



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARINA BARRETO FELISBINO

**AÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E DA TRICOSTATINA A NA
ORGANIZAÇÃO CROMATÍNICA E SUA REGULAÇÃO POR FATORES
EPIGENÉTICOS EM CÉLULAS HEPG2 SOB CONDIÇÕES DE
HIPERGLICEMIA**

**EFFECTS OF VALPROIC ACID AND TRICHOSTATIN A ON CHROMATIN
ORGANIZATION AND ITS REGULATION BY EPIGENETIC FACTORS IN
HEPG2 CELLS GROWN UNDER HYPERGLYCEMIC CONDITIONS**

Campinas, 2016

MARINA BARRETO FELISBINO

**AÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E DA TRICOSTATINA A NA
ORGANIZAÇÃO CROMATÍNICA E SUA REGULAÇÃO POR FATORES
EPIGENÉTICOS EM CÉLULAS HEPG2 SOB CONDIÇÕES DE
HIPERGLICEMIA**

**EFFECTS OF VALPROIC ACID AND TRICHOSTATIN A ON CHROMATIN
ORGANIZATION AND ITS REGULATION BY EPIGENETIC FACTORS IN
HEPG2 CELLS GROWN UNDER HYPERGLYCEMIC CONDITIONS**

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

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

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARINA BARRETO FELISBINO, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

Campinas, 2016

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

F335a Felisbino, Marina Barreto, 1988-
Ação do ácido valproico e da tricostatina A na organização cromatínica e sua regulação por fatores epigenéticos em células HepG2 sob condições de hiperglicemia / Marina Barreto Felisbino. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effects of valproic acid and trichostatin A on chromatin organization and its regulation by epigenetic factors in HepG2 cell grown under hyperglycemic conditions

Palavras-chave em inglês:

Chromatin
Epigenetics
Hyperglycemia
Valproic acid
Hepatocytes

Área de concentração: Biologia Celular

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Maria Luiza Silveira Mello [Orientador]
Marcelo Emílio Beletti
Patricia Pasquali Parise Maltempo
Murilo Vieira Geraldo
Shirlei Maria Recco Pimentel

Data de defesa: 05-08-2016

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 5 de agosto.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Profa. Dra. Patricia Pasquali Parise Maltempi

Prof. Dr. Murilo Vieira Geraldo

Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel

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

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas”

(Louis Pasteur)

Agradecimentos

Agradeço à coragem que sempre me moveu ao longo dos anos e períodos mais desafiantes dessa jornada. A fonte dessa coragem teve vozes, olhares, letras ou mesmo silêncios diferentes e oportunos. A todos que possam ser materializados ou não eu agradeço.

A minha família - meus pais, avós, tios, os quais sempre me viram com olhos mais bondosos e orgulhosos que mesmo merecia. Que nunca questionaram minha capacidade e que, com tanta convicção, me deram razões para acreditar quando poderia duvidar.

Ao meu esposo Thiago, por ser meu sinônimo de cumplicidade, por andar lado a lado, me incentivar, me desafiar, me ensinar, me dar leveza, me dar conforto. Que sorte a minha de poder dividir o caminho com um companheiro tão acertado.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, que acreditou e confiou em meu trabalho e estimulou minha capacidade por todos esses anos. Que me trouxe ensinamentos valiosos sobre o que é ciência que levarei comigo por onde quer que eu passe e faça.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, pelo exemplo de perseverança e dedicação ao trabalho, pelos ensinamentos e lições.

Aos meus amigos, companheiros de laboratório que ajudam, dividem preocupações, emprestam materiais e conselhos; a ciência é feita em conjunto e sem vocês tudo seria um pouco mais complicado. Agradeço especialmente à Giovana M. Breda Veronezi, Eli Heber dos Anjos, Camila Borges, Jessica Bertol, Ana Lucia Soledade, Karin Rocha, Rodolfo Thomé, Rosaria Di Gangi, Thiago Alves da Costa, Rafaela Ribeiro.

Agradeço aos Professores que abriram as portas de seus laboratórios, permitindo-me usar equipamentos, infraestrutura, materiais, assim como partilharam um pouco do seu conhecimento e tempo para minha formação. Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, Profa. Dra. Liana Verinaud, Profa. Dra. Wirla M. S. C.

Tamashiro, Profa. Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel, Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel.

Ao Dr. Assam El-Osta, do Baker IDI Heart and Diabetes Institute, Melbourne, Austrália que me acolheu por 4 meses em um Estágio de Pesquisa no Exterior. Durante esse período, tive a oportunidade de aprender técnicas e métodos de análises, de estar em contato com culturas e formas de interpretação de problemas diferentes que foram fundamentais para meu crescimento profissional. Agradeço a toda sua equipe especialmente ao Dr. Mark Ziemann, Dr. Harikrishnan Kaipananicka, Dr. Jun Okabe, Dra. Ana Fernandez, Dr. Prabhu Mathiyalagan, Dra. Haloom Rafehi, Ishant Khurana, Hanah Rodríguez, Sameer Jadaan, Abdul Waheed Khan.

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

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida no primeiro semestre de doutorado, à FAPESP (2012/03238-5) pela bolsa de doutorado concedida nos demais períodos, assim como pela bolsa Bepe de Estágio de Pesquisa no Exterior (2014/10198-5). Ao CNPq e FAEPEX por auxílios financeiros relacionados a projetos do nosso laboratório.

Aos membros da Banca de Qualificação ao Doutorado Profa. Dra. Luciana Bolsoni Lourenço, Prof. Dr. Mateus Mondin, Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro pelas contribuições e observações que permitiram engrandecer a interpretação dos dados.

Aos Profs. Drs. membros desta Banca de Doutorado pelo tempo dispensado e contribuição à qualidade do trabalho.

Resumo

Diabetes é uma doença complexa com diversos fatores, entre os quais epigenéticos, afetando seu desenvolvimento. Uma estratégia potencial para reverter mudanças epigenéticas associadas a várias doenças é o uso de inibidores de deacetilases de histonas (HDACis). Tem sido relatado o papel de HDACi, como o ácido valproico (VPA) e a tricostatina A (TSA), na redução da glicose plasmática, na melhoria da resistência à insulina e na redução das complicações microvasculares tardias do diabetes, assim como no controle da gliconeogênese. Além disso, HDACis têm sido apontados como novos agentes imunomoduladores, uma vez que apresentam a habilidade de reduzir a severidade de doenças inflamatórias e autoimunes.

Tendo em vista que o fígado é um órgão fundamental para o metabolismo de glicose e lipídios, o presente estudo foi desenvolvido em células hepáticas HepG2, modelo usado em estudos do diabetes. Alterações na estrutura cromatínica associadas a mudanças em marcas epigenéticas e na expressão gênica foram avaliadas de maneira a se entender as consequências em larga escala da hiperglicemia, assim como da ação de HDACi nesse contexto.

O tratamento com VPA e TSA sob normoglicemia promoveu remodelação cromatínica em células HepG2, identificada através da análise de imagem e da abundância das marcas H3K9ac e H3K9me2. Além disso, constatou-se migração dos sinais de H3K9ac para a periferia nuclear, acompanhada de dissociação das proteínas HP1- α das regiões heterocromáticas e de aumento na frequência de células na fase G1 do ciclo celular. A própria exposição das células à hiperglicemia foi capaz de promover alterações cromatínicas e epigenéticas semelhantes às reportadas acima. Curiosamente, quando as células foram tratadas com VPA e TSA em ambiente hiperglicêmico, os resultados não foram intensificados. Entretanto, apesar da ausência de indução de alterações morfológicas, esses tratamentos trouxeram significado fisiológico, reduzindo a produção de glicose hepática.

Conclui-se que o nível de glicose do microambiente afete a maneira como a cromatina de hepatócitos responde aos HDACi e que essas respostas podem se dar mais em função dos domínios e genes diferencialmente regulados do que de uma remodelação global da cromatina. Nesse sentido, uma análise global dos genes potencialmente impactados pelo tratamento com VPA foi realizada por meio de RNA-seq, visando entender os mecanismos de ação que levam à melhora do estado hiperglicêmico. Através de análises bioinformáticas iniciais, foi associada a ação do VPA com a modulação do sistema complemento e de coagulação. Esses sistemas apresentam origens evolutivas comuns, e entender a comunicação entre essas vias tem implicações clínicas fundamentais no contexto de doenças inflamatórias. A rede de fatores de transcrição que regula a expressão gênica parece ser o ponto de conexão entre as vias metabólicas e do sistema imune; então, compreendê-la melhor, assim como decifrar os padrões de acetilação nesses genes, irá ajudar a completar essas conclusões. Até o momento, foi possível avaliar como a hiperglicemia influencia a textura cromatínica e sua regulação epigenética, assim como desvendar como os HDACis atuam nesse contexto, mitigando a hiperglicemia através da modulação de vias gênicas até então não descritas, o que pode vir a enriquecer as abordagens terapêuticas para o diabetes.

Abstract

Diabetes is a complex disorder involving several factors in its progression, among which those related with epigenetics control. A potential strategy to reverse epigenetic alterations associated with diseases is the use of histone deacetylase inhibitors (HDACis). HDACis, like valproic acid (VPA) and trichostatin A (TSA) have been reported to induce plasmatic glucose reduction, mitigation of insulin resistance and decrease in microvascular late complications, as well as involvement in gluconeogenesis control. Furthermore, HDACis have been revealed as potential immunomodulatory agents, because they are capable of reducing the severity of inflammatory and autoimmune diseases.

Given that the liver is a fundamental organ for lipid and glucose metabolism, this study was developed in the HepG2 hepatocyte cells model. Chromatin structure alterations associated with epigenetic and gene expression changes were evaluated aiming to understand the large-scale consequences of hyperglycemia, and the HDACi action on this context.

VPA and TSA treatments in HepG2 cells under normoglycemia promoted chromatin remodeling as assessed by image analysis and evaluation of H3K9ac and H3K9me2 abundance. Simultaneously, H3K9ac marks were found to shift to the nuclear periphery accompanied by HP1 dissociation from the heterochromatin and G1 cell cycle arrest. High glucose *per se* promoted chromatin and epigenetic changes similar to those described above. Interestingly, these results were not intensified in cells treated with HDACis under hyperglycemic conditions. Nonetheless, despite the absence of morphological changes being promoted, HDACi treatment seems to confer a physiological meaning, through reduction of glucose production.

These observations allow us to conclude that the microenvironmental glucose level affects how chromatin responds to HDACis and their action may be more concerned with chromatin domains affected and differently regulated genes not reflecting on global chromatin

remodeling. A genome-wide analysis of a multitude of genes potentially influenced by VPA was attempted through RNA-seq, aiming to understand its mechanisms of action on amelioration of the hyperglycemic state. Initial bioinformatics analysis has associated VPA action with complement and coagulation gene modulation. Indeed, complement and coagulation pathways have common evolutionary origins and understanding the crosstalk between these pathways has fundamental clinical implications in the context of inflammatory diseases. The transcription factor network controlling gene expression may be the connecting point between immune system and metabolic pathways and further investigation of these gene regulators as well of the acetylation pattern of gene promoters may better complement present conclusions. Until this moment, the hyperglycemia influence on chromatin texture and epigenetic regulation, as well as unraveling of a new mechanism of mitigation of hyperglycemia have been evaluated to be promoted by VPA, which might improve the therapeutic approaches for diabetes.

3C - *chromosome conformation capture*

5- Aza-CdR - 5-Aza-2-deoxicitidina

5-Aza-CR - 5-Azacidina

5caC - 5-carboxilcitosina

5fC - 5-formilcitosina

5hmC - 5-hidroximetilcitosina

5mC - 5-metilcitosina

Ψ - pseudouridina

ATRX - alfa-talassemia/retardo mental ligada ao X

CBP - proteína de ligação ao CREB

cDNAs - DNA complementar

ChIP - imunoprecipitação de cromatina

CpG - citosina-fosfato-guanina

CREB - *cyclic-AMP responsive-element-binding protein*

Ct - *cycle threshold value*

CTCF - *CCCTC-binding factor*

DNMTs - DNA metil transferases

FDR - *false discovery rate*

FXS - síndrome do cromossomo X frágil

GSEA - *gene set enrichment analysis*

GTF - *gene annotation file*

H3/H4ac – histona H3 e H4 acetilada

H3K4me – mono metilação na lisina 4 da histona H3

H3K4me2 - dimetilação na lisina 4 da histona H3

H3K4me3 - trimetilação na lisina 4 da histona H3

H3K9ac – acetilação na lisina 9 da histona H3

H3K9/14ac - acetilação na lisina 9 e 14 da histona H3

H3K9me - mono metilação na lisina 9 da histona H3

H3K9me2 - dimetilação na lisina 9 da histona H3

H3K9me3 - trimetilação na lisina 9 da histona H3

H3K27me - trimetilação na lisina 27 da histona H3

H3K36me3 - trimetilação na lisina 36 da histona H3

H3K79me3 - trimetilação na lisina 79 da histona H3

H4K16ac – acetilação na lisina 16 da histona H4

H4K20me3 - trimetilação na lisina 20 da histona H4

HAT - acetiltransferase de histona

HDAC - deacetilase de histona

HDACi - inibidor de HDACs

HepG2 - *human hepatocellular carcinoma*

HG - *hyperglycemic condition*

HGP - *hepatic glucose production*

Hi-C - *genome-wide chromosome conformation capture*

HNFs - *hepatic nuclear factors*

HP1 - *heterochromatin protein 1*

ICF - síndrome de imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais

LADs - domínios associados à lâmina nuclear

LG - *normoglycemic condition*

LSD1 - demetilase de histona lisina-específica 1

MDS - síndrome mielodisplásica

MDS - *multi-dimensional scaling* (gráficos)

MeCP2 - *methyl CpG-binding protein 2*

N¹mA - N¹ metiladenina

N⁶mA - N⁶ metiladenina

NGS - sequenciamento de nova geração

NOD - camundongos diabéticos não obesos

OD - *optical density*

Abreviaturas

PPAR γ - *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*

PPARGC1A - *PPAR γ coactivator 1 α*

RNAi - RNA de interferência

SDtd - *standard deviation of the gray average per nucleus*

SMC2 - *structural maintenance of chromosomes 2*

TADs - *topologically associated domains*

TETs - ten-eleven translocation

TFBS - *transcription factor binding sites*

TSA - tricostatina A

TSS - *transcriptional start sites*

VPA - ácido valproico

Introdução	
1. Cromatina	
Composição	16
Organização da cromatina interfásica.....	18
2. Epigenética	
Definição.....	24
Modificações químicas do DNA e do RNA.....	25
Modificações químicas das histonas.....	27
3- O componente epigenético de patologias	
Doenças determinadas por alterações epigenéticas.....	31
Diabetes.....	35
Impacto dos métodos de análise global do genoma e epigenoma na pesquisa de doenças.....	37
4- Uso de moduladores epigenéticos como novas terapias	
Terapia epigenética.....	39
Evidências e mecanismos de ação de inibidores de deacetilases de histonas no tratamento do diabetes.....	43
Objetivos.....	46
Capítulo I.....	47
Capítulo II.....	60
Discussão geral.....	79
Conclusões gerais.....	86
Referências bibliográficas.....	88
Anexos	
Resumo das outras atividades desenvolvidas ao longo do período.....	103
Declaração referente à bioética e biossegurança.....	107
Declaração referente aos direitos autorais.....	108

Introdução

1- Cromatina

Composição

Os elementos básicos que constituem a cromatina são DNA, proteínas histônicas e proteínas não-histônicas estruturais. Juntos os primeiros dois compostos formam um complexo, cuja unidade fundamental de repetição são os nucleossomos. Baseado em análises de cristalografia de raios X, concluiu-se que o *core* nucleossomal (nucleoide) consiste de um octâmero de histonas, no qual um tetrâmero de histonas H3-H4 se complexa a dois dímeros de histonas H2A-H2B (Kornberg, 1977; Luger et al., 1997). Ao redor desse octâmero, um conteúdo definido de DNA é enrolado (~147 pares de bases). O DNA de ligação (50-70 pares de bases), conjuntamente a histonas de ligação H1, interconecta as unidades nucleossomais dando origem à imagem clássica de “colar de contas” que constitui o nível primário de organização da cromatina.

Histonas, uma das proteínas de eucariotos mais conservadas evolutivamente, são proteínas básicas de massa molecular relativamente baixa. Sua classificação em H1, H2A, H2B, H3 e H4 foi feita com base no seu teor de lisina e arginina. Dessa forma, histonas H1 apresentam maior riqueza em lisinas que histonas H2A e H2B, enquanto histonas H3 e H4 são ricas em arginina (Elgin e Weintraub, 1975). As histonas H3, H4, H2A e H2B possuem caudas N-terminais que se projetam do nucleoide histona-DNA, sendo assim passíveis a interações e modificações químicas.

Elegantes experimentos desenvolvidos na década de 1970 demonstraram que níveis hierárquicos superiores de organização da cromatina eram mantidos mesmo após a depleção das histonas, provando que proteínas não-histônicas comporiam um arcabouço para organização da cromatina (Adolph et al., 1977; Paulson e Laemmli, 1977). Posteriormente, foram identificadas duas proteínas com alto peso molecular como os principais componentes

desse arcabouço, hoje constatadas como topoisomerase II e SMC2 (*structural maintenance of chromosomes 2*) (Earnshaw et al., 1985; Saitoh et al., 1994). Topoisomerases catalisam a condensação, replicação e segregação cromossômica, assim como reparo de DNA (Vos et al., 2011). SMC2 é um membro da família de proteínas ATPases SMC que formam complexos de subunidades proteicas chamados condensinas (Hirano et al., 1997). Topoisomerase II e SMCs se colocam como parte da rede de proteínas que estabilizam ligações de longo alcance entre segmentos cromossômicos (Maeshima e Laemmli, 2003).

Além das histonas e proteínas do arcabouço, outras proteínas também atuam na organização global da cromatina e no empacotamento diferencial dos nucleossomos de maneira a mantê-los fiéis durante a duplicação e segregação dos cromossomos. Entre elas, destacam-se as proteínas HP1 (*heterochromatin protein 1*) e CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Yu et al., 2016). As proteínas HP1 desempenham um papel fundamental na estrutura e função da heterocromatina (James e Elgin, 1986), enquanto a proteína CTCF é essencial para formação dos níveis hierárquicos superiores de organização da cromatina, facilitando o estabelecimento dos domínios topológicos (Ong e Corces, 2014).

Há ainda complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP, grandes maquinarias proteicas que interagem com o DNA e as histonas e alteram o posicionamento relativo dos nucleossomos em relação à fita de DNA (Langst e Manelyte, 2015).

Por mais constante que sejam as unidades nucleossomais, variações podem ser introduzidas aos nucleossomos através de diversos mecanismos como modificações pós-traducionais das histonas (adição de grupamentos químicos como metil e acetil principalmente às caudas N-terminais), introdução de histonas variantes (subtipos de histonas que diferem das formas originais na sequência primária) e remodeladores cromatínicos (alteração dos contatos DNA-histona por reações dirigidas por ATP) (Jenuwein e Allis, 2001; Kouzarides, 2007). Dessa forma, embora constância possa ser a característica primária em

relação aos nucleossomos, a introdução cuidadosa de variações pode exemplificar como a estrutura da cromatina impacta funcionalmente as células (Allis e Muir, 2011).

Organização da cromatina interfásica

Uma das questões mais antigas da biologia celular é como o DNA se organiza tridimensionalmente no núcleo e como isso afeta a maneira como a célula acessa, lê e interpreta as informações genéticas (Dekker et al., 2013). Avanços tecnológicos estão agora ajudando a identificar a relação espacial e a interação entre genes e elementos regulatórios, assim como a extensiva rede de comunicação inter e intracromossomal. Ainda se busca entender se essa organização afeta a função gênica, ao invés de apenas refleti-la (Fraser e Bickmore, 2007).

Nos núcleos de eucariotos a forma mais óbvia de organização estrutural do genoma é a compartimentalização em eucromatina e heterocromatina. Tão logo os métodos de coloração e imagem da cromatina foram estabelecidos, essa organização começou a ser descrita. Em 1928, Emil Heitz observou dois tipos de cromatina no núcleo de briófitas em função da diferença de colorabilidade associada à compactação no núcleo interfásico (Heitz, 1928; Pueschel et al., 2016). Tais estudos demonstraram que a cromatina de partes específicas de certos cromossomos permanecia condensada durante a intérfase, retendo as propriedades de colorabilidade intensa, características de cromossomos metafásicos. A cromatina que apresentava esse comportamento foi então denominada heterocromatina, em contraposição à cromatina que se apresentava difusa, não compactada, durante a intérfase, denominada eucromatina (Heitz, 1928; Mello, 1978). Embora não se houvesse conhecimento sobre a natureza molecular da cromatina naquele momento, Heitz previu que os diferentes estados da cromatina observados poderiam se relacionar a diferentes domínios funcionais do núcleo, sendo eucromatina o domínio ativo e a heterocromatina o passivo (Zacharias, 1995). Em

1960, as regiões descritas através de microscopia como eucromatina e heterocromatina foram purificadas e bioquimicamente analisadas a partir de núcleos de linfócitos. Foi identificado que, embora a maior parte do DNA fosse contida na fração de heterocromatina, a maior quantidade de síntese de RNA era realizada na fração de eucromatina (Frenster et al., 1963), fornecendo-se assim provas moleculares da hipótese inicial de Heitz.

A heterocromatina é formada e mantida em função de diferentes condições como a posição cromossomal, a localização nuclear e a presença e densidade de elementos repetitivos de DNA (Huisinga et al., 2006). Há regiões, geralmente consideradas não codificadoras, que permanecem condensadas independente da fase do ciclo celular e estado fisiológico da célula e são denominadas heterocromatina constitutiva. Tais regiões contêm alta densidade de DNA repetitivo como por exemplo as que constituem os centrômeros e telômeros. No entanto, a heterocromatina pode ser também encontrada em locais onde o estado da cromatina se altera em resposta a sinais celulares e atividade gênica. Neste caso é denominada heterocromatina facultativa (Mello, 1978; Grewal e Jia, 2007), podendo ser encontrada intercalada ao longo dos braços cromossômicos, em um lote cromossômico inteiro como em insetos *mealybugs* (Bongiorni et al., 2001) ou mesmo afetar um cromossomo inteiro como no caso do cromossomo X de mamíferos placentários.

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

Há diferentes marcadores bioquímicos associados à cromatina que são importantes na distinção entre seus dois estados funcionais, o que poderia responder à antiga questão do que

faz a heterocromatina ser heterocromatina. Conforme demonstrado na tabela 1, há uma série de fatores implicados na formação da heterocromatina. Dentre eles, alguns estão associados a apenas alguns organismo estudados, outros fatores apresentam um papel controverso (Huisinga et al., 2006).

Tabela 1. Fatores implicados na formação da heterocromatina

Componente	<i>S. pombe</i>	<i>Neurospora</i>	<i>Drosophila</i>	Camundongo
DNA repetitivo				
Metilação de DNA				
Metilação de H3K9				
HP1				
Pequenos RNA				
Pol II				
RPD				

Diferentes cores indicam se o fator é implicado no papel de formação da cromatina no determinado organismo. Verde, sim. Vermelho, não. Roxo, o organismo tem o fator, mas aparentemente este não tem um papel na formação da heterocromatina. Azul, o organismo tem o fator, mas não se sabe se tem um papel na formação da heterocromatina. *Neurospora*, *Neurospora crassa*; Pol II, RNA polimerase II; RPD, RNA polimerase de dependente de RNA. (Tabela adaptada de Huisinga et al., 2006; Grewal e Jia, 2007)

Eucariotos toleram grandes quantidades de sequências repetitivas em seus genomas devido à evolução de mecanismos utilizados para seu silenciamento. Enquanto alguns metazoários possuem algumas especificidades, como utilizar metilação de DNA, outros utilizam RNA polimerase dependente de RNA como parte da maquinaria de RNA de interferência (RNAi) (Huisinga et al., 2006). Entretanto, metilação da histona H3 na lisina (K) 9 (H3K9me) e seu reconhecimento pela proteína HP1 parece ser um mecanismo comum entre diversos organismos (Tabela 1) (Grewal e Jia, 2007) (vide informações no artigo anexo Histone epigenetic marks in heterochromatin and euchromatin of the Chagas' disease vector, *Triatoma infestans*). Os elementos de DNA repetitivo e RNA não codificante parecem apresentar um papel no direcionamento dos complexos bioquímicos heterocromáticos aos

domínios cromossômicos específicos (Henikoff, 2000). O sistema de RNAi gera pequenos RNAs tendo como alvos as regiões cromatínicas com DNA repetitivo, envolvendo ainda proteína HP1 e H3K9 metiltransferases.

Uma das características mais comuns em diversos tipos celulares é a presença de heterocromatina na periferia nuclear em contato com a lâmina nuclear - uma densa rede de filamentos intermediários (Towbin et al., 2009). Estudos por microscopia de fluorescência demonstraram que genes silentes tendem a serem encontrados na periferia nuclear. Porém, embora a cromatina na periferia nuclear seja em geral transcricionalmente repressa, uma localização perinuclear por si só não é repressiva para todos os genes. Dessa forma, a lâmina nuclear seria um arcabouço para ancorar cromatina silente, ao invés de ativamente reprimir a transcrição (Pueschel et al., 2016).

Graças a novas tecnologias, as sequências genômicas associadas à lâmina nuclear vêm sendo descritas (Pickersgill et al., 2006; Guelen et al., 2008). Elas são organizadas em grandes domínios associados à lâmina nuclear (LADs), de tamanho variando entre 0.1 e 10 megabases. LADs, em concordância com seu aspecto heterocromático, são predominantemente pobres em genes, transcricionalmente silentes, e apresentam replicação tardia de DNA. Além disso, são enriquecidas em modificações de histonas de silenciamento e destituídas de marcas de ativação (Pueschel et al., 2016).

