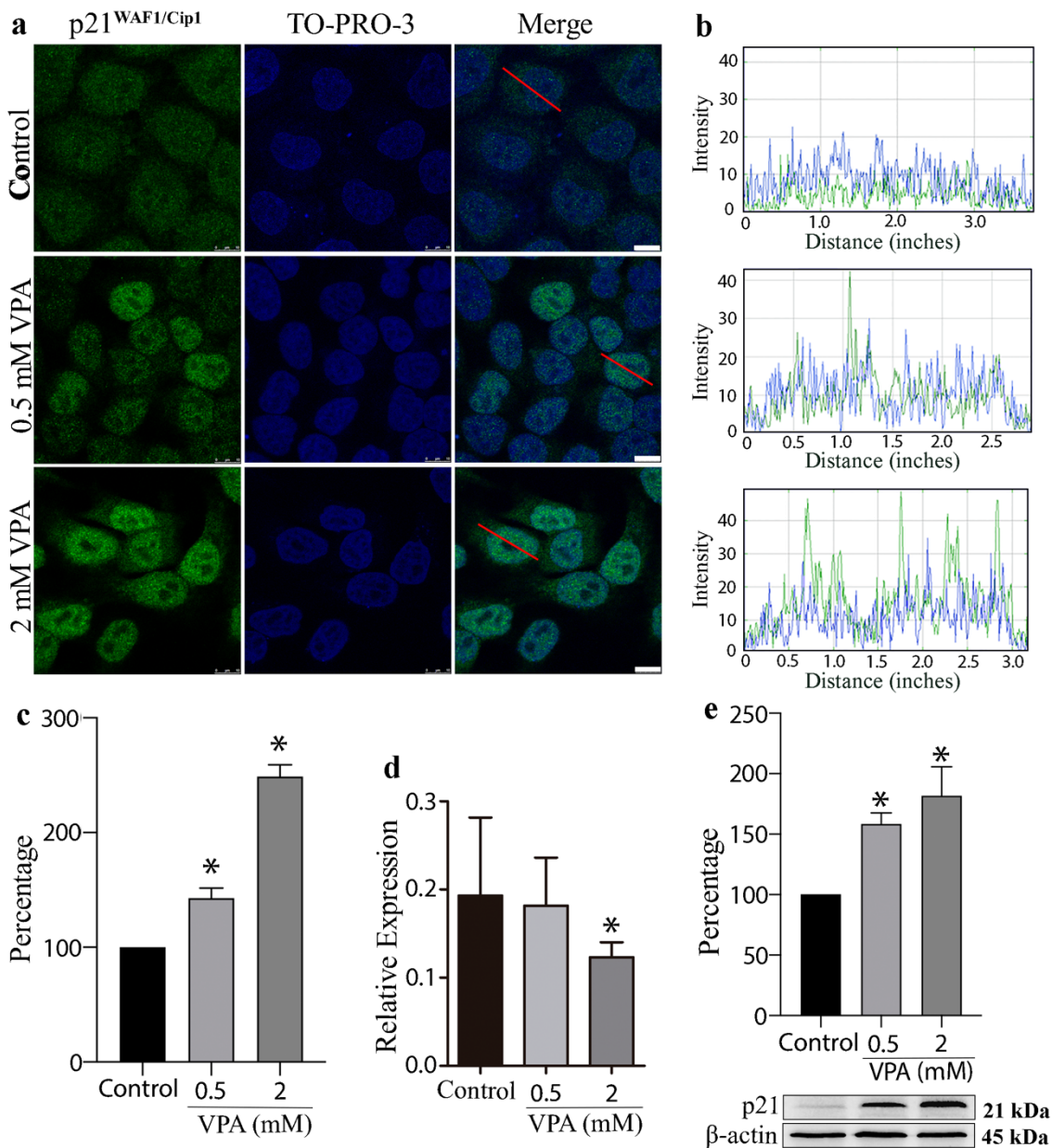
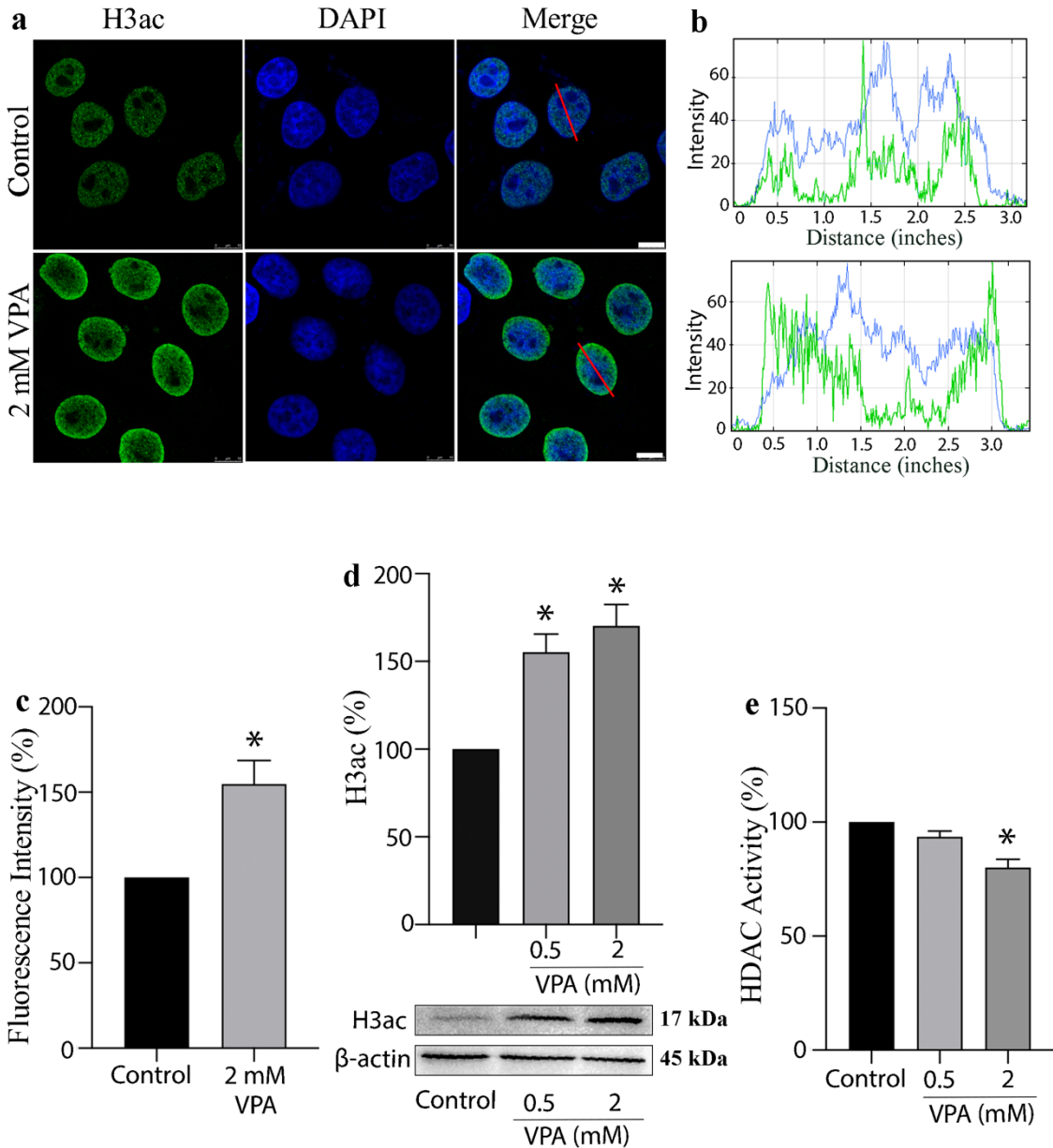
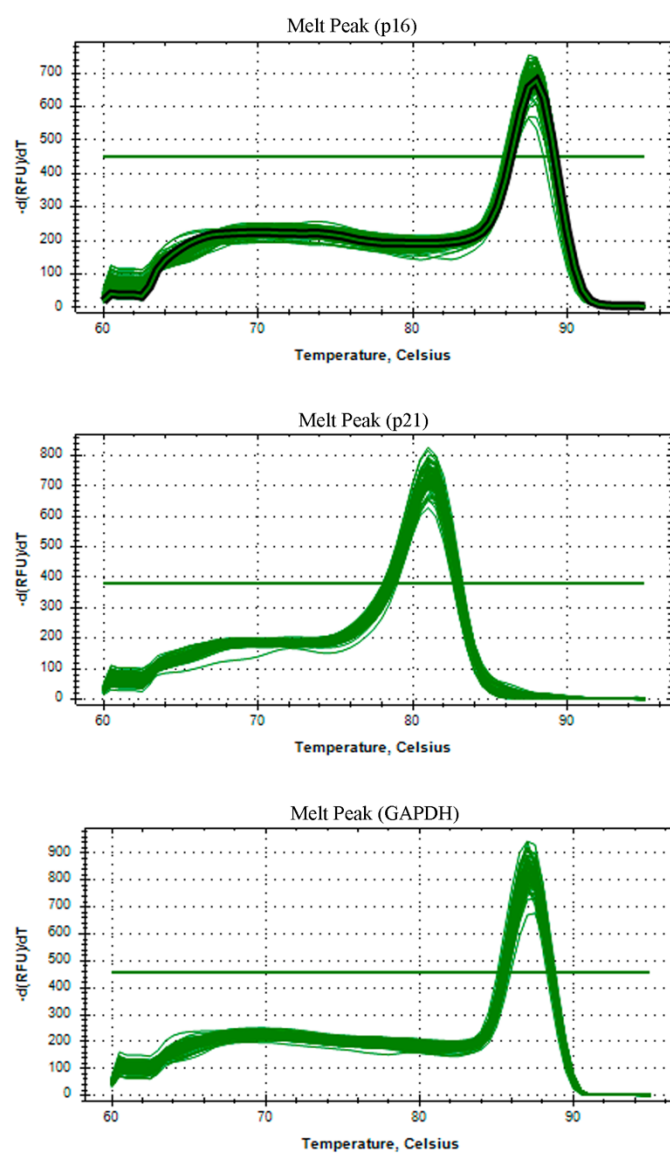


