



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAMILA BORGES MARTINS DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO VALPRÓICO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE IMAGEM E
MARCAS EPIGENÉTICAS EM CROMATINA DE UMA LINHAGEM CELULAR
DE GLIOBLASTOMA**

**VALPROIC ACID EFFECT ON IMAGING FEATURES AND EPIGENETIC MARKS
IN CHROMATIN OF A GLIOBLASTOMA CELL LINE**

CAMPINAS
2023

CAMILA BORGES MARTINS DE OLIVEIRA

**EFEITO DO ÁCIDO VALPRÓICO SOBRE CARACTERÍSTICAS DE IMAGEM E
MARCAS EPIGENÉTICAS EM CROMATINA DE UMA LINHAGEM CELULAR
DE GLIOBLASTOMA**

**VALPROIC ACID EFFECT ON IMAGING FEATURES AND EPIGENETIC MARKS
IN CHROMATIN OF A GLIOBLASTOMA CELL LINE**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular e Morfofuncional na Área de Biologia Celular.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the University of Campinas (UNICAMP) in partial fulfillment of the requirements for Master's degree in Molecular and Morphofunctional Biology in the Cell Biology Area.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE
À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CAMILA
BORGES MARTINS DE OLIVEIRA, E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA
LUIZA SILVEIRA MELLO.

CAMPINAS

2023

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

OL4e Oliveira, Camila Borges Martins de, 1986-
Efeito do ácido valpróico sobre características de imagem e marcas epigenéticas em cromatina de uma linhagem celular de glioblastoma / Camila Borges Martins de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

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

1. Glioblastoma. 2. Linhagem celular. 3. Ácido valpróico. 4. Epigenômica. 5. Remodelação da cromatina. I. Mello, Maria Luiza Silveira, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Valproic acid effect on imaging features and epigenetic marks in chromatin of a glioblastoma cell line

Palavras-chave em inglês:

Glioblastoma

Cell line

Valproic acid

Epigenomics

Chromatin remodeling

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Mestra em Biologia Molecular e Morfofuncional

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]

Maria Silvia Viccari Gatti

Alberto da Silva Moraes

Data de defesa: 26-05-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Molecular e Morfofuncional

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7151-5659>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/0963918850126668>

Campinas, 26 de Maio de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Profª. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

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

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

“Todo sujeito é livre para conjugar o verbo que quiser, todo verbo é livre para ser direto ou indireto, nenhum predicado será prejudicado, nem tampouco a frase, nem a crase, nem a vírgula e ponto vírgulas, e estar entre vírgulas pode ser aposto e eu aposto o oposto: que vou cativar a todos sendo apenas um sujeito simples”. (O Teatro Mágico)

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(Charles Chaplin)*

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus filhos Kayke, Manuela e Melissa, pelo amor incondicional e pelos quais fui até o fim.

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por me guardar e proteger até aqui.

Aos meus filhos Kayke, Manuela e Melissa, razão do meu viver e pelos quais busco sempre além.. Pelo amor, pela paciência nesses anos intensos elaborando essa pesquisa. Meu eterno amor e gratidão: a mamãe conseguiu!

Ao meu marido Vinícius, por caminhar ao meu lado, pela base e apoio nesse período, me incentivando a ir até o fim. Te amo muito.

A minha mãe, Luzia, pelo amor e investimento inicial nos meus estudos, os quais definiram meu futuro profissional e meu sucesso pessoal. Meu amor e minha gratidão para sempre.

A minha avó Preta, por me ensinar gentileza e bondade, sinto sua falta todos os dias da minha vida. Já consigo escutar a senhora falando: “eu sabia que você ia conseguir”.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pela oportunidade e confiança em meu trabalho.

Ao prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo privilégio de conviver diariamente e pelo compartilhamento de tanto conhecimento e experiências de vida.

A profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, que esteve comigo no início de minha jornada acadêmica, desde aluna de graduação desta Universidade, pelo carinho, acolhimento e por tanto me ensinar, não apenas sobre técnicas de cultivo celular, mas sobre como viver a vida de maneira correta e humilde. Para sempre terá meu carinho e eterno reconhecimento.

Aos professores Dr. Domingos da Silva Leite, Dra. Clarice Weiss Arns, Dr. José Luis Proença Módena e Dra. Cristina Pontes Vicente, por disponibilizar o espaço de cultura de células em seus laboratórios quando foi necessário.

A técnica de laboratório Ana Lucia Rodrigues da Soledad, pela amizade nesses anos e pelo treinamento em técnicas de cultura de células.

A minha psicóloga Maristela, pelo suporte e acolhimento em todos esses anos, minha gratidão, sem você com certeza essa caminhada teria sido mais tortuosa.

A minha amiga e companheira de laboratório Marina Amorim Rocha, pelos momentos alegres, pelo compartilhamento de experiências, pela torcida e ajuda durante todas as etapas de elaboração deste trabalho. Você foi fundamental nessa conquista.

Ao grande amigo que a Ciência me trouxe, Douglas dos Santos, por tanto me acolher e me fortalecer na pesquisa. Obrigada por tudo, e pelos momentos especiais que pudemos compartilhar fora do ambiente de trabalho. Te levo para sempre em meu coração.

Ao técnico de laboratório Eli Heber, pelos anos compartilhados no trabalho, pelo suporte fornecido e pela amizade construída em todos esses anos.

Ao Hemocentro, em especial à Irene Pereira dos Santos, pelo auxílio inicial com as análises de ciclo celular. E ao LaCTAD, em especial a Felipe Franco da Rocha e a Janine Schincariol Sabino, pelas contribuições nas etapas de citometria de fluxo e microscopia confocal. Ao Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC) por disponibilizar o fotodocumentador de quimioluminescência, essencial para a realização do experimento de Western Blotting.

A FAPESP (Processo 2015/10536-2) e ao CNPq (Processo 304668/2014-1) pelos auxílios financeiros imprescindíveis para a realização do presente trabalho.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para que essa pesquisa fosse concluída, por todo suporte, credibilidade e acolhimento quando necessário.

1. Resumo

O ácido valpróico é um ácido graxo de cadeia curta que, associado ao seu sal sódico (VPA), vem sendo utilizado no tratamento de diversos tipos de doenças neurológicas. Sua atuação se estende à modulação epigenética, tendo sido comprovado como inibidor de desacetilases de histonas (HDACi) e como agente modulador do nível de metilação do DNA e de histonas. Uma vez constatado que o VPA poderia afetar a proliferação celular e os mecanismos de morte celular em alguns tipos celulares, seu potencial como agente antitumoral passou a ser investigado. Em células de glioblastoma, tumor cerebral agressivo, ocorre aumento nos níveis de metilação em diversos promotores de seus genes. No presente trabalho buscamos investigar se em células obtidas de glioblastoma humano os efeitos epigenéticos induzidos pelo VPA ao lado de afetarem a inibição de HDAC, a acetilação da histona H3 (H3ac) e a demetilação global do DNA, afetariam a estrutura da cromatina por estarem associados à acetilação de histonas ou à demetilação do DNA ou a ambas. Células U-251MG sincronizadas na fase G1 do ciclo celular com 10 μ M de lovastatina foram cultivadas na presença de VPA 1 mM e 10 mM por 4 e 24 h, e de 5-aza-CdR 5 μ M por 28 h (controle de demetilação de DNA). Para o estudo das características estruturais da cromatina nessas condições experimentais, as células foram submetidas à reação de Feulgen seguindo-se análise de imagem por sistema vídeo em microscópio Axiophot 2 equipado com câmera AxioCam HRc e software Kontron KS-400-3. Foram também avaliadas a atividade de HDAC com kit específico, o nível de H3ac por Western Blotting e de 5-metilcitosina (5mC) no DNA por ELISA e imunofluorescência. Detectou-se diminuição na atividade de HDAC e aumento nos níveis de H3ac com o tratamento pelo VPA, porém não com 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR). Os níveis globais de 5mC diminuíram com os tratamentos por VPA e 5-aza-CdR. A análise de imagem revelou diminuída variabilidade no grau de empacotamento da cromatina e decréscimo na entropia nuclear, definida como o número de bits necessários para o armazenamento dos valores de absorbância por imagem nuclear, nas células U-251MG tratadas por 24 h com VPA (especialmente na concentração mais elevada), porém não nas células tratadas com 5-aza-CdR. Com base nos presentes achados sugere-se que a descompactação da cromatina nas células U-251MG por ação do VPA, o que favoreceria a sua expressão gênica, estaria mais envolvida com a acetilação de histonas do que propriamente com a demetilação do DNA.

Palavras-chave: glioblastoma, U-251MG, valproato, epigenética, remodelação cromatínica.

2. Abstract

Valproic acid is a short-chain fatty acid that, associated with its sodium salt (VPA), has been used in the treatment of several types of neurological diseases. Its performance extends to epigenetic modulation, having been proven as a histone deacetylases inhibitor (HDACi) and as a modulating agent of the level of DNA and histone methylation. Once it was established that VPA could affect cell proliferation and cell death mechanisms in some cell types, its potential as an antitumor agent began to be investigated. In glioblastoma cells, an aggressive brain tumor, there is an increase in methylation levels in several gene promoters. In the present work, we sought to investigate whether in cells obtained from human glioblastoma, the epigenetic effects induced by VPA in addition to affecting HDAC inhibition, acetylation of histone H3 (H3ac) and global DNA demethylation, would affect the chromatin structure because they are associated with histone acetylation or DNA demethylation or even both. U-251MG cells synchronized in the G1 phase of the cell cycle with 10 μ M of lovastatin were treated in the presence of 1 mM and 10 mM VPA for 4 and 24 h, and 5 μ M 5-aza-CdR for 28 h (a drug used as a DNA demethylation control). In order to study the structural characteristics of chromatin under these experimental conditions, the cells were subjected to the Feulgen reaction followed by image analysis with a video system using an Axiophot 2 microscope equipped with an AxioCam HRC camera and Kontron KS-400-3 software. The activity of HDAC with a specific kit, the level of H3ac by Western Blotting and 5-methylcytosine (5mC) in DNA by ELISA and immunofluorescence were also evaluated. A decrease in HDAC activity and an increase in H3ac levels were detected with VPA treatment, but not with 5-aza-2'-desoxycytidine (5-aza-CdR). Overall, 5mC levels decreased with VPA and 5-aza-CdR treatments. Image analysis revealed decreased variability in the degree of chromatin packing and a decrease in nuclear entropy, defined as the number of bits needed to store absorbance values per nuclear image, in U-251MG cells treated for 24 h with VPA (especially at the highest concentration), but not in cells treated with 5-aza-CdR. Based on the present findings, it is suggested that chromatin decondensation in U-251MG cells by the action of VPA, which would favor their gene expression, would be more involved with histone acetylation than with DNA demethylation.

Keywords: glioblastoma, U-251MG, valproate, epigenetic, chromatin remodeling.

3. Lista de Abreviaturas

2-HG - 2-hidroxiglutarato

5-aza-CdR - 5-aza-2'-deoxicitidina

5mC - 5-metilcitosina

aCGH - hibridização genômica comparativa de alta resolução

CpG - citosina-fosfato-guanina

CH₃ - grupo metil

DMEM – meio Eagle Modificado por Dulbecco

DMSO - dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

DNMT - DNA metiltransferases

ECACC - European Collection of Authenticated Cell Cultures

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FDA - Food and Drug Administration

GABA - ácido gama-aminobutírico

GBM - glioblastoma multiforme

HAT - histona acetiltransferases

HDAC - deacetilase de histona

HDACi - inibidor de deacetilase de histona

HMT - histona metiltransferase

HRP - anticorpo secundário conjugado com peroxidase

IDH1 - isocitrato desidrogenase 1

IOD - densidade óptica integrada

LaCTAD - Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida

LOV - lovastatina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

OD - densidade óptica

OMS - organização mundial da saúde

PBS - solução tampão fosfato

PI - iodeto de propídio

RNA - ácido ribonucléico

ROS - espécie reativa de oxigênio

SAM - S-adenosil metionina

SDtd - desvio padrão dos valores densitométricos totais

SFB - soro fetal bovino

SNC - sistema nervoso central

TET - ten-eleven-translocation

VPA - ácido valpróico

4. Sumário

5. Introdução	14
5.1. Cromatina e Epigenética	14
5.11 Metilação do DNA.....	15
5.12 Modificações em histonas	15
5.2. Glioblastoma.....	16
5.3. Células U-251MG como modelo de estudo de GBM	17
5.4. Modulação epigenética através de drogas.....	18
6. Objetivos	20
7. Materiais e Métodos	21
7. 1. Linhagem celular e condições de crescimento.....	21
7. 2. Sincronização do ciclo celular	21
7. 3. Tratamento com VPA e 5-aza-CdR.....	22
7.4. Viabilidade e citotoxicidade celular.....	22
7. 5. Atividade de HDACs.....	23
7. 6. Western Blotting	23
7.7. Imunofluorescência e ELISA	24
7.8. Fixação celular e citoquímica	25
7.9. Análise de imagem	26
7.10. Análises estatísticas	27
8. Resultados	28
8.1. Sensibilidade das células U-251MG aos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR	28
8.2. Sincronização do ciclo celular por citometria de fluxo e ensaio de viabilidade celular das células à lovastatina	29
8.3. Atividade de HDACs e acetilação de histona H3	32
8.4. Níveis de 5mC no DNA de células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR	33
8.5. Efeito do VPA e da 5-aza-CdR sobre a supraorganização da cromatina de células U-251MG interfásicas.....	35
9. Discussão.....	45
10. Conclusões	49
11. Referências Bibliográficas	50
12. Anexos.....	62

5. Introdução

5.1. Cromatina e Epigenética

Em todas as células eucarióticas o DNA integra uma estrutura complexa que é a cromatina, da qual também fazem parte histonas, proteínas não histônicas e RNA. A unidade básica da cromatina é formada por estruturas denominadas nucleossomos, que são compostos por em torno de 200 pares de bases (pb) de DNA, variando conforme o tipo celular considerado, e um octâmero das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (duas de cada). Como parte dos nucleossomos, 145-147 pb de DNA envolvem o octâmero de histonas, dando ao redor deste uma volta e $\frac{3}{4}$ volta, o que constitui o nucleóide (“core”) nucleossômico. Os demais pb do DNA que fazem parte do nucleossomo, compõem espaçadores que permitem a ligação entre as unidades básicas da cromatina. Nessas regiões se associa a histona H1, e o conjunto nucleossomo-histona H1 constitui o cromatossomo (Dombrowski et al. 2022, Draizen et al. 2016). A histona H1, além de promover a compactação do filamento da cromatina em seu nível hierárquico subsequente, possui uma organização essencial para seu desempenho fisiológico, nos eventos de transcrição gênica, replicação, reparo e recombinação do DNA. Em relação à estrutura da cromatina nos núcleos de células interfásicas, ela pode ser dividida em duas regiões principais: a heterocromatina constitutiva ou facultativa, altamente condensada, refletindo uma região gênica menos ativa, com difícil acesso a maquinaria de transcrição, ou não codificadora, e a eucromatina, menos condensada e potencialmente ativa transcricionalmente (Mello & Vidal 1978, Grewall & Moazed 2003, Dawson & Kouzarides 2012, Alberts et al. 2015).

Tanto o DNA quanto a estrutura da cromatina podem sofrer modificações reversíveis em resposta a estímulos externos, independentes de mudanças na sequência de bases do DNA, as quais podem ser mesmo herdadas após várias divisões celulares. Este é o conceito que constitui a base da Epigenética, termo cunhado primeiramente por Waddington em 1939 (Waddington 1942). Os eventos epigenéticos regulam diversos processos biológicos, incluindo transcrição gênica, diferenciação celular, reparo do DNA e controle do ciclo celular (Herseg & Vaissière 2011, Miranda Furtado et al. 2019). Estudos demonstram que o desenvolvimento de doenças, como o câncer, está associado principalmente à desregulação dos mecanismos epigenéticos, sendo a metilação do DNA, modificações em histonas e atuação de RNA de interferência as principais modificações, e uma importante ferramenta de estudo para o entendimento dos processos celulares envolvidos na tumorigênese, contribuindo para novas e mais eficazes abordagens terapêuticas (Jones & Bayling 2002, Feinberg & Tycko 2004).

5.11 Metilação do DNA

Considerada uma das principais modificações epigenéticas, a metilação do DNA é fundamental na organização cromatínica e consequentemente no controle da expressão gênica. A adição do grupo metil ($-\text{CH}_3$) é mediada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que catalisam a transferência do $-\text{CH}_3$ da S-adenosil metionina (SAM) ao carbono 5 dos resíduos de citosina presentes em uma sequência de dinucleotídeos CpG, formando a 5-metilcitosina (5mC) (Holliday & Pugh 1975, Zhang et al. 2020). Essa metilação ocorre durante a replicação e, embora bastante estável, está sujeita a mudanças dinâmicas, principalmente durante o ciclo celular (Brown et al. 2007, Desjobert et al. 2015, Vandiver et al. 2015). É reversível e o processo de demetilação ocorre de forma ativa, através de enzimas demetilases da família das TETs (*ten-eleven translocation*), ou de forma passiva através da inibição de DNMTs durante a replicação do DNA. Ambas as vias são responsáveis pela redução global dos níveis de 5mC e não ocorrem exclusivamente de maneira independente, podendo ocorrer interação entre elas (Wu & Zhang 2011, Kholi & Zhang 2013, Pastor et al. 2013).