O mapeamento global da estrutura e da organização 3D dos genomas pode ser realizado através da aplicação de abordagens moleculares como *chromosome conformation capture* (3C). Essa técnica desenvolvida por Dekker e colaboradores (2002) é baseada na premissa de que interações entre regiões próximas da cromatina são mais propensas a serem captadas por *cross-linking* do que entre regiões distantes e que a frequência de contato em uma população celular a um dado momento reflete como a cromatina é organizada no núcleo de cada célula. A arquitetura genômica pode ser estimada com esse tipo de informação

considerando-se que a frequência de contato é inversamente proporcional à distância física. Avanços recentes nesse tipo de abordagem oferecem a possibilidade de explorar o estado de empacotamento de um genoma inteiro e inclusive prever como complexos moleculares governam sua forma (Fraser et al., 2015). Entre essas tecnologias, a metodologia Hi-C fornece a mais completa visão das interações cromatínicas ao longo do genoma (Lieberman-Aiden et al., 2009; Rao et al., 2014). Essa metodologia, também chamada de “*genome-wide chromosome conformation capture*”, usa sequenciamento de alto desempenho para quantificar diretamente os produtos da ligação de proximidade em bibliotecas de contato e portanto pode ser usada para prever a organização espacial de um genoma inteiro. Essas inovações ajudaram a desvendar a organização do genoma, resultando em uma expansão sem precedentes do conhecimentos dos detalhes da topologia cromatínica e da regulação gênica (Yu et al., 2016).

Mapas de alta resolução obtidos por tecnologias C revelaram que os cromossomos são organizados em compartimentos que se sobrepõem. Os grandes compartimentos A e B podem ser divididos em domínios de contato de 0.1 a 10 megabases, denominados megadomínios. Estes, por sua vez, são organizados em grupamentos menores, de tamanho médio 185 kb, os *topologically associated domains* (TADs). A principal característica das sequências dos TADs é que elas apresentam maior frequência de contato entre si do que com as sequências de TADs vizinhos (fenômeno conhecido como insulação). Em mamíferos, TADs são evolutivamente conservados e presentes em regiões parálogas no genoma de camundongos e humanos (Dixon et al., 2012; Rao et al., 2014), levando-se a questionar seu mecanismo de formação e sua possível função biológica.

Há evidências de que o mecanismo de formação de TADs poderia se dar em função do conjunto de interações intra-TADs ou ainda da criação de bordas que limitariam as interações entre diferentes TADs. Em moscas, camundongos e humanos, CTCF e coesinas são os principais componentes encontrados nas bordas de TADs. Evidências recentes apontam o

papel dessas proteínas na formação de *loops*, os quais frequentemente conectam promotores a *enhancers*, sendo correlacionados com ativação gênica (Rao et al., 2014). Experimentos de depleção de CTCF ou de coesina mostraram ainda diminuição dos contatos intra-TAD e aumento dos contatos inter-TAD levando a uma borda dos domínios menos definida, provando que ambos os mecanismos são essenciais para formação de TADs (Seitan et al., 2013; Sofueva et al., 2013; Zuin et al., 2014).

O fato de que TADs são observados em quase todos os organismos investigados levou a se questionar se essas estruturas seriam unidades funcionais do genoma ou apenas uma consequência física da natureza nucleoproteica estrutural da cromatina. Um estudo sobre mutações que levam à má formação das mãos em humanos respondeu parte dessa questão. Lupiáñez e colaboradores (2015) mostraram que tal fenótipo de má formação estaria associado a grandes deleções, inversões e duplicações que quebram a estrutura de TADs, principalmente em seus limites, colocando genes próximos a *enhancers* que naturalmente não iriam interagir. Por outro lado, deleções de mesmo tamanho, mas que não atingem as bordas de TADs, são bem toleradas. Dessa forma, a presença de genes no TAD correto parece ser essencial para seu correto padrão de expressão, uma vez que restringe o número de *enhancers* ao qual um determinado promotor gênico possa interagir.

Há uma aparente contradição entre a alta variabilidade na distribuição de euromatina e heterocromatina observada com técnicas de microscopias e a alta conservação dos TADs identificados entre diferentes tipos celulares usando-se Hi-C. Isso pode ser explicado em parte pelo fato de que, embora os TADs sejam estruturas estáveis, mudanças em sua natureza epigenética podem impactar os tipos de contatos estabelecidos com outros TADs no genoma, alterando os compartimentos A e B que variam bastante entre tipos celulares diferentes (Dixon et al., 2015). Ainda não se sabe o exato mecanismo biológico que leva ao *cluster* entre TADs, mas se acredita que haja relação com similaridade de marcações epigenéticas da

cromatina (Jost et al., 2014). A formação desses *clusters* ajudaria a estabilizar o programa de expressão gênica, no qual regiões genômicas silentes estariam juntas a outros domínios silentes e regiões ativas teriam vizinhos ativos, resultando num mecanismo de auto-reforço, que lembra o conceito de “fábricas de transcrição” descrito no passado (Osborne et al., 2004; Meister e Taddei, 2013; Puschel et al., 2016).

2. Epigenética

Definição

O termo epigenética foi originalmente utilizado por Conrad Waddington que o definiu como "um ramo da biologia que estuda as interações causais entre os genes e seus produtos, os quais trazem o fenótipo para o ser" (Waddington, 1942). Por outro lado, Riggs e colaboradores (1996) deram a esse termo outro significado, “o estudo de mudanças herdáveis por mitose e/ou meiose na função dos genes que não podem ser explicadas por mudanças na sequência de DNA (Russo et al., 1996). Essa é a definição padrão, utilizada desde então, e presente nos livros didáticos. Ela fala sobre herança, assim como fala o que a epigenética não é (mutação gênica), deixando espaço para a inserção dos mecanismos que comporiam esse termo (Bird, 2007).

Uma terceira definição informal, mas muito usada entre a comunidade científica é a de que epigenética seria o estudo da biologia da cromatina, incluindo a complexa linguagem das modificações de histonas, os efeitos transcricionais do RNAi e os efeitos da organização tridimensional do genoma no núcleo (Bird, 2007). Essa é uma versão mais interessante, pois engloba os fenômenos biológicos contemporâneos mais estudados, entretanto falha quanto à questão da herança já que muitas marcas cromatínicas podem apresentar vida curta. Independente da definição mais adequada, abaixo se encontram descritos os fenômenos mais pesquisados que se enquadram nesse campo de estudo.

Modificações químicas do DNA e do RNA

A metilação do DNA é uma das principais e mais bem estudadas modificações epigenéticas que ocorrem no genoma. Fundamental para o controle da expressão gênica e da estrutura cromatínica em células de mamíferos, consiste na adição de um grupamento metil na posição 5 de uma base nitrogenada citosina presente em uma sequência de dinucleotídeos CpG (citosina-fosfato-guanina). Tal processo resulta na formação de 5-metilcitosina (5mC) e é catalisado por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Reik et al., 2001).

DNMTs de manutenção (DNMT1) adicionam grupos metil em DNA hemi-metilados durante a replicação, sendo fundamentais para o processo de herança do padrão de metilação. DNMTs (DNMT3a e DNMT3b) *de novo* adicionam grupos metil em sítios não anteriormente metilados, o que ocorre principalmente em momentos-chave do desenvolvimento embrionário (exceto nos genes que sofrem *imprint*) (Groth et al., 2007).

Embora bastante estável, a metilação do DNA é uma modificação reversível, sendo a remoção de grupos metil catalisada por mecanismos possivelmente relacionados à via das proteínas “Ten-Eleven Translocation” (TETs). Essas enzimas promovem a conversão de 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), que então passará por oxidações adicionais resultando na formação de 5-formilcitosina (5fC), 5-carboxilcitosina (5caC) e, ao final, retorno ao estado de citosina (Guo et al., 2011). Apesar de melhor compreendida, até pouco tempo a reversibilidade, assim como a existência de enzimas demetilases eram bastante questionadas (Bhattacharya et al., 1999; Guo et al., 2011).

A metilação do DNA tem um papel fundamental em muitos processos celulares como na regulação gênica e organização da cromatina durante a embriogênese e a gametogênese (inativação do cromossomo X de fêmeas de mamíferos placentários, *imprinting* em mamíferos) (Fagundes et al., 2011) e silenciamento de sequências repetitivas e centroméricas de fungos a mamíferos, sendo considerado um mecanismo de defesa do genoma hospedeiro

contra sequências externas (Yang e Kuroda, 2007). Além disso, como descrito anteriormente, a formação da heterocromatina em muitos organismos é mediada pela metilação do DNA e suas proteínas de ligação, em combinação com modificações em histonas e RNA de interferência (Zaratiegui et al., 2007).

Além da clássica metilação de DNA em citosinas (5mC) e dos recém-descobertos intermediários do seu processo de demetilação (5hmC, 5fC, 5caC), uma outra marca foi identificada nos últimos meses no DNA de mamíferos, a N⁶ metiladenina (N⁶mA) (Wu et al., 2016). N⁶mA está presente predominantemente em procariotos, mas foi recentemente descrita também nos eucariotos *Drosophila melanogaster* (Zhang et al., 2015), *Caenorhabditis elegans* (Greer et al., 2015) e na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Fu et al., 2015). Em todos esses trabalhos essa marca está associada à ativação gênica. Wu e colaboradores (2016) identificaram N⁶mA em células-tronco embrionárias de camundongos e sua respectiva demetilase, assim como revelaram uma nova ação envolvendo repressão gênica.

Algumas décadas após a primeira observação de N⁶mA como um abundante constituinte do transcriptoma de eucariotos, agora finalmente se entende seu importante papel no metabolismo de mRNA (Meyer et al., 2012). Uma melhor concepção da importância de modificações químicas do mRNA como pseudouridina (Ψ) (Li et al., 2015), 5mC (Squires et al., 2012) e N¹ metiladenina (N¹mA) (Dominissini et al., 2016) tem surgido, mostrando que a expressão gênica pode ser regulada pós-transcricionalmente através de modificações de RNA dinâmicas e reversíveis. Dessa forma, o RNA se junta ao DNA e às proteínas como sendo sujeito ao controle por modificações químicas; entretanto, só agora estas começam a ser entendidas e sua consequência determinada (Dominissini et al., 2016).

O papel do RNA na regulação epigenética da expressão gênica pode se dar ainda na forma de RNAi. Este mecanismo foi primeiramente descrito como uma maquinaria de silenciamento pós-transcricional no qual RNAs dupla fita desencadeariam a destruição de

RNAs cognatos (Fire et al., 1998). Estudos subsequentes implicaram o mecanismo de RNAi em diversas outras funções celulares, como com o descobrimento do complexo de silenciamento transcricional RITS, que contém uma proteína de associação à cromatina, assim como proteína associada à RNAi, sendo fundamental para o controle da expressão gênica (Verdel et al., 2004).

Modificações químicas das histonas

Após a descoberta da estrutura do nucleossomo por Kornberg e Thomas (1974), entre as informações estruturais importantes, o entendimento da extensão da cauda amino terminal das histonas que se projeta do octâmero tornava evidente a sua acessibilidade a modificações. A partir de 1980, Grunstein e colaboradores (Wallis et al., 1980, Durrin et al., 1991) conseguiram provar que as caudas amino terminais das histonas são essenciais para a regulação gênica e para o silenciamento de domínios de cromatina. Desde então, novas modificações de histonas têm sido identificadas, assim como tem-se reavaliado o papel daquelas previamente conhecidas (Allis et al., 2007).

Tais modificações pós-traducionais são adicionadas e removidas graças à catalisação de enzimas (conhecidas como “*writers*” e “*erasers*” respectivamente), assim como são reconhecidas por proteínas de ligação à cromatina (“*readers*”) (Yu et al., 2016). Embora as caudas amino terminais sejam o maior repositório de modificações, os domínios globulares podem sofrer também modificações que afetam as interações DNA-histona intranucleossomais (Tropberger e Schneider, 2013). Metilação e acetilação são as formas de modificações pós-traducionais das histonas mais investigadas; entretanto, um número grande de modificações covalentes existe como fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, citrulinação, propionilação, glicosilação e n-nitrosação (Burgess e Zhang, 2010).

Histonas são metiladas predominantemente em resíduos de lisina (K) e arginina (R). Essa marcação reversível pode estar relacionada à ativação ou repressão gênica, dependendo do local e do número de resíduos adicionados, que variam de um a três. Por exemplo, trimetilação de H3K4, H3K36 e H3K79 em geral está associada à eucromatina e atividade gênica, ao passo que trimetilação de H3K9, H3K27 e H4K20 são marcas associadas à heterocromatina e repressão gênica (Peterson e Laniel, 2004). A ação da metilação não se dá pelos rompimento dos contatos nucleossomais através da alteração da carga dos resíduos, mas por meio da ligação de proteínas efetoras que possuem domínios especializados que facilitam o reconhecimento e a ligação a tais marcas, promovendo efeitos *downstream*. Os domínios caracterizados por reconhecer e se ligar a resíduos metilados são cromodomínios, domínios tudor, *PHD fingers*, domínios MBT, entre outros (Gardner et al., 2011).

A acetilação de histonas, que ocorre principalmente em resíduos de lisina, afeta muitas propriedades fisiológicas dos nucleossomos, neutralizando a carga positiva das histonas, o que reduz sua interação com o DNA e a auto-associação. Dessa forma, esta marca está normalmente associada com domínios ativos de cromatina ou regiões que são geralmente permissivas à transcrição. As enzimas responsáveis pela adição de grupos acetil em resíduos de lisinas são chamadas acetiltransferases de histonas (HATs) e as responsáveis por sua remoção são conhecidas como deacetilases de histonas (HDACs) (Kleff et al., 1995).

HATs e HDACs atuam de maneira antagônica no equilíbrio da acetilação das histonas. As HATs catalisam a transferência do resíduo acetil oriundo de um acetil-CoA a um grupo amino presente nas histonas e são classificadas em dois grupos, HAT A e HAT B, de acordo com o mecanismo de catálise e a localização celular. Os membros da família HAT A são encontrados no núcleo, onde catalisam a adição após associação da histona ao nucleossomo. HAT B atuam no citoplasma, transferindo o grupo acetil a histonas livres, antes de sua deposição nos nucleossomos (Peserico e Simone, 2010). As HDACs identificadas em

humanos são subdivididas em quatro classes, baseadas nas suas homologias com HDACs de leveduras, localização celular e atividade enzimática (Lagace et al., 2004). As classes I, II e IV são relacionadas às proteínas de levedura Rpd3, HAd1 e Hos3 respectivamente e se enquadram na família clássica de HDACs dependentes de zinco. As classes I e II apresentam localização generalizada, entre núcleo e citoplasma, enquanto a classe IV é encontrada apenas no núcleo. A classe III é NAD⁺ dependente e homóloga à proteína Sir2 de leveduras, correspondendo à família das sirtuínas. Alguns representantes apresentam exclusivamente localização nuclear, citoplasmática ou mitocondrial (Peserico e Simone, 2010). Proteínas não histônicas, como as que contêm bromodomínios, reconhecem as marcas acetil e agem como efectoras (Ferri et al., 2016).

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

A incorporação de histonas variantes especializadas provem a célula com ferramentas adicionais para introduzir variação estrutural e funcional na cromatina. Elas são isoformas das histonas canônicas e, diferente destas, apresentam nível menor de expressão, em geral independente da replicação da cromatina (Osley, 1991). Há 11 variantes da histona de ligação H1 que exibem padrões de expressão que se alteram durante a diferenciação, desenvolvimento e progressão de doenças. Entre as histonas que compõe o *core* nucleossomal, variantes ocorrem principalmente em H3 e H2A, ao passo que H4 e H2B são geralmente invariáveis (Kamakaka e Biggins, 2005). Histonas H2A têm o maior espectro de

variantes e sua incorporação altera a estabilidade e dinâmica dos nucleossomos. Entre as variantes, H2A.X é localizada em sítios de cromossomos frágeis e parece recrutar proteínas de reparo em resposta a danos no DNA (Szilard et al., 2010). Histonas H3 apresentam 6 variantes; entre elas CENP-A é a mais conhecida. É incorporada nos centrômeros, sendo crucial para determinar seu posicionamento e a correta segregação cromossômica (Filipescu et al., 2014). Complexos remodeladores da cromatina, dependentes de ATP, modificam a acessibilidade da cromatina, alterando as interações histona-DNA e permitindo a introdução de histonas variantes no nucleóide nucleossomal com o auxílio de proteínas chaperonas (Polo e Almouzni, 2006; Allis e Muir, 2011).

A grande variabilidade de modificações, assim como o fato de uma modificação não ser invariavelmente traduzida em uma consequência biológica específica, mas a combinação e o acúmulo de modificações, revelam a limitação do conceito de "código de histonas". O termo código se refere a combinações definidas que levem a produtos absolutos, não sendo o caso das modificações de histonas. Dessa forma, autores discutem que esse conceito deva ser revisto e evoluir (Gardner et al., 2011; Yu et al., 2016). Para isso, o uso de novas ferramentas como a tecnologia de edição do genoma CRISPR-Cas9 (Jinek et al., 2012; Doudna e Charpentier, 2014) foi recentemente adaptada para a avaliação de marcas epigenéticas, oferecendo uma boa estratégia. Gersbach, Reddy e colaboradores acoplaram uma proteína Cas9 inativada a uma enzima acetiltransferase de histonas p300 visando controlar, de maneira precisa, a ação dessa enzima e interrogar a relação entre a marca epigenética e o controle transcricional. A fusão da enzima catalisou a acetilação de H3K27 nos sítios alvos do direcionamento, levando a um robusto aumento da atividade dos genes nos quais a marca inseriu-se em seus promotores ou *enhancers* (Hilton et al., 2015). Esses resultados finalmente comprovaram que a acetilação das histonas pode ser a causa direta da ativação gênica, uma vez que há muita controvérsia sobre quanto dessas marcas epigenéticas seria a causa de

alterações gênicas e quanto apenas efeitos de tais alterações, podendo ambos os conceitos estarem corretos. Dessa forma, a simplicidade e versatilidade da tecnologia CRISPR–Cas9 pode dar oportunidade para se lançar esses tipos de investigações em larga escala e futuramente se atingir tal nível de entendimento.

3- O componente epigenético de patologias

Doenças determinadas por alterações epigenéticas

Modificações epigenéticas atuam em conjunto com mecanismos genéticos visando regular a atividade transcricional em tecidos normais e estão frequentemente desreguladas quando do desenvolvimento de doenças (Egger et al., 2004). Aberrações epigenéticas normalmente precedem o desenvolvimento de doenças, sendo portanto valiosos indicadores de diagnóstico de fator de risco para o aparecimento de determinada patologia ou indicadores de prognóstico na progressão de doenças (Kelly et al., 2010). Na tabela 2, reúnem-se exemplos de doenças determinadas por aberrações epigenéticas.

Tabela 2. Exemplos selecionados de alterações epigenéticas associadas a doenças

Marca epigenética	Doença	Alteração epigenética	Comentários	Referência
Metilação de DNA	Câncer	Hipometilação global, hipermetilação de alguns promotores de ilhas CpG		Jones e Baylin, 2007 Villeneuve e Natarajan, 2010
	Diabetes	Hipermetilação do promotor de PPARGC1A		
	Lupus eritematoso sistêmico	Hipometilação de alguns promotores de ilhas CpG	Diminuição da expressão de DNMT1 e DNMT3B	Javierre et al., 2010
	Síndrome ATR-X	Hipometilação de sequências repetitivas e satélites	Mutação de ATRX	Urduinguio et al., 2009
	Síndrome ICF	Hipometilação de sítios específicos	Mutação de DNMT3B	Feng e Fan, 2009
	Síndrome de Rett	Inabilidade de "Ier" metilação de DNA	Mutação MeCp2	Urduinguio et al., 2009
Acetilação de histonas	Asma	Hiperacetilação	Aumento da atividade de HAT e diminuição da atividade de HDAC	Adcock et al., 2005
	Câncer	Perda de H4K16ac		Jones e Baylin, 2007 Villeneuve e Natarajan, 2010
	Diabetes	Hiperacetilação nos promotores de genes inflamatórios	Mutação do gene que codifica CBP, um conhecido HAT	Feng e Fan, 2009
	Síndrome de Rubinstein-Taybi	Hipoacetilação		
Metilação de histonas	Câncer	Perda de H4K20me3	Hipometilação de sequências de DNA repetitivo	Jones e Baylin, 2007
	Doença de Huntington	Aumento de H3K9me3 e possível aumento de H3K27me3	Aumento na expressão de HMT ESET e aumento na atividade de PRC2	Urduinguio et al., 2009
	Síndrome de Sotos	Diminuição de H4K20me3 e H3K36me3	Perda de função de NSD1, uma HMT	Berdasco et al., 2009

ATR-X, alfa-talassemia ligada ao X; HAT, acetiltransferase de histona; HDM, demetilase de histona; HMT, metiltransferase de histona; ICF, imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais; ac, acetilação; me3, trimetilação. Modificado de Kelly et al., 2010.

Algumas patologias, conhecidas como doenças epigenéticas monogênicas, têm o aparecimento determinado por distúrbios na expressão de genes epigeneticamente regulados, como genes *imprinted* ou ainda por mutações em enzimas fundamentais na adição ou remoção de marcas epigenéticas. Para esses casos, tem-se relativo conhecimento da patogênese dessas doenças e de mecanismo envolvidos em sua determinação (Feinberg, 2007).

Um exemplo desse caso é a síndrome de Beckwith–Wiedemann, cujo estudo foi fundamental para o entendimento do processo normal de *imprinting*. Pacientes com tal síndrome apresentam ruptura de um ou de ambos subdomínios *imprinted* na região 11p15. O primeiro subdomínio, H19/IGF2, é metilado no alelo paterno, sendo o alelo materno expresso. O segundo subdomínio que inclui p57^{KIP2}, TSSC3, SLC22A1, KvLQT1 e LIT1 é normalmente metilado no alelo materno, mas não no paterno. Em pacientes portadores da síndrome, microdeleções em cada subdomínio promovem aberrações na metilação dos alelos e perda da regulação normal dos genes *imprinted* (Niemitz et al., 2004; Sparago et al., 2004).

A outra classe de doenças epigenéticas monogênicas envolve genes que codificam componentes da maquinaria enzimática que regula o epigenoma. A Síndrome de Rett está relacionada à mutação do gene que codifica a proteína MeCP2 (*methyl CpG-binding protein 2*), a qual se liga a sequências de DNA metilado (Bienvenu e Chelly, 2006). Nessa síndrome, caracterizada por problemas no neurodesenvolvimento, o DNA é normalmente metilado, porém o silenciamento epigenético é prejudicado pela falha no reconhecimento dessa marca. A síndrome ICF (síndrome de imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais) envolve a mutação do gene que codifica a enzima DNA metiltransferase DNMT3B, que é responsável por metilações *de novo* durante o desenvolvimento. Pacientes com essa síndrome apresentam falha no desenvolvimento do sistema imune, uma vez que DNMT3B tem um papel no silenciamento gênico e reativação da imunoglobulina e pode estar

relacionada à falha na formação da heterocromatina (Blanco-Betancourt et al., 2004). A síndrome da alfa-talassemia/retardo mental ligada ao X (ATRX) é determinada pela mutação do gene que codifica uma helicase envolvida na remodelação cromatínica que leva a defeitos psicomotores, urogenitais e no desenvolvimento hematopoético, com defeitos na maturação de precursores de eritrócitos, lembrando a alfa-talassemia (Gibbons e Higgs, 2000). Por fim, a síndrome de Rubinstein–Taybi envolve a mutação da proteína de ligação ao CREB (*cyclic-AMP responsive-element-binding protein*) CBP, que tem atividade de acetiltransferase de histona. Mutações em CBP levam à má formação esquelética e cardíaca, assim como do neurodesenvolvimento, com perda de plasticidade neural (Petrif et al., 2002).

Há ainda doenças complexas, em que aberrações epigenéticas estão envolvidas na sua determinação, porém diversos mecanismos parecem atuar na sua patogênese e existem apenas alguns indícios de como isso ocorra, sendo necessárias maiores investigações. Dentre elas destacam-se o câncer, doenças auto-imunes e neurodegenerativas e o diabetes.

Células cancerígenas são caracterizadas pela perda global de metilação de DNA (20-60% menos 5-mC), ao passo que hipermetilação de DNA é observada em certos promotores de ilhas CpG. Além disso, há redução global de H4K16ac, mediada por HDACs, as quais estão superexpressas ou mutadas em diferentes tipos de tumores. Células tumorais podem ter ainda perda global de marcas de ativação como H3K4me3 (Hamamoto et al., 2004) e ganho de marcas repressivas como H3K9me (Kondo et al., 2007) e H3K27me3 (Vire et al., 2006), devido a expressão aberrante das enzimas metiltransferase e demetilase de histonas (Portela e Esteller, 2010). A hipometilação global de DNA ocorre principalmente em sequências repetitivas, promovendo instabilidade cromossômica, translocações, ruptura de genes e reativação de sequências endoparasitas, o que é observado em tumores de mama, fígado, bexiga e pulmão (Goelz et al., 1985; Gaudet et al., 2003). Hipometilação de promotores específicos pode ativar a expressão de oncogenes e induzir perda de *imprinting* em alguns

loci. Exemplos de genes hipometilados bem estudados no desenvolvimento de tumores são: S100P em câncer pancreático, SNCG em câncer de mama e ovário, e MAGE e DPP6 em melanomas (Wilson et al., 2007). Por outro lado, a repressão transcricional causada por hipermetilação de promotores em ilhas CpG afeta genes envolvidos nas principais vias celulares: reparo de DNA, controle do ciclo celular, via da p53 e apoptose, entre outras (Esteller, 2007). Tais promotores hipermetilados tem sido propostos como uma nova geração de marcadores para diagnóstico e prognóstico da doença (Portela e Esteller, 2010). De fato, modificações epigenéticas vêm sendo usadas para estratificar os subtipos dessa doença, assim como sua severidade e a responsividade a tratamentos. Acetilação de H3 e dimetilação de H3K9 permitem discriminar entre tecidos prostáticos cancerosos e não malignos e trimetilação de H3K4 pode prever a recorrência de doença após prostactemia (Kelly et al., 2010).