Figura 3



ARQUIVO SUPLEMENTAR



Curvas de dissociação dos *primers* usados para amplificação de mRNA nos ensaios de RT-qPCR.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os resultados apresentados nesta Tese mostraram que na linhagem celular de câncer cervical HeLa, o VPA promove modificações nos perfis de diferentes marcadores epigenéticos, localizados em resíduos de lisina da histona H3, bem como alterações na expressão de alguns de seus genes reguladores do ciclo celular. Foi possível ainda contribuir com informações importantes metabólicas atribuídas ao papel do VPA como agente terapêutico antitumoral.

A fim de atingir os objetivos iniciais propostos para o Projeto de Doutorado pertinente a alterações em marcas epigenéticas na histona H3 das células HeLa e enzimas a elas associadas, induzidas pelo VPA, foram obtidos resultados que se acham detalhados no capítulo I desta Tese e que resultaram em publicação no prelo na *Current Molecular Pharmacology* (Rocha et al. 2022). Assim, os presentes resultados demonstraram que o VPA pode afetar os estados de metilação H3K4me2/me3, H3K9me/me2 e H3K27me/me3 em células HeLa.

Demonstramos que o VPA está associado a regulação das marcas epigenéticas de forma positiva para H3K4me2/me3 e H3K9me, que estão associadas à transcrição gênica ativa, corroborando achados relatados para outras linhagens celulares (Nightingale et al. 2007, Li et al. 2019). O aumento nos níveis de H3K4me2/me3 foi associada à atividade da metiltransferase *KMT2D*. De modo interessante, imagens de microscopia confocal mostraram que com o tratamento pelo VPA as marcas H3K4me2 apareceram mais concentradas perto da periferia nuclear, o que foi sugerido estar associado à geração de um estado de memória transcritiva que possa durar vários dias (Light & Brickner 2013, Fišerová et al. 2017). Isso é sugestivo de que o VPA possa ter a capacidade de melhorar a memória transcricional em células HeLa.

Foi demonstrado que enquanto os níveis de H3K9me aumentaram, marca de ativação transcricional, os níveis da marca repressiva, H3K9me2, diminuíram junto com aumento na expressão gênica da demetilase *KDM3A* (Rice et al. 2003, Wu et al. 2005). Em conjunto, esses resultados são consistentes com uma intensificação da expressão gênica global induzida pelo VPA em células HeLa (Dejligbjerg et al. 2008).