5.12 Modificações em histonas

As histonas são proteínas classificadas em cinco grupos, com base em seu teor de lisina e arginina, sendo a H1 muito rica em lisina, H2A e H2B moderadamente ricas em lisina, e H3 e H4 ricas em arginina. Suas caudas N-terminais se projetam para o exterior da estrutura do nucleossomo e formam locais ideais para modificações covalentes, principalmente acetilações, metilações e fosforilações, que podem levar à remodelação cromatínica e modulação da expressão gênica (Alberts et al. 2015).

A acetilação e a deacetilação nas histonas são caracterizadas, respectivamente, pela inserção ou remoção de um grupo acetil especialmente em resíduos de lisina e são catalisadas pelas enzimas histona acetiltransferases (HATs) e histona deacetilases (HDACs), respectivamente. São essenciais para a regulação da expressão gênica e, de maneira geral, regiões hiperacetiladas estão associadas a uma maior atividade transcricional, ao passo que a hipacetilação leva a uma menor atividade. A metilação de histonas, que ocorre nos resíduos de lisina e é catalisada pela enzima histona metiltransferase (HMT), pode adicionar até 3 grupos $-\text{CH}_3$ em cada resíduo tendo como doadora a SAM. A fosforilação das histonas, por sua vez, ocorre pela adição de grupos fosfato em seus resíduos de serina, treonina e tirosina, e é umas das modificações pós-traducionais mais comuns (Cohen 1989). Os principais e mais bem estudados sítios de modificações do tipo acetilação ou metilação ocorrem nos resíduos de lisina

4, 9, 14, 18, 23, 27 e 36 da histona H3, e 5, 8, 12, 16 e 20 da H4 (Thorne et al. 1990, Strahl & Allis 2000, Lawrence et al. 2015, Zhang et al. 2021). Diversas modificações em histonas já foram descritas, e alterações no seu padrão têm sido relacionadas à ocorrência de diversas doenças, como o câncer, impactando no prognóstico e agressividade de cada tipo tumoral (Shanmugam et al. 2018, Elsheikh et al. 2019).

5.2. Glioblastoma

O glioblastoma, conhecido como glioblastoma multiforme (GBM), devido à sua heterogeneidade no formato e tamanho celular, é o tumor primário maligno mais comum do sistema nervoso central (SNC), representando cerca de 80% dos casos. Acomete principalmente homens e sua incidência aumenta de acordo com a idade. Estima-se que sejam diagnosticados mundialmente cerca de 3 casos a cada 100.000 pessoas por ano. É uma doença considerada incurável e com prognóstico baixo devido principalmente a sua grande resistência terapêutica (Xie et al. 2015), sendo a taxa de sobrevivência em 5 anos de aproximadamente 4-5% dos casos, em pacientes com mais de 55 anos de idade, e de 26 a 33% em 2 anos (Omuro & deAngelis 2013, Witthayanuwat et al. 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou, em 2016, o GBM como uma neoplasia de grau 4 com alta taxa de diferenciação astrocítica, atipias nucleares, alta taxa de angiogênese e necrose e, com isso, alta demanda de nutrientes e de oxigênio (Komori 2017). Embora de início os tumores de SNC fossem diagnosticados baseando-se em características histológicas (Baily & Cushing 1927), recentes descobertas demonstraram que alterações genéticas e epigenéticas são importantes eventos na determinação das características fenotípicas, prognóstico e estratégias terapêuticas desses tumores.

Além de disfunções metabólicas, células de GBM apresentam alterações epigenéticas importantes, e a combinação desses dois fatores é um ponto crítico na origem, agressividade e resposta terapêutica desse tipo de tumor. Em 1956, Otto Warburg deu nome ao termo “efeito Warburg”, também chamado de glicólise aeróbica, ao revelar que as células cancerígenas metabolizavam glicose através da fermentação, mesmo em ambientes ricos em oxigênio, através de transportadores de glicose GLUT1-4 e grupos de enzimas glicolíticas, como a classe das HKs, GAPDH, GLAM, ENO1, PKM2 e LDHA. O padrão de metilação dos genes codificadores dessas enzimas estão alterados no GBM. Enquanto o intron 1 dos genes glicolíticos PKM2 e HK2 frequentemente esteja hipometilado, as regiões promotoras dos genes GLAM, ENO1, GAPDH, HK3 e LDHA encontram-se hipermetiladas em GBM que possuem

mutação no gene codificador da enzima isocitrato desidrogenase 1 (IDH1), a qual catalisa a descarboxilação do isocitrato em alfa-cetoglutarato durante o ciclo de Krebs, demonstrando pois a estreita relação entre a glicólise e o perfil epigenético deste tipo de tumor (de Almeida Sassi et al. 2012, Venneti & Thompson 2012, Chen et al. 2017, Dong & Cui 2019). Modificações em histonas também são frequentes em células de GBM. Mutações com ganho de função no gene IDH1 causam aumento nos níveis do onco-metabólito 2-hidroxiglutarato (2-HG) e levam à interrupção da metilação dos resíduos de lisina K27 e K36 da histona H3. Além disso, mutações no gene H3F3A, que codifica a histona variante H3.3, também estão associadas a um padrão de metilação distinto que leva à desregulação da expressão gênica em células de GBM (Sturm et al. 2012, Bender et al. 2013).

5.3. Células U-251MG como modelo de estudo de GBM

Nas últimas décadas, muitos modelos celulares provenientes de GBM foram descritos e vêm sendo utilizados a fim de mimetizar o ambiente natural deste tipo de tumor e fornecer mais informações sobre sua origem, agressividade e progressão, na tentativa de se obter novas possibilidades terapêuticas. A escolha de um modelo celular deve levar em consideração mecanismos genéticos e celulares envolvidos no GBM. Jacobs e colegas, em 2011, descreveram alguns dos modelos mais utilizados nos estudos envolvendo esse tipo de tumor.

A linhagem celular de glioma maligno U-251MG foi estabelecida há quase 50 anos em um laboratório na Upsalla, Suécia, a partir do tumor de um homem de 75 anos (Westermarck et al. 1973, Ponten & Westermarck 1975). Esta linhagem possui características histológicas, imuno-histoquímicas e genéticas que mais se assemelham ao GBM humano (Jacobs et al. 2011). A partir de resultados de hibridização genômica comparativa de alta resolução (aCGH), técnica importante que identifica os perfis genéticos mais comuns nos diferentes tipos de câncer, subclones de U-251 foram caracterizados e revelaram um acúmulo de alterações genéticas, amplificações e deleções gênicas, além de diferenças na ploidia de cada um, em comparação à linhagem original U-251MG coletada de células congeladas em Uppsala em 1969, com número médio de 66 cromossomos. Deste modo, cada subclone possui características fenotípicas distintas (morfologia e expressão de marcadores de superfície celular, taxa de crescimento alterada) e, conseqüentemente, respostas adversas a agentes terapêuticos. Essas alterações genéticas se acumulam durante uma cultura prolongada, e subculturas de longo prazo perdem parte da assinatura genética típica de GBM, mostrando a

relevância de se utilizar linhagens celulares bem estabelecidas e com baixo número de subculturas (Torsvik et al. 2014).

5.4. Modulação epigenética através de drogas

Por serem reversíveis e exercerem um papel importante na modulação da expressão genica através da remodelação cromatinica, as alterações epigenéticas tem sido alvo de intensos estudos envolvendo o uso de compostos químicos, conhecidos como epidrogas, e que atuam principalmente inibindo a ação das DNMTs e HDACs, enzimas necessárias para a manutenção e estabelecimento de modificações epigenéticas, sendo consideradas estratégias terapêuticas importantes no combate a inúmeras doenças (Rodríguez-Paredes & Esteller 2011).

O ácido valpróico (VPA), ou ácido 2-n-propilpentanoico, é um composto aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e já estabelecido no tratamento de crises epiléticas, transtornos bipolares e enxaqueca (Lagace et al. 2004, Frazee & Foraker 2008, Silva et al. 2008). Sintetizado por Burton em 1882, consiste em um ácido graxo ramificado de cadeia curta de apenas oito carbonos (Burton 1882) (Figura 1A), e age inibindo o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e bloqueando canais de sódio e de cálcio do tipo T (Perrucci 2002, Chateauvieux et al. 2020). Em 1997, Cinatl e colegas descreveram os efeitos do VPA contra células tumorais, como inibidor de HDACs (HDACi), favorecendo a acetilação das histonas H3 e H4 e, consequentemente, afetando a transcrição gênica através da remodelação cromatinica (Kramer et al. 2003, Sami et al. 2008). Estudos relatam que concentrações terapêuticas de VPA (0,3 – 0,7 mM) induzem parada do ciclo celular, diferenciação celular, e morte celular em vários tipos de células tumorais, incluindo glioblastomas (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Yagi et al. 2010, Ryu et al. 2012, Han et al. 2013, Riva et al. 2014, Zhou et al. 2014, Sanaei & Kavoosi 2022), além de induzir acetilação da histona H4 (Das et al. 2007). Esta epidroga também está envolvida no processo de demetilação do DNA e de histonas, causando remodelação cromatinica e, consequentemente, alterando a expressão gênica em diversos outros tipos celulares (Detich et al. 2003, Milutinovic et al. 2007, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, Mello 2021, Rocha et al. 2023). Diversas linhagens celulares de glioblastomas demonstraram alteração no padrão de metilação de diversos genes após o tratamento com VPA, muitos dos quais passando de um estado metilado para um demetilado (Riva et al. 2016).

Outra epidroga bastante conhecida e também aprovada pela FDA é a 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR) (Figura 1B), sintetizada primeiramente por Sorm e colegas (1964).

É um agente clássico de demetilação do DNA, que atua através da sua ligação a DNMT1 na via ativa do processo de metilação durante a replicação, causando perda da atividade catalítica desta enzima (Ghoshal et al. 2005), mas também de forma passiva, independente da replicação, através das proteínas TETs, causando alterações significativas nos níveis dos intermediários de 5mC (Sajadian et al. 2015, Manzoni 2016, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019). Esta droga está envolvida na reativação de genes supressores de tumores, reguladores de ciclo celular e naqueles envolvidos no reparo do DNA, muitos dos quais estão silenciados pela metilação em regiões promotoras, sendo uma alternativa terapêutica no tratamento de muitos tipos de tumores (Liu et al. 2001, Yan et al. 2005, Datta et al. 2009, Christman 2012, Chu et al. 2012, Kim et al. 2016).

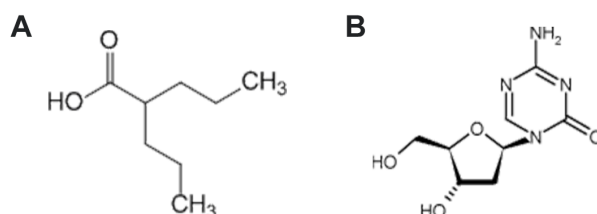


Figura 01. Fórmulas estruturais do VPA (A) e da 5-aza-CdR (B).

Apesar do conhecimento acima relatado, estudos adicionais são ainda necessários para compreender melhor a atuação destas drogas, sob diferentes concentrações, nos padrões epigenéticos de diferentes modelos, fornecendo uma base mais sólida sobre seus efeitos na organização cromatínica, e para atingir melhor compreensão sobre o potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças.

6. Objetivos

- 1 – Comprovar a ação do VPA em diferentes concentrações e por diferentes tempos de tratamento sobre as HDACs e a acetilação da histona H3 na linhagem celular de glioblastoma humano U-251MG.
- 2 - Avaliar o efeito do VPA sobre a metilação global de DNA que se encontra aumentada nas células U-251MG, tendo como controle positivo deste processo a 5-aza-CdR.
- 3 – Avaliar se em associação aos efeitos sobre marcas epigenéticas induzidos pelo VPA em células U-251MG ocorreria remodelação da cromatina de núcleos interfásicos avaliada por análise de imagem.

7. Materiais e Métodos

7. 1. Linhagem celular e condições de crescimento

Células da linhagem glioblastoma astrocitoma humano U-251MG foram adquiridas da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) (ECACC 09063001) e cultivadas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Nutrilab, Campinas, Brasil), e penicilina-estreptomicina a 1% (Sigma-Aldrich®, 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente), e mantidas a 37°C com 5% de CO₂ em atmosfera úmida.

7. 2. Sincronização do ciclo celular

O tempo de cultivo em lovastatina (Sigma®), droga utilizada para a sincronização do ciclo celular, e de sua concentração ideal para promover a parada de 70% ou mais das células U-251MG na fase G1 foram determinados após ensaios realizados a partir de adaptações dos protocolos propostos por Keyomarsi (1996), Jackman & O'Connor (1998), Chan et al. (2008), Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi (2008), Ma & Poon (2011) e Lee et al. (2018), realizados em diversos tipos celulares. Foi monitorado através da citometria de fluxo, onde observou-se que a porcentagem de células sincronizadas não aumentava proporcionalmente conforme aumentava-se tanto a concentração da droga quanto o tempo de exposição das células a ela, optando-se então pela menor concentração testada, 10 µM, por 28 h. Este tempo foi definido com base em ensaios preliminares que apontam um tempo médio de duplicação desta linhagem celular de 27,8 h (Lee et al. 2015).

As células U-251MG cultivadas em placas de 6 poços na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/mL por 24 h foram tratadas com lovastatina nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM e incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24, 28 e 48 h. Após, o meio foi aspirado e lavaram-se as células duas vezes com solução tampão fosfato (PBS), fixando-as durante 30 min em etanol 70% a -20°C. Após repetidas lavagens com PBS, utilizou-se 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (Sigma®) diluído em solução de Vindel (1 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM de NaCl, 0.1% de Triton X-100 e 10 µg/ml de RNase A) por 30 min a 37°C. O perfil do ciclo celular e conteúdo de DNA foi então avaliado através da técnica de citometria de fluxo, conforme proposto por Bártová et al. (2005), e realizado com o uso de um citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences®, San José, Califórnia) equipado com o software BD FACS Diva™ no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida

(LaCTAD) da Universidade Estadual de Campinas (Campinas, Brasil). A análise do ciclo celular foi feita através do software ModFit LTTM disponibilizado pelo Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro), da Universidade Estadual de Campinas.

7.3. Tratamento com VPA e 5-aza-CdR

Células U-251MG nas passagens de 14 a 28, sincronizadas previamente na fase G1 do ciclo celular, foram tratadas com valproato de sódio (VPA) (Sigma®) na concentração de 1 e 10 mM por 4 e 24 h. Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-CdR) (Sigma®), na concentração de 5 μ M por 28 h, foi utilizado como controle positivo de demetilação de DNA. Todas essas condições foram comparadas a controles cultivados na ausência da droga.

7.4. Viabilidade e citotoxicidade celular

A avaliação de citotoxicidade induzida por cada tratamento foi realizada com testes de exclusão de MTT e azul de Tripán a partir de adaptações dos protocolos de Mosmann (1983), Denizot & Lang (1986) e Strober (2015). O teste MTT é um ensaio colorimétrico largamente usado em estudos de citotoxicidade para avaliar a sobrevivência celular em presença dos agentes testados. Consiste na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) pela enzima desidrogenase mitocondrial, levando à formação do produto azul formazan, cuja concentração é proporcional ao número de células vivas presentes na amostra. Já o ensaio com azul de Tripán é uma técnica que utiliza a exclusão do corante em células viáveis, ou seja, em células cuja membrana plasmática está íntegra, em comparação a células não viáveis, que ao perder a integridade da membrana não conseguem excluir o corante de seu interior e, portanto, são visualizadas ao microscópio de luz com coloração azul. Para o ensaio com MTT (Sigma®), as células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 células/mL em meio completo por 24 h. Após esse período, receberam seus devidos tratamentos, sendo eles controles na ausência da droga por 4, 24 e 28 h; VPA 1, 10 e 20 mM por 4 e 24 h, e 5-aza-CdR 5 μ M por 28 h, além de lovastatina nas concentrações de 10, 20, 30 e 40 μ M por 28 e 48 h. Na sequência, os tratamentos foram interrompidos por inversão da placa e foram adicionados 100 μ L de solução de MTT diluída em PBS em meio DMEM sem vermelho de fenol (Sigma®) com concentração final de 0,5 mg/mL. A placa foi então novamente incubada por 3 h a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente, o MTT foi cuidadosamente removido e foram adicionados em cada poço 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma®). A placa foi agitada vagarosamente por 10 min a fim de garantir a

solubilização do azul de formazan. Por fim, realizou-se a leitura de absorbância de cada poço utilizando-se o espectrofotômetro MultiSkan Go (Thermo Fisher Scientific®, Helsinki, Finlândia), no comprimento de onda teste de 560 nm e no de referência de 690 nm (Rocha et al. 2021). A utilização da leitura de um comprimento de onda de referência (690 nm) é de grande importância, pois segundo Denizot & Lang (1986) quando este é subtraído da leitura da densidade óptica em 560 nm, ocorre a correção de artefatos como arranhões no fundo dos poços, uma vez que o formazan não é absorvido em 690 nm.