Em doenças autoimunes, como é o caso de lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, é comum observar hipometilação global de DNA (Javierre et al., 2010). Os padrões de metilação de DNA parecem também ser bastante alterados em doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Alzheimer em que o promotor do gene NEP, também conhecido como MME, é hipermetilado, assim como do gene SMN2 na atrofia muscular espinhal (Urduíngio et al., 2009). Por outro lado, sítios de hipometilação de DNA foram reportados nos promotores de TNF α que são superexpressos na substância negra de pacientes com doença de Parkinson, levando à apoptose de células neuronais (Pieper et al., 2008). Hipometilação de DNA também foi reportado no promotor do gene PADI2 em pacientes com esclerose múltipla (Urduíngio et al., 2009). Quanta às modificações das histonas, doenças neurológicas são associadas à hipoacetilação global, assim como aumento de trimetilação de H3K9 foi descrito na doença de Huntington (Portela e Esteller, 2010).

Diabetes

O diabetes mellitus designa um grupo de doenças crônicas no qual a falta relativa ou absoluta de insulina leva a aberrações no metabolismo dos seus substratos, gerando complicações agudas e tardias. Embora sua marca clínica e diagnóstica seja o elevado nível de glicose sanguínea, o distúrbio metabólico do diabetes não está limitado apenas à glicose, envolvendo também o metabolismo de proteínas e lipídios (Christensen et al., 2011). Diabetes mellitus do tipo 1 e diabetes mellitus do tipo 2 constituem as duas principais formas da doença; entretanto, com respeito à patologia, a estrita dicotomia entre elas é uma simplificação. Há, cada vez mais, o reconhecimento de que as duas formas possam representar extremos de espectro contínuo, com destruição das células pancreáticas β de um lado e resistência à insulina de outro (Gray e Meyts, 2005; Christensen et al., 2011).

Diabetes é uma das doenças globais não-transmissíveis mais comuns, e, ainda hoje, um dos problemas de saúde mais desafiantes. É evidente que uma complexa interação entre fatores ambientais, nutricionais e genéticos atue na sua patogênese, sendo, portanto, a cromatina e sua regulação epigenética fortes candidatos na sua determinação (Gray e Meyts, 2005; Villeneuve e Natarajan, 2010; Christensen et al., 2011). Granner e O'Brien (1992) apontaram o papel potencial de fatores de transcrição e regiões regulatórias do DNA, ao contrário de mutações gênicas em regiões estruturais, no código metabólico por trás do diabetes. Esse conceito tem sido estendido para a avaliação dos mecanismos de controle epigenético na patogênese do diabetes. Nesse sentido, o ambiente da cromatina e em particular as enzimas que afetam o status de acetilação das histonas podem desempenhar um papel importante no diabetes (Villeneuve e Natarajan, 2010; Christensen et al., 2011). Uma das primeiras indicações de que HDACs possam desempenhar tal papel vieram de “*genome wide scans*” dos loci de diabetes tipo 1 e tipo 2. Uma correlação significativa foi observada na região cromossômica 6q21 onde está localizado o gene codificador de HDAC2 (Nerup e

Pociot, 2001; Xiang et al., 2004). Hoje sabe-se que HDACs estão envolvidas em várias vias biológicas relevantes para a etiologia e patogênese dessa doença. A hiperglicemia parece promover perda de modificações de histonas repressivas como H3K9me e aumento de marcas de histonas ativas como H3K4me, assim como acetilação, resultando na abertura da cromatina ao redor de genes patológicos chave (Villeneuve e Natarajan, 2010). Ainda pouco se sabe sobre a ação de enzimas que adicionam e removem os resíduos químicos nas histonas em modelos de hiperglicemia e memória metabólica, assim como nas complicações do diabetes, mas a metiltransferase de histona Set7 é uma das mais bem caracterizadas. Atuando também sobre substratos não histônicos, catalisa a metilação de H3K4me e modula a expressão de genes importantes na patogênese dessa doença (Keating e El-Osta, 2012).

Quanto à metilação do DNA, há ainda poucas informações quanto a sua ação no diabetes; entretanto, padrões de metilação alterados foram reportados em pacientes com diabetes (Keating e El-Osta, 2012). Estudos em ratos demonstraram que a exposição a uma má alimentação intrauterina pode predispor o feto ao desenvolvimento do diabetes na vida adulta em função de metilações de DNA aberrantes em ilhotas pancreáticas (Thompson et al., 2010). De maneira interessante, tem-se demonstrado que a metilação de DNA desempenha um papel na regulação da expressão da insulina (Kuroda et al., 2009). Sabe-se que a metilação no promotor do gene *PPARGCIA* (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (*PPAR γ*) *coactivator 1 α*) é essencial para modulação do diabetes (Ling et al., 2008) e que em camundongos *agouti*, a metilação e expressão do gene *AGOUTI* altera a tendência no desenvolvimento de obesidade e diabetes (Morgan et al, 1999). Com relação ao diabetes tipo 1, estudos globais do genoma em monócitos de gêmeos monozigóticos discordantes para essa doença, identificaram metilações de DNA variáveis em diversas posições entre os indivíduos. Análises posteriores revelaram que algumas dessas alterações aparecem anteriormente ao diagnóstico, sugerindo que elas surgem cedo na patologia do diabetes e não podem ser

explicadas por disfunções celulares desenvolvidas após o desenvolvimento da doença (Rakyan et al., 2011).

Impacto dos métodos de análise global do genoma e epigenoma na pesquisa de doenças

O aumento do interesse em epigenética foi acompanhado de descobertas tecnológicas que agora possibilitam estudos epigenômicos em larga escala, os quais permitem o mapeamento de marcas epigenéticas em todo o genoma, como metilação de DNA, modificação de histonas e o posicionamento de nucleotídeos que são críticos para a regulação gênica. Dessa forma, tem-se maior entendimento de como marcas epigenéticas aberrantes e mutações na maquinaria enzimática epigenética podem levar ao desenvolvimento de doenças e o estudo dos mecanismos epigenéticos e suas alterações nas doenças tornou-se prioritário na pesquisa médica e no desenvolvimento de novas terapias (Portela e Esteller, 2010).

Sequenciamento de alto desempenho, também conhecido como sequenciamento de nova geração (NGS), tem revolucionado a pesquisa genômica. Nos últimos anos as tecnologias NGS progrediram, com redução de custos e aumento do número e profundidade de sequenciamento, assim como evoluíram os métodos para preparo dos ácido nucleicos (DNA ou RNA) a serem sequenciados e a construção das bibliotecas NGS, tornando-se uma tecnologia mais acessível para os laboratórios ao redor do mundo (Head et al., 2014).

Atualmente, RNA-seq, uma metodologia para a caracterização de RNA baseada em NGS vem substituindo técnicas baseadas em hibridização como *microarrays* no estudo da expressão gênica (Nagalakshmi et al., 2008). Para isso, o RNA da amostra de interesse é fragmentado, mRNA selecionado pela presença da cauda poli-A e reversamente transcrito em DNA complementar (cDNAs). Os cDNAs obtidos são então amplificados e acoplados a adaptadores, permitindo sua clusterização e posterior sequenciamento. Os milhões de pequenos *reads* gerados podem então ser computacionalmente mapeados em um genoma de

referência e o número de *reads* alinhado a cada gene, chamado de *counts*, dá a medida relativa da expressão do gene na amostra investigada. Dessa forma, a técnica de RNA-seq permite a investigação, de maneira relativamente fácil, dos transcriptomas (o conjunto completo do RNAs transcritos dos genes de uma célula) nos diversos organismos e situações fisiológicas (Finotello e Di Camillo, 2014). Da mesma forma, o avanço da tecnologia NGS permitiu o mapeamento preciso em todo o genoma das modificações de histonas, assim como dos locais de ligação de fatores de transcrição. Para tanto, a tecnologia de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) foi acoplada ao sequenciamento de alto desempenho, levando ao desenvolvimento da técnica de ChIP-seq, a partir de 2007 (Johnson et al., 2007). Nessa tecnologia, fragmentos de DNA enriquecidos a partir da precipitação com anticorpos que se ligam a proteínas de interesse são utilizados para construção da biblioteca de sequenciamento. Em substituição à técnica de ChIP-chip, em que o DNA enriquecido era hibridizado a sondas de *microarray*, agora todo o genoma é sequenciado, permitindo a contagem de *reads* e identificação de picos, levando-se à análise da distribuição e do nível da modificação de histona investigada em associação a cada gene (Park, 2009; Ma e Wong, 2011).

Embora análises globais de expressão de RNA e ChIP-seq tenham se tornado ferramentas mais comuns na pesquisa, extrair conclusões biológicas dessas informações continua sendo um grande desafio. O trabalho de Hawkins et al. (2010) explica por que a análise integrativa de dados *multi-omic* pode fornecer oportunidade de responder questões de longa data sobre a função dos genomas e doenças. Entretanto, apesar das vantagens, a integração dos dados é ainda um dos problemas mais desafiantes na ciência moderna (Gomez-Cabrero et al., 2014). Para facilitar os pesquisadores nessa tarefa há a necessidade de desenvolvimento de novas e intuitivas ferramentas de exploração dos dados de ChIP-seq e RNA-seq do ponto de vista estatístico, permitindo reprodutibilidade e melhorando a transferência do conhecimento (Angelini e Costa, 2014). Nesse sentido diversos consórcios

internacionais têm surgido visando juntar recursos e esforços para publicação desses mapas. Em 2012, os resultados do projeto ENCODE foram publicados (The ENCODE Project Consortium, 2012); seu objetivo foi descrever todos os elementos funcionais codificados no genoma humano, mapeando as modificações epigenéticas. Este projeto foi pioneiro e trouxe um grande impacto nos estudos genéticos humanos. Entretanto, sua aplicação clínica é limitada, pois os resultados vêm em sua maioria de um pequeno número de linhagens celulares. O projeto Roadmap Epigenomics, dirigido pelo US National Institutes of Health, fez avanços nesse sentido (Skipper et al., 2015). Tal projeto gera e publica informações epigenômicas de células-tronco e maduras de uma grande variedade de tecidos de pessoas saudáveis e pacientes com doenças neurodegenerativas, auto-imunes e câncer.

De uma perspectiva biológica, a integração dos dados obtidos por essas tecnologias não seria um fim para responder questões fundamentais, mas um meio de gerar novas hipóteses, inclusive de buscar novos alvos terapêuticos para doenças correlacionadas com aberrações epigenéticas.

4- Uso de moduladores epigenéticos como novas terapias

Terapia epigenética

Uma vez que os mecanismos epigenéticos determinam quais genes e vias de sinalização são ativadas, a presença de aberrações nessas modificações ajuda a encontrar e monitorar abordagens terapêuticas. A reversibilidade das modificações epigenéticas fazem delas alvos mais moldáveis do que a tentativa de corrigir a própria sequência de DNA (Kelly et al., 2010). Além disso, é possível que células doentes possam se tornar dependentes ao fenótipo epigenético aberrante, tornando-as mais sensíveis que células normais a terapias epigenéticas (Baylin e Ohm, 2006).

As principais terapias desenvolvidas até o momento estão relacionadas com a modulação das enzimas responsáveis por adicionar e remover as marcas epigenéticas. Esse é o caso dos inibidores de metilação de DNA, como a 5-Azacitidina (5-Aza-CR; Vidaza; azacitidine), um análogo de nucleosídeo que se incorpora no DNA e RNA e já é aprovado para o tratamento de pacientes com síndrome mielodisplásica (MDS) de alto risco (Fenaux et al., 2009). 5-Aza-2-deoxicitidina (5-Aza-CdR; Dacogen; decitabine) é um deoxiderivado de 5-Aza-CR e é incorporado apenas no DNA. Em baixas doses, ambas as drogas agem sobre as enzimas DNMT, sequestrando-as após a sua incorporação no DNA, levando a uma demetilação global do DNA (Kelly et al., 2010).

Enzimas metiltransferase e demetilase de histonas são geralmente bastante específicas em seus alvos, porém também atuam sobre a metilação de substratos não histônicos (Huang e Berger, 2008). Muito esforço tem sido feito para se encontrar drogas capazes de reverter marcas de metilação em histonas específicas. Neste contexto, uma nova classe de análogos de oligoaminas foi recentemente descoberta como potencial inibidora de demetilase de histona lisina-específica 1 (LSD1). LSD1, além de atuar sobre histonas, pode demetilar também DNMT1, resultando na desestabilização e perda da metilação de DNA de manutenção; dessa forma, essa enzima tem se mostrado um alvo promissor para a terapia epigenética. Tratamento de células de câncer de cólon com o inibidor de LSD1 (SL11144) aumentou o nível de H3K4me, diminuiu H3K9me2 e restaurou a expressão de SFRP2 (Huang et al., 2009). Outra droga que está sendo pesquisada é a DZNep, que diminui o conteúdo celular de componentes de PRC2 (EZH2, EED e SUZ12) e conseqüentemente reduz os níveis de H3K27me3, induzindo apoptose em câncer de mama, mas não em células normais (Tan et al., 2007).

Nos últimos anos a modulação da acetilação de histonas, através da inibição de enzimas HDACs, tem sido proposta como uma estratégia potencial para reverter mudanças

epigenéticas associadas a várias doenças. Nesse sentido, muitas classes estruturalmente diversas de inibidores de HDACs (HDACis) têm sido purificadas a partir de produtos naturais, ou desenvolvidas sinteticamente e utilizadas em estudos clínicos como potenciais terapias epigenéticas. Revisões literárias têm sido extensivamente produzidas reunindo resultados de testes clínicos com esses agentes (Falkenberg e Johnstone, 2014). Além de atuar sobre a acetilação de histonas, esses agentes atuam também sobre a acetilação de proteínas não histônicas, podendo portanto gerar feitos mais globais (Choudhary et al., 2009). Os HDACis foram inicialmente utilizados no tratamento de variados tipos de câncer devido as suas ações no ciclo celular, nas vias de apoptose, na produção de ROS e na senescência celular, entre outras (Xu et al., 2007). O sucesso na utilização de tais compostos no tratamento antitumoral fez com que mais estudos aprofundassem o papel dessas drogas, revelando novas vias de atuação e com isso novos alvos terapêuticos, com potencial para serem utilizados em patologias inflamatórias e doenças autoimunes (Falkenberg e Johnstone, 2014). Entre essas patologias, o uso de HDACi tem-se mostrado benéfico no tratamento de diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, doença do enxerto versus hospedeiro, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal e colite (Chung et al., 2003; Leoni et al., 2002; Reddy et al., 2004, 2008; Reilly et al., 2004). Recentemente, o papel dos HDACi vem sendo investigado ainda em patologias do sistema nervoso central como doença de Huntington's, mal de Alzheimer, acidente vascular encefálico e esclerose lateral amiotrófica (Kazantsev e Thompson, 2008; Chuang et al., 2009)

Dentre os vários tipos de inibidores de HDAC identificados, o ácido valproico (VPA) ou ácido 2-*n*-propylpentanoico, comercialmente conhecido como Depakote, Depakene, Depacon, entre outros, (Gavin et al., 2009; Chateauvieux et al., 2010) tem sido muito utilizado. O VPA é um ácido graxo de cadeia curta rotineiramente utilizado na clínica para o tratamento de epilepsia, enxaqueca, e transtorno bipolar, sendo bem tolerado pelos pacientes

(Silva et al., 2008). Foi produzido pela primeira vez em 1882 como um solvente orgânico, mas seu potencial terapêutico foi descoberto acidentalmente em 1962, quando Carraz e colaboradores o utilizaram como um solvente para anti-convulsivos experimentais e reconheceram que ele mesmo possuía uma atividade anti-convulsiva. Estas descobertas foram publicadas em 1963 e são consideradas um marco na história do tratamento da epilepsia (Lagace et al., 2004)

Em concentrações terapêuticas (0,3-0,7 mM) o VPA inibe HDACs em vários tipos celulares, incluindo-se células tumorais, como HeLa, F9 teratocarcinoma e Neuro2Aneuroblastoma (Göttlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001; Eyal et al., 2004; Felisbino et al., 2011), mas também células não-tumorais, como osteoblastos, adipócitos e fibroblastos (Lagace e Nachtigal, 2004; Qiao et al., 2006; Schroeder et al., 2007; Felisbino et al., 2014).

Nos experimentos em que se pesquisa a inibição de HDACs, outra droga utilizada é a tricostatina A (TSA). TSA foi originalmente isolada do *Streptomyces hygroscopicus* como um agente fungicida. Sua principal ação foi encontrada acidentalmente através da análise de modificação de histonas, revelando que as células tratadas com TSA apresentavam acetilação em alta extensão, não usual. Experimentos posteriores revelaram que a hiperacetilação induzida por TSA era devida não a um aumento de acetilação, mas a uma diminuição na deacetilação de histonas (Yoshida e Horinouchi, 1999). Assim como no caso do VPA, a ação da TSA como inibidora de HDACs em células tumorais e não tumorais vem sendo relatada em diversas publicações (Catania et al., 2006; Rao et al., 2007; Roy et al., 2008; Felisbino et al., 2014). Em trabalhos anteriores, levantamos um conjunto de dados por análise de imagem, indicativos de que o VPA, em concentrações terapêuticas, da mesma forma que a TSA, induz descompactação cromatínica em células tumorais HeLa, assim como em células não tumorais fibroblásticas 3T3 (Felisbino et al., 2011; 2014).

Há suspeitas de que o VPA, além de causar hiperacetilação de histonas, possa também induzir demetilação do DNA em genes específicos, fato comprovado em células HEK293 (Detich et al., 2003; Milutinovic et al., 2007), embora não em linhagens celulares linfoblastóides FXS (síndrome do cromossomo X frágil) (Tabolacci et al., 2008) e de embriões de camundongos (Tung e Winn, 2010). Mais recentemente a inibição de HDAC por VPA e TSA vem sendo também relacionada à indução de metilação de histonas em astrócitos e neurônios corticais de ratos com aumento de di e trimetilação de H3K4 (Marinova et al., 2011) e em embriões de camundongos com aumento de H3K4me e diminuição de H3K9me (Tung e Winn, 2010). Essas alterações epigenéticas poderiam também promover descompactação cromatínica, podendo estar contribuindo para a remodelação cromatínica observada em outros modelos.

Evidências e mecanismos de ação de inibidores de deacetilases de histonas no tratamento do diabetes

A acetilação de histonas está envolvida tanto na regulação da secreção de insulina, como no dano associado à hiperglicemia. Terapias que têm como alvo as enzimas que regulam essa modificação epigenética podem, portanto, aliviar alguns aspectos relacionados ao diabetes (Keating e El-Osta, 2012). Evidências levaram Christensen e colaboradores (2011) a propor que haveria um forte indicativo para se conduzir testes pré-clínicos e clínicos visando avaliar a ação de HDACis como nova terapêutica para o diabetes. De fato, tem sido relatado o papel de HDACis, incluindo o VPA e a TSA, na redução da glicose plasmática assim como da deposição de gordura no tecido adiposo e fígado (Avery e Bumpus, 2014; Khan et al., 2015). Esses agentes parecem atuar ainda no desenvolvimento, proliferação e diferenciação de células pancreáticas β , e na prevenção do seu dano inflamatório (Patel et al., 2011; Jayaraman et al., 2013). Promovem melhora na situação de resistência à insulina (Sun e

Zhou, 2008) e redução das complicações microvasculares tardias do diabetes (Kochar et al., 2004; Patel et al., 2014). Influenciam a sinalização e produção de insulina (Lundh et al., 2015), assim como o controle da gliconeogênese (Mihaylova et al., 2011; Oiso et al., 2011; Khan et al., 2015).

Além disso, HDACs tem sido apontados como novos agentes imunomoduladores, uma vez que apresentam a habilidade de reduzir a severidade de doenças inflamatórias e autoimunes em modelos animais (Dinarello, 2010; Dinarello et al., 2011; Faraco et al., 2011; Vojinovic et al., 2011). A análise de expressão global de células endoteliais aórticas tratadas com TSA revelou diminuição da expressão de diversas citocinas e quimiocinas inflamatórias como IL-6, IL-8, MCP-1 e MIF, além de moléculas de adesão celular como ICAM-1 (Sugimoto et al., 2014). Receptores do sistema imune têm se mostrado sensores do stress metabólico fundamentais para a determinação do início da inflamação metabólica, sendo o estudo da intersecção entre imunologia e metabolismo um campo em crescimento (Jin et al., 2013).

No fígado, em um quadro de diabetes onde não há ação da insulina, as fosforilases responsáveis pela degradação do glicogênio, assim como os promotores da gliconeogênese, são estimulados, elevando a glicemia (Milech, 1980). O aumento de produção de glicose hepática é, portanto, o evento central no desenvolvimento e progressão do diabetes (Rossetti, 1995; Nakajima et al., 2000). Nesse quadro, também é aumentada a cetogênese e há níveis ínfimos de glicólise nas células hepáticas (Cherrington e Vranic, 2000). Tais variações metabólicas, conforme estudos em nosso laboratório revelaram, provocam alterações na estrutura da cromatina, como as observadas em hepatócitos de camundongos diabéticos não obesos (NOD) (Mello et al., 2009; Ghiraldini et al., 2012). O fígado é um órgão fundamental no metabolismo da glicose e dos lipídeos, na síntese de ácidos biliares e na detoxificação de drogas (Rossetti, 1995). Atua ainda na produção de proteínas das cascatas sinalizadoras do

sistema imune, como o sistema complemento, e das proteínas do sistema de coagulação (Qin e Gao, 2006). Além disso, os hepatócitos apresentam fenótipo nuclear que responde a diversas situações metabólicas, como o jejum e o envelhecimento, com alterações na supraorganização cromatínica (Moraes et al. 2005; 2007; Mello et al., 2011; Ghiraldini et al., 2012). Dessa forma, trata-se de um ambiente importante para estudo da ação de HDACis, como o VPA e a TSA, em condições de hiperglicemia do ponto de vista da remodelação da cromatina e de sua regulação por fatores epigenéticos.

No presente trabalho foi utilizada a linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2, a qual, sob condição que simula o diabetes, apresentou resultados promissores que se assemelham aos de camundongos diabéticos NOD (Ghiraldini et al., 2013), porém com a vantagem de se testar diferentes condições experimentais em um modelo de estudo mais simples do que um modelo animal *in vivo*.

Embora haja fortes evidências para a investigação da ação de HDACis em uma situação do diabetes, nenhum estudo global do genoma associando essas situações foi ainda realizado no ambiente hepático. Esse tipo de caracterização vem sendo grandemente assistida pelos recentes avanços de tecnologias como sequenciamento massivo e ferramentas de bioinformática. Pôde-se, assim, expandir o conhecimento sobre as consequências em larga escala da hiperglicemia em células hepáticas, assim como da ação de HDACi nesse contexto.

Objetivos

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

- 1- Detectar, com o uso de análise de imagem, possível remodelação cromatínica em células HepG2 em condições de hiperglicemia e após diferentes tempos de tratamento com diferentes concentrações dos HDACi VPA e TSA.
- 2- Conhecer a abundância e a localização *in situ* de modificações de histonas em sítios-alvo para HDAC (H3K9ac), em metilações de histonas (H3K4me2 e H3K9me2) e proteínas envolvidas na manutenção da heterocromatina (HP1- α), buscando-se analisar os efeitos dos tratamentos com VPA e TSA sobre células HepG2 em condições de hiperglicemia.
- 3- Avaliar os níveis de expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos, assim como envolvidos na resposta a HDACis, e determinar a presença de marcações epigenéticas nos seus promotores no modelo experimental proposto, após tratamento com VPA.

Para cumprir estes propósitos foram empregadas técnicas morfológicas (topoquímica, imunofluorescência, análise de imagem) e bioquímicas (citometria de fluxo, extração de RNA, qPCR, imunoprecipitação de cromatina), além de preparação de biblioteca para sequenciamento de nova geração e análises bioinformáticas. Os resultados obtidos foram divididos em dois capítulos, o primeiro dos quais já publicado (Felisbino et al., 2016). Adicionalmente, consta em anexo a informação sobre dois artigos e um capítulo de livro publicados com nossa participação como co-autor.

Artigo:

Differential Response of Human Hepatocyte Chromatin to HDAC Inhibitors as a Function of Microenvironmental Glucose Level.

Publicado em Journal of Cellular Physiology 231: 2257-2265, 2016. doi: 10.1002/jcp.25343

Differential Response of Human Hepatocyte Chromatin to HDAC Inhibitors as a Function of Microenvironmental Glucose Level

MARINA BARRETO FELISBINO,^{1*} THIAGO ALVES DA COSTA,¹
MARIA SILVIA VICCARI GATTI,² AND MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO¹

¹Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brazil

Diabetes is a complex multifactorial disorder characterized by chronic hyperglycemia due to impaired insulin secretion. Recent observations suggest that the complexity of the disease cannot be entirely accounted for genetic predisposition and a compelling argument for an epigenetic component is rapidly emerging. The use of histone deacetylase inhibitor (HDACi) in clinical setting is an emerging area of investigation. In this study, we have aimed to understand and compare the response of hepatocyte chromatin to valproic acid (VPA) and trichostatin A (TSA) treatments under normoglycemic or hyperglycemic conditions to expand our knowledge about the consequences of HDACi treatment in a diabetes cell model. Under normoglycemic conditions, these treatments promoted chromatin remodeling, as assessed by image analysis and H3K9ac and H3K9me2 abundance. Simultaneously, H3K9ac marks shifted to the nuclear periphery accompanied by HPI dissociation from the heterochromatin and a G1 cell cycle arrest. More striking changes in the cell cycle progression and mitotic ratios required drastic treatment. Under hyperglycemic conditions, high glucose per se promoted chromatin changes similar to those promoted by VPA and TSA. Nonetheless, these results were not intensified in cells treated with HDACis under hyperglycemic conditions. Despite the absence of morphological changes being promoted, HDACi treatment seems to confer a physiological meaning, ameliorating the cellular hyperglycemic state through reduction of glucose production. These observations allow us to conclude that the glucose level to which the hepatocytes are subjected affects how chromatin responds to HDACi and their action under high-glucose environment might not reflect on chromatin remodeling.

J. Cell. Physiol. 9999: 1–9, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Diabetes is a complex multifactorial disorder that represents a considerable burden on worldwide healthcare. It is characterized by chronic hyperglycemia due to impaired insulin secretion and many pathways affect its progression (Wilkin, 2007; Christensen et al., 2011; Peakman, 2013). Understanding the biological mechanisms underlying this complex disease continues to prove challenging and suggests that it cannot be entirely explained by genetic predisposition (Gray and Meyts, 2005; Ling and Groop, 2009). A compelling argument for an epigenetic component is emerging (Keating and El-Osta, 2012, 2013).