Embora o VPA induza um aumento nos níveis globais de sinais de H3K27me e níveis de proteína H3K27me3, provavelmente regulados pelo aumento na expressão do gene *EZH2* da metiltransferase, nenhuma conexão causal entre esses marcadores e a fisiologia da cromatina pôde ser sugerida. Geralmente, H3K27me/me3 tendem a estar associadas à heterocromatina (Barth & Imhof 2010, Margueron et al. 2011). No entanto, há também relatos

de que modificações de H3K27me3 possam ocorrer em regiões de cromatina transcricionalmente ativas (Herz et al. 2013, Halsall et al. 2015).

É importante ressaltar que as alterações na metilação da histona H3 induzidas pela ação do VPA nas condições de concentração e tempo de exposição à droga não foram acompanhadas por modificações nos perfis das curvas espectrais de FT-IR, o que não exclui que modificações conformacionais das histonas possam acontecer sob a ação de concentrações mais elevadas e mais longos tempos de tratamento pela droga (Vidal & Mello 2020).

Para determinar se os presentes resultados epigenéticos teriam implicações consistentes do VPA afetando a regulação gênica em células HeLa, se fez necessária a investigação em um grupo selecionado de genes, como genes supressores de tumor.

A partir de constatações relatadas na literatura e nos trabalhos desenvolvidos na nossa dissertação de Mestrado e no primeiro capítulo desta Tese, em que o VPA mostrou promover em células HeLa diferentes alterações epigenéticas que afetam a expressão gênica (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019; 2022), achamos necessária uma análise específica envolvendo não apenas respostas globais sobre modificações epigenéticas, mas também uma busca pela associação desse HDACi com a regulação na expressão de alguns diferentes genes.

Para tal, investigamos em células HeLa a ação do VPA sobre a expressão de um conjunto de genes considerados supressores de tumor, *p16^{INK4a}* e *p21^{WAF1/Cip1}* que se encontram em níveis desregulados nessas células e também porque além de o VPA ser considerado um agente antitumoral, pode ele regular genes e proteínas participantes do controle de ciclo celular. Além disso, confirmamos o efeito do VPA sobre a hiperacetilação de H3 e a inibição da atividade de HDAC para os tratamentos aqui utilizados. Os resultados obtidos acham-se relatados no capítulo II desta Tese.

p16^{INK4a} atua como um gene supressor de tumor na maioria das células e está inativado em uma variedade de tumores humanos mas em câncer cervical esse gene encontra-se superexpresso, participando da atividade oncogênica na qual o seu papel de supressor tumoral está abolido (Medema et al. 1995, Klaes et al. 2001, Kim & Zhao 2005, Zhang et al. 2014, Huo et al. 2020, Li et al. 2020). De fato, nossos dados constatarem reação positiva de *p16^{INK4a}* nas células HeLa, linhagem celular originada a partir de câncer cervical de colo de útero, além de uma diminuição nos níveis de mRNA e proteicos após o tratamento pelo VPA, corroborando com o achado em fibroblastos humanos que tiveram níveis de *p16^{INK4a}* regulados negativamente após exposição com outros HDACis, tais como tricostatina A e butirato de sódio (Matheu et al. 2005).

É conhecido que $p21^{WAF1/Cip1}$ se ligue a CDKs e iniba a progressão do ciclo celular em G1-S (Kim & Zhao 2005, Han et al. 2013). Evidências apontam que o VPA promova o aumento na expressão gênica ou proteica de $p21^{WAF1/Cip1}$ em diferentes linhagens tumorais (Sami et al. 2008, Tsai et al. 2013, Mawatari et al. 2015, Lipska et al. 2021). Além disso, outros estudos demonstraram aumento nos níveis de $p21^{WAF1/Cip1}$, resultando no acúmulo de células na fase G1 promovidos por HDACis (Han et al. 2000, Kim et al. 2000, Luna-Palencia et al. 2021). Assim, nossos dados de que os níveis proteicos de $p21^{WAF1/Cip1}$ tenham aumentado após o tratamento das células HeLa com VPA por 24 h indicam que o mesmo possa promover parada na fase G1 do ciclo celular resultante da regulação positiva de $p21^{WAF1/Cip1}$.

No que se refere a essas alterações dos genes $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1/Cip1}$, vários mecanismos poderiam estar envolvidos na regulação de sua expressão e na abundância de suas respectivas proteínas. Há relatos de que as alterações nas marcas H3K4me3 e H3K27me3, no promotor, estejam implicadas na regulação da expressão de $p16^{INK4a}$. Já para o aumento de $p21^{WAF1/Cip1}$ há evidências apontando a participação de diversos mecanismos epigenéticos tais como acetilação de H3, metilação de DNA, di- e trimetilação de H3K4 e de H3K9, todas associadas ao promotor desse gene (Richon et al. 2000, Lin et al. 2008, McLaughlin-Drubin et al. 2011; 2013, Aizawa & Yamamuro 2015, Guo et al. 2016, Li et al. 2016, Beyer et al. 2017).

Acreditamos ser ainda necessária a busca por tais perfis epigenéticos, no promotor desses genes, uma vez que parte dessas alterações epigenéticas a níveis globais, na presença do VPA, já foram encontradas para essas mesmas condições experimentais em células HeLa (Rocha et al. 2022). Os próximos passos para completar essas buscas estão em andamento. Estes envolvem o estabelecimento do perfil de metilação de DNA nos promotores dos genes $p16^{INK4a}$ e $p21^{WAF1/Cip1}$ analisados por *Methylation Specific Polymerase Chain Reaction* (MSP) além de imunoprecipitação de cromatina acompanhada por RT-qPCR (ChIP- RT-qPCR) para resolver questões relativas a uma possível correlação referentes aos níveis de modificações de histonas como H3ac, H3K4me2/me3 e H3K9me2/me3, em região promotora, envolvidas na expressão de $p21^{WAF1/Cip1}$, bem como investigação dos perfis de H3K4me3 e H3K27me3 no promotor do gene $p16^{INK4a}$ após tratamentos com VPA.

Os resultados desta etapa do trabalho portanto demonstraram que o VPA, em células HeLa, além de promover demetilação do DNA, acetilação, e metilação/demetilação de histonas (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, 2022), induz a ativação de uma proteína supressora de tumor e reprime um gene participante de atividade oncogênica. Tais resultados são mais uma importante contribuição para compor o

panorama de ação desse HDACi que já faz parte de uma classe de agentes antitumorais promissores (Lin et al. 2008, Chun et al. 2015, Li et al. 2020).