Para o ensaio com azul de Tripán, as células foram cultivadas em placas de 6 poços na concentração de 1×10^5 células/mL em meio completo por 24 h. Após esse período, elas receberam seus devidos tratamentos, sendo eles controles na ausência da droga por 4, 24 e 28 h; VPA 1, 10 e 20 mM por 4 e 24 h, e 5-aza-CdR 5 μ M por 28 h. Na sequência, os tratamentos foram interrompidos, as células foram lavadas com PBS e, em cada poço, adicionou-se 500 μ L de solução de tripsina-EDTA (Nutrilab®, Campinas, Brasil) de modo a proporcionar a desagregação celular. Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio DMEM completo e realizada a contagem de células viáveis e não viáveis após a coloração com o azul de Tripán 0,4% em PBS (Sigma®), utilizando-se um hemocitômetro convencional.

7. 5. Atividade de HDACs

Para a análise da atividade das HDACs, foi utilizado o kit de Ensaio HDAC (Sigma®), seguindo-se as recomendações do fabricante. Extratos de células U-251MG sincronizadas em G1 e tratadas com VPA foram incubados em placas de 96 poços com o substrato da reação (peptídeo com resíduo de lisina acetilada ligado a um grupo fluorescente) por 30 min, seguida da adição do revelador que promove a quebra do substrato deacetilado pelas HDACs presentes nas amostras e consequente liberação do grupo fluorescente. A fluorescência é diretamente proporcional à atividade de deacetilação e foi medida utilizando-se o espectrofotômetro MultiSkan Go (Thermo Fisher Scientific®), no comprimento de onda teste de 360 nm e no de referência de 460 nm.

7. 6. Western Blotting

Este procedimento foi utilizado para detecção do grau de acetilação da histona H3. Após cultivo celular, sincronização e tratamento com VPA, proteínas totais foram extraídas dos preparados usando o tampão RIPA (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 150 mM de NaCl; 1% de Triton X-100; 0,5% de deoxicolato de sódio; 0,1% de SDS; 1 mM de EDTA; 0,5 mM de EGTA

e 1 mM de PMSF) por pelo menos 30 min em gelo. A quantificação de proteínas de cada amostra foi feita utilizando-se o reagente de Bradford (Sigma®) conforme instruções do fabricante. 40 µg de proteína de cada preparado foram incubadas em tampão de amostra (0,06 M de Tris-HCl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de β-mercaptoetanol, 0,025% de azul de bromofenol) por 5 min a 95°C para promover a desnaturação das proteínas e para que fossem submetidas à eletroforese vertical em SDS-PAGE com amperagem constante de 36 mA. Ao final deste procedimento realizou-se a transferência do gel de poliacrilamida a 17% para uma membrana de nitrocelulose (Applied Biosystem®, Waltham, Massachusetts) em amperagem fixa de 250 mA por 90 min. A membrana foi então incubada com a solução bloqueio de BSA a 5% em tampão TBST (0,01 M de Tris-HCl pH 8, 0,15 M de NaCl, 1% de Triton-X) por 2 h e, depois, com o anticorpo anti-H3 acetil (Millipore®, Billerica, USA) a 0,1 µg/µL em BSA 3% *overnight* a 4°C. Por fim, após remoção do tampão contendo anticorpo primário e lavagens com TBST, a membrana foi novamente incubada por 2 h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, HRP (Millipore®, Billerica, USA). A revelação por quimioluminescência foi realizada com o kit *ECL Detection Reagents* (Amersham®, Pittsburgh, USA), de acordo com protocolo do fabricante, e detectada através do fotodocumentador Alliance 6,7 (UVITEC®, Cambridge, UK) no Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades (OCRC), da Universidade Estadual de Campinas. A mesma membrana foi posteriormente incubada com anticorpo anti-H4 (Abcam®, Cambridge, USA), atuando como um controle endógeno e de normalização de modo a garantir que as diversas marcações do anticorpo de interesse não acontecessem por conta de possíveis diferenças de concentração de proteínas entre as amostras. A análise dos resultados obtidos foi realizada através do software ImageJ (NIH®, Bethesda, USA).

7.7. Imunofluorescência e ELISA

O nível global nuclear de 5mC foi avaliado com ensaios de imunofluorescência e por ELISA. Para o ensaio de imunofluorescência, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro, na concentração de 1×10^4 células/mL em DMEM suplementado por 24 h. Após sincronização e tratamento com VPA e 5-aza-CdR, as células aderidas às lamínulas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min a -20 °C, lavadas em PBS e submetidas à hidrólise por 1 h em solução de HCl 2 M a 37°C, lavagens com solução tampão borato (ácido bórico 100 mM, NaCl 75 mM e tetraborato de sódio 25 mM, pH 8,5), e bloqueio com 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS por 30

minutos. Foram então incubadas com anticorpo primário anti-5mC de camundongo (Sigma®, diluição 1:100) em solução de bloqueio *overnight* a 4°C no escuro, seguido por várias lavagens em PBS, incubação por mais 1 h no escuro com anticorpo secundário anti-mouse conjugado ao Alexa-Fluor 647 (Life Technologies®, Carlsbad, Califórnia, diluição 1: 250), e lavagens com PBS. Após a completa secagem dos preparados, foram eles montados com o meio específico para imunofluorescência Vectashield (Vector Laboratories®, Burlingame, California, USA) e analisadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 II (Wetzlar®, Alemanha), no LaCTAD. As imagens foram capturadas para cada condição com parâmetros idênticos e analisadas posteriormente utilizando-se o software ImageJ (NIH®, Bethesda, EUA).

Para a quantificação de 5mC por ELISA, as células foram cultivadas em placas de 6 poços, na concentração de 1×10^5 células/mL por 24 h. Após sincronização e tratamento com as drogas, DNA genômico das amostras foi extraído usando-se o kit QIAamp DNA mini (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e quantificado, usando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®, Carlsbad, EUA), observando-se se a proporção nos comprimentos de ondas 260/280 nm era no mínimo 1,8 para cada amostra, o que é um indicativo de pureza da amostra. Por fim, 100 ng do DNA extraído de cada amostra foi utilizado no kit de ELISA para a quantificação de 5mC (Zymo®, Irvine, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

7.8. Fixação celular e citoquímica

As células sincronizadas em G1, destinadas à análise de imagem, foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro a uma concentração de 1×10^4 células/mL em meio completo durante 24 h, seguindo-se de tratamento com VPA a 1 mM e 10 mM, dissolvido em PBS e pré-preparado em DMEM suplementado com 1% de SFB. Tanto as células em tratamento quando os controles na ausência da droga foram cultivadas por 4 e 24 h. Células tratadas com 5 μ M de 5-aza-CdR por 28 h, usando o mesmo tempo para o controle, foram utilizadas como um controle positivo de demetilação do DNA. Após os respectivos tempos de tratamento, as células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas em mistura de etanol absoluto-ácido acético glacial (3:1, v/v) durante 1 min, lavadas três vezes em etanol a 70% e secadas à temperatura ambiente. As preparações foram submetidas à reação de Feulgen específica para DNA (Mello & Vidal, 2017) utilizando-se hidrólise em HCl 4 M a 25°C por 60 min, seguida por tratamento com reagente de Schiff por 40 min, três banhos de 5 min cada em água sulfurosa e um banho em água destilada e secadas

à temperatura ambiente. Por fim, foram diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo natural do Canadá ($n_D=1,54$).

7.9. Análise de imagem

Imagens de duzentos núcleos corados com Feulgen, escolhidos aleatoriamente para cada condição experimental, foram obtidas em microscópio Axiophot (Carl Zeiss®, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera de vídeo colorida Sony CCD IRIS/RGB Hyper HAD em interface com um computador pessoal, e utilizando-se o software Kontron KS400 (Eching, Munique, Alemanha). Os parâmetros obtidos por esta metodologia foram utilizados para descrever um perfil do estado da cromatina sob todas as condições testadas. As condições de operação utilizadas foram as seguintes: objetiva Neofluar 40/0,75, fator optovar 2, condensador de 0,9 e luz de comprimento de onda igual a 546 nm, obtido com um filtro de interferência Schott. Dois valores limites determinaram qual intervalo de valores de cinza da imagem de entrada é retido ou excluído na saída da imagem. Valores limiares (valores de cinza) chamados Low (L) e High (H) foram determinados movendo-se as bordas no histograma de valores cinza, de modo que as imagens nucleares parecessem bem segmentadas umas das outras e do fundo (Vidal et al. 2006). No presente estudo, os limiares de L e H foram iguais a 0-27 e 110-117, respectivamente. Nas condições operacionais usadas, 1 μm correspondia a 12,4 pixels. O software forneceu informações quantitativas sobre 1) parâmetros geométricos, como área total nuclear (μm^2), área de absorção nuclear (μm^2), perímetro nuclear (μm) e razão Feret nuclear (Feret mínimo/Feret máximo, como uma indicação da forma nuclear); 2) parâmetros densitométricos, como o valor médio de cinza por núcleo (convertido subsequente em absorbâncias ou densidade óptica, OD, e densidade óptica integrada, IOD); e 3) parâmetros texturais, como desvio padrão dos valores densitométricos totais por núcleo ou variabilidade de absorbância por núcleo (SDtd), entropia e energia nuclear. SDtd reflete a variabilidade no grau de empacotamento da cromatina por imagem corada com a reação de Feulgen (Mello et al. 2003, Vidal et al. 2006). A entropia foi definida como o número de bits necessários para armazenar os valores densitométricos por imagem nuclear ou a quantidade de variabilidade dos valores cinza por núcleo (Kontron Elektronik Imaging System 1995, Mello et al. 2009). Como mediu a complexidade de uma imagem (Barba et al. 1988), um alto valor de entropia para núcleos corados com Feulgen pode estar associado a um alto contraste entre cromatina condensada e não condensada, enquanto um valor de baixa entropia é um indicador de uma imagem com graus razoavelmente constantes (imagem mais homogênea) (Oberholzer et al.

1996, Mello et al. 2003, Vidal et al. 2006, Vidal et al. 2014). IOD, neste caso, reflete o conteúdo de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias, e é obtido pelas absorbâncias multiplicadas pela área nuclear total.

7.10. Análises estatísticas

Os cálculos foram realizados usando-se o software Prism 5 (La Jolla®, Califórnia, EUA). A significância estatística considerada em todas as análises foi de $P < 0,05$, sendo calculada por ANOVA e teste t de student quando as amostras apresentaram uma distribuição normal avaliada através do teste de Shapiro-Wilk, e pelo teste Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para avaliar a significância estatística quando as amostras não seguiram uma distribuição normal.

8. Resultados

8.1. Sensibilidade das células U-251MG aos tratamentos com VPA e 5-aza-CdR

Os resultados obtidos com o ensaio MTT não indicaram alteração significativa da viabilidade e citotoxicidade celular para os tratamentos nos quais as células foram cultivadas em presença de VPA 1, 10 ou 20 mM por 4 h, ou de VPA 1 mM por 24 h, bem como em presença de 5-aza-CdR por 28 h (Figura 1). Porém, sob tratamentos mais drásticos e prolongados, como naqueles nos quais as células foram tratadas com VPA 10 e 20 mM por 24 h, observou-se decréscimo na viabilidade celular (Figura 1).

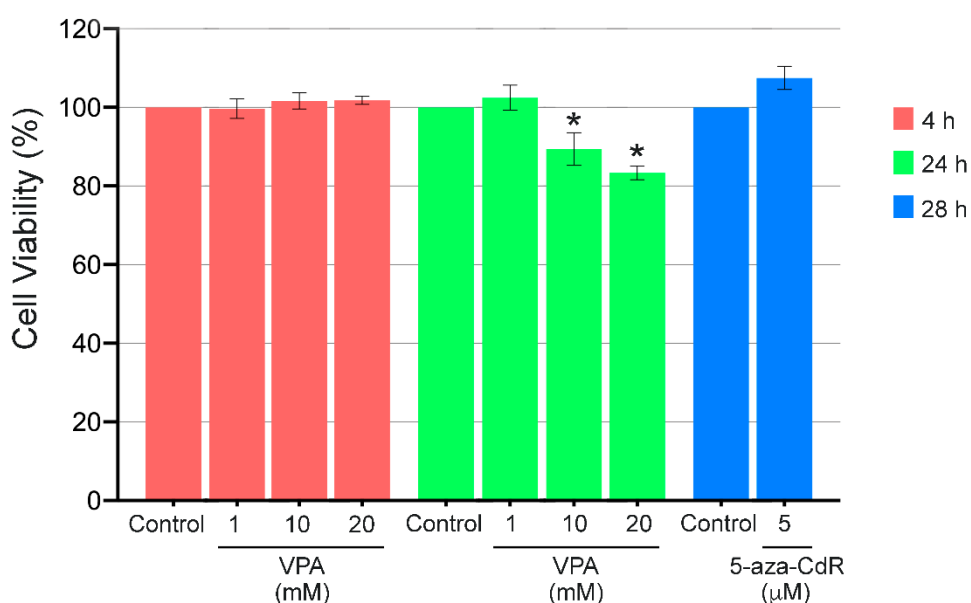


Figura 1. Viabilidade das células U-251MG determinada com ensaio MTT. Os dados representam as médias e erros padrão de experimentos independentes ($n = 12$ cada condição). *Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$.

No ensaio com azul de Tripan, porém, não houve indicação de alteração estatisticamente significativa da viabilidade celular em todas as condições utilizadas (Figura 2).

Para os ensaios subsequentes, optou-se por excluir o uso de VPA na concentração de 20 mM, pela perda da viabilidade celular demonstrada com o teste de MTT.

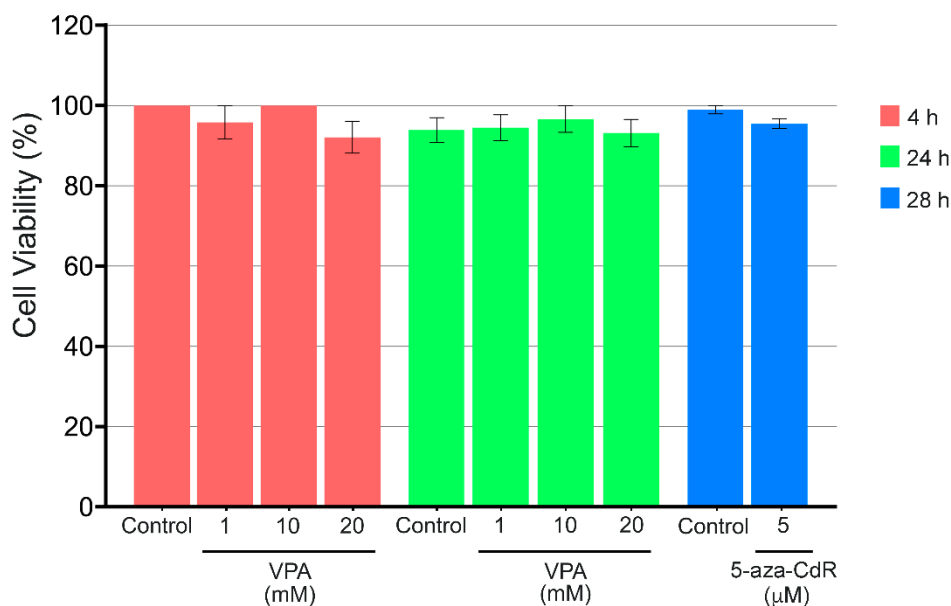


Figura 2. Viabilidade das células U-251 determinada pelo ensaio com o uso do azul de Tripan. O tratamento das células com VPA seguiu um cultivo por 4 e 24 h. Os dados representam as médias e erros padrão de experimentos independentes (n = 3 cada condição).

8.2. Sincronização do ciclo celular por citometria de fluxo e ensaio de viabilidade celular das células à lovastatina

Células tratadas com lovastatina (LOV) exibiram morfologia celular característica, com alterações no tamanho e densidade celular, devido a alterações na expressão de componentes do citoesqueleto, como a F-actina (Kuzma-Kuzniarska et al., 2015) (Figura 3), e foram analisadas por de citometria de fluxo a fim de se averiguar qual concentração e tempo de ação desta droga seriam necessários para a parada de pelo menos 70% das células na fase G0/G1 do ciclo celular, conforme proposto na literatura (Keyomarsi, 1996). Observou-se que após 24 h de tratamento com esta droga, a porcentagem de células sincronizadas não atingia 70%. Ensaio preliminares apontam um tempo médio de duplicação desta linhagem celular de 27,8 h (Lee et al. 2015) e, de fato, após tratamento com LOV por 28 e 48 h houve um aumento significativo na porcentagem de células em G1, em comparação aos respectivos controles, mas não de forma dose-dependente, uma vez que aumentando-se a concentração dessa droga o número de células em G1 não aumentava proporcionalmente (Figura 4A). Após o tratamento das células com lovastatina e análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo (Figuras 4B e 4C) seguiu-se com o ensaio de viabilidade celular para verificar se alguma dessas concentrações teria efeito citotóxico. Os resultados mostraram que a droga alterou significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 20, 30 e 40 μM por 28 h, assim como quando as células foram tratadas por um tempo maior em todas as concentrações analisadas (Figura 5). Foi então

definido o tratamento com LOV na concentração de 10 μ M por 28 h para a sincronização das células U-251MG na fase G1 do ciclo celular. Estes resultados corroboram relatos prévios publicados para diversos outros tipos celulares (Jackman & O'Connor, 1998, Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi, 2008).