Chromatin is a dynamic assembly of DNA and various nucleoproteins, and the central template for epigenetic processes (Jenuwein and Allis, 2001). Altered transcriptional states are initiated or perpetuated by the dynamic structural adaptation of chromatin regions that confer transcriptionally permissive or repressive configurations (Bird, 2007).

Changes in the epigenetic regulation of gene expression represent potentially important pathogenic mechanisms underlying complex diseases (Keating and El-Osta, 2012, 2015). Therapeutic targeting of the enzymes that regulate epigenetic mechanisms such as histone modification may alleviate some aspects of these diseases. Acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs) are enzymes involved in the maintenance of the balance between histone acetylation and deacetylation, which controls several physiological and pathological cellular processes (Kuo and Allis, 1998; Peserico and Simone, 2011). The use of histone deacetylase inhibitors (HDACi) in research and

clinical settings is an emerging area of investigation (Eyal et al., 2004; Frew et al., 2009; Delcuve et al., 2012).

There is evidence for a role for HDACis in preventing pancreatic β -cell inflammatory damage, improving insulin

Conflict of interest: The authors declare no potential conflict of interests.

Contract grant sponsor: São Paulo State Research Foundation (FAPESP).

Contract grant sponsor: Brazilian National Council for Research and Development (CNPq).

Contract grant sponsor: FAPESP;

Contract grant numbers: 2010/50015-6 (MLSM), 2012/03238-5 (MBF).

Contract grant sponsor: CNPq;

Contract grant number: 475261/2012-7(MLSM).

*Correspondence to: Marina Barreto Felisbino, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, R. Monteiro Lobato 255, 13083-862 Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: felisbinomb@gmail.com

Manuscript Received: 18 September 2015

Manuscript Accepted: 12 February 2016

Accepted manuscript online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com): 00 Month 2015.

DOI: 10.1002/jcp.25343

resistance, and positively affecting late diabetic microvascular complications (Christensen et al., 2011). Results indicate that chromatin remodeling, among other mechanisms, can contribute to diabetes amelioration by differential gene transcription. Thus, epigenetic modulation could be a novel therapeutic approach to block the progression of diabetes (Patel et al., 2011; Jayaraman et al., 2013). Although there is a strong rationale for the investigation of HDACi in diabetes, studies associating these inhibitors, and chromatin structure in a liver cell model remain poorly understood. We have previously shown that the HDACis valproic acid (VPA) and trichostatin A (TSA) could trigger histone acetylation and chromatin remodeling in human tumoral and non-transformed rodent cells (Felisbino et al., 2011, 2014).

Liver is the key organ that releases glucose into the circulation under fasting conditions. An increase in hepatic glucose production due to insulin resistance or insulin deficiency is the central event in the development and progression of diabetes (Rossetti, 1995; Nakajima et al., 2000). Therefore, an understanding of the response of the liver cell chromatin to HDACi agents in presence of high glucose levels has the potential to expand our knowledge of the consequences of such a treatment.

Hence, in this study, we have investigated the effect of VPA and TSA treatments on cells cultivated under normoglycemic (LG) or hyperglycemic (HG) conditions to assess changes in the chromatin and epigenetic landscape. HepG2 cells were chosen as an *in vitro* model for diabetic cells (Pang et al., 2012; Yuasa et al., 2014). We have found that the glycemic level under which HepG2 cells were cultivated affects how their chromatin responds to HDACis.

Materials and Methods

Cell culture

Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil) and cultivated at 37°C under 5% CO₂ and 95% air. The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) basal glucose (Sigma[®], St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (Nutricell[®], Campinas, Brazil), penicillin and streptomycin (Sigma[®]) (100 UI and 100 µg/ml, respectively) and 1% non-essential aminoacids (Sigma[®]). Twenty-four hours after seeding, the cells were cultivated in a normoglycemic medium containing 10% Charcoal stripped fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 7 µg/ml insulin or in a hyperglycemic medium containing D-glucose (Sigma[®]) up to a final concentration of 50 mM and 10% Charcoal stripped fetal bovine serum (Invitrogen[®], Carlsbad, CA). Cells under normoglycemic (LG) and hyperglycemic (HG) conditions were treated with VPA (0.5 and 1.0 mM) and TSA (20 and 100 ng/ml) for the last final hour of assay and compared with the respective untreated controls. Caco-2 cell line purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil) were cultivated at the same above-described conditions for a comparative test. Caco-2 cells differentiate spontaneously in a 14-day culture producing a homogeneous and highly polarized cellular monolayer, which displays many of the intestinal enterocyte characteristics (Natoli et al., 2012).

Image analysis

Chromatin analysis of Feulgen-stained nuclei of HepG2 and Caco-2 cells was performed using video image analysis. The parameters obtained by this methodology were used to predict a profile of the chromatin state under all tested conditions.

Cells were fixed in a mixture of absolute ethanol-glacial acetic acid (3:1, v/v) for 1 min, rinsed in 70% ethanol, air dried at room temperature, and subjected to the Feulgen reaction with hydrolysis conducted in 4 M HCl for 60 min at 25°C.

Geometric, densitometric, and textural parameters for HepG2 and Caco-2 cell nuclei were obtained using a Carl Zeiss Axiophot 2 microscope equipped with Neofluar 40/0.75 objective, 2 optovar, 0.90 condenser, $\lambda = 546$ nm, and Kontron KS400-3 software (Oberkochen, Munich, Germany). Under the optical conditions used 1 µm corresponds to 12.4 pixels. The minimum area measured corresponds to 4.0 pixels. Geometric (area in µm² and perimeter in µm), densitometric (optical density [OD]) and textural (standard deviation of the gray average per nucleus [SDtd]) parameters were evaluated. One hundred Feulgen-stained HepG2 cell nuclei and 200 Feulgen-stained Caco-2 cell nuclei from each experimental condition were chosen at random and measured in groups of cells.

Flow cytometry

Flow cytometry experiments for modified histones were performed as previously described (Obier and Muller, 2010). HepG2 cells collected by centrifugation (5×10^6 cells per sample) were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at 37°C. Pre-chilled cells were then permeabilized in 90% methanol for 30 min on ice. The supernatant was removed and the cell pellets were resuspended in the incubation buffer (0.5% BSA in PBS). After another pelleting step, the cells were washed and resuspended in 100 µl of incubation buffer containing one of the following antibodies: rabbit monoclonal anti-H3K9ac (1:100), rabbit monoclonal anti-H3K4me2 (1:100), and rabbit polyclonal anti-H3K9me2 (1:100). The secondary antibody utilized was Alexa647-linked anti-rabbit. All the antibodies were purchased from Cell Signaling Technology[®] (Danvers, MA). Flow cytometry in at least five independent experiments was performed on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) and analyzed with FlowJo software.

For cell cycle analysis, a procedure similar to that previously reported (Bártová et al., 2005) was used. Briefly, 1×10^6 cells per sample were fixed for 30 min in 70% ethanol at -20°C. After repeated washing in PBS, the cells were stained with propidium iodide diluted to 10 µg/ml in Vindel's solution (1 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 10 µg/ml RNase A) for 30 min at 37°C. The cell-cycle profile was determined from three independent experiments with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and the phases were analyzed using FlowJo software.

Quantitative real-time RT-pcr

Total RNA was isolated from HepG2 cells using the RNeasyMini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and then reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA). RT-PCR was performed using an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR system following standard protocols and TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems[®]) for DNMT1 (Hs00945875_m1). Cycle threshold (Ct) values were calculated from experiments performed in triplicate and normalized with respect to the housekeeping gene GAPDH (Hs02758991_g1).

Immunofluorescence staining

HepG2 cells grown on round coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, and then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. The cells were then incubated with a blocking buffer (10% BSA in PBS) for 30 min. Histone modifications were detected using rabbit monoclonal anti-H3K9ac (1:800), rabbit polyclonal anti-H3K9me2 (1:800), and rabbit monoclonal anti-H3K4me2 (1:1200) antibodies (Cell Signaling[®]). Non-histone HPI- α protein was determined using the respective polyclonal rabbit antibody (1:400) (Cell Signaling[®]). The primary antibody incubation was performed overnight at 4°C, followed by 1 h

incubation with Alexa488-linked anti-rabbit secondary antibody (Abcam, Cambridge, United Kingdom). DNA was labeled with TO-PRO-3 (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR). The coverslips were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and images were obtained using a TCS SP5 II Leica Confocal Microscope (Wetzlar, Germany) that was equipped with argon, helium neon543, and helium neon633 lasers and that promoted the analysis of high-resolution optical sections. The images were obtained from triplicates in the Multiuser Facility LaCTAD (Unicamp, Campinas, Brazil).

Hepatic glucose production assay

HepG2 cells were cultured in a 12-well plate at the density 1.5×10^5 cells/well and treated under conditions above described. The medium was then replaced with 1 ml of glucose production buffer consisting of glucose-free DMEM (Nutricell[®], Campinas, Brazil) without phenol red and glucose, and supplemented with 20 mM sodium lactate (Sigma[®]) and 2 mM sodium pyruvate (Sigma[®]). After a 3 h incubation, the medium was collected and the glucose concentration measured using a colorimetric glucose assay kit (Sigma[®]).

Results

Global chromatin remodeling was induced by hyperglycemia and by HDACi treatment, but was not intensified under both conditions

The HepG2 cells exposed to the HG medium under control conditions had an increase in nuclear area and perimeter when compared to the LG control (Table 1). The changes in these geometric parameters were accompanied by a decrease in the optical density (OD) as well as in the SDtd parameter (Table 1). The VPA and TSA treatments under LG conditions showed an increase in the nuclear areas and perimeters accompanied by decrease in SDtd values, although a decrease in the OD values occurred only after the VPA treatment. Interestingly, when HepG2 cells were treated with VPA or TSA under HG conditions, these results were not intensified. Conversely, for most comparisons there was no significant difference with respect to the untreated control, or there was even a decrease in nuclear area and perimeter (0.5 mM VPA) as well as an increase in OD values in all cases (Table 1).

When comparing the results obtained for Caco-2 cells, a human intestinal cell line, cultivated under the same conditions as HepG2, differences were detected not only with respect to HG response (there was not such an increase in area and perimeter compared to LG conditions) but also regarding HDACis treatment response under HG environment (there

was an increase in area and perimeter parameters accompanied by a decrease in OD values compared to HG controls) (Table S1).

Chromatin remodeling was confirmed by abundance of histone H3 acetylation and dimethylation of lysine 9

To confirm the image analysis changes detected in the chromatin of the HepG2 cells subjected to VPA or TSA treatment and/or high glucose exposure, the level of some histone modifications was assessed under the same experimental conditions by flow cytometry. Some activating marks (H3K9ac, H3K4me2) together with a repressive mark (H3K9me2) were investigated, to attempt to achieve an epigenetic landscape for HDACi treatment as a function of the glycemic level. While no significant difference was observed in the level of H3K4me2 (Fig. 1a) under any tested condition, an increase in the abundance of H3K9ac was noticed after 0.5 mM VPA treatment as well as after the hyperglycemic exposure compared to the untreated normoglycemic control (Fig. 1a). Nevertheless, under HG conditions, no difference was observed between VPA and TSA-treated cells and respective untreated controls (Fig. 1a). Moreover, the intensity level of H3K9me2 marks decreased after VPA or TSA treatment and after HG conditions in comparison with LG untreated control, but it was not intensified when the cells were treated under both conditions (Fig. 1a).

Epigenetic modification similarity was not accompanied by gene expression

Interestingly, although VPA or TSA treatment and high glucose exposure promoted similar epigenetic alterations, it did not result in similar gene expression alterations. Taking as example DNA methyltransferase 1 (DNMT1), an important chromatin-remodeling protein, it was possible to notice that while HDACi treatments promoted reduction of mRNA expression compared to control, HG condition was not capable of inducing a significant change in comparison with LG condition (Fig 1b).

The histone acetylation induced by VPA and TSA treatment was preferentially located at the nuclear periphery

The above-mentioned histone modifications were also investigated with regard to their cellular localization using immunofluorescence. An H3K9ac signal in LG and HG untreated controls was homogeneously distributed in the cell nuclei, except in the nucleolar and heterochromatin areas

TABLE 1. Geometric, densitometric, and textural parameters obtained by image analysis of HepG2 cells treated with VPA and TSA for 1 h under normoglycemic or hyperglycemic conditions

Treatment		Area (µm ²)			Perimeter (µm)			OD		SDtd	
Groups	Items	X	S	Md	X	S	Md	X	S	X	S
LG	Control	89.69	23.15	87.84	39.77	5.44	39.20	0.44	0.03	8.80	2.21
	0.5mM VPA	127.68	44.82	120.67*	53.26	12.49	52.11*	0.42*	0.03	6.23*	2.05
	1.0mM VPA	142.99	45.03	131.88*	55.12	12.15	51.71*	0.41*	0.03	6.10*	1.83
	20 ng/ml TSA	108.50	38.63	99.35*	45.18	9.07	43.04*	0.48*	0.04	6.82*	2.19
	100 ng/ml TSA	118.83	26.79	113.65*	48.93	8.01	47.62*	0.45	0.02	6.37*	1.80
HG	Control	121.06	44.20	111.60	49.74	9.97	47.38	0.30	0.03	7.22	2.07
	0.5mM VPA	92.56	28.76	86.02*	40.64	6.77	39.55*	0.44*	0.02	8.34*	1.92
	1.0mM VPA	121.46	36.41	117.16	56.30	12.16	54.31*	0.47*	0.02	5.96*	1.67
	20 ng/ml TSA	129.82	65.43	116.75	54.24	15.45	51.72	0.42*	0.02	5.82*	2.11
	100 ng/ml TSA	109.98	31.00	101.91	45.88	7.92	43.99	0.49*	0.02	6.42	1.64

OD, optical density; Md, median; S, standard deviation; SDtd, standard deviation of the gray average per nucleus; X, arithmetic mean; n, 100. For all tested parameters the LG (normoglycemic) control differs significantly from the HG (hyperglycemic) control.
*The values for the VPA and TSA treatments differ significantly from their respective controls at the P 0.05 level (Mann–Whitney test for area and perimeter or Student’s t-test for OD and SDtd).

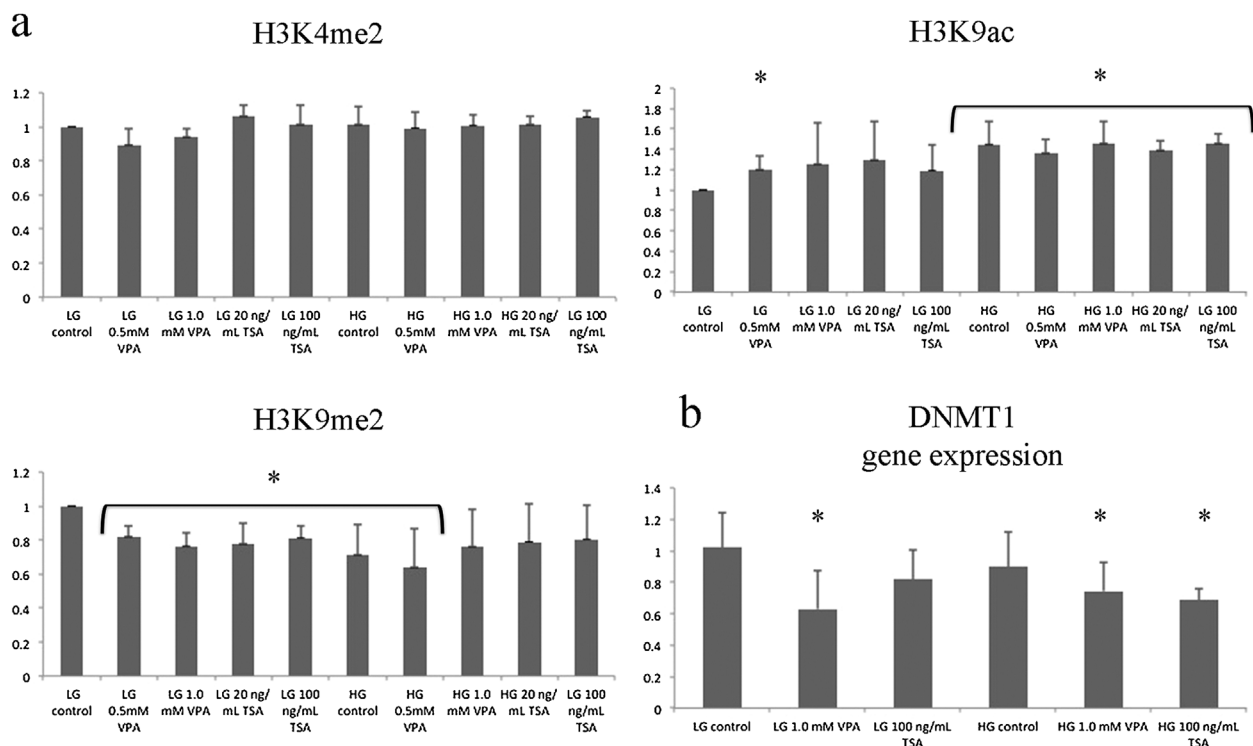


Fig. 1. Relative abundance of histone modifications and gene expression analysis. a: H3K4me2, H3K9ac, and H3K9me2 abundance after VPA and TSA treatments under LG and HG conditions. Y axis, relative abundance. b: Fold change of DNMT1 mRNA under LG and HG conditions. Y axis, relative expression. * represents differences at $P < 0.05$ (Student's t-test) in comparison with untreated LG control. Error bars indicate standard deviation.

(Fig. 2a). VPA and especially treatment with TSA for one resulted in a clear increase in the acetylation signal, mainly identified at the nuclear periphery (Fig. 2a). Graphs were plotted to represent the signal quantification obtained for both TO-PRO-3 and H3K9ac along the line drawn in the merged picture, clarifying the differences in signal intensity throughout the nucleus (Fig. 2b).

Regarding the H3K4me2 and H3K9me2 nuclear localization, no difference was observed among the different conditions (Supplementary Figs. S1 and S2).

The change in H3K9ac signal localization matched with a disruption of nuclear domains enriched in HPI- α proteins

It was of interest whether the shift of the H3K9ac signals to the nuclear periphery was accompanied by a loss of heterochromatin integrity. Therefore, the fate of heterochromatin protein 1, subunit alpha (HPI- α) was followed under the various experimental conditions. After VPA or TSA treatment, HPI- α labeling was dissociated from the dots associated with the pericentric heterochromatin observed in the LG control, and dispersed within the nucleoplasm (Fig. 3). Remarkably, the same pattern was observed in the HG control and the VPA and TSA treatments.

The cell cycle progression was affected by hyperglycemia and by VPA and TSA treatments, although deeper changes required a drastic treatment

The above-mentioned results suggested that the cell cycle progression might be affected. Indeed, a flow cytometric

analysis showed that HG or VPA and TSA treatment induced specific changes in the cell-cycle profile. After TSA treatment, there was an increased number of cells in the G1 phase (Fig. 4a) compared with the LG untreated control. Cell cultivation under HG conditions also induced an accumulation of cells in G1 when compared to the untreated LG control; however, after VPA and TSA treatment under HG conditions no intensification of this result was evident. The $>4C$ peak (C, haploid DNA content) was approximately associated with 20% of the adherent cell population, a finding that was expected for HepG2 cells (Celton-Morizur et al., 2010), although there was a slight increase in this population after VPA treatment under hyperglycemic conditions compared with the untreated HG control.

Despite these findings, a microscopically calculated effect that would change the contribution of the M phase in the adherent population (Fig. 4c) would possibly require a more extensive long-term treatment with higher concentrations of the HDACis. Therefore, a 5.0 mM 48-h-VPA treatment was tested. After this treatment under LG conditions, a pronounced increase in cells in G1, accompanied by a decrease in cells in S and G2/M phases (Fig. 4b) was evident. The apoptotic sub-G1 peak was increased as well. This treatment under HG conditions showed the same results when compared to the untreated control, although it was not so pronounced (Fig. 4b).

HDACi treatment may not have a morphological but a physiological meaning

Hepatic glucose production (HGP) is a combination of gluconeogenesis and glycogenolysis events making the liver an

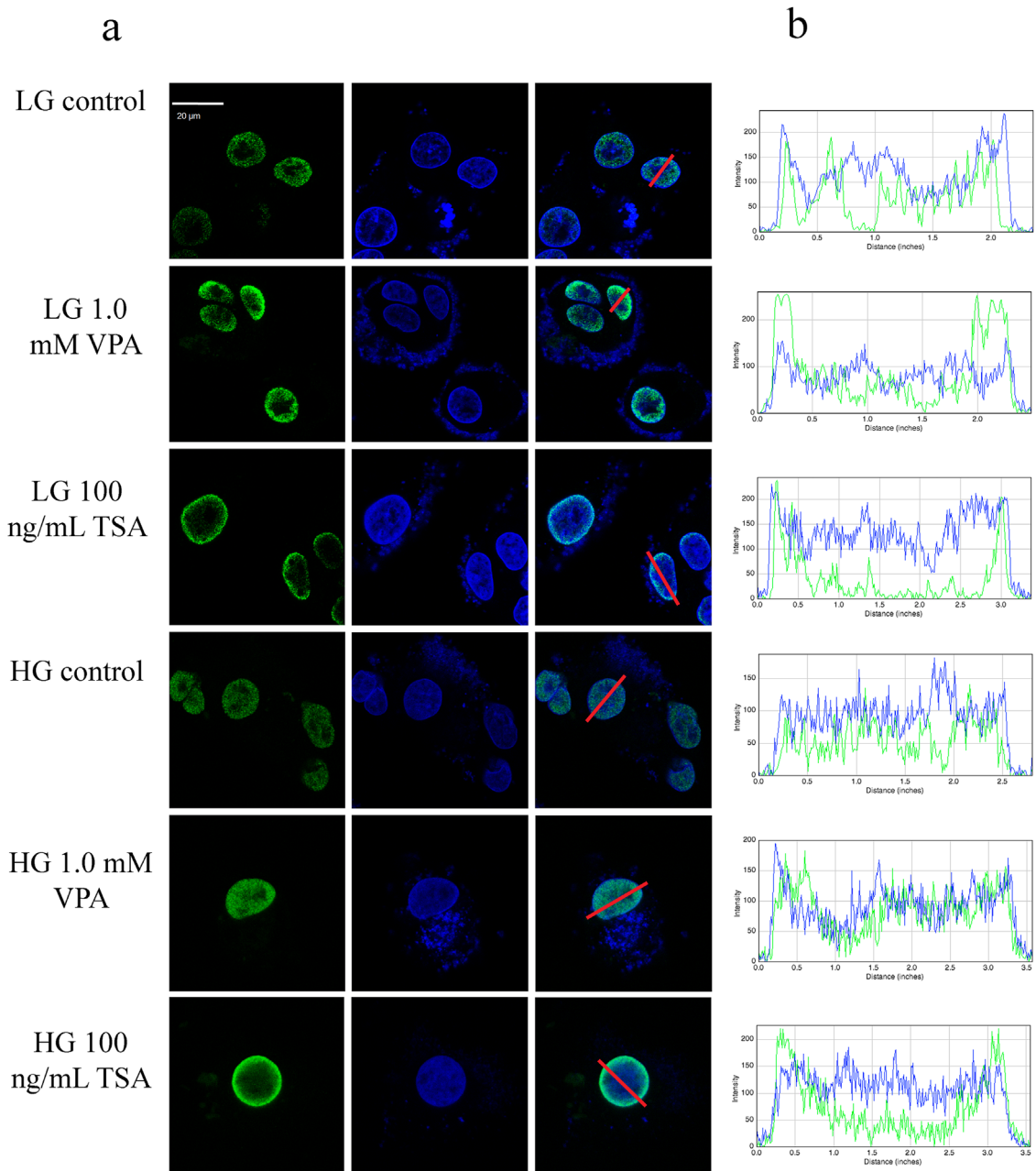


Fig. 2. a: Localization of H3K9ac signals under LG and HG conditions as detected by confocal microscopy. b: Graphs representing the signal quantification obtained for both TO-PRO-3 (blue) and H3K9ac (green) along the red line drawn in the merged picture.

essential organ for control of hyperglycemia. Therefore, the glucose content presented in HepG2 medium was evaluated after VPA and TSA treatments under HG conditions showing a significant decrease (Fig. 5), mitigating the HG HGP enhancer. Treatments with HDACis under LG conditions did not promote changes in HGP in comparison with control (Fig. 5).