6. CONCLUSÕES GERAIS

1. Em células HeLa ocorre alteração nos padrões de metilação da histona H3 e na expressão de genes envolvidos nas vias de metilação e demetilação de histonas em resposta à administração do VPA, um potente inibidor de HDAC.

2. Os níveis de marcas epigenéticas na histona H3 de células HeLa, associadas à ativação gênica, aumentam concomitante com a diminuição da ocorrência de marca repressiva, com o tratamento pelo VPA, sendo consistentes com uma intensificação da expressão gênica global.

3. O aumento induzido por VPA nos níveis das marcas epigenéticas H3K4me2/me3, associadas à transcrição gênica ativa, conta com a participação da metiltransferase *KMT2D*. Em particular, o aumento na abundância de H3K4me2, mais intensificado na periferia nuclear, possivelmente esteja envolvido com a geração de um estado de memória transcritiva.

4. O VPA reduz os níveis de H3K9me2, marca geralmente ligada ao silenciamento de genes e formação de heterocromatina constitutiva, de modo coerente com o aumento na expressão gênica da demetilase *KDM3A*.

5. Apesar de o VPA induzir um aumento nos níveis globais das marcas repressivas H3K27me/me3, provavelmente regulado pelo aumento na expressão do gene *EZH2*, nenhuma conexão causal entre elas pôde ser sugerida.

6. Apesar de serem constatadas mudanças nos níveis de metilação de H3 sob a ação do VPA, nas condições experimentais utilizadas não se acham presentes alterações nos espectros de FTIR das histonas totais que indicassem alterações nos seus grupos metil ou na sua conformação proteica.

7. Ao lado dos efeitos do VPA sobre as modificações nas histonas de células HeLa, essa droga também induz ativação da proteína supressora de tumor p21 e reprime o gene *p16* que nas células HeLa participa de atividade oncogênica.

8. Os resultados do trabalho aqui desenvolvido contribuem para o conhecimento básico voltado à potencialidade antitumoral desse fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahir BK, Pratten MK. (2014). Developmental cardiotoxicity effects of four commonly used antiepileptic drugs in embryonic chick heart micromass culture and embryonic stem cell culture systems. *Toxicology in Vitro*, 28, 948–960. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.04.001>
- Aizawa S, Yamamuro Y. (2015). Valproate administration to mice increases hippocampal p21 expression by altering genomic DNA methylation. *Neuroreport*, 26, 915–920. doi.org/10.1097/WNR.0000000000000448
- Allan J, Harborne N, Rau DC, Gould H. (1982). Participation of core histone “tails” in the stabilization of the chromatin solenoid. *Journal of Cell Biology*, 93, 285–297. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.2.285>
- Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the regulation of RNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51, 786–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Allis CD, Jenuwein T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 17, 487–500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>
- Alvarez-Venegas R, Avramova Z. (2002). SET-domain proteins of the Su(var)3-9, E(z) and Trithorax families. *Gene*, 285, 25–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00401-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00401-8)
- Aztopal N, Erkisa M, Erturk E, Ulukaya E, Tokullugil AH, Ari F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, 280, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.003>
- Bannister AJ, Kouzarides T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21, 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. (2007). High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*, 129, 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Barth TK, Imhof A. (2010). Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in biochemical sciences*, 35, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.05.006>

- Batty N, Malouf GG, Issa JPJ. (2009). Histone deacetylase inhibitors as anti-neoplastic agents. *Cancer Letters*, 280, 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.013>
- Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. (2016). H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends Genet.*, 176, 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Berger SL. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12, 142–148. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00279-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00279-4)
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8695–8700. <https://doi.org/10.1073/pnas.082249499>
- Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, Bekiranov S, Bailey DK, Huebert DJ, McMahon S, Karlsson EK, Kulbokas EJ, Gingeras TR, Schreiber SL, Lander ES. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*, 120, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.001>
- Beyer S, Zhu J, Mayr D, Kuhn C, Schulze S, Hofmann S, Dannecker C, Jeschke U, Kost BP. (2017). Histone H3 acetyl K9 and histone H3 tri methyl K4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 477. <https://doi.org/10.3390/ijms18030477>
- Bird A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396–398. <https://doi.org/10.1038/nature05913>
- Blaheta RA, Cinatl J. (2002). Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. *Medicinal Research Reviews*, 22, 492–511. <https://doi.org/10.1002/med.10017>
- 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. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500, 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature12362>
- Boudadi E, Stower H, Halsall JA, Rutledge CE, Leeb M, Wutz A, O'Neill LP, Nightingale KP, Turner BM. (2013). The histone deacetylase inhibitor sodium valproate causes limited transcriptional change in mouse embryonic stem cells but selectively overrides Polycomb-mediated Hoxb silencing. *Epigenetics and Chromatin*, 6, 11. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-11>

- Burgess RJ, Zhang Z. (2010). Histones, histone chaperones and nucleosome assembly. *Protein and Cell*, 1, 607–612. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0086-y>
- Chanda S, Ang CE, Lee QY, Ghebrial M, Haag D, Shibuya Y, Wernig M, Südhof TC. (2019). Direct Reprogramming of Human Neurons Identifies MARCKSL1 as a Pathogenic Mediator of Valproic Acid-Induced Teratogenicity. *Cell Stem Cell*, 25, 103–119.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.04.021>
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. (2010). Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 479364. <https://doi.org/10.1155/2010/479364>
- Chen J, Zheng Z, Chen Y, Li J, Qian S, Shi Y, Sun L, Han Y, Zhang S, Yu K. (2016). Histone deacetylase inhibitors trichostatin a and MCP30 relieve benzene-induced hematotoxicity via restoring topoisomerase II α . *PLoS ONE*, 11, e0153330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153330>
- Chen YX, Fang JY, Zhu HY, Lu R, Cheng ZH, Qiu DK. (2004). Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 2643–2646. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i18.2643>
- Cheng X, Zhang X. (2007). Structural Dynamics of Protein Lysine Methylation and De-Methylation - 2006. *Mutation research*, 618, 102–115. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Chun SM, Lee JY, Choi J, Lee JH, Hwang JJ, Kim CS, Suh YA, Jang SJ. (2015). Epigenetic modulation with HDAC inhibitor CG200745 induces anti-proliferation in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*, 10, e0119379. doi:10.1371/journal.pone.0119379.
- Cutter AR, Hayes JJ. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters*, 589, 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>
- Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, Gopalakrishnan V. (2007). Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, 85, 159–170. <https://doi.org/10.1007/s11060-007-9402-7>
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 319, 1097–1113. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00386-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00386-8)

- Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, Jeffers M, Lichenstein H, Jensen PB, Sehested M. (2008). Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Molecular cancer*, 7, 70. doi:10.1186/1476-4598-7-70.
- Detich N, Bovenzi V, Szyf M. (2003). Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 27586–27592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303740200>
- Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. (2010). Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics*, 5, 730–735. <https://doi.org/10.4161/epi.5.8.13053>
- Duan L, Liu Y, Wang J, Liao J, Hu J. (2016). The dynamic changes of DNA methylation in primordial germ cell differentiation. *Gene*, 591, 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.036>
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*, 34, 206–222. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.11.003>
- Dupont C, Armant DR, Brenner CA. (2009). Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in reproductive medicine*, 27, 351–357. doi:10.1055/s-0029-1237423
- Elgin SC, Weintraub H. (1975). Chromosomal proteins and chromatin structure. *Annual review of biochemistry*, 44, 725–774. doi:10.1146/annurev.bi.44.070175.003453
- Eyal S, Yagen B, Shimshoni J, Bialer M. (2005). Histone deacetylases inhibition and tumor cells cytotoxicity by CNS-active VPA constitutional isomers and derivatives. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1501–1508. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.02.012>
- Fang E, Wang J, Hong M, Zheng L, Tong Q. (2018). Valproic acid suppresses Warburg effect and tumor progression in neuroblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.103>
- Fang J, Zhang H, Jin S. (2014). Epigenetics and cervical cancer: From pathogenesis to therapy. *Tumor Biology*, 35, 5083–5093. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1737>
- Feinberg AP, Tycko B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, 4, 143–153. <https://doi.org/10.1038/nrc1279>

- 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
- Fišerová J, Efenberková M, Sieger T, Maninová M, Uhlířová J, Hozák P. (2017). Chromatin organization at the nuclear periphery as revealed by image analysis of structured illumination microscopy data. *Journal of cell science*, 130, 2066–2077. <https://doi.org/10.1242/jcs.198424>
- Ganai SA, Malli Kalladi S, Mahadevan V. (2015). HDAC inhibition through valproic acid modulates the methylation profiles in human embryonic kidney cells. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33, 1185–1197. <https://doi.org/10.1080/07391102.2014.938247>
- Gilbert N, Gilchrist S, Bickmore WA. (2005). Chromatin organization in the mammalian nucleus. *International Review of Cytology*, 242, 283–336. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42007-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42007-5)
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO Journal*, 20, 6969–6978. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Greer EL, Shi Y. (2014). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13, 343–357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173>
- Guo Q, Li X, Han H, Li C, Liu S, Gao W, Sun G. (2016). Histone Lysine Methylation in TGF- β 1 Mediated p21 Gene Expression in Rat Mesangial Cells. *BioMed research international*, 2016, 6927234. doi:10.1155/2016/6927234
- Halsall JA, Turan N, Wiersma M, Turner BM. (2015). Cells adapt to the epigenomic disruption caused by histone deacetylase inhibitors through a coordinated, chromatin-mediated transcriptional response. *Epigenetics & chromatin*, 8, 29. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0021-9>
- Han BR, You BR, Park WH. (2013). Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncology reports*, 30, 2999–3005. doi:10.3892/or.2013.2747
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW. (2000). Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer research*, 60, 6068–6074.

- Heers H, Stanislaw J, Harrelson J, Lee MW. (2018). Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer. *European Journal of Pharmacology*, 835, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.057>
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, 39, 311–318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>
- Herz HM, Garruss A, Shilatifard A. (2013). SET for life: Biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 38, 621–639. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.09.004>
- Huo W, Zhai S, Wang Y, Qiang X, Na R, Gui H, Wu N, Cao Y, Bai H. (2020). Relevance research between the expression of p16^{INK4a}, Notch1, and hTERC genes: The development of HPV16-positive cervical cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*, 34, e23207. doi:10.1002/jcla.23207.
- Hyun K, Jeon J, Park K, Kim J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental and Molecular Medicine*, 49, e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
- Ibrahim TS, Sheha TA, Abo-Dya NE, AlAwadh MA, Alhakamy NA, Abdel-Samii ZK, Panda SS, Abuo-Rahma GEDA, Mohamed MFA. (2020). Design, synthesis and anticancer activity of novel valproic acid conjugates with improved histone deacetylase (HDAC) inhibitory activity. *Bioorganic Chemistry*, 99, 103797. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103797>
- Ito S, Dalessio AC, Taranova O V., Hong K, Sowers LC, Zhang Y. (2010). Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466, 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
- Jambhekar A, Dhall A, Shi Y. (2019). Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20, 625–641. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0151-1>
- Jiang J, Lu J, Lu D, Liang Z, Li L, Ouyang S, Kong X, Jiang H, Shen B, Luo C. (2012). Investigation of the acetylation mechanism by GCN5 histone acetyltransferase. *PLoS ONE*, 7, e36660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036660>

- Khorasanizadeh S. (2004). The nucleosome. *Scientific American*, 244, 52–64. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0281-52>
- Kim YB, Ki SW, Yoshida M, Horinouchi S. (2000). Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *The Journal of antibiotics*, 53, 1191–1200. doi:10.7164/antibiotics.53.1191.
- Kim YT, Zhao M. (2005). Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Medical Journal*, 46, 597–613. doi:10.3349/ymj.2005.46.5.597.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. (2001). Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International journal of cancer*, 92, 276–284. doi:10.1002/ijc.1174.
- Kornberg RD. (1974). Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science*, 184, 868–871.
- Kornberg RD, Lorch Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98, 285–294. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81958-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81958-3)
- Kouzarides T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128, 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Krouwels IM, Wiesmeijer K, Abraham TE, Molenaar C, Verwoerd NP, Tanke HJ, Dirks RW. (2005). A glue for heterochromatin maintenance: Stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain. *Journal of Cell Biology*, 170, 537–549. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502154>
- Kulis M, Esteller M. (2010). DNA methylation and cancer. *Advances in genetics*, 70, 27–56. doi:10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2
- Lacal I, Ventura R. (2018). Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 292. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00292>
- Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. (2004). Valproic acid: How it works. Or not. *Clinical Neuroscience Research*, 4, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.cnr.2004.09.013>