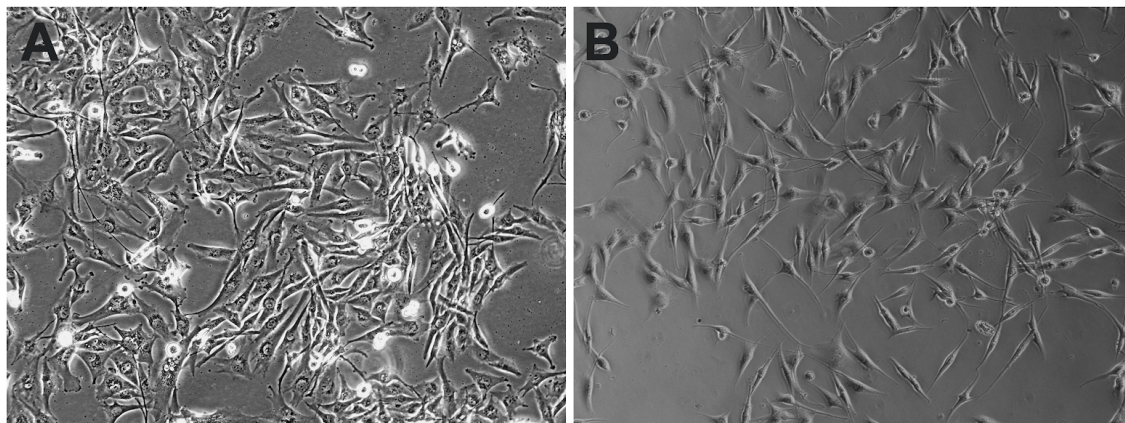


Figura 3: Imagens de células U-251MG adquiridas em contraste de fase. (A) representa células na ausência da lovastatina e (B) representa células tratadas com 10 μ M da droga por 28 h.

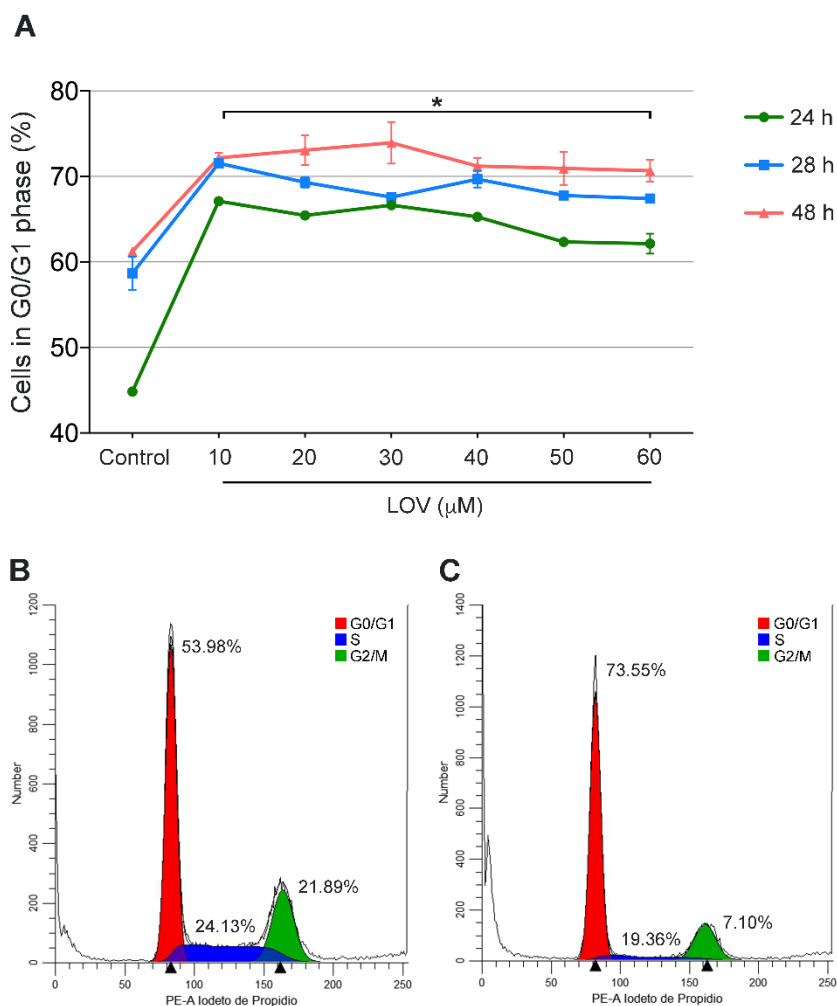


Figura 4: Sincronização das células U-251MG por lovastatina avaliada por citometria de fluxo. (A) representa a porcentagem de células na fase G0/G1 em diferentes tempos de exposição à droga (24, 28 e 48 h), em seis concentrações crescentes, em comparação aos respectivos controles. (B) e (C) representam o perfil do ciclo celular em células controle e em células tratadas com 10 µM de LOV por 28 h, respectivamente.

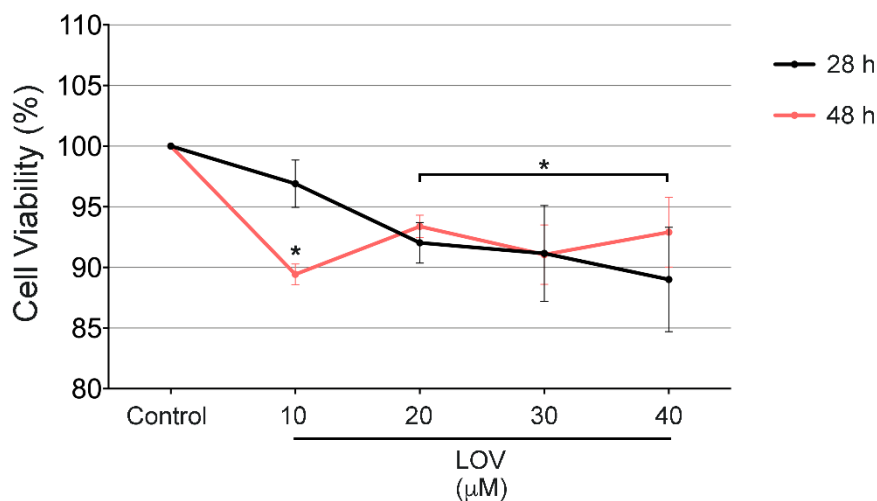


Figura 5. Viabilidade das células U-251MG determinada com ensaio MTT. Os dados representam as médias e erros padrão de experimentos independentes. (n = 15 cada condição)
*Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$.

8.3. Atividade de HDACs e acetilação de histona H3

O ensaio enzimático para atividade de HDACs revelou diminuição estatisticamente significativa na atividade dessas enzimas após tratamento com VPA 1 e 10 mM por 4 h. Embora o tratamento por 24 h não tenha revelado alteração significativa em termos estatísticos, há uma tendência a decréscimo nessa atividade. Não houve alteração na atividade enzimática quando as células foram tratadas com 5-aza-CdR (Figura 6).

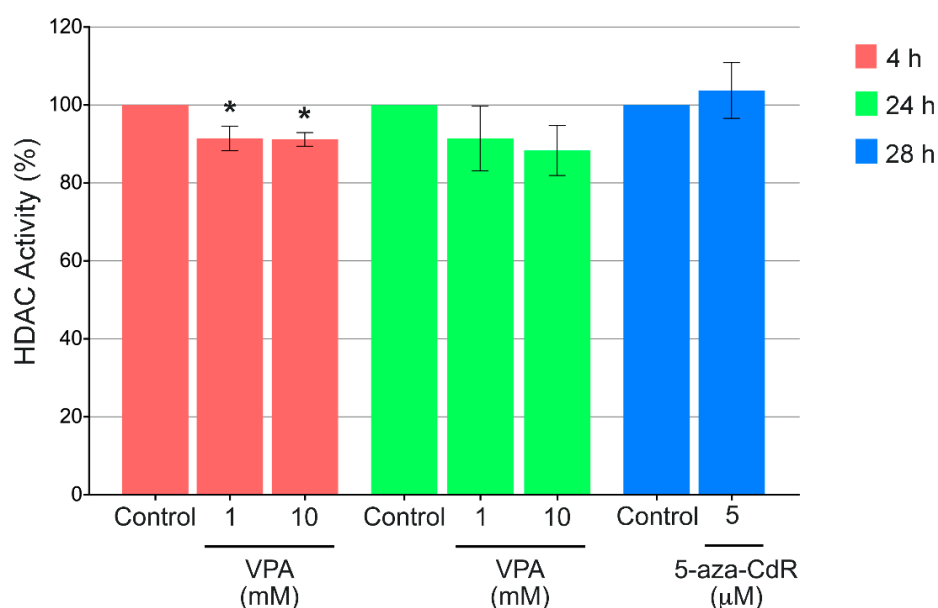


Figura 6. Atividade relativa de HDACs em células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR. Os dados representam as medianas e erros padrão de experimentos independentes (n = 8 em cada condição). *, diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$.

Os ensaios de WB mostraram um aumento significativo nos níveis de acetilação da histona H3 em todas as condições em que as células foram tratadas com VPA, sendo que este aumento se revelou dose-dependente. Não houve alteração significativa nos níveis de acetilação de H3 com o tratamento por 5-aza-CdR (Figura 7).

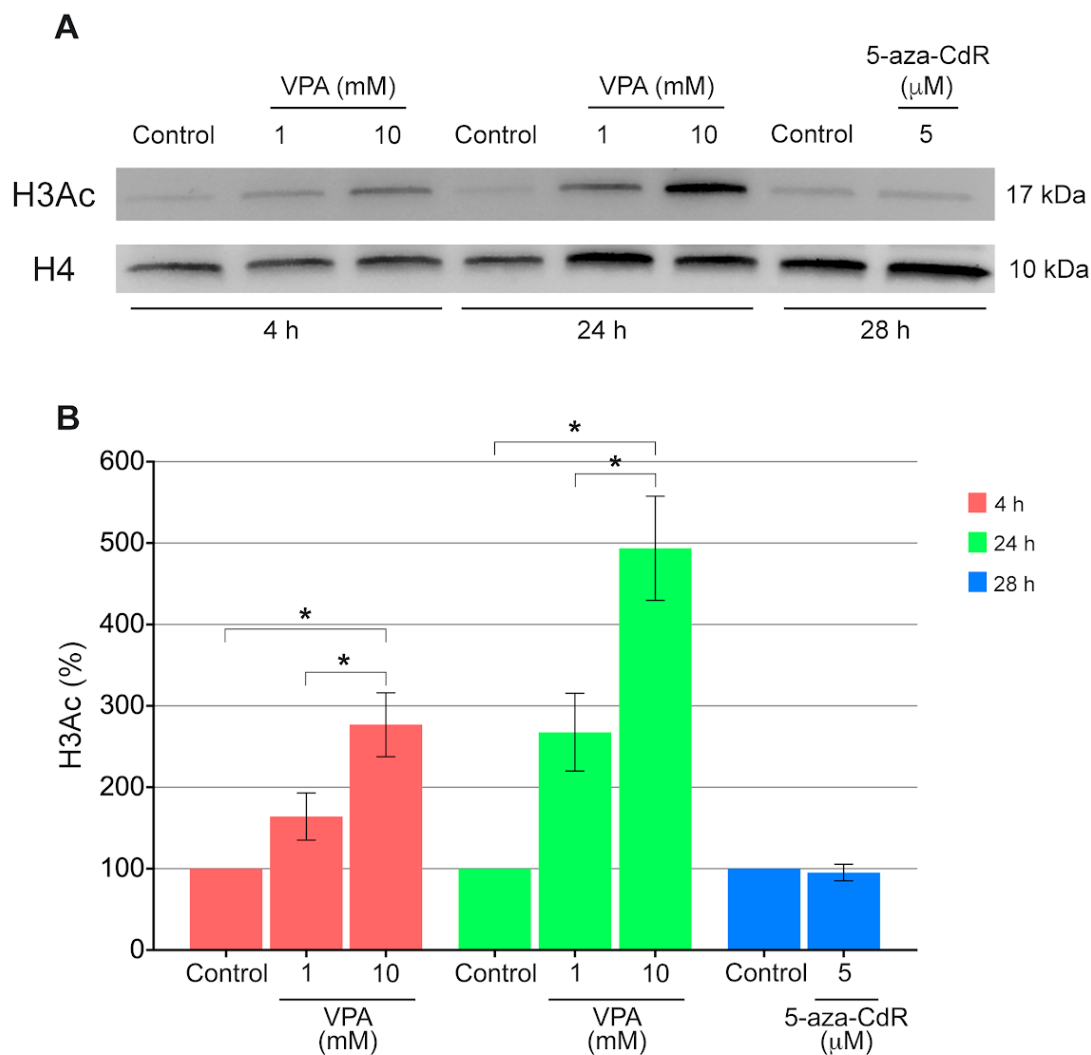


Figura 7. Acetilação da histona H3 em células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR. (A) representa um exemplo de blot com a histona H4 sendo utilizada como controle endógeno e normalizador dos níveis de H3ac. (B) representa a acetilação relativa da histona H3 nas diferentes condições analisadas, comparadas entre si ($n = 5$ cada condição). *Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$.

8.4. Níveis de 5mC no DNA de células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR

Os níveis de 5mC, avaliados com ensaios imunofluorescência e ELISA, demonstraram haver uma diminuição na abundância de metilação global no DNA de células U-251MG quando tratadas com VPA e 5-aza-CdR nas condições experimentais utilizadas (Figura 8). A diminuição nos níveis de 5mC, apesar de presente, não foi estatisticamente significativa para tratamentos prolongados com o VPA através de ELISA, provavelmente pela limitação no número de testes realizados neste ensaio afetados por sua variabilidade. 5-aza-CdR confirmou-se como agente clássico de demetilação do DNA (Ghoshal et al. 2005, Datta et al. 2009), diminuindo os níveis de 5mC nas células U-251MG tratadas com esta droga em ambos os

ensaios realizados. A análise visual das células obtida através de imunofluorescência também evidencia estes resultados (Figura 9).

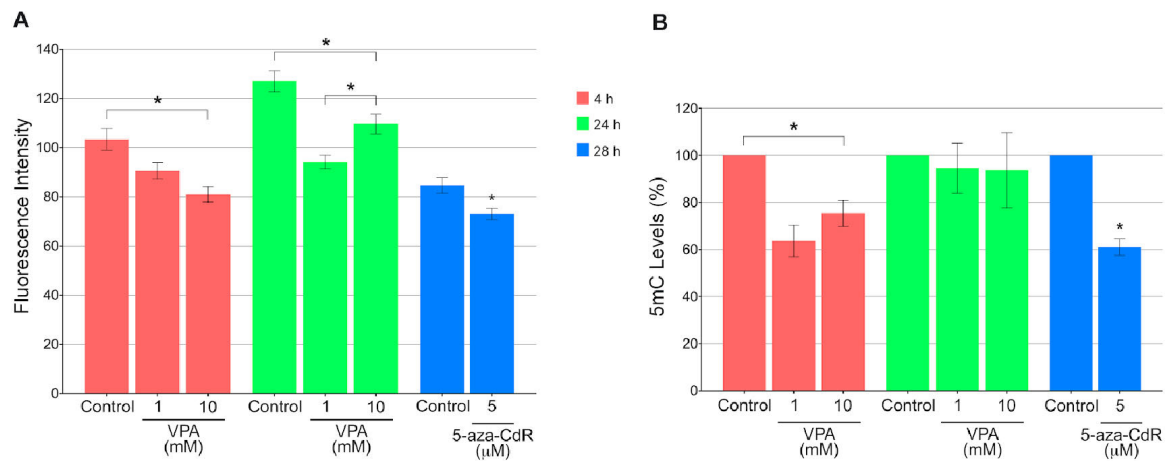


Figura 8. Níveis globais de 5mC em células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR. Resultados obtidos com ELISA (A) e imunofluorescência (B). Os dados representam as médias e erros padrão de experimentos independentes para imunofluorescência (n = 80 cada condição) e ELISA (n = 6 cada condição). *Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$.