Discussion

Although it is well known that treatment with HDACis promote chromatin decondensation in several cell models (Tóth et al., 2004; Rao et al., 2007; Felisbino et al., 2011, 2014), the present findings reveal that the effects of VPA and TSA on

HepG2 cells depend on the glycemic level of the culture medium, which is a fundamental parameter for cell life. Diabetes is a complex syndrome that dysregulates carbohydrate and lipid metabolism and that is characterized by chronic hyperglycemia, primarily due to pancreatic β -cell dysfunction associated with a variable degree of insulin resistance (Gray and Meyts, 2005). Although both HepG2 and Caco-2 cell are metabolically active cells frequently used in diabetes studies (Nakajima et al., 2000; Zang et al., 2004; Kojima et al., 2011; Pang et al., 2012; Yuasa et al., 2014; Duan et al., 2015; Han et al., 2015; Wong et al., 2015), their chromatin was found to respond differently to a HG environment, as well as to HDACi treatments. Therefore,

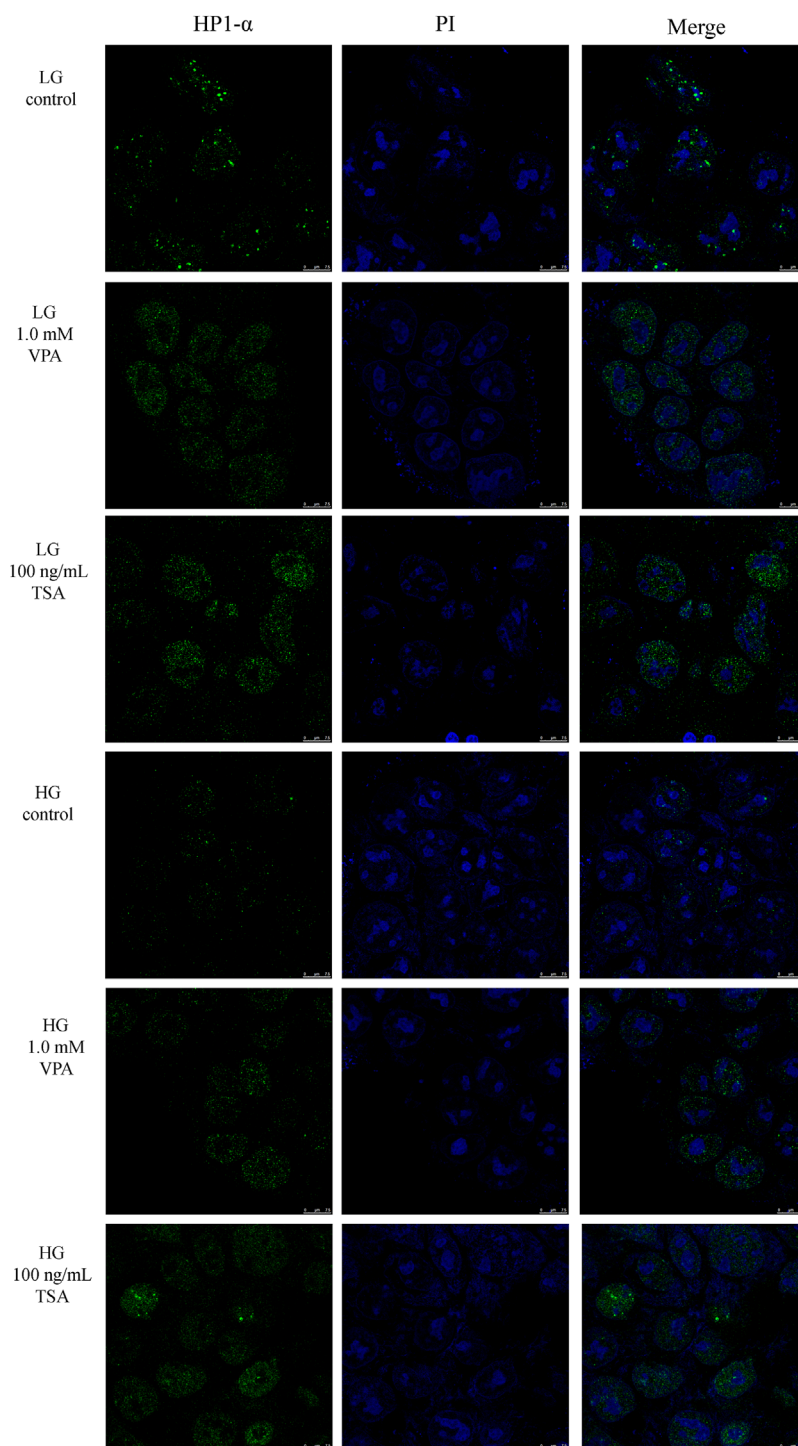


Fig. 3. HP1- α signals in HepG2 cells treated with VPA and TSA under LG and HG conditions using confocal microscopy.

there is an avenue of knowledge regarding cell-type-specific chromatin state and its consequences under HG conditions that could yet be explored, bringing possible relevant results.

The reciprocal impact of higher-order chromatin structure and gene activity is greatly related to specific histone modifications of chromatin domains (Bártová et al., 2008). An increase in active chromatin marks, such as H3K4me2 and

H3K9ac, may lead to chromatin decondensation and the formation of chromatin loops, which segregate actively transcribed genes from more compact chromatin, while other marks, such as H3K27me3 and H3K9me2, are highly enriched in heterochromatin (Chambeyron and Bickmore, 2004; Russo et al., 2012). Taken together, the nuclear architecture and the abundance and position of histone marks are essential to determine the chromatin landscape.

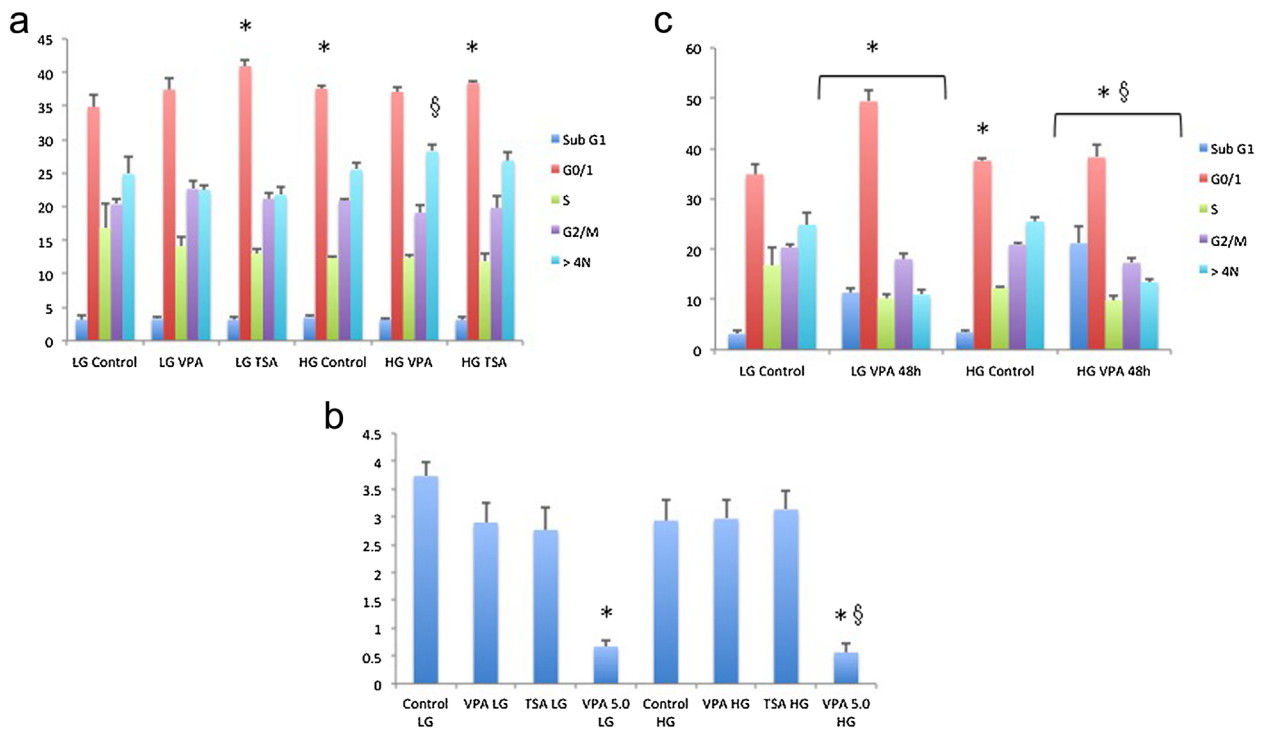


Fig. 4. Cell cycle analysis of HepG2 cells. **a:** Cell-cycle profile of cells treated with the initial conditions (1.0 mM VPA and 100 ng/ml TSA for 24 h). Y axis, frequency of cell cycle phase. **b:** Microscopically established mitotic ratio. Y axis, mitotic ratio from 1000 nuclei, n = 3. **c:** Cell-cycle profile of cells treated with 5.0 mM VPA for 48 h. Y axis, frequency of cell cycle phase. Results represent the arithmetic mean \pm SD of three independent experiments. The values obtained for the VPA- and TSA- treated cells differ significantly at the $P < 0.05$ (Student's t-test) from LG control (*) or HG control (§).

The results in this study indicated that under LG conditions, VPA and TSA treatments promoted global chromatin decondensation in HepG2 cells, a conclusion that was obtained by image analysis parameters and identification of H3K9ac and H3K9me2 abundance. Moreover, a shift of H3K9ac nuclear localization to the periphery of the nucleus concomitant with disruption of HP1- α from pericentromeric heterochromatin might be related to the spatio-temporal properties of the replication of the different chromatin domains and their association with histone modifications (Wu et al., 2005).

The nuclear periphery is an epigenetically dynamic compartment that accumulates facultative heterochromatin in differentiated cells and can contain substantial fractions of both repressed and active genes (Luo et al., 2009). Our findings are supported by data from Taddei et al. (2001) that showed accumulation of H4K5ac at the nuclear periphery following treatment of HeLa cells with TSA. Similarly, sodium butyrate treatment resulted in increased levels of H3K9ac at the nuclear periphery of A549, HT29, and FHC human cell lines (Bártová et al., 2005) as well as of H3/H4ac at the nuclear periphery of

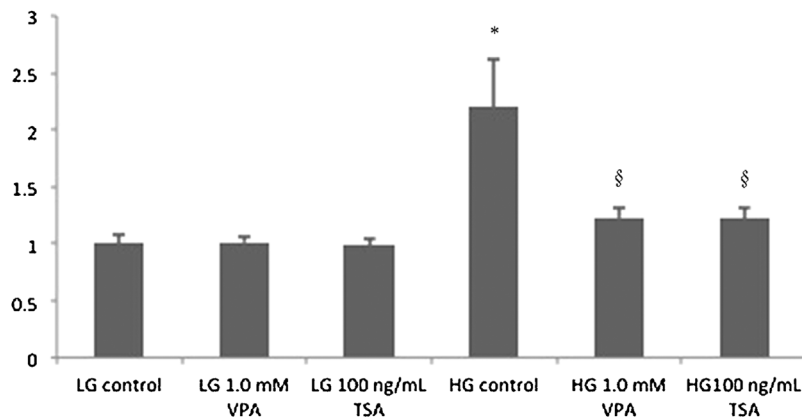


Fig. 5. Hepatic glucose production analysis. The values for the VPA- and TSA-treated differ significantly at the $P < 0.05$ (Student's t-test) from LG control (*) or HG control (§). Bars indicate standard errors of means. Y axis, relative glucose production.

HepG2 cells (Rada-Iglesias et al., 2007). In this context, the inhibition of deacetylation preventing the trimethylation of histone H3, which in turn leads to a loss of association of HPI with pericentric heterochromatin domains, might have occurred in HepG2 cells. It is possible that increased acetylation preferentially affects nuclear histones not bound to DNA located at the nuclear periphery (Alvarez et al., 2011). In this respect, H3/H4 interacts *in vitro* with HPI and LBR, a component of the inner nuclear membrane (Polioudaki et al., 2001). Therefore, free histones might have been previously acetylated and targeted to the nuclear periphery, and then incorporated into heterochromatin in a cell-cycle dependent manner (Taddei et al., 2005; Rada-Iglesias et al., 2007).

The cell cycle progression is expected to be affected by treatment with VPA or TSA. Cell exposure to HDACi decreases the relative frequency of cells in the S-phase and increases the frequency of cells in the G0/G1 phases (Takai et al., 2008; Ma et al., 2015). Moreover, high-glucose levels have also been proposed to promote G1 arrest (Luo et al., 2012; Zhang et al., 2014). Although we found a slight increase in the proportion of cells in G1 under the initial conditions tested here, a more drastic treatment (5.0 mM for 48 h) was necessary to trigger more evident alterations in the cell cycle progression, which even affected the mitotic cell ratio as observed microscopically. Indeed, while an HPI- α depletion from pericentromeric heterochromatin has been reported for NIH 3T3 cells, under mild VPA and TSA treatments, drastic effects resulted only from a long exposure to high doses of these HDACis (Felisbino et al., 2014).

Regarding the results of high-glucose exposure, there is evidence that hyperglycemia *per se* promotes overall chromatin decondensation (Mello et al., 2009; Villeneuve et al., 2011; Ghiraldini et al., 2012; Leung et al., 2014; Schones et al., 2015). Hyperglycemia promotes the loss of repressive histone modifications, and increase of activating histone marks, thus resulting in the opening of the chromatin structure around key pathologic genes (Villeneuve and Natarajan, 2010). Image analysis and evaluation of H3K9ac and H3K9me2 abundance revealed the same chromatin remodeling results as promoted by the VPA and TSA treatments under normoglycemia. However, the associated gene expression changes induced by hyperglycemia are not identical to those induced by HDACis treatment as shown here using DNMT1 analysis. Although initial, this result suggests yet that the mechanism by which HG conditions achieve chromatin remodeling may differ from that induced by HDACis treatment in terms of DNA methylation, which might be a matter of further investigation.

Interestingly, VPA and TSA treatment did not intensify the chromatin remodeling promoted by hyperglycemia. It is clear that the mechanisms of HDACi action are complex, and not completely understood. Large-scale experimental results have shown that TSA and SAHA induce genome-wide deacetylation in endothelial cells, which challenges the traditional view that HDAC inhibition increasing acetylation is the predominant event controlling gene expression changes (Rafehi et al., 2014). Therefore, these data suggest that the long-held views regarding HDAC inhibition may be subject to more flexibility than previously imagined. Genes with initially high levels of H3K9 acetylation have also been demonstrated to exhibit a very slightly increased, or even a decreased, acetylation level after VPA treatment in E14 ESCs cells (Hezroni et al., 2011).

Although there is a strong rationale for investigating HDACi in diabetes, to the best of our knowledge, this is the first time these two conditions have been investigated together regarding chromatin and the epigenetic landscape. Despite HDACis treatment lack the capacity of intensifying the morphological changes produced by HG, it seems to confer a physiological protection against hyperglycemia through reduction of HGP. This glucose production, due to insulin

resistance or insulin deficiency, is the central event in the development and progression of diabetes (Rossetti, 1995; Nakajima et al., 2000). Further investigations however are required to confirm which pathway is involved. Our observations allow us to conclude that chromatin alterations promoted by VPA and TSA under hyperglycemia in HepG2 cells may be a function of the differently regulated nuclear domains and genes rather than of global remodeling. Hence, we are currently pursuing a genome-wide approach that might reveal some significant transcriptional and epigenetic differences and expand our knowledge about the consequences of HDACi treatment.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) and by the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Literature Cited

- Alvarez F, Muñoz F, Schilcher P, Imhof A, Almouzni G, Loyola A. 2011. Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J Biol Chem* 286:17714–17721.
- Bártová E, Krejci J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. 2008. Histone modifications and nuclear architecture: A review. *J Histochem Cytochem* 56:711–721.
- Bártová E, Pachernick J, Harnicarová A, Kovarik A, Kovariková M, Hofmanová J, Skalniková M, Kozubek M, Kozubek S. 2005. Nuclear levels and patterns of histone H3 modifications and HPI proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci* 118:5035–5046.
- Bird A. 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398.
- Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D, Desdouets C. 2010. Polyploidy and liver proliferation: Central role of insulin signaling. *Cell Cycle* 9:460–466.
- Chambeyron S, Bickmore WA. 2004. Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev* 18:1119–1130.
- Christensen DP, Dahllof M, Lundh M, Rasmussen DN, Nilsen MD, Billestrup N, Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. 2011. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med* 17:378–390.
- Delcuve GP, Khan DH, Davie JR. 2012. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: Emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* 4:5.
- Duan H, Ning M, Zou O, Ye Y, Feng Y, Zhang L, Leng Y, Shen J. 2015. Discovery of intestinal targeted TGR5 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *J Med Chem* 58:3315–3328.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. 2004. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45:737–744.
- Felisbino MB, Tamashiro WMSC, Mello MLS. 2011. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS ONE* 6:e29144.
- Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS. 2014. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem* 115:1937–1947.
- Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. 2009. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280:125–133.
- Ghiraldini FG, Silva IS, Mello MLS. 2012. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin dependent diabetic and aged mice. *Cytometry A* 81:755–764.
- Gray SG, Meyts P. 2005. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 21:416–433.
- Han T, Proctor WR, Costales, Cai H, Everett RS, Thakker DR. 2015. Four cation-selective transporters contribute to apical uptake and accumulation of metformin in Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 352:519–528.
- Hezroni H, Sailaja BC, Meshorer E. 2011. Pluripotency-related, valproic acid (VPA)-induced genome-wide histone H3 lysine 9 (H3K9) acetylation patterns in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 286:35977–35988.
- Jayaraman S, Patel A, Jayaraman A, Patel V, Holtermann M, Prabhakar B. 2013. Transcriptome analysis of epigenetically modulated genome indicates signature genes in manifestation of type 1 diabetes and its prevention in NOD mice. *PLoS ONE* 8:e55074.
- Jenuwein T, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* 293:1074–1080.
- Keating ST, El-Osta A. 2012. Chromatin modifications associated with diabetes. *J Cardiovasc Trans Res* 5:399–412.
- Keating ST, El-Osta A. 2013. Epigenetic changes in diabetes. *Clin Genet* 84:1–10.
- Keating ST, El-Osta A. 2015. Epigenetics and Metabolism. *Circ Res* 116:715–736.
- Kojima K, Shimada T, Nahareda Y, Watanabe M, Ishizaki J, Sai Y, Miyamoto K, Aburada M. 2011. Preventive effect of geniposide on metabolic disease status in spontaneously obese type 2 diabetic mice and free fatty acid-treated HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 34:1613–1618.
- Kuo M, Allis C. 1998. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20:615–626.
- Leung A, Parks BW, Du J, Trac C, Setten R, Chen Y, Brown K, Lusic AJ, Natarajan R, Schones DE. 2014. Open chromatin profiling in mice livers reveals unique chromatin variations induced by high fat diet. *J Biol Chem* 289:23557–23567.
- Ling C, Groop L. 2009. Epigenetics: A molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 58:2718–2725.
- Luo L, Gassman KL, Petell LM, Wilson CL, Bewersdorff J, Shopland LS. 2009. The nuclear periphery of embryonic stem cells is a transcriptionally permissive and repressive compartment. *J Cell Sci* 122:3729–3737.
- Luo M, Liu Z, Hao H, Lu T, Chen M. 2012. High glucose facilitates cell cycle arrest of rat bone marrow multipotent adult progenitor cells through transforming growth factor- β 1 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling without changing Oct4 expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39:843–851.

- Ma J, Guo X, Zhang S, Liu H, Lu J, Dong Z, Liu K, Ming L. 2015. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines. *Mol Med Rep* 11:4231–4525.
- Mello MLS, Aldrovani M, Moraes AS, Guaraldo AMA, Vidal BC. 2009. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 40:577–585.
- Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, Ikeo S, Komatsu M, Aizawa T, Hashizume K. 2000. Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells. *J Biol Chem* 275:20880–20886.
- Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro* 26:1243–1246.
- Obier N, Muller AM. 2010. Chromatin flow cytometry identifies changes in epigenetic cell states. *Cells Tissues Organs* 191:167–174.
- Pang J, Xi C, Dai Y, Gong H, Zhang T. 2012. Altered expression of base excision repair genes in response to high glucose-induced oxidative stress in HepG2 hepatocytes. *Med Sci Monit* 18:BR281–BR285.
- Patel T, Patel V, Singh R, Jayaraman S. 2011. Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. *Immunol Cell Biol* 89:640–649.
- Peakman M. 2013. Immunological pathways to β -cell damage in Type 1 diabetes. *Diab Med* 30:147–154.
- Peserico A, Simone C. 2011. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol* 2011:1–10.
- Polioudaki H, Kourmouli N, Drosou V, Bakou A, Theodoropoulos PA, Singh PB, Giannakourous T, Georgatos SD. 2001. Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep* 2:920–925.
- Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameur A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, Wilcox S, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Dunham I, Komorowski J, Wadelius C. 2007. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res* 16:708–719.
- Rafehi H, Balcerczyk A, Lunke S, Kaspi A, Ziemann M, Kn H, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du XJ, Chang L, Haviv I, Keating ST, Karagiannis TC, El-Osta A. 2014. Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition. *Genome Res* 24:1271–1284.
- Rao J, Bhattacharya D, Banerjee B, Sarin A, Shivashankar GV. 2007. Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363:263–268.
- Rossetti L. 1995. Glucose toxicity: The implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 18:255–260.
- Russo J, Santucci-Pereira J, de Cicco RL, Sheriff R, Russo PA, Peri S, Sifker M, Ross E, Mello ML, Vidal BC, Belitskaya-Lévy I, Arslan A, Zeleniuch-Jacquotte A, Bordas P, Lenner P, Ahman J, Afanasyeva Y, Hallmans G, Toniolo P, Russo IH. 2012. Pregnancy-induced chromatin remodeling in the breast of postmenopausal women. *Int J Cancer* 131:1059–1070.
- Schones DE, Leung A, Natarajan R. 2015. Chromatin modifications associated with diabetes and obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1557–1561.
- Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G. 2001. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3:114–120.
- Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. 2005. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: Implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 6:520–524.
- Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K, Narahara H. 2008. Histone deacetylase inhibitors induce growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 21:109–115.
- Tóth KF, Knoch TA, Wachsmuth M, Frank-Stöhr M, Stöhr M, Bacher CP, Müller G, Rippe K. 2004. Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J Cell Sci* 117:4277–4287.
- Villeneuve LM, Natarajan R. 2010. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *AJP-Renal Physiol* 299:F14–F25.
- Villeneuve LM, Reddy MA, Natarajan R. 2011. Epigenetics: Deciphering its role in diabetes and its chronic complications. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38:451–459.
- Wilkin TJ. 2007. Changing perspectives in diabetes: Their impact on its classification. *Diabetologia* 50:1587–1592.
- Wong TP, Chan LK, Leung PS. 2015. Involvement of the niacin receptor GPR109a in the local control of glucose uptake in small intestine of type 2 diabetic mice. *Nutrients* 7:7543–7561.
- Wu R, Terry AV, Singh PB, Gilbert DM. 2005. Differential sub-nuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol Biol Cell* 16:2872–2881.
- Yuasa T, Amo K, Ishikura S, Nagaya H, Uchiyama K, Hashida S, Ebina Y. 2014. Development of in vitro model of insulin receptor cleavage induced by high glucose in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 445:236–243.
- Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA. 2004. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem* 279:47898–47905.
- Zhang Z, Li J, Jiang X, Yang L, Lei L, Cai D, Zhang H, Chen H. 2014. GLP-1 ameliorates the proliferation activity of INS-1 cells inhibited by intermittent high glucose concentrations through the regulation of cyclins. *Mol Med Rep* 10:683–688.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Table S1. Geometric, densitometric and textural parameters obtained by image analysis of Caco-2 cells treated with VPA and TSA for 1 h under normoglycemic or hyperglycemic conditions

Groups	Treatment Items	Area (μm^2)			Perimeter (μm)			OD		SDtd	
		X	S	Md	X	S	Md	X	S	X	S
LG	Control	112.71	36.00	103.67	47.63	10.76	45.49	0.59	0.06	15.01	3.00
	1.0 mM VPA	116.28	63.57	96.37*	47.45	18.83	41.83*	0.64*	0.06	14.09*	2.27
	100 ng/mL TSA	130.64	55.20	114.06*	51.53	16.00	48.76*	0.62*	0.06	12.45*	2.43
HG	Control	115.31	41.43	106.06	47.43	12.20	44.52	0.63*	0.07	12.35*	2.83
	1.0 mM VPA	134.06	42.35	123.79*§	52.76	11.00	51.21*§	0.58*§	0.07	12.72*	3.16
	100 ng/mL TSA	136.84	42.12	130.89*	50.79	10.01	48.93*§	0.60§	0.06	12.14*	1.88

The values for the VPA and TSA treatments differ significantly at the P 0.05 level (Mann-Whitney test for area and perimeter or Student's t test for OD and SDtd) from LG control (*) or HG control (§). OD, optical density; Md, median; S, standard deviation; SDtd, standard deviation of the grey average per nucleus; X, arithmetic mean; n, 200.