- Lanouette S, Mongeon V, Figeys D, Couture JF. (2014). The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular Systems Biology*, 10, 724. <https://doi.org/10.1002/msb.134974>
- Lee JH, Choy ML, Ngo L, Foster SS, Marks PA. (2010). Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14639–14644. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008522107>
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AAHA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AHFM. (2003). Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. *Current Biology*, 13, 1192–1200. <https://doi.org/10.1016/S>
- Li H, Zhang Z, Gao C, Wu S, Duan Q, Wu H, Wang C, Shen Q, Yin T. (2019). Combination chemotherapy of valproic acid (VPA) and gemcitabine regulates STAT3/Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell and Bioscience*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0312-0>
- Li M, Yang J, Liu K, Yang J, Zhan X, Wang L, Shen X, Chen J, Mao Z. (2020). p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis. *Journal of Cancer*, 11, 1457–1467. doi:10.7150/jca.35479.
- Li X, Li C, Li X, Cui P, Li Q, Guo Q, Han H, Liu S, Sun G. (2016). Involvement of Histone Lysine Methylation in p21 Gene Expression in Rat Kidney In Vivo and Rat Mesangial Cells In Vitro under Diabetic Conditions. *Journal of diabetes research*, 2016, 3853242. doi:10.1155/2016/3853242.
- Light WH, Brickner JH. (2013). Nuclear pore proteins regulate chromatin structure and transcriptional memory by a conserved mechanism. *Nucleus (United States)*, 4, 357–360. <https://doi.org/10.4161/nucl.26209>
- Lin YC, Lin JH, Chou CW, Chang YF, Yeh SH, Chen CC. (2008). Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. *Cancer Research*, 68, 2375–2383. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5807.
- Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee ES, Kim HK, Kim I. (2005). The hypermethylation and protein expression of p16INK4A and DNA repair gene O6 -methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 131, 364–370. <https://doi.org/10.1007/s00432-004-0657-5>

- Lipska K, Filip A, Gumieniczek A. (2021). The Impact of Chlorambucil and Valproic Acid on Cell Viability, Apoptosis and Expression of *p21*, *HDM2*, *BCL2* and *MCL1* Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cells*, 10, 1088. doi:10.3390/cells10051088.
- Lipska K, Gumieniczek A, Filip AA. (2020). Anticonvulsant valproic acid and other short-chain fatty acids as novel anticancer therapeutics: Possibilities and challenges. *Acta Pharmaceutica*, 70, 291–301. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0021>
- Liu N, Zhang Z, Wu H, Jiang Y, Meng L, Xiong J, Zhao Z, Zhou X, Li J, Li H, Zheng Y, Chen S, Cai T, Gao S, Zhu B. (2015). Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability. *Genes and Development*, 29, 379–393. <https://doi.org/10.1101/gad.254425.114>
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luna-Palencia GR, Correa-Basurto J, Trujillo-Ferrara J, Meraz-Ríos MA, Vásquez-Moctezuma I. (2021). Epigenetic Evaluation of N-(2-hydroxyphenyl)-2-Propylpentanamide, a Valproic Acid Aryl Derivative with Activity Against HeLa Cells. *Current molecular pharmacology*, 14, 570–578. doi:10.2174/1874467213666200730113828.
- Lund PJ, Lehman SM, Garcia BA. (2019). Quantitative analysis of global protein lysine methylation by mass spectrometry. *Methods in Enzymology*, 626, 475–498. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.07.036>
- Lyko F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19, 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Research*, 65, 3815–3822. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2478>
- Margueron R, Reinberg D. (2011) The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469, 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature09784>
- Marinova Z, Leng Y, Leeds P, Chuang DM. (2011). Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacology*, 60, 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.09.022>

- Matheu A, Klatt P, Serrano M. (2005). Regulation of the INK4a/ARF locus by histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 280, 42433–42441. doi:10.1074/jbc.M508270200.
- Mawatari T, Ninomiya I, Inokuchi M, Harada S, Hayashi H, Oyama K, Makino I, Nakagawara H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Fushida S, Ohta T. (2015). Valproic acid inhibits proliferation of HER2-expressing breast cancer cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis through Hsp70 acetylation. *International journal of oncology*, 47, 2073–2081. doi:10.3892/ijo.2015.3213.
- McGrath J, Trojer P. (2015). Targeting histone lysine methylation in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 150, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.002>
- McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Münger K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2130–2135. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009933108>
- McLaughlin-Drubin ME, Park D, Munger K. (2013). Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 16175–16180. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310432110>
- Medema RH, Herrera RE, Lam F, Weinberg RA. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 6289–6293. doi:10.1073/pnas.92.14.6289.
- Mello MLS, Vidal BC. Cromatina e Cromossomos. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. (Org.). *A Célula*. 3ed. Barueri: Manole Ltda. 3: 185-204, 2013.
- Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. (1963). [Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid]. *Thérapie*, 18, 435–438.
- Milutinovic S, Detich N, Szyf M. (2007). Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*, 28, 560–571. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl167>
- Moore LD, Le T, Fan G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

- Murray K. (1964). The Occurrence of ϵ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry*, 3, 10–15. <https://doi.org/10.1021/bi00889a003>
- Nightingale KP, Gendreizig S, White DA, Bradbury C, Hollfelder F, Turner BM. (2007). Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 4408–4416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606773200>
- Pan MR, Hsu MC, Chen LT, Hung WC. (2018). Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75, 209–223. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8>
- Pang TY, Short AK, Bredy TW, Hannan AJ. (2017). Transgenerational paternal transmission of acquired traits: stress-induced modification of the sperm regulatory transcriptome and offspring phenotypes. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 14, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2017.02.007>
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. (2013). TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14, 341–356. <https://doi.org/10.1038/nrm3589>
- Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, Asmus M, Tuorto F, Uhr M, Holsboer F, Rein T, Zschocke J. (2010). Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology*, 35, 792–805. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.188>
- Perucca E. (2002). Overtreatment in epilepsy: Adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Research*, 52, 25–33. [https://doi.org/10.1016/S0920-1211\(02\)00182-1](https://doi.org/10.1016/S0920-1211(02)00182-1)
- Peschansky VJ, Wahlestedt C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics*, 9, 3–12. <https://doi.org/10.4161/epi.27473>
- Peters AHFM, Kubicek S, Mechtler K, O’Sullivan RJ, Derijck AAHA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JHA, Jenuwein T. (2003). Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Molecular Cell*, 12, 1577–1589. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00477-5)
- Peterson GM, Naunton M. (2005). Valproate: A simple chemical with so much to offer. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 30, 417–421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.2005.00671.x>

- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 36734–36741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
- Pitetzis DA, Spilioti MG, Yovos JG, Yavropoulou MP. (2017). The effect of VPA on bone: From clinical studies to cell cultures—The molecular mechanisms revisited. *Seizure*, 48, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.03.013>
- Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. (2003). Histone Methyltransferases Direct Different Degrees of Methylation to Define Distinct Chromatin Domains. *Molecular Cell*, 12, 1591–1598. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00479-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00479-9)
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. (2000). Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 10014–10019. doi:10.1073/pnas.180316197.
- Robinson PJJ, Fairall L, Huynh VAT, Rhodes D. (2006). EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 6506–6511. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601212103>
- Rocha MA, Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Tamashiro WMSC, Mello MLS. (2019). Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Scientific Reports*, 9, 18236. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54848-x>
- Rocha MA, Vidal BC, Mello MLS. (2022). Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells. (PRINT). *Current molecular pharmacology*. doi:10.2174/1874467215666220316110405.
- Roh TY, Wei G, Farrell CM, Zhao K. (2007). Genome-wide prediction of conserved and nonconserved enhancers by histone acetylation patterns. *Genome Research*, 17, 74–81. <https://doi.org/10.1101/gr.5767907>
- Sami S, Höti N, Xu HM, Shen Z, Huang X. (2008). Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both in vitro and in vivo. *Journal of biochemistry*, 144, 357–362. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn074>

- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NCT, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419, 407–411. <https://doi.org/10.1038/nature01080>
- Sargolzaei J, Rabbani-Chadegani A, Mollaei H, Deezagi A. (2017). Spectroscopic analysis of the interaction of valproic acid with histone H1 in solution and in chromatin structure. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.098>
- Schuermann D, Weber AR, Schär P. (2016). Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair*, 44, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.013>
- Scialdone A, Hasni MS, Damm JK, Lennartsson A, Gullberg U, Drott K. (2017). The HDAC inhibitor valproate induces a bivalent status of the CD20 promoter in CLL patients suggesting distinct epigenetic regulation of CD20 expression in CLL in vivo. *Oncotarget*, 8, 37409–37422. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16964>
- Seto E, Yoshida M. (2014). Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shilatifard A. (2006). Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 243–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>
- Shilatifard A. (2012). The COMPASS Family of Histone H3K4 Methylases: Mechanisms of Regulation in Development and Disease Pathogenesis. *Annual review of biochemistry*, 81, 65–95. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051710-134100>
- Shinsky SA, Monteith KE, Viggiano S, Cosgrove MS. (2015). Biochemical reconstitution and phylogenetic comparison of human SET1 family core complexes involved in histone methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 6361–6375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.627646>
- Silva MFB, Aires CCP, Luis PBM, Ruiter JPN, IJst L, Duran M, Wanders RJA, Tavares de Almeida I. (2008). Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31, 205–216. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-0841-x>

- Spencer VA, Davie JR. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*, 240, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00405-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00405-9)
- Sterner DE, Berger SL. (2000). Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 435–459. <https://doi.org/10.1128/mmbr.64.2.435-459.2000>
- Sun L, Coy DHC. (2014). Anti-Convulsant Drug Valproic Acid in Cancers and in Combination Anti-Cancer Therapeutics. *Modern Chemistry & Applications*, 2, 1–5. <https://doi.org/10.4172/2329-6798.1000118>
- Swygert SG, Peterson CL. (2014). Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839, 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.013>
- Terbach N, Williams RSB. (2009). Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochemical Society Transactions*, 37, 1126–1132. <https://doi.org/10.1042/BST0371126>
- Thinnes CC, England KS, Kawamura A, Chowdhury R, Schofield CJ, Hopkinson RJ. (2014). Targeting histone lysine demethylases - Progress, challenges, and the future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839, 1416–1432. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.05.009>
- Tolou-Ghamari Z, Palizban AA. (2015). Review of Sodium Valproate Clinical and Biochemical Properties. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17, e2207. <https://doi.org/10.17795/zjrms-2207>
- Tomson T, Battino D, Perucca E. (2016). Valproic acid after five decades of use in epilepsy: Time to reconsider the indications of a time-honoured drug. *The Lancet Neurology*, 15, 210–218. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00314-2)
- Tran LNK, Kichenadasse G, Morel KL, Lavranos TC, Klebe S, Lower KM, Ormsby RJ, Elliot DJ, Sykes PJ. (2019). The combination of metformin and valproic acid has a greater anti-tumoral effect on prostate cancer growth in vivo than either drug alone. *In Vivo*, 33, 99–108. <https://doi.org/10.21873/invivo.11445>
- Tsai C, Leslie JS, Franko-Tobin LG, Prasnal MC, Yang T, Vienna Mackey L, Fuselier JA, Coy DH, Liu M, Yu C, Sun L. (2013). Valproic acid suppresses cervical cancer tumor progression possibly via activating Notch1 signaling and enhances receptor-targeted cancer chemotherapeutic via activating somatostatin receptor type II. *Archives of gynecology and obstetrics*, 288, 393–400. doi:10.1007/s00404-013-2762-7.

- Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC. (1998). Disruption of Higher-Order Folding by Core Histone Acetylation Dramatically Enhances Transcription of Nucleosomal Arrays by RNA Polymerase III. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 4629–4638. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.8.4629>
- Tung EWY, Winn LM. (2010). Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.001>
- Venkataramani V, Rossner C, Iffland L, Schweyer S, Tamboli IY, Walter J, Wirths O, Bayer TA. (2010). Histone deacetylase inhibitor valproic acid inhibits cancer cell proliferation via down-regulation of the alzheimer amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 10678–10689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.057836>
- Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, De Vidal BC. (2017). DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS ONE*, 12, e0170740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170740>
- Vidal BC, Mello MLS. (2017). Chiral supramolecular order revealed during the formation of calf thymus and phage DNA crystals. *Micron*, 102, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.08.008>
- Vidal BC, Mello MLS. (2020). Sodium valproate (VPA) interactions with DNA and histones. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.265>
- Völkel P, Angrand PO. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, 89, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.009>
- Waddington, CH. (1942). The epigenotype. *Endeavour*, 1, 18–20.
- Wang P, Lin C, Smith ER, Guo H, Sanderson BW, Wu M, Gogol M, Alexander T, Seidel C, Wiedemann LM, Ge K, Krumlauf R, Shilatifard A. (2009). Global Analysis of H3K4 Methylation Defines MLL Family Member Targets and Points to a Role for MLL1-Mediated H3K4 Methylation in the Regulation of Transcriptional Initiation by RNA Polymerase II. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 6074–6085. <https://doi.org/10.1128/mcb.00924-09>
- Wang Z, Liu H. (2019). Lysine methylation regulates nervous system diseases. *Neuropeptides*, 76, 101929. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.04.004>