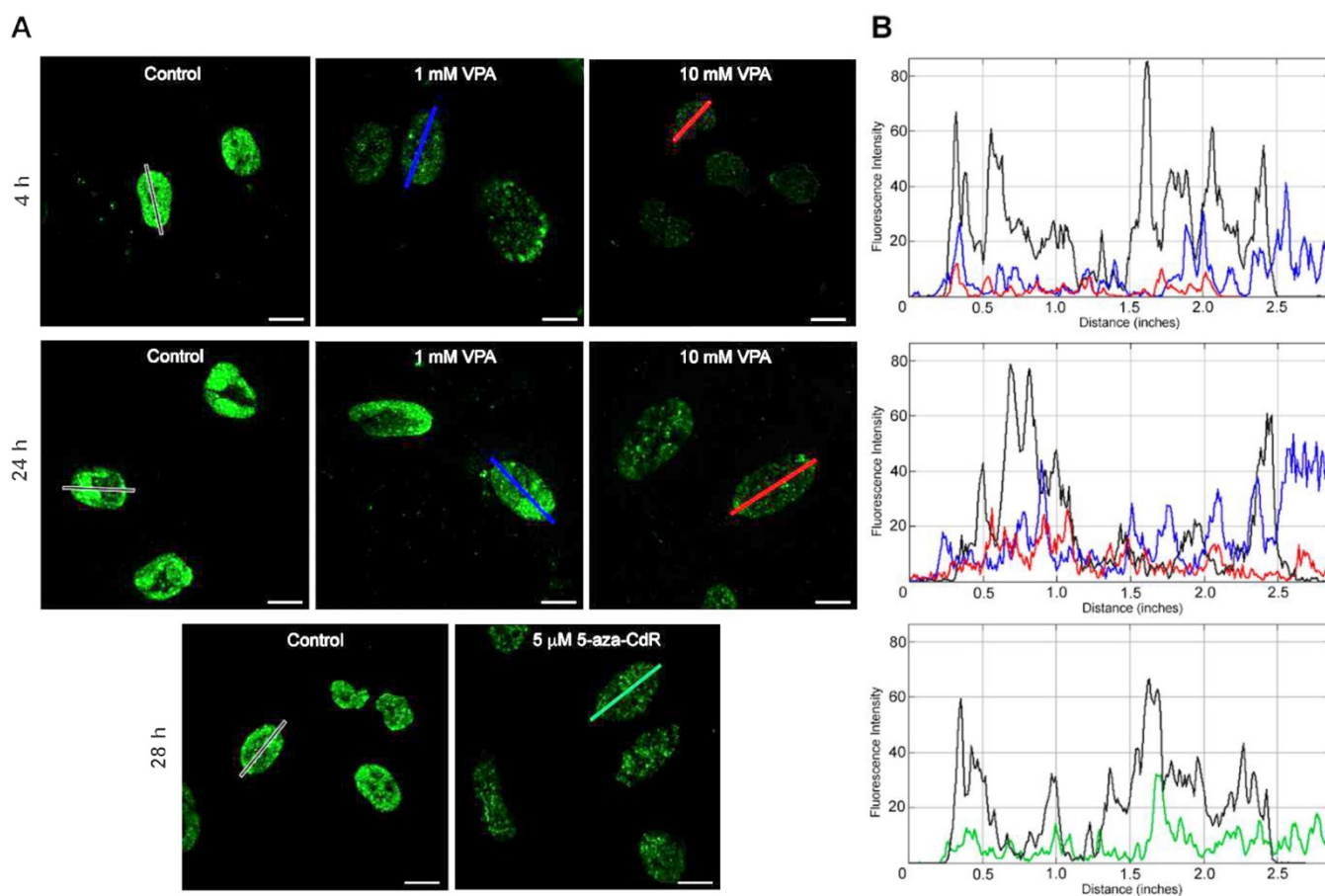


Figura 9. Sinais de imunofluorescência para 5mC em células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR. (A) Imagens nucleares das células tratadas com VPA por 4 e 24 h e por 5-aza-CdR por 28 h. Os controles se referem ao cultivo na ausência da droga. As imagens são representativas de experimentos independentes ($n = 80$ cada condição). A barra das escalas corresponde a 10 μ m. (B) Perfis obtidos com o software ImageJ representativos da intensidade de fluorescência ao longo de um eixo estabelecido na imagem de núcleos de células cultivadas na ausência das drogas (preto), nas células cultivadas na presença de VPA 1 mM (azul) e 10 mM (vermelho) e de 5-aza-CdR (verde).

8.5. Efeito do VPA e da 5-aza-CdR sobre a supraorganização da cromatina de células U-251MG interfásicas

Exemplos de imagens dos núcleos interfásicos das células submetidas à reação de Feulgen obtidas com fotomicroscópio Zeiss Axiophot 2 podem ser observados na Figura 10. A análise de imagem com sistema de vídeo permitiu o estabelecimento de dados relacionados a parâmetros geométricos, densitométricos e texturais.

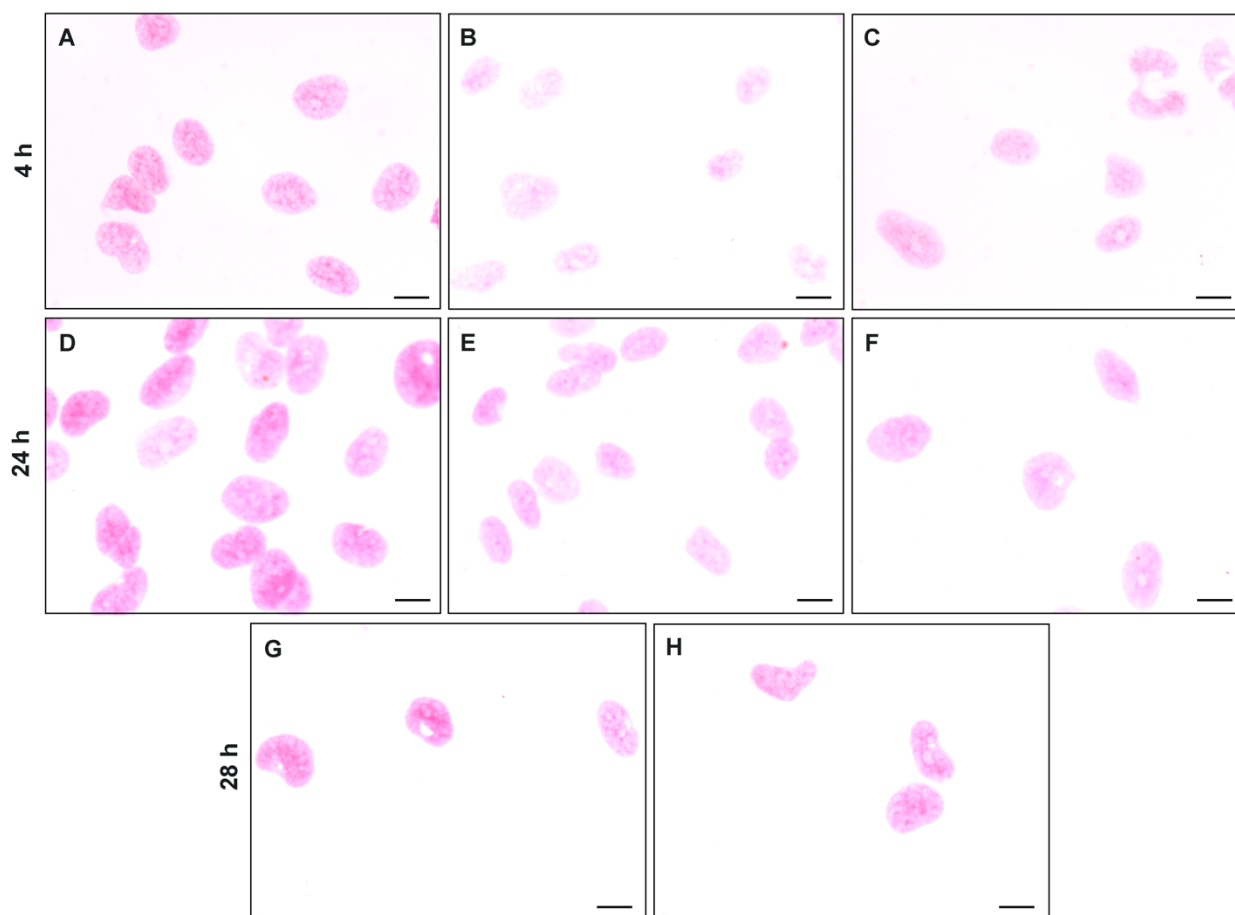


Figura 10. Células U-251MG submetidas à reação de Feulgen. A, D e G representam núcleos corados de células controle cultivadas na ausência das drogas, B e E, células tratadas com VPA 1 mM; C e F, células tratadas com VPA 10 mM; H, células tratadas com 5-aza-CdR 5 μ M. Barras de escala, 50 μ m.

Os dados referentes a parâmetros geométricos e densitométricos estudados neste trabalho estão apresentados na tabela 1. Em relação aos controles não tratados com VPA, demonstrou-se um aumento na área nuclear concomitante a uma diminuição em OD com o avanço do tempo de cultura (Figuras 11 e 12, Tabela 1). O tratamento das células com VPA por 4 h induziu elevada variabilidade nos valores de área nuclear, mas que, se comparados em termos de mediana com teste estatístico não paramétrico, indicaram aumento nesse item (Tabela 1). Em simultaneidade a esse evento, ocorreu diminuição em OD (Figuras 11 e 12, Tabela 1). Quando o tratamento com VPA se estendeu por 24 h, houve acentuado decréscimo em área nuclear, acompanhado por decréscimo em OD, ambos de maneira dose-dependente (Figuras 11 e 12, Tabela 1). Com o tratamento por 5-aza-CdR houve aumento na variabilidade dos valores de área nuclear e significativo decréscimo em OD (Figuras 11 e 12, Tabela 1).

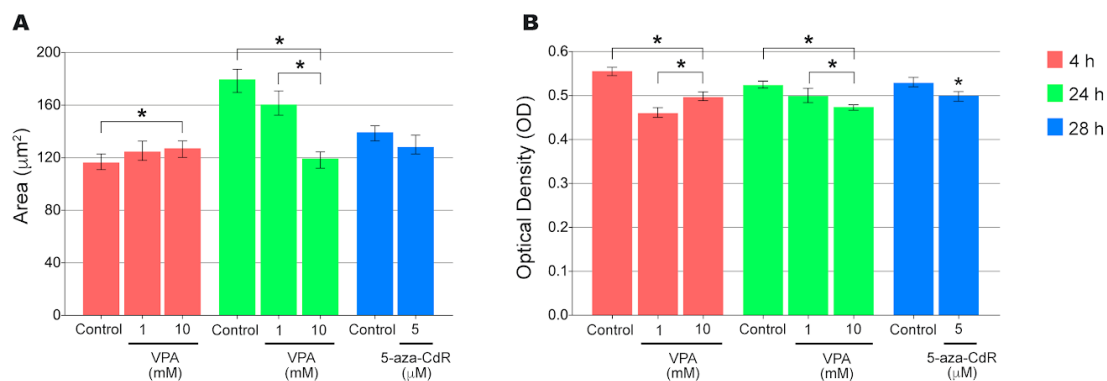


Figura 11. Área nuclear (μm^2) (A) e OD (B) de núcleos interfásicos de células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR e submetidas à reação de Feulgen. Os dados representam as medianas e erros padrão de experimentos independentes. *, diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney).

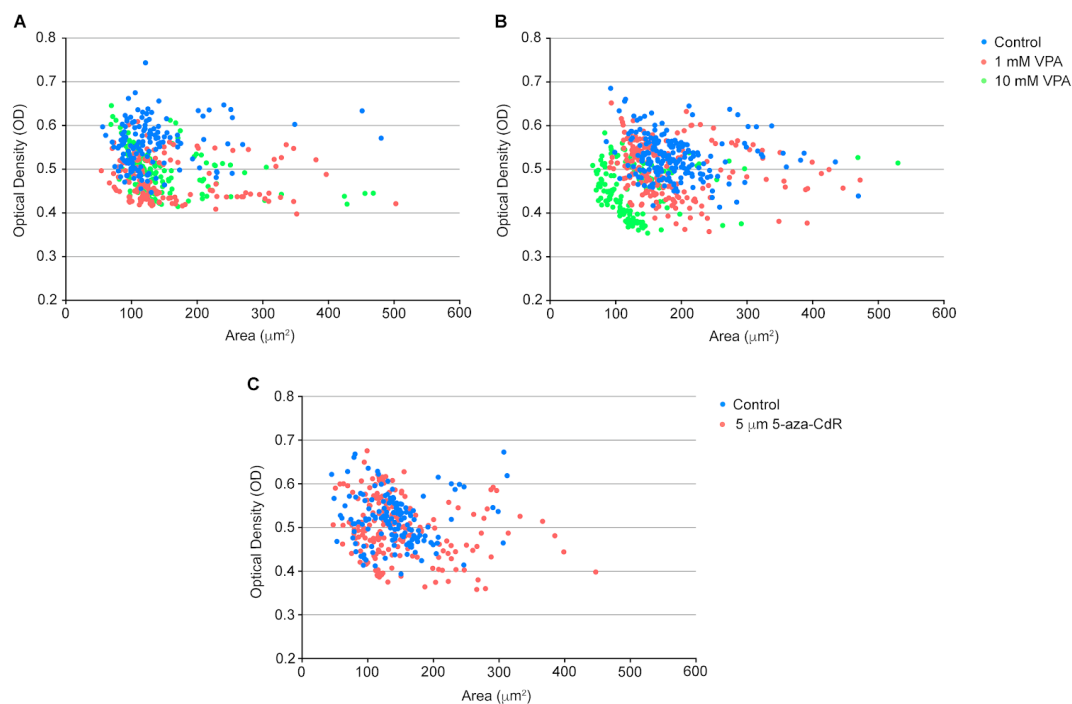


Figura 12: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre a densidade ótica (OD) e área nuclear de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se à análise de 200 núcleos por tratamento.

Os núcleos de células tratadas por 4 h com 10 mM de VPA e por 28 h com 5 μM de 5-aza-CdR tiveram aumento significativo dos valores de razão Feret em relação aos controles não tratados, indicando alteração de forma nuclear para um corpo elipsóide menos alongado (Figura 13).

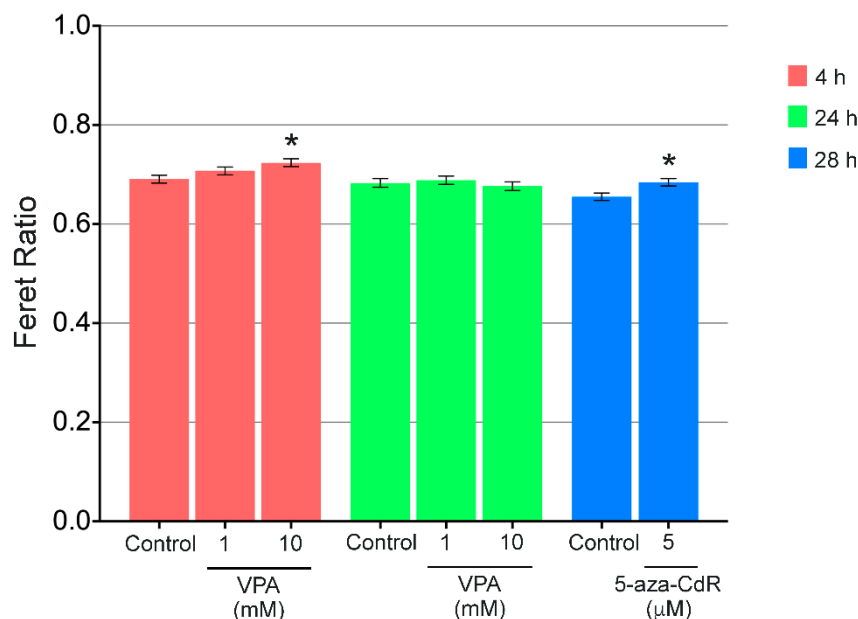


Figura 13. Razão Feret de núcleos interfásicos de células U-251MG submetidas à reação de Feulgen. Os dados representam as medianas e erros padrão de experimentos independentes. *Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney).

O conteúdo Feulgen-DNA, representado pelo parâmetro IOD, não se mostrou alterado após tratamentos com VPA por 4 h e com 5-aza-CdR por 28 h, porém mostrou decrescido dose-dependente após tratamento com VPA por 24 h (Tabela 1, Figura 14). A diminuição nos valores de Feulgen-DNA (IOD) com o tratamento por VPA por 24 h é nítida quando se examina a frequência desses valores deslocada para o lado esquerdo de seu gráfico de distribuição seja correlacionada com os respectivos valores de área nuclear ou de razão Feret (Figuras 15 e 16).