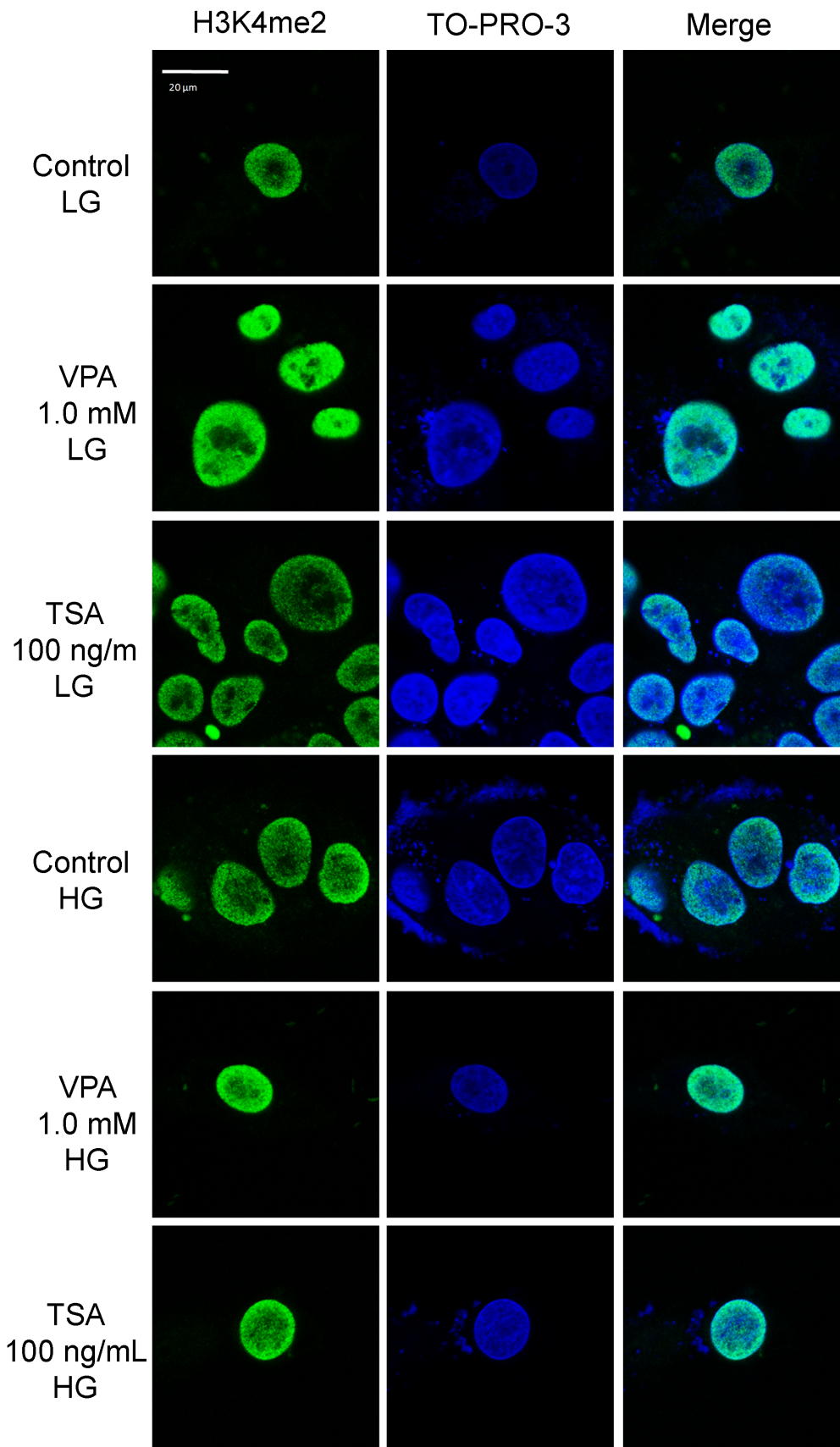


Fig S1. Immunofluorescence of H3K4me2 signals obtained using confocal microscopy for HepG2 cells under normoglycemic (LG) and hyperglycemic (HG) conditions

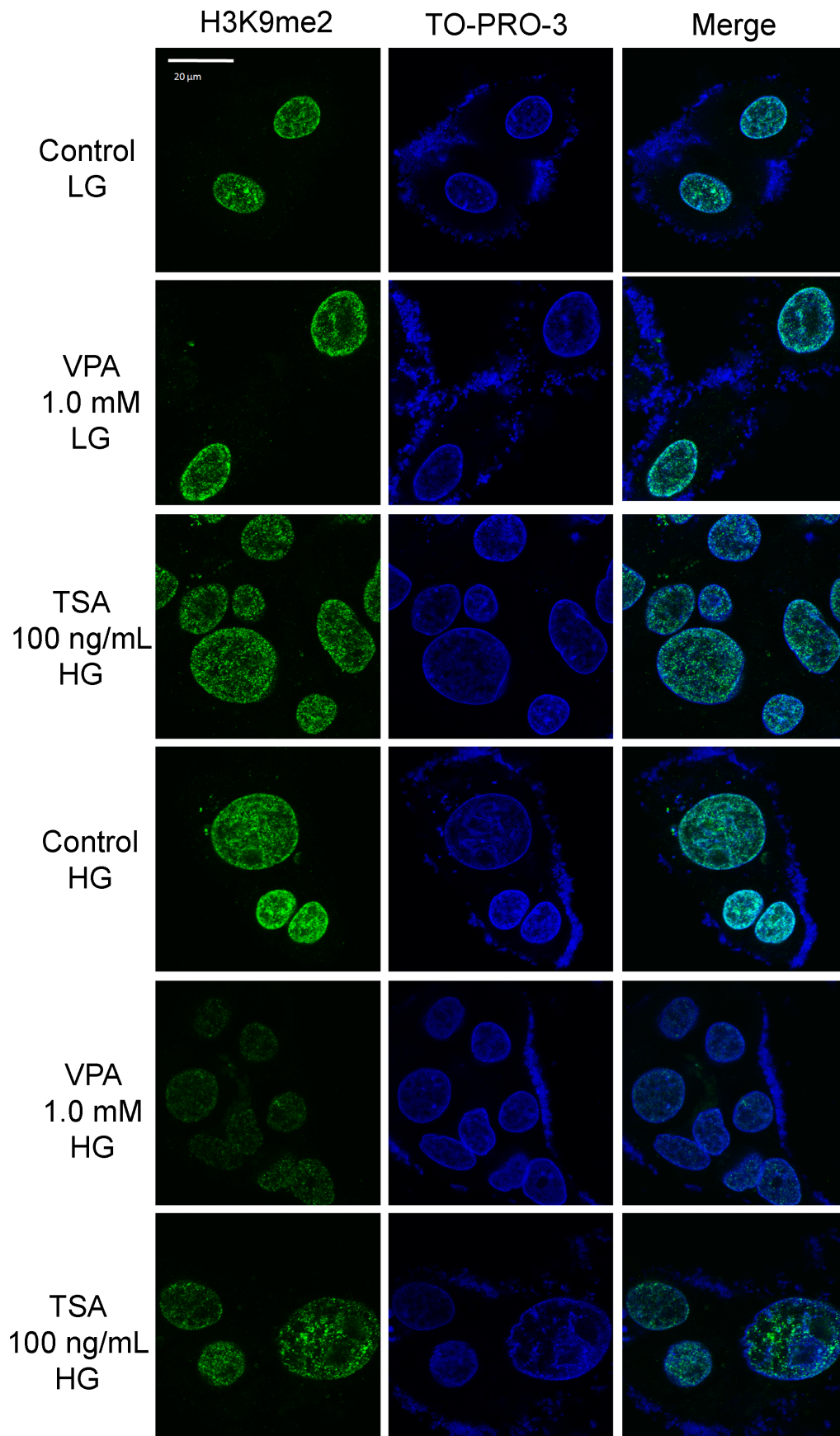


Fig S2. Immunofluorescence of H3K9me2 signals obtained using confocal microscopy for HepG2 cells under normoglycemic (LG) and hyperglycemic (HG) conditions

Manuscrito em preparação:

Valproic acid ameliorates the deleterious effect of hyperglycemia through complement and coagulation cascade modulation

Marina Barreto Felisbino^{1*}, Mark Ziemann², Ishant Khurana², Maria Luiza S. Mello^{1†}, Assam El-Osta^{2†}

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

²*Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory and Epigenomics Profiling Facility, Baker IDI Heart and Diabetes Institute, The Alfred Medical Research and Education Precinct, Melbourne, Vic, Australia*

†Shared senior authorship

*Corresponding author: Marina Barreto Felisbino. Institute of Biology, University of Campinas, R. Monteiro Lobato 255, 13083-862 Campinas, SP, Brazil. Tel: +55 19 35216124. E-mail: felisbinomb@gmail.com

ABSTRACT

Diabetes is a multifactorial disorder with several factors, including epigenetics, influencing its progression. Inappropriate chromatin remodeling and histone acetylation as well as inflammatory stressors are important components in diabetes development. Recently, histone deacetylase (HDAC) inhibitors (HDACi) have proved to reduce the severity of inflammatory diseases. We have previously shown that chromatin alterations promoted by HDACi under hyperglycemia in HepG2 cells, related with reduction of hepatic glucose production, may be a function of differently regulated nuclear domains and genes. Here we attempted a genome-wide analysis of a multitude of genes potentially impacted by the HDACi valproic acid (VPA), aiming to understand its mechanisms of action and therapeutic target in amelioration of hyperglycemic state. High throughput sequencing technologies have greatly enhanced our ability to interrogate this kind of cellular responses. Under this context we could, for the first time, associate HDAC inhibition with complement and coagulation gene modulation. Complement and coagulation pathways have common evolutionary origins and understanding the crosstalk between these pathways has fundamental clinical implications in the context of inflammatory diseases. The transcription factor network may be the connecting point between immune system and metabolic pathways and further investigation of these gene regulators as well of the acetylation pattern of gene promoters may better complete our conclusions. Until this moment, we could unravel a new avenue of action, and a new mechanism of mitigation of hyperglycemia promoted by VPA, which might improve the therapeutic approaches for diabetes.

INTRODUCTION

Diabetes is a multifactorial disorder with several pathways influencing its progression (Gray and Meyts, 2005). In addition to genetic, environmental and nutritional factors play a role in its pathogenesis; therefore an epigenetic component has been suggested (Keating and El-Osta, 2012; 2013). Evidences point to inappropriate chromatin remodeling and histone acetylation as important events in diabetes development (Christensen et al., 2011; Felisbino et al., 2016). Moreover, both diabetes forms (I and II) seem to involve common extracellular inflammatory stressors in the pancreatic islets, inducing an intracellular signaling cascade (Donath et al., 2008). Recent findings suggest that metabolic disorders such as diabetes, obesity, and atherosclerosis all possess an important inflammatory component (Mamane et al., 2009; Jin et al, 2013).

The epigenetic component of metabolic/inflammatory disorders has come recently to attention, revealing epigenetic drugs as potential immunomodulatory agents. The recent discovery that histone deacetylases (HDAC) inhibitors (HDACi) have the ability to reduce the severity of inflammatory and autoimmune diseases, including diabetes, in several animal models, has posed them as alternative anti-inflammatory agents (Dinarello, 2010). Their paradigmatic mode of action has been considered as increase histone acetylation, which controls gene expression; however, recent studies have shown a more diverse mechanism of gene regulation (Halsall et al., 2012; Ooi et al., 2015).

We have previously shown that treatment of HepG2 human hepatocytes with HDACi promoted reduction of hepatic glucose production, although no difference was detected in global chromatin structure and epigenetic landscape. Chromatin alterations promoted by HDACi under hyperglycemia may be a function of the differently regulated nuclear domains and genes rather than of global remodeling (Felisbino et al., 2016). Therefore, identification of a multitude of genes potentially impacted by HDAC inhibition is paramount to a

comprehensive understanding of its mechanisms of action and therapeutic target in amelioration of hyperglycemic state (Rafehi et al., 2014). In this study, HepG2 cells exposed to high-glucose (HG) were treated with valproic acid (VPA), the worldwide most used HDAC inhibitor. The rapid emergence and increased accessibility of high throughput sequencing technologies has facilitated genome-wide analysis and greatly enhanced our ability to interrogate cellular responses. In consequence, we could, for the first time, associate HDAC inhibition with complement and coagulation gene expression modulation, unraveling a new avenue of action, as well as a new mechanism of mitigation of hyperglycemia promoted by VPA.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HepG2 cells from ATCC at passage 9 were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) basal glucose (Gibco, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GE) and penicillin and streptomycin (Gibco) (100 UI and 100 g/mL, respectively). The cells were cultivated for 48 h in normoglycemic (LG) or hyperglycemic (HG) medium, containing D-glucose (Sigma, St. Louis, USA) up to a final concentration of 20 mM. Cells under LG and HG conditions were then treated with 1.0 mM VPA (Sigma) for another 12 h and compared with the respective untreated controls.

RNA isolation

Cells were disrupted with trizol. RNA was isolated from trizol homogenates using the Direct-zol Kit (Zymo Research, Irvine, USA). RNA was quantified on the MultiNA bioanalyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

mRNA sequencing library preparation and deep sequencing

NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module was used to enrich mRNA from 1 µg of total RNA. We used the NEBNext® Ultra™ Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (San Diego, USA) to generate barcoded libraries. Libraries were quantified on the MultiNA bioanalyzer (Shimadzu) and pooled to equimolar ratios for sequencing.

Cluster generation was performed at a concentration of 10 pM (TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS) and the flow cell was run on Illumina HiSeq2500 generating 50 nt reads.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

The culture medium was removed and cells were fixed for 10 min with 1% formaldehyde in PBS. This solution was later replaced by 0.125M glycine in PBS for 10 min to quench crosslink reaction. Harvested cells were homogenized in 1% SDS cell lysis buffer. Chromatin sheared by sonication (Diagenode, Liege, Belgium) had its shearing efficiency evaluated on MultiNA electrophoresis microchip (Shimadzu). Sheared chromatin with an optimal size range of 100-1000 bp with a peak at ~200-300 bp was processed for immunopurification. ChIP was performed by addition of antibody directed to histone H3K9/14ac (Millipore, Billerica, USA) and Protein A Dynabeads (Novex LifeTech, Waltham, USA). Samples were incubated overnight at 4°C with rotation. Immunoprecipitated complexes were collected with DynaMag™-2 magnet (Invitrogen, Waltham, USA), washed (in the following sequence: low salt buffer, high salt buffer, LiCl buffer, TE buffer and TE 0,01% SDS buffer) and eluted in elution buffer with 1% SDS. Protein-DNA cross-links were reversed by adding Proteinase K (Sigma) and incubation at 62°C for 2 h. DNA was recovered using a Nucleospin column and quantified by Qubit (Life Technologies, Carlsbad, USA). Two replicate ChIPs were performed for each sample and input pooled for library preparation.

Library construction and ChIP deep sequencing

ChIP-seq libraries were prepared using NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina® from New England Libraries. Briefly, 10 ng of immunopurified DNA or genomic

DNA from an input sample was end-repaired, adenylated and ligated to universal library adapters. Size selection of DNA 250–350-bp was achieved with Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA). DNA libraries were enriched with 12-cycle PCR amplification (98°C for 30 s; then 12 cycles of 98°C for 10 s, 65°C for 10 s, 72°C for 60 s; then 65°C for 5 min). Column purified libraries were quantified fluorimetrically and visualized by MultiNA electrophoresis for quality control. Barcoded libraries were diluted to 10 nM, pooled and stored at -20°C prior to cluster generation and sequencing on a HiSeq2500 instrument (Illumina) according to the manufacturer's protocols. Sequencing depth ranged from 44.2 to 76.7 million informative sequence tags per ChIP sample, and for input samples, the range was 16.2 to 39.9 million reads.

Bioinformatics analysis

mRNA-seq data processing

Low quality bases (Qscore < 20) were removed from the 3' end with FASTX Toolkit 0.0.13. Trimmed reads less than 20 nt were also discarded. The human genome sequence and annotation (GRCh37.75) set were downloaded from the Ensembl website (www.ensembl.org/info/data/ftp). Reads were aligned using STAR version 2.3.1p_r359 (Dobin et al., 2013). Sorted bam files were generated with SamTools (version 0.1.19-44428cd; Li and Durbin, 2009). A gene expression count matrix was generated with featureCounts v1.4.2 (Liao et al., 2014) using a map quality threshold of 10. Genes with an average of fewer than 10 reads per sample were omitted from downstream analysis.

Statistical analysis of gene expression

EdgeR version 3.6.8 and limma version 3.20.9 were used to perform statistical analysis (Robinson et al., 2010). False discovery rate controlled p-values (FDR) ≤ 0.05 were considered significant.

Pathway analysis

Gene expression of pathways was analyzed with GSEA-P using the classic mode (Subramanian et al., 2005). A differential abundance score was obtained for each gene by multiplying the significance ($-1/\log_{10}$ p-value) by the sign of the fold change. This score was used to rank genes from most upregulated to most downregulated. Curated gene sets were downloaded from MSigDB (Liberzon et al., 2011).

ChIP-Seq data processing

Low quality bases and reads were removed as mentioned above for mRNA data, and reads were aligned to the human genome using Burrows-Wheeler Aligner (Li and Durbin, 2009). Samtools was again used to convert SAM files to BAM format. The coordinates of transcriptional start sites (TSS) were obtained from the Ensembl gene annotation file (GTF) and 6 kbp windows around the TSS were generated using BedTools (version 2.17.0; Quinlan and Hall, 2010). Overlapping regions were also merged. The reads aligned to these regions of interest were quantified with Featurecounts as above described to generate a count matrix. Regions with an average of fewer than 10 reads per sample in were omitted from downstream analysis. EdgeR software was used to determine statistical significance of differential histone modification as above mentioned.

RESULTS

Effect of hyperglycemia on HepG2 gene expression

In order to understand the effect of high glucose on hepatic gene expression and function, we used RNA-seq to profile gene expression. The power and richness of this counting-based measurement comes at the cost of routinely handling tens to hundreds of millions of reads. Whereas early users necessarily developed their own custom computer code to analyze the first RNA-seq datasets, a new generation of more sophisticated algorithms and software tools are emerging to assist the analysis phase of these projects (Pepke et al., 2009). After alignment and read counts, secondary analysis was performed and some of the

preliminary results are summarized below. Multi-Dimensional Scaling (MDS) Plot was used to measure the similarity of the samples. The closer the labels are together, the more similar the samples are. Thus, it is interesting to see that low (LG) and high glucose (HG) sample groups clustered together (Figure 1A). Multidimensional scaling analysis also shows that HG treatment had a strong effect on HepG2 cells, with 4,259 genes showing differential expression ($FDR \leq 0.05$; Figure 1B – red points). This figure is much higher than that reported for high glucose treated monocytes (Miao et al., 2013) suggesting that hepatic cells are more responsive to changes in carbohydrate supply.

The top 50 differentially expressed genes by significance are shown in heatmap form (Figure 1C). Some of the upregulated genes are: *TXNIP*, a known hyperglycemia inducible gene that is highly abundant in HepG2 cells (TXNIP protein inhibits the normal function of thioredoxin leading to accumulation of ROS.); *SERPING1*, which encodes C1 esterase inhibitor, and is involved in inhibition of complement cascade; *MPZ*, that encodes a structural component of the myelin sheath and is thought to be specific to nervous system tissues; *MSMO1*, that encodes a protein involved in cholesterol biosynthesis; *PCSK9*, whose protein acts binding to and degrading low-density lipoprotein receptors; *IGF2*, that encodes an insulin like growth factor, the central regulator of somatic growth and cell proliferation. Some of the downregulated genes are: *MANF*, whose protein promotes survival of dopaminergic neurons, possibly playing a role in ER stress response; *HSPA5* (aka *GRP78*), which encodes a glucose sensing protein, whose expression is upregulated by glucose starvation and is also present in the ER; *CALR*, that encodes calreticulin, a major calcium storage protein in the ER; *DNAJB11*, which encodes yet another ER localized protein that acts as a chaperone for a number of partners. The glucose transporter gene *SLC2A1*, encoding GLUT1 was also strongly downregulated.

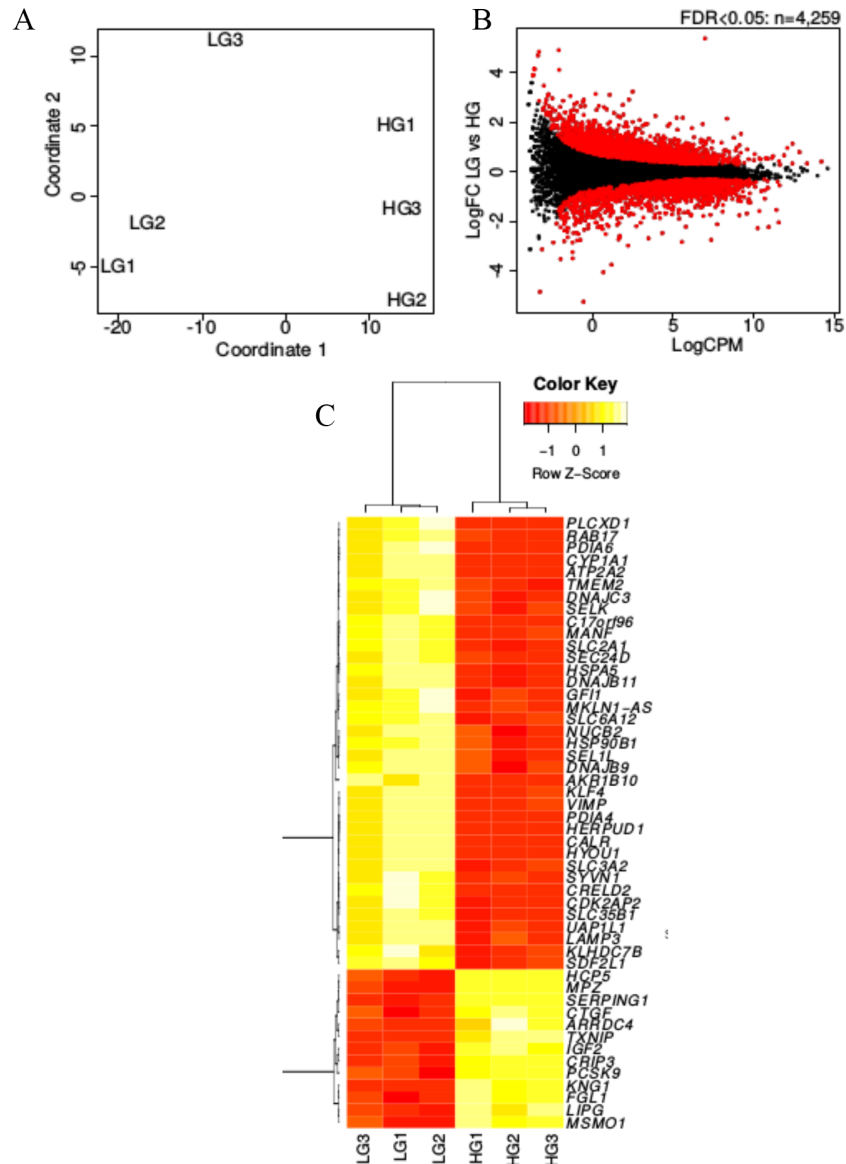


Figure 1. RNA-seq analysis reveals massive alterations in HepG2 cells gene expression in response to high glucose. (A) Multidimensional scaling analysis of library size normalized counts shows sample clusters based upon treatment on dimension 1. (B) Smear plot depicts the log2 fold change and average expression level log2 counts per million for each detected gene. Genes with differential expression ($FDR_{w} \leq 0.05$) are highlighted in red. (C) Heatmap of the 50 most significant differentially expressed genes.

A powerful analytical method called Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for interpreting gene expression data was used. We performed GSEA with REACTOME gene sets in order to understand the main pathways altered by hyperglycemia. From 575 gene sets

considered, 34 were upregulated and 139 were downregulated ($FDR \leq 0.05$). The top 20 gene sets by enrichment score in the up and downregulated directions are shown (Figure 2A). Downregulated gene sets included those associated with extracellular matrix interactions, chaperone function, calnexin/calreticulin cycle, N-glycan trimming and peptide chain elongation (Figure 2A), while gene sets upregulated in response to hyperglycemia included cholesterol biosynthesis, complement cascade and formation of fibrin/clotting (Figure 2B, C, D).

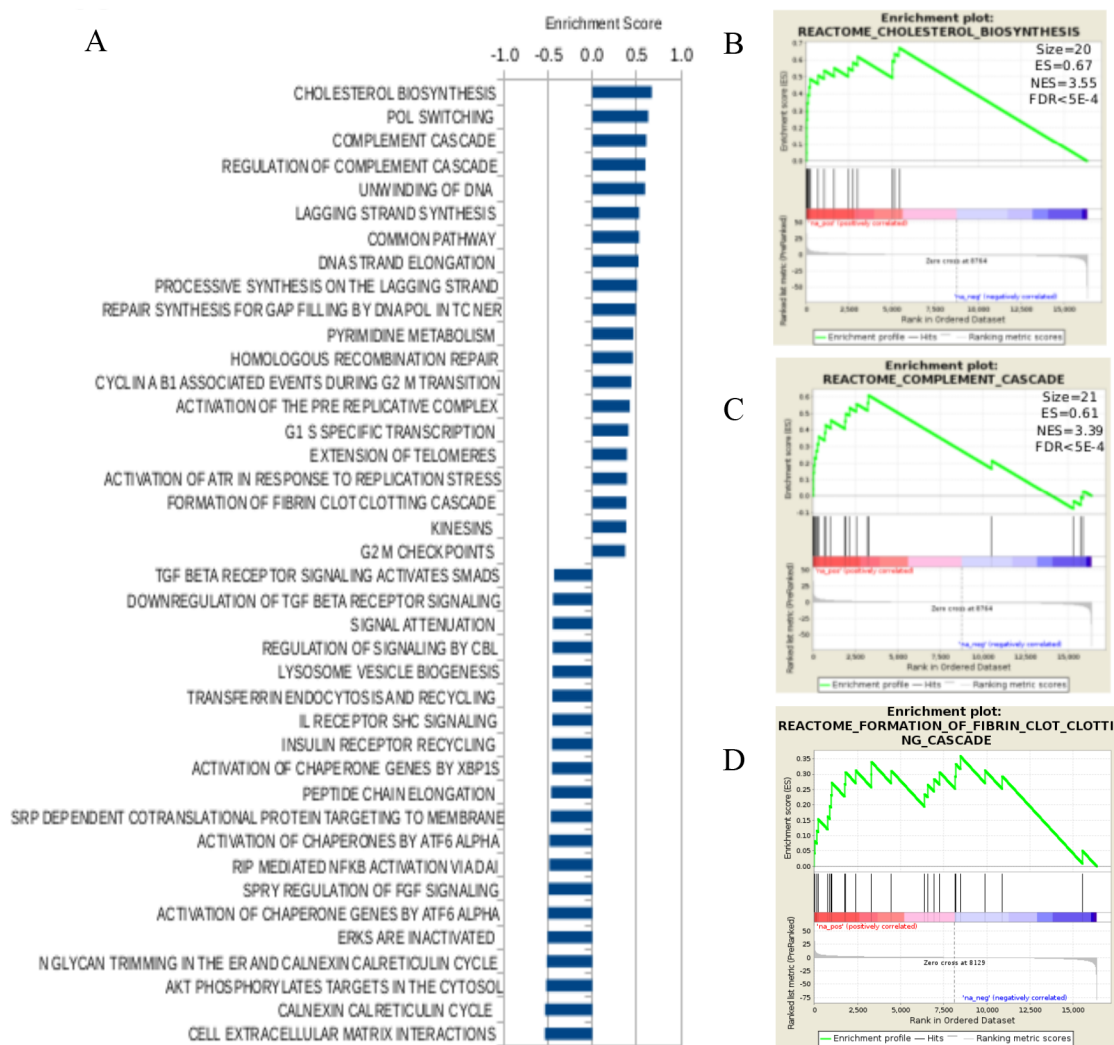


Figure 2. Gene sets differently expressed in response to high glucose. (A) Top 20 REACTOME pathways with differential expression determined with pre ranked gene set enrichment analysis (GSEA-P). (B, C, D) Enrichment plots show upregulation of cholesterol biosynthesis, complement cascade and clotting cascade in response to hyperglycemia.

Does VPA ameliorate the deleterious effect of hyperglycemia?

MDS plot shows that samples cluster based on sample group. Untreated samples (LG, HG) are clearly separated from VPA-treated samples (LGV, HGV) as well as normoglycemic samples (LG, LGV) are separated from hyperglycemic ones (HG, HGV) (Figure 3A). MA plot shows that 7,802 genes were altered in expression due to VPA treatment under hyperglycemia (Figure 3B). Heatmap of top 50 genes shows that the majority was upregulated. It seems a pattern is observed where genes initially low expressed were upregulated after VPA treatment; on the other hand, genes initially high expressed were downregulated by these conditions (Figure 3C).