- Wu H, Zhang Y. (2014). Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell*, 156, 45–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.019>
- Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. (2005). Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Molecular biology of the cell*, 16, 2872–2881. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0997>
- Wu Z, Connolly J, Biggar KK. (2017). Beyond histones – the expanding roles of protein lysine methylation. *FEBS Journal*, 284, 2732–2744. <https://doi.org/10.1111/febs.14056>
- Yang Q, Tian Y, Liu S, Zeine R, Chlenski A, Salwen HR, Henkin J, Cohn SL. (2007). Thrombospondin-1 peptide ABT-510 combined with valproic acid is an effective antiangiogenesis strategy in neuroblastoma. *Cancer Research*, 67, 1716–1724. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2595>
- Young MD, Willson TA, Wakefield MJ, Trounson E, Hilton DJ, Blewitt ME, Oshlack A, Majewski IJ. (2011). ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Research*, 39, 7415–7427. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr416>
- Zhang CY, Bao W, Wang LH. (2014). Downregulation of p16(ink4a) inhibits cell proliferation and induces G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *International journal of molecular medicine*, 33, 1577–1585. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1731>
- Zhang X, Wen H, Shi X. (2012). Lysine methylation: Beyond histones. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 44, 14–27. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr100>

8. ANEXOS

Resumo de outras atividades desenvolvidas ao longo do período:

1. Estágio no Laboratório Genômica Integrativa do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências de Botucatu no período de 10/12 a 17/12/2021.

2. Colaboração em aulas práticas da disciplina BS111 – A Célula, para o curso de graduação em Medicina da Unicamp nos anos de 2018 e 2019 e para a disciplina BS115 – Estrutura e função de células e tecidos, para o curso de graduação em Farmácia da Unicamp nos anos de 2018 e 2019.

3. Disciplina cursada da Pós-Graduação NC752 - Cromatina e Epigenética, Instituto de Biologia, Unicamp. Durante o segundo semestre de 2019.

4. Orientações em técnicas de laboratório (Alessandra Bassani, Camila Borges M. de oliveira, Douglas S. dos Santos).

5. Disciplina da Graduação BC698 - Cromatina e Epigenética, Instituto de Biologia, Unicamp. “Metilação do DNA” e “Efeitos do ácido valproico sobre a metilação do DNA durante o ciclo celular de células HeLa”, 2018, 2019 e 2020. Palestra.

6. Disciplina de Pós-Graduação NC752 - Cromatina e Epigenética, Instituto de Biologia, Unicamp. “Metilação do DNA” e “Efeitos do ácido valproico sobre a metilação do DNA durante o ciclo celular de células HeLa”, 2019. Palestra.

Participação em congressos, com apresentações de trabalho:

1. XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology (Online) - 1 a 10 de dezembro de 2021, apresentando o trabalho “The HDAC inhibitor sodium valproate affects the methylation status of lysines 4 and 9 in histone H3 of HeLa cells”.

2. Epigenetics & Chromatin Virtual Conference, Cold Spring Harbor - 15 a 18 de setembro de 2020, apresentando o trabalho “Sodium valproate (VPA) modulates the methylation status of histone H3 in HeLa cells”.

3. 65th Brazilian Congress of Genetics, Águas de Lindoia - 17 a 20 de setembro de 2019, apresentando o trabalho “Histone modifications in response to sodium valproate (VPA) treatment in HeLa cells” e participando como co-autora do trabalho “Sodium valproate does not induce lysine acetylation in histones H3 and H4 of the heterochromatin of *Triatoma infestans*”.

4. 4th International Congress on Epigenetics & Chromatin, London - 03 a 05 de setembro de 2018, apresentando o trabalho “Valproic acid effects on DNA methylation during the cell cycle of HeLa cells”.

5. XXII International Congress of Genetics (ICG), Foz do Iguaçu - 10 a 14 de setembro de 2018 com apresentação do trabalho “Epigenetic effects of sodium valproate (VPA) and 5-aza-deoxycytidine (5-aza-CdR) on DNA methylation along the cell cycle of HeLa cells.”

Publicações de Artigos

1. Rocha MA, Vidal BC, Mello MLS. Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells. *Current Molecular Pharmacology* (PRINT), 2022. doi:10.2174/1874467215666220316110405

2. Santos DS, Rocha MA, Mello MLS. Epigenetic studies in insects and the valproic acid perspective. *Brazilian Journal of Biology*, e256045, 2024. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256045>.

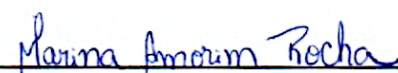
3. Bassani A, Rocha MA, Rodrigues VLCC, Santos DS, Rocha JA, Mello MLS. Effects of sodium valproate on the chromatin of *Triatoma infestans* (Klug, 1834) (Hemiptera, Reduviidae) under in vitro culture conditions. *Acta Histochemica*, 123, 151695, 2021. doi:10.1016/j.acthis.2021.151695

4. Rocha MA, Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Sodium valproate and 5-aza- 2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Scientific Reports*, 9, 18236, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54848-x>. (Artigo derivado de trabalho de Mestrado).

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITOS DO VALPROATO DE SÓDIO NOS NÍVEIS DE METILAÇÕES DA HISTONA H3, NA INTERAÇÃO VPA-HISTONAS E NA REGULAÇÃO DOS GENES p16INK4a E p21WAF1/Cip1 EM CÉLULAS HeLa**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 18 de outubro de 2022

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Marina Amorim Rocha**
RG n.º 15.143.635-50

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



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 Tese de Doutorado, intitulada **"EFEITOS DO VALPROATO DE SÓDIO NOS NÍVEIS DE METILAÇÕES DA HISTONA H3, NA INTERAÇÃO VPA-HISTONAS E NA REGULAÇÃO DOS GENES p16INK4a E p21WAF1/Cip1 EM CÉLULAS HeLa"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

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

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

Data: 18 de outubro de 2022