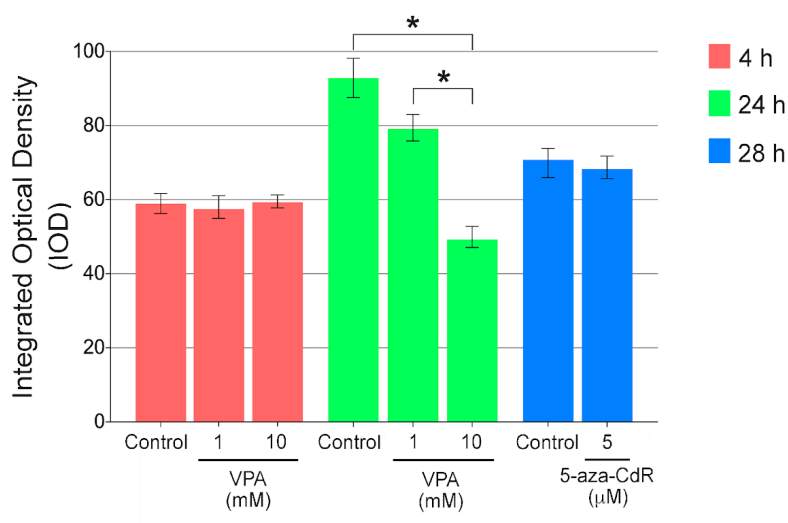


Figura 14. Valores de IOD (Feulgen-DNA) *Diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney).

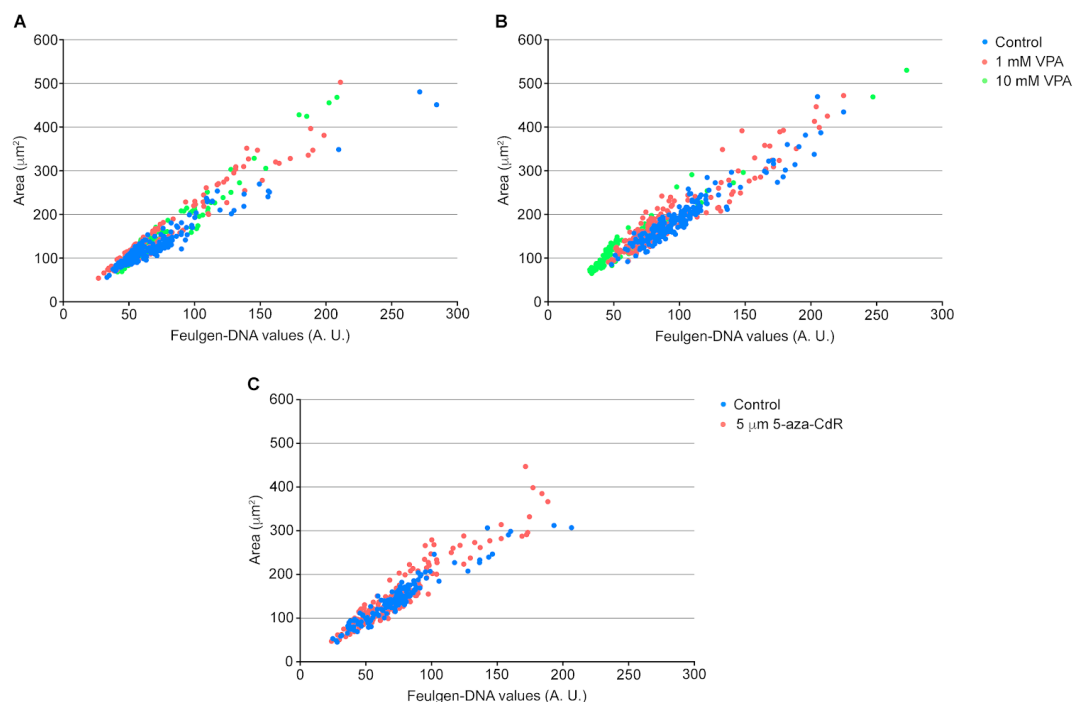


Figura 15: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre a área nuclear (μm^2) e os valores de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias (A. U.) de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se à análise de 200 núcleos por tratamento.

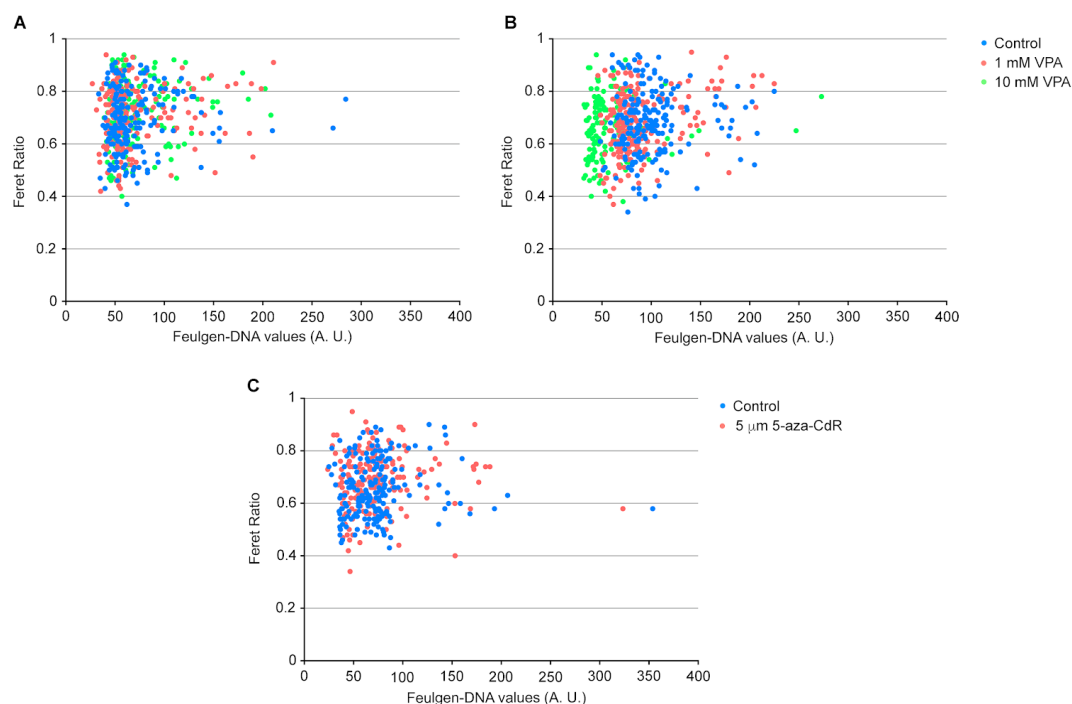


Figura 16: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre a razão Feret e os valores de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias (A. U.) de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se à análise de 200 núcleos por tratamento.

Tabela 1. Parâmetros geométricos e densitométricos de células U-251MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR e submetidas à reação de Feulgen.

Tempo (h)	Tratamento		Área Nuclear (μm^2)			Razão Feret			OD			IOD (unidades arbitrárias)		
	Droga	Concentração	$\bar{X}$	S	Md	$\bar{X}$	S	Md	$\bar{X}$	S	Md	$\bar{X}$	S	Md
4	VPA (mM)	zero	130,01	54,84	116,39 ^a	0,6909	0,1167	0,6900 ^a	0,554	0,053	0,556 ^a	69,17	33,07	58,95
		1	155,31	80,04	124,83 ^b	0,7067	0,1144	0,7100	0,475	0,047	0,460 ^b	70,33	34,44	57,45
		10	152,96	103,06	127,31 ^b	0,7239	0,1108	0,7300 ^b	0,499	0,050	0,497 ^c	72,43	50,83	59,33
24	VPA (mM)	zero	190,13	59,74	179,72 ^a	0,6833	0,1205	0,6900	0,528	0,048	0,524 ^a	99,70	31,24	92,89 ^a
		1	182,37	72,63	160,60 ^b	0,6886	0,1190	0,6900	0,499	0,060	0,499 ^b	90,11	35,29	79,14 ^b
		10	129,01	60,80	119,41 ^c	0,6768	0,1201	0,6800	0,464	0,052	0,474 ^c	58,77	31,28	49,30 ^c
28	5-aza-CdR (μM)	zero	141,97	50,82	139,47	0,6554	0,1068	0,6500 ^a	0,533	0,061	0,529 ^a	73,31	35,39	70,83
		5	152,17	77,19	128,30	0,6846	0,1059	0,6900 ^b	0,500	0,066	0,500 ^b	74,76	36,09	68,25

Letras diferentes significam diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney); $\bar{X}$, média aritmética; S, desvio padrão; Md, mediana. Os dados representam os resultados das análises de 200 núcleos interfásicos.

Os parâmetros texturais SDtd, entropia e energia, que refletem a heterogeneidade e complexidade de distribuição da estrutura cromatínica revelada com a reação de Feulgen, sofreram modificações significativas com a ação do VPA, porém não se alteraram com o tratamento pela 5-aza-CdR nas condições experimentais utilizadas (Tabela 2, Figuras 17 - 20). Tanto os valores de SDtd quanto os de entropia aumentaram após tratamento das células com VPA 10 mM por 4 h e decresceram quando esse tratamento se estendeu por 24 h (Tabela 2, Figuras 17 - 19). Houve decréscimo nos valores de SDtd, porém não nos de entropia, após tratamento das células com VPA 1 mM por 4 h, o que no caso de SDtd parece ter sido contribuído por pequena parte da população analisada (Figura 18). Os dados obtidos para o parâmetro energia nuclear foram em sua maioria inversamente proporcionais aos resultados de SDtd e entropia (Figuras 17 - 20).

Tabela 2. Parâmetros texturais de células U-251 MG tratadas com VPA e 5-aza-CdR e submetidas à reação de Feulgen.

Tempo (h)	Tratamento		SDtd			Entropia			Energia		
	Droga	Concentração	$\bar{X}$	S	Md	$\bar{X}$	S	Md	$\bar{X}$	S	Md
4	VPA (mM)	zero	8,603	1,995	8,235 ^a	5,126	0,359	5,100 ^a	0,033	0,009	0,030 ^a
		1	8,305	1,935	7,980 ^b	5,079	0,374	5,055 ^b	0,036	0,010	0,040 ^b
		10	11,523	3,033	11,400 ^c	5,431	0,364	5,460 ^c	0,027	0,008	0,026 ^c
24	VPA (mM)	zero	12,571	3,147	12,300 ^a	5,630	0,316	5,635 ^a	0,025	0,007	0,020 ^a
		1	12,524	2,440	12,450 ^b	5,574	0,274	5,590 ^b	0,024	0,006	0,021 ^b
		10	10,005	3,010	9,520 ^c	5,223	0,393	5,230 ^c	0,032	0,010	0,030 ^c
28	5-aza-CdR (μ M)	zero	16,276	3,810	15,855	5,908	0,302	5,930	0,019	0,005	0,020
		5	15,847	3,241	15,490	5,884	0,273	5,910	0,019	0,005	0,020

Letras diferentes significam diferenças significativas ao nível de $P < 0,05$ (teste de Mann-Whitney). $\bar{X}$, média aritmética; S, desvio padrão; Md, mediana. Os dados representam os resultados das análises de 200 núcleos interfásicos.

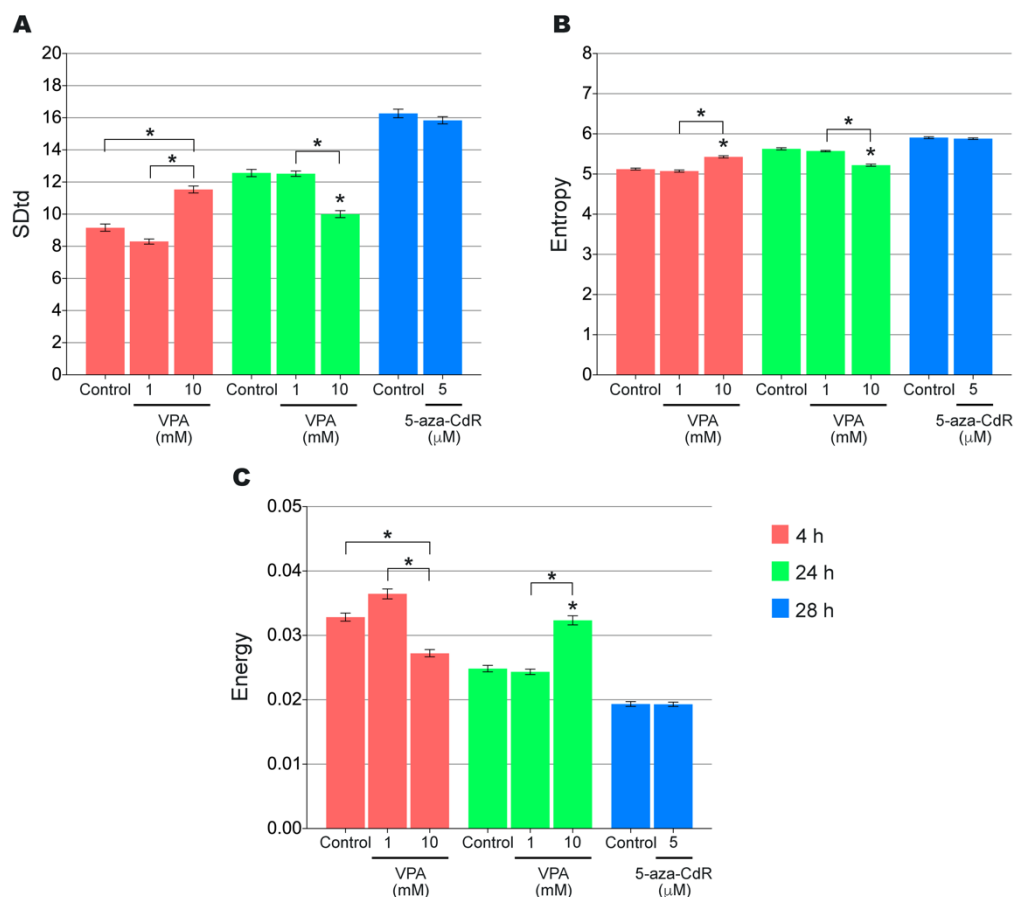


Figura 17. Parâmetros texturais de núcleos interfásicos de células U-251 MG submetidas à reação de Feulgen. Acham-se representados dados de SDtd (A), entropia (B) e energia (C). Os dados representam as medianas e erros padrão de experimentos independentes. *, diferenças significativas ao nível de $P < 0.05$ (teste de Mann-Whitney).

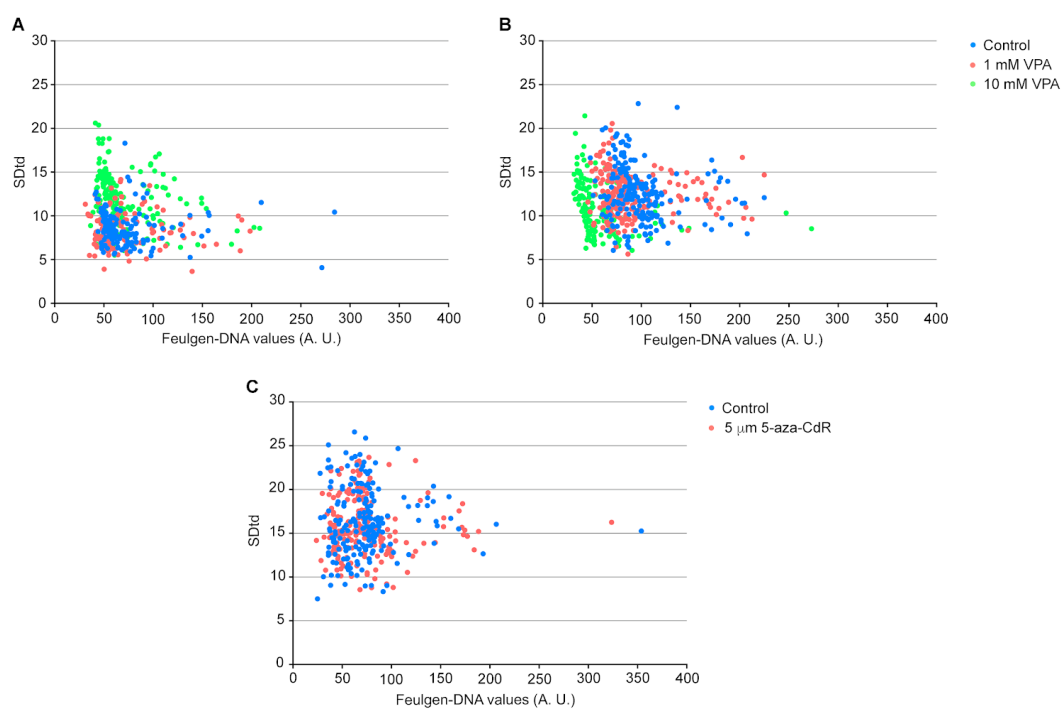


Figura 18: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre o parâmetro textural SDtd e os valores de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias (A. U.) de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se a análise de 200 núcleos por tratamento

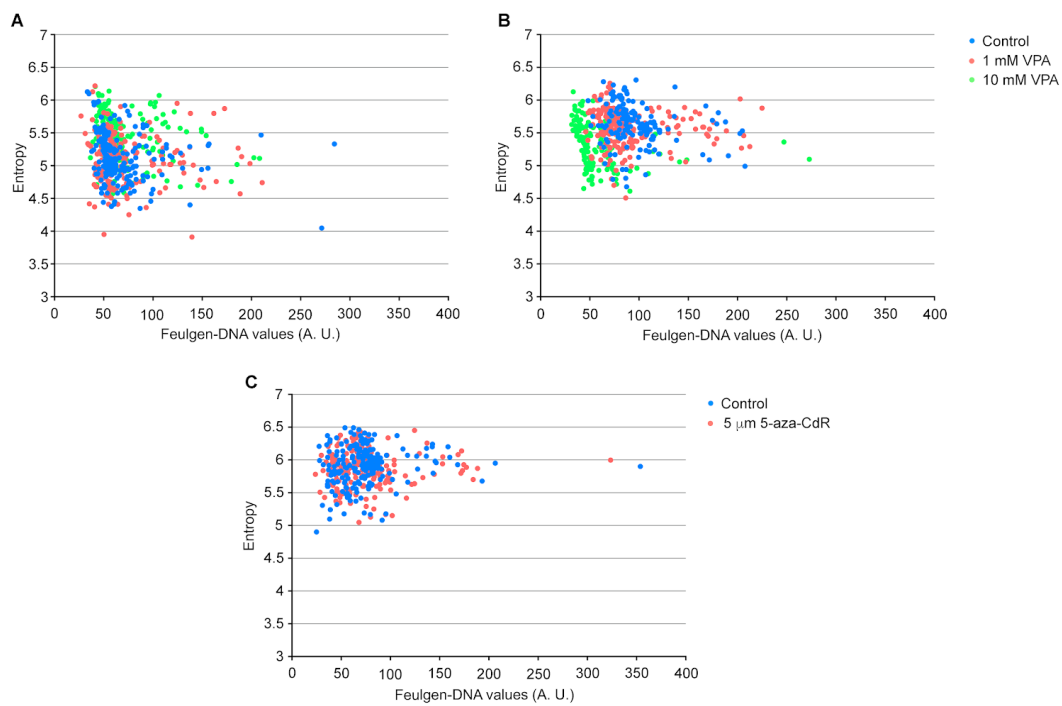


Figura 19: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre o parâmetro textural entropia e os valores de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias (A. U.) de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se a análise de 200 núcleos por tratamento.