The top 20 gene sets by enrichment score in the up and downregulated directions are shown (Figure 4A). Gene sets upregulated included those related to function of neurons including potassium channels, neurotransmitter receptor, L1-type/ankyrins interactions. Downregulated gene sets included common pathway of fibrin clot formation, complement cascade and genes involved in protein synthesis.

Complement cascade genes were downregulated by VPA in hyperglycemic condition (Figure 4B). When looking at the regulation of all genes in response to glucose and VPA on a two dimensional rank-rank plot, we see that these are distributed relatively throughout the four quadrants (Figure 4C). Plotting genes related to complement cascade with the same method demonstrates the upregulation of these genes with hyperglycemia and downregulation with VPA (Figure 4D). The FDR corrected MANOVA p-value for this association is $1.5E-7$. Clotting cascade pathways showed a similar pattern of regulation (FDR MANOVA = $2.0E-4$).

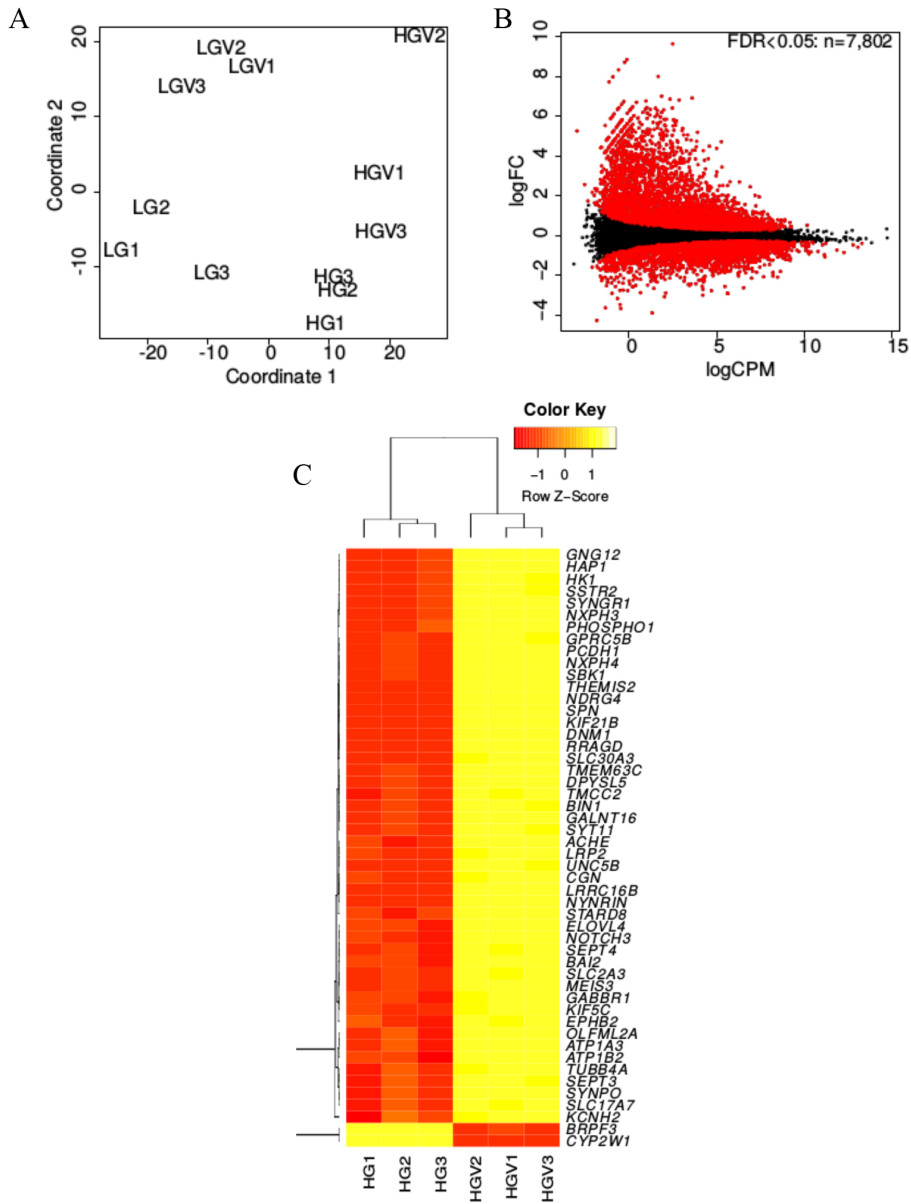


Figure 3. RNA-seq analysis reveals massive alterations in HepG2 cells gene expression in response to VPA under hyperglycemia (A) Multidimensional scaling analysis of library size normalized counts shows samples cluster based upon treatment groups. (B) Smear plot showing the effect of VPA treatment on hyperglycemic HepG2 cells. Genes with differential expression ($FDR \leq 0.05$) are highlighted in red. (C) Heatmap of the 50 most significant differentially expressed genes responding to VPA.

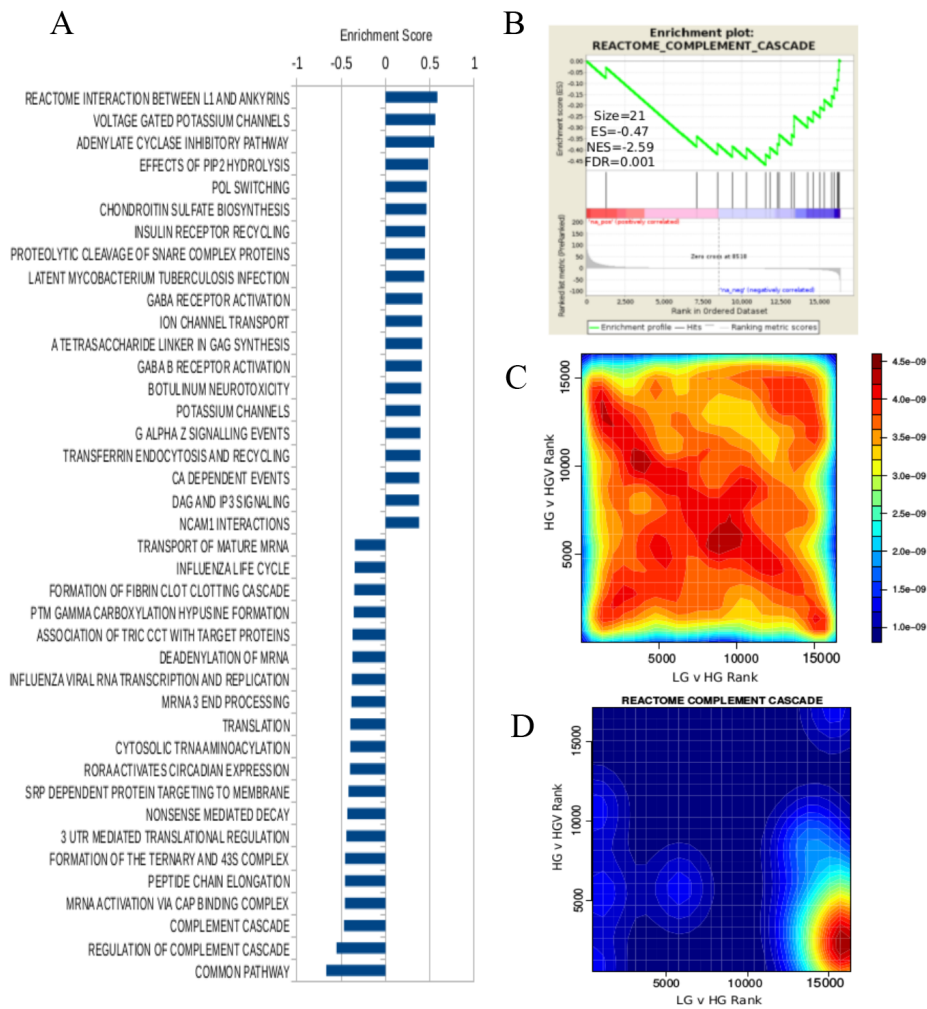


Figure 4. VPA reverses hyperactivity of clotting and complement pathways in hyperglycemia-treated HepG2 cells (A) Top 20 REACTOME pathways with differential expression in response to VPA determined with preranked gene set enrichment analysis (GSEA-P). (B) Enrichment plots show upregulation of complement cascade in response to VPA. (C) Rank-rank plots of gene expression changes for all detected genes and (D) specifically for genes in the REACTOME complement cascade pathway.

Consequences on HepG2 histone acetylation

While ChIP-seq technique revealed an enrichment of acetylation under all experimental conditions in comparison with input samples as depicted in Figure 5, an increase in sample replicates as well as better analytical tools may be required for a more accurate interpretation of results. Differential acetylation analysis does not show a strong correlation

for upregulated genes under hyperglycemia (Figure 6A). On the other hand, genes downregulated at the mRNA level also showed reduced acetylation (Figure 6B).

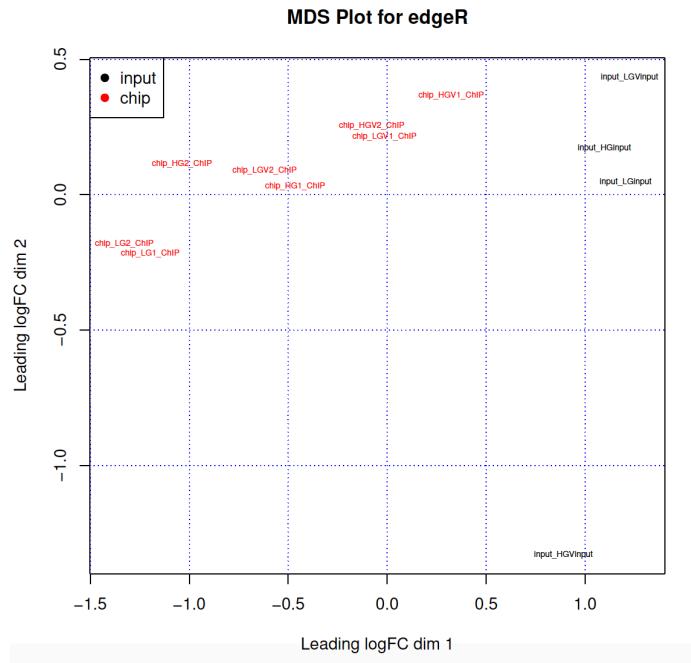


Fig. 5. Multidimensional scaling analysis of all experimental conditions shows the divergence between input and ChIP-enriched samples

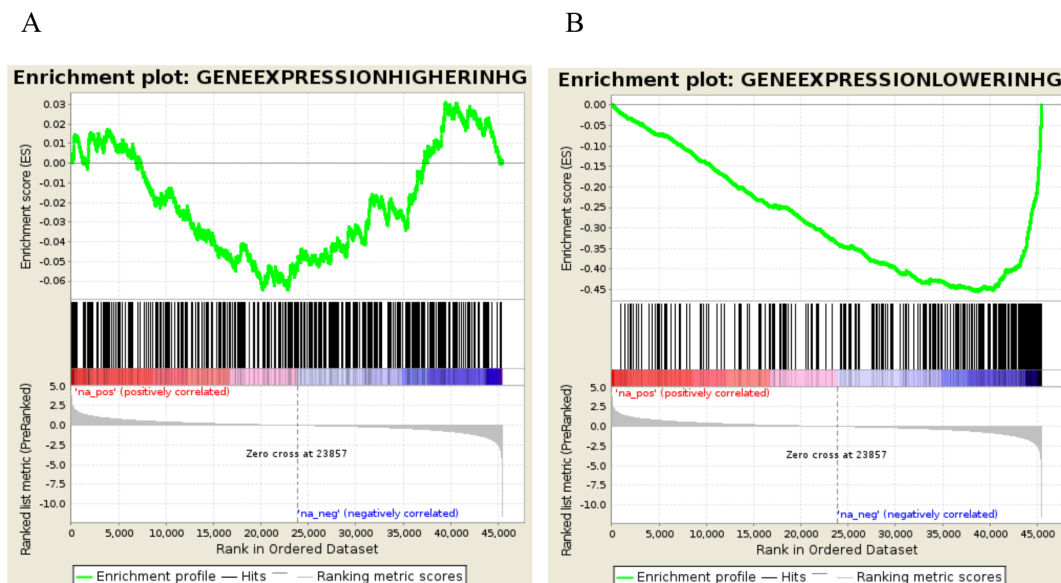


Fig. 6. (A) Genes that are upregulated at the mRNA level with HG do not show an overall trend of increasing H3K9/K14 acetylation, while (B) genes that are downregulated at the mRNA level with HG show a significant overall trend of decreasing H3K9/K14 acetylation

DISCUSSION

High throughput sequencing is capable of generating large amount of data, which require specialized computational structure and methods for a trustful analysis. A powerful analytical method called Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) for interpreting gene expression data has been developed (Subramanian et al., 2005). The method derives its power from focusing on gene sets, that is, groups of genes that share common biological function, chromosomal location, or regulation. Single-gene analysis may miss important effects on pathways. Cellular processes often affect sets of genes acting in concert. An increase of 20% in all genes encoding members of a metabolic pathway may dramatically alter the flux through the pathway and may be more important than a 20-fold increase in a single gene (Subramanian et al., 2005). Therefore, the top 20 gene sets by enrichment score in the up and downregulated directions were analyzed in the present study in order to understand the main pathways altered by hyperglycemia. Potently promisor pathways are that altered by high glucose exposure and then reverted by VPA treatment. Plotting genes related to complement cascade on a two-dimensional rank-rank plot demonstrated that these genes were upregulated by hyperglycemia and downregulated with VPA treatment (Figure 4D). The FDR corrected MANOVA p-value for this association is $1.5E-7$. Clotting cascade pathways showed a similar pattern of regulation (FDR MANOVA = $2.0E-4$). These were thus the pathways initially investigated in order to find a new mechanism of mitigation of hyperglycemia promoted by HDACi.

Indeed, the participation of complement in metabolism and metabolic disorders has recently came into evidence and has received increasing scientific attention. A recent study demonstrated higher plasma C3 levels in diabetic patients compared to healthy individuals (Hess et al., 2012; Phieler et al., 2013). Increased complement gene expression has also been associated with adipocyte insulin resistance, waist circumference, and triglyceride levels (van

Greevenbroek et al., 2012; Vlaicu et al., 2016). As a prime initiator and important modulator of immunological and inflammatory processes, the complement system has emerged as an attractive target for early and upstream intervention in inflammatory diseases (Ricklin and Lambris, 2013).

The complement system, a central component of immunity and modulator of inflammatory processes, comprises a complex and tightly regulated assembly of proteins involving various soluble and surface-bound components. Depending on the activation trigger, the complement cascade follows one of three pathways (classical, lectin or alternative) (Ricklin and Lambris, 2007).

Complement and coagulation pathways, the major blood-borne proteolytic cascades, have common evolutionary origins, although are generally viewed as distinct (Conway, 2015). The interplay between complement and coagulation can be highlighted by C3, C4, C5a e FB complement protein presence in thrombus (Howes et al., 2012). Procoagulation enzymes thrombin and IXa, Xa, XI factors seem activate complement (Amara et al., 2010). MASP2, a component of lectin complement activation, is capable of cleaving prothrombin in thrombin (Pagowska-Klimek and Cedzynski, 2014). Thus, understanding the crosstalk between these pathways has fundamental clinical implications in the context of diseases with an inflammatory pathogenesis, in which complement–coagulation interactions contribute to the development of complications (Markiewski et al., 2007).

Liver, mainly hepatocytes, is responsible for the majority of complement and coagulation components biosynthesis. Furthermore, the promoter regions of these components are controlled by several common liver-specific transcription factors like HNFs and C/EBP (Qin and Gao, 2006). Thomas and co-workers (2013) compared the genome-wide binding of Fxr and Hnf4 α in mouse liver and characterized their cooperative activity on binding to and activating target gene transcription. Genes co-bound by Fxr and Hnf4 α are enriched in

complement and coagulation cascades, as well as in pathways related to drug metabolism. Furthermore, these transcription factors are involved in gluconeogenesis and glycogenolysis gene expression (Jitrapakdee, 2012; Oh et al., 2013). Thus, the transcription factor network controlling their expression may be the connecting point between immune system and metabolism pathways. Therefore, further investigation on these gene regulators may aid to complete our initial hypothesis. Further investigation is required to a better understanding of the acetylation pattern under hyperglycemic condition and its consequence in gene expression in VPA-treated cells, which would better implement our conclusions.

In this work we could for the first time associate HDAC inhibition with complement and coagulation gene expression modulation, unraveling a new avenue of action, as well as a new mechanism of mitigation of hyperglycemia promoted by VPA. Once confirmed by *in vivo* assays, this hypothesis might help to improve the therapeutic approaches for diabetes treatment.

REFERENCES

- Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, Bruckner UB, Nilsson B, Gebhard F, Lambris JD, Huber-Lang M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 185: 5628–5636, 2010.
- Christensen DP, Dahllof M, Lundh M, Rasmussen DN, Nilsen MD, Billestrup N, Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. Histone deacetylase (HDAC) inhibition as a novel treatment for diabetes mellitus. *Mol Med* 17: 378-390, 2011.
- Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost* 13: S121-32, 2015.
- Dinarello CA. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. *Cell* 40: 935-950, 2010.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15-21, 2013.
- Donath MY, Storling J, Berchtold LA, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Cytokines and beta-cell biology: from concept to clinical translation. *Endocr. Rev.* 29:334–50, 2008.
- Felisbino MB, Alves da Costa T, Gatti MS, Mello ML. Differential Response of Human Hepatocyte Chromatin to HDAC Inhibitors as a Function of Microenvironmental Glucose Level. *J Cell Physiol* 231: 2257-2265, 2016.
- Gray SG, Meyts P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 416-433, 2005.

Halsall J, Gupta V, O'Neill LP, Turner BM, Nightingale KP. Genes are often sheltered from the global histone hyperacetylation induced by HDAC inhibitors. *PloS One* 7: e33453, 2012.

Hess K, Alzahrani SH, Mathai M, Schroeder V, Carter AM, Howel GI, Koko T, Strachan MW, Price JF, Smith KA, Grant PJ, Ajjan RA. A novel mechanism for hypofibrinolysis in diabetes: the role of complement C3. *Diabetologia* 55: 1103-1113, 2012.

Howes JM, Richardson VR, Smith KA, Schroeder V, Somani R, Shore A, Hess K, Ajjan R, Pease RJ, Keen JN, Standeven KF, Carter AM. Complement C3 is a novel plasma clot component with anti-fibrinolytic properties. *Diab Vasc Dis Res* 9: 216-225, 2012.

Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA. Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression. *Cell Metab* 17: 873-882, 2013.

Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 33-45, 2012.

Keating ST, El-Osta A. Chromatin modifications associated with diabetes. *J Cardiovasc Trans Res* 5: 399-412, 2012.

Keating ST, El-Osta A. Epigenetic changes in diabetes. *Clin Genet* 84: 1-10, 2013.

Kobow K, Kaspi A, Harikrishnan KN, Kiese K, Ziemann M, Khurana I, Fritzsche I, Hauke J, Hahnen E, Coras R, Mühlebner A, El-Osta A, Blümcke I. Deep sequencing reveals increased DNA methylation in chronic rat epilepsy. *Acta Neuropathol* 126: 741-756, 2013.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25: 1754-1760, 2009.

Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923-930, 2014.

Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 27: 1739-1740, 2011.

Mamane Y1, Chung Chan C, Lavalley G, Morin N, Xu LJ, Huang J, Gordon R, Thomas W, Lamb J, Schadt EE, Kennedy BP, Mancini JA. The C3a Anaphylatoxin Receptor Is a Key Mediator of Insulin Resistance and Functions by Modulating Adipose Tissue Macrophage Infiltration and Activation. *Diabetes* 58: 2006-2017, 2009.

Markiewski MM1, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* 28:184-192, 2007.

Miao F, Chen Z, Zhang L, Wang J, Gao H, Wu X, Natarajan R. RNA-sequencing analysis of high glucose-treated monocytes reveals novel transcriptome signatures and associated epigenetic profiles. *Physiol Genomics* 45: 287-299, 2013.

Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. Transcriptional regulators of hepatic gluconeogenesis. *Arch Pharm Res* 36: 189-200, 2013.

Ooi JY, Tuano NK, Rafehi H, Gao XM, Ziemann M, Du XJ, El-Osta A. HDAC inhibition attenuates cardiac hypertrophy by acetylation and deacetylation of target genes. *Epigenetics* 10: 418-430, 2015.

Pagowska-Klimek I, Cedzynski M. Mannan-binding lectin in cardiovascular disease. *Biomed Res Int* 2014: 616817, 2014.

- Pepke S1, Wold B, Mortazavi A. Computation for CHIP-seq and RNA-seq studies. *Nat Methods* 6: S22-32, 2009.
- Phieler J, Garcia-Martin R, Lambris JD, Chavakis T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. *Semin Immunol* 25: 47-53, 2013.
- Qin X, Gao B. The Complement System in Liver Diseases. *Cell Mol Immunol* 3: 333-340, 2006.
- Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* 26: 841–842, 2010.
- Rafehi H, Balcerczyk A, Lunke S, Kaspi A, Ziemann M, Kn H, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du XJ, Chang L, Haviv I, Keating ST, Karagiannis TC, El-Osta. Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition. *Genome Res* 24: 1271-1284, 2014.
- Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 25: 1265-1275, 2007.
- Ricklin D, Lambris JD. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions. *J Immunol* 190: 3839-3847, 2013.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26: 139-140, 2010.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15545-15550, 2005.
- Thomas AM, Hart SN, Li G, Lu H, Fang Y, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha and farnesoid X receptor co-regulates gene transcription in mouse livers on a genome-wide scale. *Pharm Res* 30: 2188-2198, 2013.
- van Greevenbroek MM, Ghosh S, van der Kallen CJ, Brouwers MC, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Up-regulation of the complement system in subcutaneous adipocytes from nonobese, hypertriglyceridemic subjects is associated with adipocyte insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 4742-4752, 2012.
- Vlaicu S, Tatomir A, Boodhoo D, Vesa S, Mircea P, Rus H. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunol Res*, 2016 [Epub ahead of print]

Discussão Geral

Quando observados em conjunto, os dados obtidos ao longo do período de Doutorado nos permitiram traçar o perfil de alterações cromatínicas, epigenéticas e de expressão gênica induzidas em células hepáticas pela condição de hiperglicemia. Além disso, foi possível entender, em detalhes, as consequências do tratamento com HDACi para esses perfis em células sob normoglicemia e hiperglicemia, e assim avaliar a ação dessas drogas como possíveis agentes terapêuticos.

Visando atingir os dois primeiros objetivos apresentados para esse Projeto que dizem respeito ao aspecto da cromatina e à abundância e localização de marcas epigenéticas, foram realizadas as análises que se encontram publicadas no artigo presente no capítulo I.

Os parâmetros obtidos, através de análise de imagem por sistema vídeo, apontaram para uma descompactação cromatínica nas células HepG2 tratadas com VPA e TSA em relação ao controle não tratado em situação normoglicêmica. Tais resultados, observados em uma situação normoglicêmica, estão em concordância com nossos dados prévios de descompactação cromatínica em células HeLa (Felisbino et al., 2011) e em células NIH 3T3 não transformadas tratadas com VPA e TSA (Felisbino et al., 2014). Essa remodelação cromatínica é corroborada pela observação da abundância de algumas modificações em histonas. A acetilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9ac) foi avaliada por nós, por se tratar de um alvo comum de modificação após tratamento com HDACis como o VPA e a TSA (Hezroni et al., 2011). Mais recentemente, a inibição de HDAC por VPA e TSA vem sendo também relacionada à indução de alteração nos níveis de metilação de histonas em astrócitos e neurônios corticais de ratos, com aumento de di e trimetilação de H3K4 (Marinova et al., 2011) e, em embriões de camundongos, com aumento de H3K4me e diminuição de H3K9me (Tung e Winn, 2010). Tais alterações epigenéticas parecem promover descompactação cromatínica em alguns modelos (Trievel, 2004; Bártoová et al., 2005; Goldberg et al., 2007),

podendo estar contribuindo para a remodelação cromatínica aqui observada através de análise de imagem. De fato, os dados obtidos por citometria de fluxo sugeriram aumento no nível de H3K9ac e redução no nível de H3K9me2 para as células tratadas com VPA e TSA por 1 h, em normoglicemia, em relação ao controle não tratado. Porém, não houve aparente diferença no nível de H3K4me2.

Foram observadas ainda a localização *in situ* dessas modificações, por meio de microscopia confocal, assim como da proteína HP1- α , envolvida na manutenção da heterocromatina. Através de secções ópticas, foi possível verificar uma maior intensidade de sinais para a marcação de H3K9ac na periferia nuclear. Observações anteriores relatavam o acúmulo de marcações de acetilação na periferia nuclear de células humanas após tratamento com TSA (Taddei et al., 2001), ou com butirato de sódio (Bártová et al., 2005; Rada-Iglesias et al., 2007). Uma possível explicação para o fato seria que o aumento nos níveis de acetilação, após tratamento com HDACis, afetaria preferencialmente histonas nucleares não ligadas ao DNA. Além disso, poderia ocorrer também um dismantelamento da heterocromatina (Bártová et al., 2005). De fato, foi possível identificar uma diminuição na presença de proteínas HP1- α das áreas heterocromáticas e sua posterior dispersão, após tratamento com VPA e TSA, coincidindo com as observações de H3K9ac na periferia nuclear. Seria esperado que tal resultado afetasse o ciclo celular (Takai et al., 2008; Ma et al., 2015) e, realmente, isso foi observado em células tratadas com VPA e TSA, porém tratamentos mais drásticos foram necessários para uma parada mais efetiva em G1, concomitante com redução do índice mitótico.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório reportaram uma descondensação cromatínica em núcleos de hepatócitos de camundongos diabéticos não obesos (NOD) em relação a camundongos da linhagem Balb/C ou ainda em relação a camundongos NOD com hiperglicemia moderada (Mello et al., 2009; Ghiraldini et al., 2012; 2013). Os níveis de

H3K9ac e H3K9me2, assim como a localização de HP1- α e análise de imagem corroboram esses achados. Uma vez que a própria hiperglicemia promove descompactação cromatínica nas células HepG2, conforme revelaram nossos dados, o tratamento com HDACis como o VPA e a TSA, que tendem a promover o mesmo efeito sobre a textura cromatínica dessas células, não intensifica esse estado. Ao contrário, o nível de compactação cromatínica permanece igual ou mesmo tende a aumentar. De fato, dados recentes apontam para um aumento na acetilação de histonas após estímulo de HDACis estar relacionado a regiões genômicas inicialmente menos acetiladas, porém regiões previamente hiperacetiladas podem inclusive serem deacetiladas (Rafehi et al., 2014). Embora não haja alterações em níveis morfológicos, o tratamento com HDACi teve um significado fisiológico, reduzindo a produção hepática de glicose. Isso sugere que os efeitos do VPA e da TSA em condições de hiperglicemia podem acontecer mais em função das diferentes áreas de cromatina remodeladas e, em consequência, dos genes ativados e desativados, do que em função da extensão total da compactação cromatínica e dos níveis de histonas modificadas. O esquema apresentado na figura 1 resume os resultados discutidos acima.