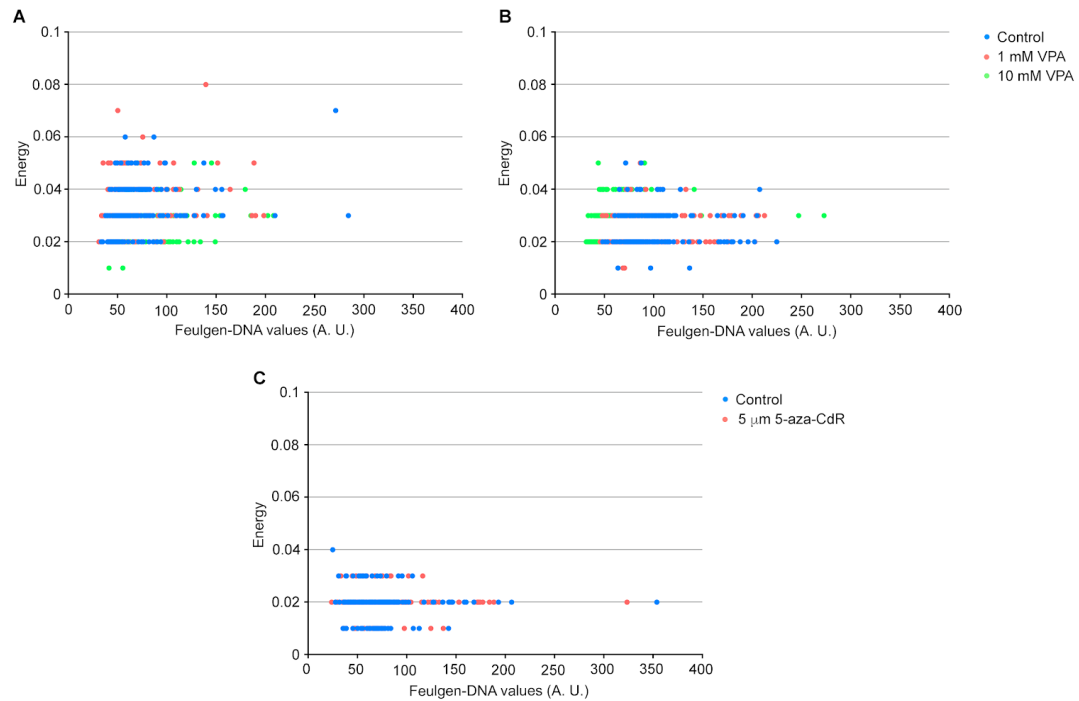


Figura 20: Diagramas de dispersão mostrando a relação entre o parâmetro textural energia e os valores de Feulgen-DNA em unidades arbitrárias (A. U.) de células U-251MG tratadas com VPA por 4 h (A), 24 h (B), e 5-aza-CdR por 28 h (C) e seus respectivos controles na ausência das drogas. Os dados referem-se a análise de 200 núcleos por tratamento.

9. Discussão

Neste estudo, buscou-se comprovar a ação do VPA em diferentes concentrações e por diferentes tempos de tratamento sobre a atividade de HDACs, a acetilação da histona H3, a metilação global de DNA e o estado estrutural da cromatina na linhagem celular de glioblastoma humano U-251MG.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram redução na atividade de HDACs, estatisticamente comprovada com o tratamento mais curto pelo VPA e com tendência de redução, embora não estatisticamente demonstrada, com o tratamento mais longo por essa droga. Tal redução, um efeito esperado frente ao tratamento com um inibidor de HDAC como o VPA, encontra suporte em relatos prévios para diversos tipos celulares incluindo células de glioblastoma (Kramer et al. 2003, Sami et al. 2008, Eckschlager et al. 2017, Sanaei & Kavoosi 2022).

Em simultaneidade à redução na atividade de HDACs, nossos dados demonstraram, nos vários tratamentos com VPA, a indução de acetilação de histonas, o que é um evento geralmente constatado em outros tipos celulares, conforme consta na literatura (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Kramer et al. 2003, Sami et al. 2008, Yagi et al. 2010, Ryu et al. 2012, Han et al. 2013, Riva et al. 2014, Zhou et al. 2014, Eckschlager et al. 2017, Mello 2021, Sanaei & Kavoosi 2022). No caso das células U-251MG, demonstramos que o VPA induz a acetilação da histona H3, havendo já o relato de que nessas células o VPA induz acetilação da histona H4 (Das et al. 2007). Como esperado, o tratamento com 5-aza-CdR não afetou nem a atividade de HDACs nem a acetilação da histona H3.

Quanto ao estudo dos efeitos do VPA sobre a metilação do DNA em células de glioblastoma, deve-se salientar que nessas células tal marca epigenética acha-se intensificada em promotores de diversos genes tais como GLAM, ENO1, GAPDH, HK3 e LDHA (de Almeida Sassi et al. 2012, Venneti & Thompson 2012, Chen et al. 2017, Dong & Cui 2019) e que já existe o relato de que o VPA possa afetar esse cenário (Riva et al. 2016).

Já é bem estabelecido o efeito do VPA sobre a metilação do DNA, promovendo, na maioria das vezes, diminuição desta marca epigenética em diversos tipos celulares, incluindo linhagens de glioblastomas, principalmente quando em associação com outras drogas (Detich et al. 2003, Tabolacci et al. 2008, Dong et al. 2010, Riva et al. 2016, Veronezi et al. 2017, Barciszewska et al. 2022). Após sincronização celular e tratamento com VPA, as células U-251MG apresentaram diminuição nos níveis globais de 5mC para todas as condições analisadas, ainda que os resultados obtidos por ELISA não tenha sido estatisticamente

significativos para o tratamento mais prolongado com essa droga, fato que pode ser facilmente justificado pela limitação do kit em relação ao número de repetições possíveis de serem realizadas e também se levarmos em consideração que por 24 h a uma concentração de 10 mM o VPA diminui a viabilidade celular na linhagem considerada no estudo. Essa redução também foi visualizada através de imagens de imunofluorescência. Vale ressaltar também que o tratamento com a 5-aza-CdR também ocasionou as mesmas observações em todas as condições, efeito esperado por ser um agente demetilante do DNA (Ghoshal et al. 2015, Kim et al. 2016), que ao se ligar ao DNA reativa genes supressores de tumor que foram silenciados pela metilação do seu promotor. A demetilação do DNA por 5-aza-CdR em células U-251MG e a redução no tamanho de tumores induzidos por tais células tratadas com 5-aza-CdR foram já demonstradas (Chu et al. 2012).

Trabalhos recentes de Barciszewska e colegas (2019, 2022) mostram que a hipometilação do DNA através da ação do VPA também ocorre através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), em um mecanismo chamado demetilação oxidativa do DNA. Segundo eles, a formação de 8-oxo-dG fornece informações sobre o processo de metilação do DNA devido à reação do grupo metil de 5mC com ROS. Seus trabalhos com diferentes linhagens de glioblastoma tiveram resultados interessantes ao relacionar hipermetilação global do DNA quando as células foram submetidas a dosagens de VPA que variavam de 250 a 500 mM por 3 e 24 h, com uma diminuição concomitante dos níveis de 8-oxo-dG (um marcador de dano oxidativo ao DNA). Este fato sugere indução de mecanismos de reparo do DNA, porém a exposição prolongada ao VPA (48 h) promoveu diminuição global dos níveis de 5mC (hipometilação) sem que houvesse alteração em 8-oxo-dG, o que está mais próximo dos achados encontrados no presente trabalho, ainda que não tenha sido mensurado os níveis deste marcador. Os níveis de ROS em células tumorais são mais altos que em células normais devido ao fato de terem maior atividade metabólica e disfunções relacionadas a ela, que afetam inclusive a sinalização celular, levando a uma maior atividade oncogênica, com maiores taxas de proliferação e metástase (Conti et al. 2010, Salazar-Ramiro et al. 2016), estando portando o cérebro muito mais suscetível aos efeitos nocivos das ROS devido ao seu alto metabolismo, consumo de oxigênio e baixa capacidade de regeneração celular. Seguindo este raciocínio pode-se sugerir que os resultados apresentados neste estudo, no que se refere a demetilação global do DNA através da ação do VPA em concentrações altas e com uma maior exposição, pode estar relacionado a uma maior instabilidade genômica devido a demetilação oxidativa do DNA, com a reação do grupo metil de 5mC com ROS, já comprovada em outro estudo (Barciszewska et al. 2019), porém estudos adicionais precisam ser realizados a fim de

se comprovar se nas condições deste estudo ocorreria aumento deste marcador de dano oxidativo ao DNA.

Ao lado da indução de inibição da atividade de HDACs, acetilação da histona H3 e decréscimo nos valores globais de 5mC no DNA das células U-251MG pela ação do VPA, dados originais referentes ao estado estrutural da cromatina foram obtidos neste trabalho, com análise de imagem, em preparados submetidos à reação de Feulgen. Dentre os vários parâmetros estudados, saliente-se que o grau de empacotamento da cromatina por núcleo, identificado como SDtd e a entropia nuclear, definida em termos de número de bits necessários para armazenar valores densitométricos por imagem, segundo o software Kontron KS-400 utilizado, indicaram que o tratamento por VPA tem o potencial de promover remodelação cromatínica nas células U-251MG. Isto não aconteceu quando essas células foram cultivadas em presença de 5-aza-CdR.

Dado que os valores de SDtd e de entropia, que de início se mostraram aumentados com o tratamento mais curto (4 h) com VPA 10 mM, decresceram significativamente com o tratamento mais longo (24 h) com VPA na mesma concentração, admite-se ocorrer descondensação cromatínica. Uma vez que o tratamento com 5-aza-CdR não induz tal alteração na cromatina, sugere-se que o evento promovido por ação do VPA, e que poderia favorecer a expressão gênica, possa estar mais envolvido com a acetilação de histonas do que com a demetilação do DNA. A descompactação da cromatina gerada por ação do VPA pode levar regiões mais frouxas da cromatina a exercerem menor resistência à hidrólise ácida da reação de Feulgen, o que explicaria a redução nos valores Feulgen-DNA (IOD) e alteração em formas e tamanhos nucleares nas células cultivadas na presença de VPA 10 mM por 24 h. Tais resultados obtidos através da análise de imagem de núcleos interfásicos submetidos à reação de Feulgen estão em concordância com trabalhos prévios de nosso grupo, em outras linhagens celulares (Felisbino et al. 2011, 2014, Veronezi et al. 2017).

Quanto aos procedimentos metodológicos utilizados neste trabalho, verificou-se redução da viabilidade celular das células U-251MG aos tratamentos mais drásticos e prolongado com VPA (10 e 20 mM, 24 h), quando analisadas por teste de MTT, mas não houve as mesmas alterações através da análise por teste de exclusão com azul de tripan. Dessa maneira, como uma forma de comparação, optou-se por manter apenas as concentrações de 1 e 10 mM de VPA, levando-se em consideração estudos anteriores que relatam indução da inibição da viabilidade e supressão da proliferação celular (Han et al. 2013, Tsai et al. 2013, Han et al 2020), porém deve-se ter cautela na interpretação dos dados obtidos nas concentrações e tempos de exposição consideradas citotóxicas para a linhagem celular utilizada

neste estudo. Para a 5-aza-CdR, droga utilizada como controle de demetilação do DNA, não houve diminuição da viabilidade celular na concentração de 5 μ M por 28 h, corroborada com estudos anteriores que mostraram que tal diminuição ocorreria quando as células são tratadas com doses acima de 1 μ M por um período mais longo (Palli et al. 2008).

Ainda levando-se em consideração o efeito do VPA sobre a progressão do ciclo celular (Tsai et al. 2013, Rocha et al. 2019), a sincronização da fase celular fez-se necessária para obter populações de células em um mesmo momento celular, o que permitiu uma melhor interpretação dos resultados. O uso da lovastatina como uma ferramenta bioquímica nesse processo conseguiu promover a sincronização de cerca de 75% das células U-251MG em G1, sem trazer riscos de citotoxicidade, comprovada através do ensaio por MTT. O teste de citotoxicidade realizado é de suma importância, uma vez que esta droga pode induzir apoptose em alguns tipos celulares (Javanmoghadam-Kamrani & Keyomarsi 2008).

10. Conclusões

1 – Houve aumento na acetilação da histona H3, decréscimo nos níveis globais de 5mC no DNA e remodelação cromatínica identificável por análise de imagem nas células de glioblastoma U-251MG cultivadas na presença de VPA na concentração de 1 e 10 mM pelo tempo de 24 h, que exibem redução na atividade de HDACs,

2 - As células U-251MG sofrem hipometilação de DNA, porém não demonstram aumento na acetilação de histonas H3 nem alteração na supraorganização da cromatina, quando cultivadas na presença de 5-aza-CdR 5 μ M por 28 h.

3 - Admite-se que a descompactação cromatínica detectável pela ação do VPA nas células U-251MG estaria mais envolvida com a indução de acetilação de histonas do que propriamente com a demetilação do DNA, comparando-se os resultados obtidos após cultivo das células U-251MG em presença de VPA e de 5-aza-CdR.

4 - Não há indução de citotoxicidade avaliada através do teste de MTT com o uso da lovastatina na concentração de 10 μ M por um período de 28 h, para sincronização celular na fase G1 de células U-251MG. O mesmo ocorre com o uso da 5-aza-CdR na concentração de 5 μ M, pelo mesmo tempo de exposição.

5 - O VPA induz citotoxicidade nas células U-251MG na concentração de 10 μ M pelo tempo de 24 h e, por isso, é importante avaliar e interpretar de maneira criteriosa os resultados obtidos nesta condição específica.

11. Referências Bibliográficas

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Water P. DNA, chromosomes and genomes. In: Molecular biology of the cell 6th ed. Garland science, Taylor & Francis Group. New York, 2015.

Bailey P, Cushing H. A classification of the tumours of the glioma group on a histogenetic basis, with a correlated study of prognosis. *Br J Surg.* 14(55): 554–555, 1927.

Barba J, Jeany H, Fenster P and Gil J. The use of local entropy measures in edge detection for cytological image analysis. *J Microsc* 156: 125-134, 1988.

Barciszewska AM, Giel-Pietraszuk M, Perrigue PM, Naskręt-Barciszewska M. Total DNA Methylation Changes Reflect Random Oxidative DNA Damage in Gliomas. *Cells.* 8(9): 1065, 2019.

Barciszewska AM, Belter A, Gawrońska I, Giel-Pietraszuk M, Naskręt-Barciszewska MZ. Cross-reactivity between histone demethylase inhibitor valproic acid and DNA methylation in glioblastoma cell lines. *Front Oncol.* 16(12): 1033035, 2022.

Bártová E, Pacherník J, Harnicarová A, Kovarik A, Kovariková M, Hofmanová J, Skalníková M, Kozubek M, Kozubek S. Nuclear levels and patterns of histone H3 modifications and HP1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci.* 118: 5035-5046, 2005.

Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W, Radlwimmer B, Højfeldt JW, Truffaux N, Castel D, Schubert S, Ryzhova M, Seker-Cin H, Gronych J, Johann PD, Stark S, Meyer J, Milde T, Schuhmann M, Ebinger M, Monoranu CM, Ponnuswami A, Chen S, Jones C, Witt O, Collins VP, von Deimling A, Jabado N, Puget S, Grill J, Helin K, Korshunov A, Lichter P, Monje M, Plass C, Cho YJ, Pfister SM. Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer Cell.* 24(5): 660-672, 2013.

Brown SE, Fraga MF, Weaver IC, Berdasco M, Szyf M. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics* 2(1): 54-65, 2007.

Burton BS. On the propyl derivatives and decomposition products of ethylacetoacetate. *Am. Chem. J.* 3, 385-395, 1882.

Chan DY, Chen GG, Poon WS, Liu PC. Lovastatin sensitized human glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis. *J Neurooncol* 86: 273–283, 2008.

Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 479364, 2010.

Chen C, Shi Y, Li Y, He ZC, Zhou K, Zhang XN, Yang KD, Wu JR, Kung HF, Ping YF, Bian XW. A glycolysis-based ten-gene signature correlates with the clinical outcome, molecular subtype and IDH1 mutation in glioblastoma. *J Genet Genomics* 44(11): 519-530, 2017.

Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21(35): 5483-5495, 2012.

Chu SH, Ma YB, Feng DF, Zhang H, Qiu JH, Zhu ZA. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on SLC22A18 in glioma U251 cells. *Mol Med Rep.* 5(1): 138-141, 2012.

Cinatl JJ, Cinatl J, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe D Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 8: 958–963, 1997.

Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 58: 453–508, 1989.

Conti A, Guli C, La Torre D, Tomasello C, Angileri FF, Aguenouz M. Role of inflammation and oxidative stress mediators in gliomas. *Cancers (Basel).* 2(2): 693-712, 2010.

Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, Gopalakrishnan V. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J Neuro-Oncol* 85: 159-170, 2007.

Datta J, Ghoshal K, Denny WA, Gamage SA, Brooke DG, Phiasivongsa P, Redkar S, Jacob S. A new class of quinolone-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity inducing its degradation. *Cancer Res.* 69(10): 4277-4285, 2009.

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 150(1): 12-27, 2012.

De Almeida Sassi F, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R, Abujamra AL. Glioma Revisited: From Neurogenesis and Cancer Stem Cells to the Epigenetic Regulation of the Niche. *J Oncol* 2012: 537861, 2012.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 89: 271-277, 1986.

Desjobert C, El Maï M, Gérard-Hirne T, Guianvarc'h D, Carrier A, Pottier C, Arimondo PB, Riond J. Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. *Epigenetics* 10(1): 82-91, 2015.

Detich N, Bovenzi V, Szyf M. Valproate induces replication-independent active DNA demethylation. *J Biol Chem.* 278(30): 27586-27592, 2003.

Dombrowski M, Engholm M, Dienemann C, Dodonova S, Cramer P. Histone H1 binding to nucleosome arrays depends on linker DNA length and trajectory. *Nat Struct Mol Biol.* (5): 493-501, 2022.

Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5(8): 730-735, 2010.

Dong Z, Cui H. Epigenetic modulation of metabolism in glioblastoma. *Semin Cancer Biol.* 57:45-51, 2019.

Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci.* 18(7): 1414, 2017.

Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 69: 3802–3809, 2009.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4: 143-153, 2004.

Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS One* 6:e29144. doi: 10.1371/journal.pone.0029144, 2011.

Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem.* 115(11): 1937-1947, 2014.

Frazer LA, Foraker KC. Use of intravenous valproic acid for acute migraine. *Ann Pharmacother.* 42: 403-407, 2008.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 5-aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol.* 25(11): 4727-4741, 2005.

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J.* 20: 6969-6978, 2001.

Grewal SI, Moazed D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301: 798-802, 2003.

Han BR, You BR, Park WH. Valproic acid inhibits the growth of HeLa cervical cancer cells via caspase-dependent apoptosis. *Oncol Rep.* 30(6): 2999-3005, 2013.

Han W, Yu F, Cao J, Dong B, Guan W, Shi J. Valproic acid enhanced apoptosis by promoting autophagy via Akt/mTOR signaling in glioma. *Cell Transplant* 29: 963689720981878, 2020.

Herceg Z, Vaissière T. Epigenetic mechanisms and cancer: an interface between the environment and the genome. *Epigenetics* 6(7): 804-819, 2011.

Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187: 226–232, 1975.

Jackman J, O'Connor PM. *Current Protocols in Cell Biology*: 8.3.1-8.3.20, 1998.

Jacobs VL, Valdes PA, Hickey WF, De Leo JA. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN Neuro*. 3(3): e00063, 2011.

Javanmoghadam-Kamrani S, Keyomarsi K. Synchronization of the cell cycle using lovastatin. *Cell Cycle*. 15: 2434-2440, 2008.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415-428, 2002.

Keyomarsi K. Synchronization of mammalian cells by Lovastatin. *Methods Cell Sci* 18: 109-114, 1996.

Kim KW, Roh JK, Wee HJ, Kim C. Molecular targeted anticancer drugs. In *Cancer drug discovery – science and history*. Springer. New York, 2016.

Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502(7472): 472-479, 2013.

Komori T. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol Med Chir* 57, 301–311, 2017.

Kontron Elektronik Imaging System KSC100. User's Guide, Vol. 1. Eching/Munich: Kontron Elektronik GmbH, 1995.

Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzel T, Göttlicher M. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* 22: 3411-3420, 2003.

Kuzma-Kuzniarska M, Cornell HR, Moneke MC, Carr AJ, Hulley PA. Lovastatin-Mediated Changes in Human Tendon Cells. *J Cell Physiol.* 230(10): 2543-2551, 2015.

Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. Valproic acid: how it works. Or not. *Clin Neurosc Res.* 4: 215-225, 2004.

Lawrence M, Daujat S, Schneider R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet.* 32(1): 42-56, 2016.

Lee DW, Lee MY, Ku B, Nam DH. Automatic 3D Cell Analysis in High-Throughput Microarray Using Micropillar and Microwell Chips. *Journal of Biomolecular Screening* 20(9): 1178–1184, 2015.

Liu LH, Xiao WH and Liu WW. Effect of 5-Aza-2'-deoxycytidine on the P16 tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *World J Gastroenterol* 7: 131-135, 2001.

Ma HT, Poon RYC. Synchronization of HeLa cells. *Method Mol Biol.* 761: 151-161, 2011.

Manzoni EFM, Pennarossa G, deEguileor M, Tettamanti G, Gandolfi F, Brevini TAL. 5azacytidine affects TET2 and histone transcription and reshapes morphology of human skin fibroblasts. *Sci Rep.* 6: 37017, 2016.

Mello MLS, Vidal BC. A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult* 30: 665-676, 1978.

Mello MLS, Vidal BC, Lareef MH, Hu YF, Yang X, Russo J. DNA content, chromatin texture and nuclear morphology in benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells after microcell-mediated transfer of chromossomes 11 and 17. *Cytometry Part A* 52: 70-76, 2003.

Mello MLS, Russo P, Russo J, Vidal BC. Entropy of Feulgen-stained 17- β -estradiol-transformed human breast epithelial cells as assessed by restriction enzymes and image analysis. *Oncol Rep* 21: 1483-1487, 2009.

Mello MLS, Vidal BC. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochem* 119(6): 603-609, 2017.

Mello MLS. Sodium Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Front Cell Dev Biol.* 9: 645518, 2021.

Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis*. 28(3): 560-571, 2007.

Miranda Furtado CL, Dos Santos Luciano MC, Silva Santos RD, Furtado GP, Moraes MO, Pessoa C. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics* 14(12): 1164-1176, 2019.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 65: 55-63, 1983.

Oberholzen M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M. Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 105: 333-355, 1996.

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA* 310(17): 1842-1850. 2013.

Palli SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT et al. DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol.* 28 (2): 752-771, 2008.

Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(6):341-356, 2013.

Perucca E. Overtreatment in epilepsy: Adverse consequences and mechanisms. *Epilepsy Res.* 52(1): 25-33, 2002.

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogene. *J Biol Chem.* 276: 36734-36741, 2001.

Ponten J, Westermarck B. Properties of human malignant glioma cells in vitro. *Med. Biol.* 56: 184–193, 1978.

Riva G, Baronchelli S, Paoletta L, Butta V, Biunno I, Lavitrano M, Dalprà L, Bentivegna A. In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells. *Toxicol Rep.* 1: 188-199, 2014.

Riva G, Butta V, Cilibrasi C, Baronchelli S, Redaelli S, Dalprà L, Lavitrano M, Bentivegna A. Epigenetic targeting of glioma stem cells: Short-term and long-term treatments with valproic acid modulate DNA methylation and differentiation behavior, but not temozolomide sensitivity. *Oncol Rep.* 35(5): 2811-2824, 2016.

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.* 9(1): 18236, 2019.

Rocha MA, Oliveira CBM, Mello MLS. Sodium valproate cytotoxicity effects as assessed by the MTT assay. <https://doi.org/10.25824/redu/XPTX4F>, Repositório de Dados de Pesquisa da Unicamp, 2021.

Rocha MA, de Campos Vidal B, Mello MLS. Sodium Valproate Modulates the Methylation Status of Lysine Residues 4, 9 and 27 in Histone H3 of HeLa Cells. *Curr Mol Pharmacol.* 16(2): 197-210, 2023.

Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.* 17: 330–339, 2011.

Ryu CH, Yoon WS, Park KY, Kim SM, Lim JY, Woo JS, Jeong CH, Hou Y, Jeun SS. Valproic acid downregulates the expression of MGMT and sensitizes temozolomide-resistant glioma cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012: 987495, 2012.

Sajadian SO, Ehnert E, Vakilian H, Koutsouraki E, Damm G, Seehofer D, Thasler W, Dooley S, Baharvand H, Sipos B, Nussler AK. Induction of active demethylation and 5hmC formation by 5-azacytidine is TET2 dependent and suggests new treatment strategies against hepatocellular carcinoma. *Clin Epig* 7(98): 1-14, 2015.

Salazar-Ramiro A, Ramírez-Ortega D, Pérez de la Cruz V, Hernández-Pedro NY, González-Esquivel DF, Sotelo J, Pineda B. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol.* 2016 7: 156, 2016.

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

Sanaei M, Kavooosi F. The effect of valproic acid on intrinsic, extrinsic, and JAK/STAT pathways in neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *Res Pharm Sci.* 17(4): 392-409, 2022.

Shanmugam MK, Arfuso F, Arumugam S, Chinnathambi A, Jinsong B, Warriar S, Wang LZ, Kumar AP, Ahn KS, Sethi G, Lakshmanan M. Role of novel histone modifications in cancer. *Oncotarget.* 9: 11414–11426, 2018.

Silva MFB, Aires CCO, Luis PBM, Ruitter JP, Ljlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I. Valproic acid metabolism and its effect on mitochondrial fatty acid oxidation: A review. *J Inherit Metab Dis.* 31: 205-216, 2008.

Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403(6765): 41-45, 2000.

Sorm F, Pískala A, Cihák A, Veselý J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia.* 20(4): 202-203, 1964.

Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* – Appendix 3B. (doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111), 2015.

Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tönjes M, Sill M, Bender S, Kool M, Zapatka M, Becker N, Zucknick M, Hielscher T, Liu XY, Fontebasso AM, Ryzhova M, Albrecht S, Jacob K, Wolter M, Ebinger M, Schuhmann MU, van Meter T, Frühwald MC, Hauch H, Pekrun A, Radlwimmer B, Niehues T, von Komorowski G, Dürken M, Kulozik AE, Madden J, Donson A, Foreman NK, Drissi R, Fouladi M, Scheurlen W, von Deimling A, Monoranu C, Roggendorf W, Herold-Mende C, Unterberg A, Kramm CM, Felsberg J, Hartmann C, Wiestler B, Wick W, Milde T, Witt O, Lindroth AM, Schwartzentruber J, Faury D, Fleming A, Zakrzewska M, Liberski PP, Zakrzewski K, Hauser P, Garami M, Klekner A, Bogner L, Morrissy S, Cavalli F, Taylor MD, van Sluis P, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, Mikkelsen T, Aldape K, Reifenberger G, Collins VP, Majewski J, Korshunov A, Lichter P, Plass C, Jabado N, Pfister SM. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell*. 22(4): 425-437, 2012.

Tabolacci E, De Pascalis I, Accadia M, Terracciano A, Moscato U, Chiurazzi P, Neri G. Modest reactivation of the mutant FMR1 gene by valproic acid is accompanied by histone modifications but not DNA demethylation. *Pharmacogenet Genomics* 18: 738-741, 2008.

Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C. Patterns of histone acetylation. *Eur. J. Biochem*. 193: 701-713, 1990.

Torsvik A, Stieber D, Enger PO, Golebiewska A, Molven A, Svendsen A, Westermarck B, Niclou SP, Olsen TK, Chekenya Enger M, Bjerkvig R. U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. *Cancer Med*. 3(4): 812-824, 2014.

Tsai C, Leslie JS, Franko-Tobin LG, Prasnal MC, Yang T, Vienna Mackey L, Fuselier JA, Coy DH, Liu M, Yu C, Sun L. Valproic acid suppresses cervical cancer tumor progression possibly via activating Notch1 signaling and enhances receptor-targeted cancer chemotherapeutic via activating somatostatin receptor type II. *Arch Gynecol Obstetr*. 288 (2): 393-400, 2013.

Vandiver AR, Idrizi A, Rizzardi L, Feinberg AP, Hansen KD. DNA methylation is stable during replication and cell cycle arrest. *Sci Rep.* 5:17911, 2015.

Venneti S, Thompson CB. Metabolic modulation of epigenetics in gliomas. *Brain Pathol.* 23(2): 217-221, 2013.

Veronezi GMB, Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS, Vidal BC. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS One* 12: e0170740, 2017.

Vidal BC, Moraes AS and Mello MLS. Nucleus image properties assessed by video image analysis in mouse hepatocytes under a short lysis for extended chromatin fiber formation. *Cytometry Part A* 69: 1106-1113, 2006.

Vidal BC, Felisbino MB, Mello MLS. Image analysis of chromatin remodeling. In: Stockert JC et al. (eds). *Functional Analysis of DNA and chromatin. Methods in Mol. Biol.*, vol. 1094. doi 10.1007/978-1-62703-706-8_9. Springer Science+Business Media, New York, 2014.

Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1: 18-20, 1942.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309-314, 1956.

Westermarck B, Ponten J, Hugosson R. Determinants for the establishment of permanent tissue culture lines from human gliomas. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A.* 81: 791–805, 1973.

Witthayanuwat S, Pesee M, Supaadirek C, Supakalin N, Thamronganantasakul K, Krusun S. Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pac J Cancer Prev.* 19(9): 2613-2617, 2018.

Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev.* 25(23) :2436-2452, 2011.

Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindeberg N, Segerman A, Wicher G, Niklasson M, Baskaran S, Sreedharan S, Everlien I, Kastema M, Hermansson A, Elfineh L,

Libard S, Holland EC, Hesselager G, Alafuzoff I, Westermark B, Nelander S, Forsberg-Nilsson K, Uhrbom L. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine* 2: 1351–1363, 2015.

Yagi Y, Fushida S, Harada S, Kinoshita J, Makino I, Oyama K, Tajima H, Fujita H, Takamura H, Ninomiya I, Fujimura T, Ohta T, Yashiro M, Hirakawa K. Effects of valproic acid on the cell cycle and apoptosis through acetylation of histone and tubulin in a scirrhous gastric cancer cell line. *J Exp Clin Cancer Res.* 29(1): 149, 2010.

Yan WH, Lin AF, Chang CC and Ferrone S: Induction of HLA-G expression in a melanoma cell line OCM-1A following the treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cell Res* 15: 523-531, 2005.

Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. In: Chang C, Lu Q (eds) *Epigenetics in Allergy and Autoimmunity*. Adv Exp Med Biol. 1253. Springer, Singapore, 2020.

Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, Fang Y, Fang D. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol.* 1283: 1-16, 2021.

Zhou Y, Xu Y, Wang H, Niu J, Hou H, Jiang Y. Histone deacetylase inhibitor, valproic acid, radiosensitizes the C6 glioma cell line in vitro. *Oncol Lett.* 7(1): 203-208, 2014.

12. Anexos



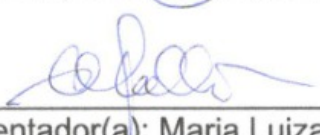
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgeb@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada ***"Efeito do ácido valpróico sobre características de imagem e marcas epigenéticas em cromatina de uma linhagem celular de glioblastoma"***, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: 
Nome do(a) aluno(a): Camila Borges Martins de Oliveira

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

Data: 25 de Julho de 2023.

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 **"Efeito do ácido valpróico sobre características de imagem e marcas epigenéticas em cromatina de uma linhagem celular de glioblastoma"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, "25 de Julho de 2023

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Camila Borges Martins de Oliveira**

RG n.º 43.927.951-3

Assinatura : _____

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

RG n.º 3.032.241