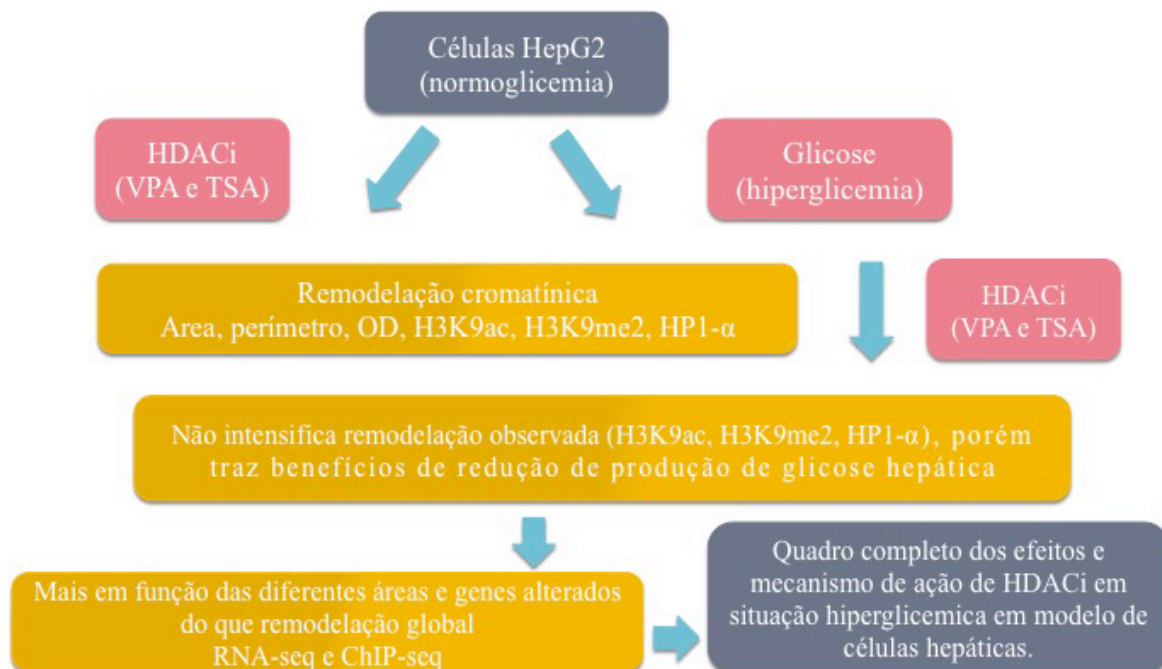


Figura 1. Esquema dos principais resultados e conclusões obtidos a partir dos primeiros objetivos do projeto, conforme apresentados no capítulo I.

As conclusões obtidas na primeira etapa de Doutorado nos levaram a questionar a necessidade de uma análise mais ampla e profunda, não apenas dos níveis totais de modificações de histonas, mas de sua associação com a expressão de diferentes genes. Nesse sentido, optamos por não apenas analisar um único conjunto de genes, como inicialmente proposto no terceiro objetivo desse Projeto de Doutorado, mas ir além e fazer uma análise global de todo o genoma. Embora haja fortes evidências para a investigação da ação de HDACs em uma situação do diabetes, nenhum estudo global do genoma associando essas situações em hepatócitos foi ainda realizado. Desta forma, nosso grupo utilizou metodologias de análise global do genoma (RNA-seq e ChIP-seq) no modelo de células HepG2 sob condições de hiperglicemia para, pela primeira vez, caracterizar os mecanismos moleculares de ação do VPA associados a mudanças em marcas epigenéticas. O controle de genes importantes para o metabolismo da glicose e de lipídeos, assim como na regulação do sistema imune e processos inflamatórios foram alvos de nosso interesse.

Sequenciamentos de alto desempenho geram grande quantidade de dados, requerendo infraestrutura computacional e métodos especializados para uma análise confiável. Por essa razão, a parte inicial de tais procedimentos foi realizada em um local que já possui experiência na identificação e caracterização de modificação de cromatina derivadas de sequenciamento, como é o caso do Epigenetics in Human Health and Disease Laboratory, do Baker IDI Institute, em Melbourne, Austrália.

Até o momento, os principais passos no processamento de milhões de *reads* produzidas por RNA-seq foram delineados, culminando com uma análise de expressão diferencial entre as amostras. Entretanto, mais informações são alcançadas quando se observam padrões de mudanças de expressão gênica em *gene set*, o que vem sendo feito. Por meio de análise bioinformática dos dados inicialmente obtidos e, devidamente avaliados

quanto a sua qualidade, foram dissecados para se encontrar diferentes vias potencialmente afetadas pela hiperglicemia (captação de glicose e via glicolítica, via da gliconeogênese e glicogenólise, via do sistema complemento e do sistema de coagulação, via da produção de colesterol e degradação de ácidos graxos, entre outras). Vias potencialmente importantes são aquelas alteradas pela hiperglicemia e posteriormente revertidas pela ação do VPA. Enquadraram-se neste critério as vias do sistema complemento e de coagulação, assim como a via da biossíntese de colesterol, que foram *upregulated* pela hiperglicemia e posteriormente *downregulated* frente ao tratamento com VPA. Merece destaque ainda a via da reciclagem dos receptores de insulina que aparece diminuída pela hiperglicemia e é aumentada pela ação do VPA. Assim, essas foram as vias inicialmente investigadas e esmiuçadas a fim de se chegar a uma hipótese do mecanismo molecular de ação do VPA frente a uma condição de hiperglicemia. De fato, a participação do sistema complemento no metabolismo e em doenças metabólicas tem recebido maior atenção científica nos últimos tempos (Hess et al., 2012; van Greevenbroek et al., 2012; Phielers et al., 2013; Vlaicu et al., 2016). Por ser um importante iniciador e modulador do sistema imune e dos processos inflamatórios, o sistema complemento surge como um alvo atrativo para intervenção precoce em doenças inflamatórias (Ricklin e Lambris, 2013). Além disso, o sistema de coagulação, semelhante em sua composição ao sistema complemento, por envolver cascatas proteolíticas, parece ter origem evolutiva comum (Howes et al., 2012; Conway, 2015). Assim, quando algum mecanismo regulatório desses sistemas falha, ambos são alterados, contribuindo para desenvolvimento e progressão de diversas patologias, entre as quais se inclui o diabetes (Markiewski et al., 2007). Entender como esses sistemas se conectam e encontrar intervenções terapêuticas capazes de atuar sobre ambas as vias constituem, portanto, importantes objetivos científicos.

Análises das regiões promotoras dos componentes do sistema complemento revelaram ser controladas por diversos fatores de transcrição específicos do fígado como *hepatic nuclear factors* (HNFs) e C/EBP (Qin e Gao, 2006). Nesse sentido, evidências apontam que a co-ligação dos fatores de transcrição Fxr e Hnf4 α parece acontecer nos genes da cascata do complemento e de coagulação e nos genes envolvidos no metabolismo de drogas (Thomas et al., 2013). Os mesmos fatores de transcrição regulam ainda genes envolvidos na gliconeogênese e glicogenólise (Jitrapakdee, 2012; Oh et al., 2013). Este pode ser, portanto, o ponto de conexão entre as vias do sistema imune e do metabolismo da glicose, interface tão discutida e estudada recentemente. Além disso, analisar os níveis de modificações de histonas como a acetilação de H3K9/14 associadas aos promotores dos genes de interesse ajudaria a completar o entendimento do quadro.

Como perspectivas geradas dos dados apresentados até o momento, os próximos passos para completar esse quadro seriam no sentido de validar em níveis de expressão gênica e proteica os componentes das vias dissecadas. Investigaremos ainda a rede de fatores de transcrição que regulam o conjunto de genes de interesse. Além disso, um grande potencial em gerar maior entendimento de uma variedade de mecanismos existe quando se analisam não só os dados de expressão gênica, mas também informações de modificações globais de histonas. Nesse sentido, temos o objetivo de ajustar a técnica, interpretar e validar, assim como integrar os resultados obtidos por ChIP-seq para H3K9/14ac com os dados obtidos por RNA-seq, o que será realizado em ativa colaboração com o Dr. El-Osta e sua equipe. Essas análises serão feitas inicialmente no modelo proposto de células HepG2, porém objetivamos ainda conduzir experimentos *in vivo* a fim de validar a proposta de ação terapêutica do VPA. Acreditamos, assim, que esta tese de Doutorado e os novos experimentos advindos dela irão ajudar a expandir nosso conhecimento sobre as consequências em larga escala da hiperglicemia em células hepáticas, assim como da ação de HDACi nesse contexto. Além

disso, permitirão estabelecer e incorporar as novas metodologias e procedimentos de análise às rotinas experimentais do nosso grupo de pesquisa, ampliando as linhas de pesquisa de nosso Departamento e as colaborações estabelecidas

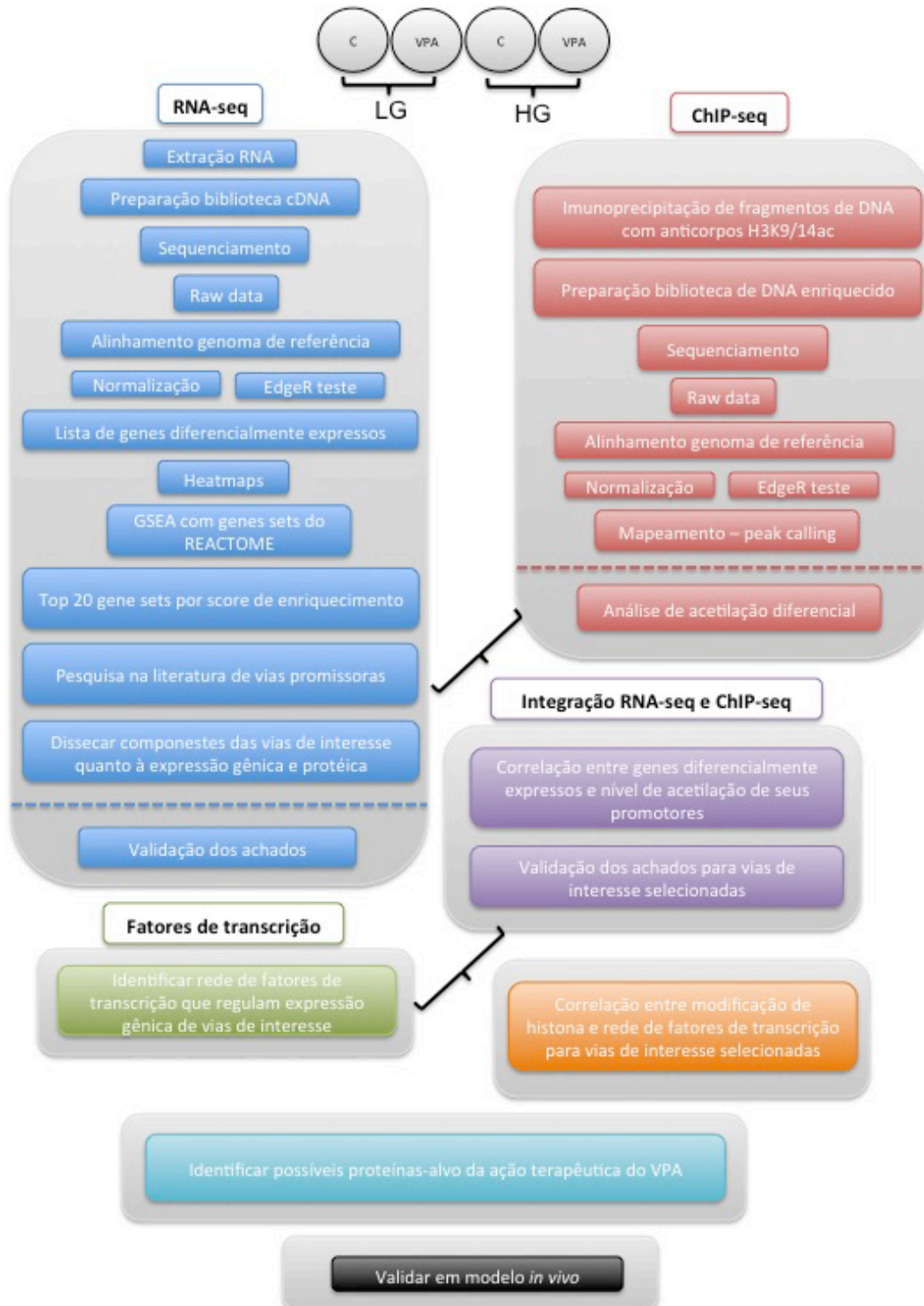


Figura 2. Esquema do delineamento experimental referente ao terceiro objetivo do Projeto de Doutorado, ressaltando resultados já obtidos (acima do tracejado) e objetivos a serem alcançados

Conclusões Gerais

1. Remodelação global da cromatina é induzida em células HepG2 em condições de hiperglicemia ou pelo tratamento com VPA e TSA em condições de normoglicemia, observada através de alterações em parâmetros obtidos por análise de imagem (OD, área, perímetro, etc). Além disso, a remodelação cromatínica é confirmada pela abundância de modificações de histonas pesquisadas, com aumento no nível de H3K9ac e diminuição de H3K9me2.
2. A similaridade das alterações epigenéticas induzidas pela hiperglicemia e pelos tratamentos com VPA e TSA em normoglicemia não necessariamente se reflete nos genes diferencialmente expressos, como demonstrado pela expressão de DNMT1 que é diminuída pela ação das drogas, mas não pela exposição à alta concentração de glicose.
3. O aumento de acetilação de histona induzido por VPA e TSA é preferencialmente localizado na periferia nuclear e essa migração da marca H3K9ac é acompanhada de dissociação da proteína HP1- α de regiões heterocromáticas.
4. A progressão do ciclo celular é afetada pelo tratamento com VPA e TSA, assim como pela hiperglicemia, com parada do ciclo celular em G1. Porém, condições de tratamento mais drásticas são necessárias para induzir uma parada mais significativa que reflita em diminuição de índice mitótico observado por microscopia.
5. O nível glicêmico afeta a maneira como a cromatina de hepatócitos responde ao tratamento com drogas. Células submetidas à alta concentração de glicemia e posterior tratamento com VPA e TSA não apresentam intensificação da remodelação cromatínica observada por análise de imagem, assim como nenhuma diferença significativa nos níveis de H3K9ac e H3K9me2. As alterações induzidas pelo tratamento com os HDACi em hiperglicemia devem se dar mais em função das diferentes áreas e genes modificados do que de uma remodelação global da cromatina, como previamente imaginado.

6. Apesar da ausência de modificações morfológicas, o tratamento com VPA e TSA em condições de hiperglicemia apresenta significado fisiológico ao reduzir a produção hepática de glicose, melhorando o estado hiperglicêmico das células.
7. A expressão global do genoma, obtida por RNA-seq, de células HepG2 é intensamente modificada pela exposição à hiperglicemia, com alteração de gene *sets* como os das vias do sistema complemento, sistema de coagulação, biossíntese de colesterol, entre outros.
8. A expressão das vias gênicas do sistema complemento e de coagulação é revertida pela ação do VPA em hiperglicemia, sendo um interessante alvo terapêutico desses agentes ainda pouco explorado. A validação desses dados, junto a uma análise mais acurada da rede de fatores de transcrição envolvida na expressão desses genes e dos níveis de acetilação global de H3K9/14 em todo o genoma irão ajudar a completar esse quadro e possibilitar a adequação para experimentos *in vivo*.

Referências Bibliográficas

(Citações presentes nas seções Introdução, Discussão Geral e Conclusões gerais)

Adolph KW, Cheng SM, Laemmli UK. Role of nonhistone proteins in metaphase chromosome structure. *Cell* 12: 805-816, 1977.

Allis CD, Jenuwein T, Reinberg D, Caparros ML. A Brief History of Epigenetics. In: *Epigenetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nova York, 2007.

Allis CD, Muir TW. Spreading chromatin into chemical biology. *Chembiochem*, 12: 264-279, 2011.

Angelini C, Costa V. Understanding gene regulatory mechanisms by integrating ChIP-seq and RNA-seq data: statistical solutions to biological problems. *Front Cell Dev Biol* 2: 51, 2014.

Avery LB, Bumpus NN. Valproic acid is a novel activator of AMP-activated protein kinase and decreases liver mass, hepatic fat accumulation, and serum glucose in obese mice. *Mol Pharmacol* 85: 1-10, 2014.

Bártová E, Pacherníck 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: 5035-46, 2005.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 6: 107-116, 2006.

Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397: 579-583, 1999.

Bienvenu T, Chelly J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nature Rev. Genet.* 7: 415-426, 2006.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396-398, 2007.

Blanco-Betancourt CE, Moncla A, Milili M, Jiang YL, Viegas-Péquignot EM, Roquelaure B, Thuret I, Schiff C. Defective B-cell-negative selection and terminal differentiation in the ICF syndrome. *Blood* 103: 2683-2690, 2004.

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature Rev Drug Discv* 5: 769-784, 2006.

Bongiorni S, Mazzyoli M, Masci S, Prantera G. Facultative heterochromatinization in parahaploid male mealybugs: involvement of a heterochromatin-associated protein. *Development* 128: 3809-3017, 2001.

Burgess RJ, Zhang Z. Histones, histone chaperones and nucleosome assembly. *Protein Cell* 1: 607-612, 2010.

Catania A, Iavarone C, Carlomagno SM, Chiariello M. Selective transcription and cellular proliferation induced by PDGF require histone deacetylase activity. *Biochem Biophys Res Comm* 343: 544-554, 2006.

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

Cherrington AD, Vranic M. Hormonal control of gluconeogenesis in vivo. In: Kraus-Friedmann, N. Hormonal control of gluconeogenesis. CRC Press, Inc. Florida, USA p. 15-38, 2000.

Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* 325: 834-840, 2009.

Christensen DP, Dahllof M, Lundh M, Rasmussen DN, Nilsen MD, Billestrup N, Grunnet LG, Mandrup-Poulsen T. Histone Deacetylase (HDAC) Inhibition as a Novel Treatment for Diabetes Mellitus. *Mol Med* 17: 378-390, 2011.

Chuang D-MM, Leng Y, Marinova Z, Kim HJ, Chiu CT. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. *Trends Neurosci* 32: 591-601, 2009.

Chung YL, Lee MY, Wang AJ, Yao LF. A therapeutic strategy uses histone deacetylase inhibitors to modulate the expression of genes involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Mol Ther* 8: 707-717, 2003.

Conway EM. Reincarnation of ancient links between coagulation and complement. *J Thromb Haemost* 13: S121-132, 2015.

Dekker J, Marti-Renom MA, Mirny LA. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nat Rev Genet* 14: 390-403, 2013.

Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N. Capturing chromosome conformation. *Science* 295: 1306-1311, 2002.

Dinarello CA. Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 140:935-950, 2010.

Dinarello CA, Fossati G, Mascagni P. Histone deacetylase inhibitors for treating a spectrum of diseases not related to cancer. *Mol Med* 17: 333-352, 2011.

Dixon JR, Jung I, Selvaraj S, Shen Y, Antosiewicz-Bourget JE, Lee AY, Ye Z, Kim A, Rajagopal N, Xie W, Diao Y, Liang J, Zhao H, Lobanenko VV, Ecker JR, Thomson JA, Ren B. Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation. *Nature* 518: 331-336, 2015.

Dixon JR, Selvaraj S, Yue F, Kim A, Li Y, Shen Y, Hu M, Liu JS, Ren B. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485: 376-380, 2012.

Dominissini D, Nachtergaele S, Moshitch-Moshkovitz S, Peer E, Kol N, Ben-Haim MS, Dai Q, Di Segni A, Salmon-Divon M, Clark WC, Zheng G, Pan T, Solomon O, Eyal E,

HersHKovitz V, Han D, Doré LC, Amariglio N, Rechavi G, He C. The dynamic N1-methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 530: 441-446, 2016.

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

Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096, 2014.

Durrin LK, Mann RK, Kayne PS, Grunstein M. Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation *in vivo*. *Cell* 65: 1023-1031, 1991.

Earnshaw WC, Halligan B, Cooke CA, Heck MM, Liu LF. Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol* 100: 1706-1715, 1985.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457-463, 2004.

Elgin SCR, Weintraub H. Chromosomal proteins and chromatin structure. *Ann Rev Biochem* 44: 725-774, 1975.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286–298, 2007.

Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of anti-epileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737-744, 2004.

Fagundes NS, Michalczechen-Lacerda VA, Caixeta ES, Machado GM, Rodrigues FC, Melo EO, Dode MA, Franco MM. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the GF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Mol Hum Reprod* 17: 85-91, 2011.

Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* 13: 673-691, 2014.

Faraco G, Cavone L, Chiarugi A. The therapeutic potential of HDAC inhibitors in the treatment of multiple sclerosis. *Mol Med* 17: 442–447, 2011.

Feinberg A. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447: 433-440, 2007.

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

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

Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR; International Vidaza High-Risk MDS

Survival Study Group. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 10: 223-232, 2009.

Ferria E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: Structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol* 106:1-18, 2016.

Filipescu D, Muller S, Almouzni G. Histone H3 variants and their chaperones during development and disease: contributing to epigenetic control. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30: 615–646, 2014.

Finotello F, Di Camillo B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. *Brief Funct Genomics pii: elu035*, 2014.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806–811, 1998.

Fraser J, Wikkiamson I, Bickmore WA, Dostie J. An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C. *Microbiol Mol Biol Rev* 79: 347-372, 2015.

Fraser P, Bickmore W. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447: 413-417, 2007.

Frenster JH, Allfrey VG, Mirsky AE. Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 50: 1026-1032, 1963.

Fu Y, Luo GZ, Chen K, Deng X, Yu M, Han D, Hao Z, Liu J, Lu X, Doré LC, Weng X, Ji Q, Mets L, He C. N6-methyldeoxyadenosine marks active transcription start sites in *Chlamydomonas*. *Cell* 161: 879–892, 2015.

Gardner KE, Allis CD, Strahl BD. OPERating ON Chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol* 409: 36–46, 2011.

Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489–492, 2003.

Gavin D, Kartan S, Chase K, Jayaraman S, Sharma RP. Histone deacetylase inhibitors and candidate gene expression: An in vivo and in vitro approach to studying chromatin remodeling in a clinical population. *Psych Res* 43: 870-886, 2009.

Ghiraldini FG, Crispim ACV, Mello MLS. Effects of hyperglycemia and aging on nuclear sirtuins and DNA damage of mouse hepatocytes. *Mol Biol Cell* 24: 2467-2476, 2013.

Ghiraldini FG, Silva IS, Mello MLS. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin dependent diabetic and aged mice. *Cytometry A* 81: 755-764, 2012.

Gibbons RJ, Higgs DR. Molecular-clinical spectrum of the ATR-X syndrome. *Am J Med Genet* 97: 204-212, 2000.

- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363: 15–23, 2005.
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP. Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187–190, 1985.
- Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A landscape takes shape. *Cell* 128: 635–638, 2007.
- Gomez-Cabrero D, Abugessaisa I, Maier D, Teschendorff A, Merckenschlager M, Gisel A et al. Data integration in the era of omics: current and future challenges. *BMC Syst Biol* 8: 11, 2014.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20: 6969–6978, 2001.
- Granner DK, O'Brien RM. Molecular physiology and genetics of NIDDM. Importance of metabolic staging. *Diabetes Care* 15: 369–395, 1992.
- Gray SG, Meyts P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 416–433, 2005.
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizábal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C, Shi Y. DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell* 161: 868–878, 2015.
- Grewal ISS, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev* 8: 35–46, 2007.
- Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. Chromatin challenges during DNA Replication and Repair. *Cell* 128: 721–733, 2007.
- Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, van Steensel B. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453: 948–951, 2008.
- Guo JU, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond. *Cell Cycle* 10: 2662–2668, 2011.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 6: 731–740, 2004.
- Hawkins RD, Hon GC, Ren B. Next-generation genomics: an integrative approach. *Nat Rev Genet* 11: 476–486, 2010.
- Head SR, Komori HK, LaMere SA, Whisenant T, Van Nieuwerburgh F, Salomon DR, Ordoukhanian P. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques* 56: 61–64, 2014.

- Heitz, E. Das Heterochromatin der Moose. I Jahrb Wiss Botanik 69: 762–818, 1928 (in German)
- Henikoff, S. Heterochromatin function in complex genomes. Biochim Biophys Acta 1470: 1–8, 2000.
- Hess K, Alzahrani SH, Mathai M, Schroeder V, Carter AM, Howel GI, Koko T, Strachan MW, Price JF, Smith KA, Grant PJ, Ajjan RA. A novel mechanism for hypofibrinolysis in diabetes: the role of complement C3. Diabetologia 55: 1103–1113, 2012.
- Hezroni H, Sailaja BC, Meshorer E. Pluripotency-related, valproic acid (VPA)-induced genome-wide histone H3 lysine 9 (H3K9) acetylation patterns in embryonic stem cells. J Biol Chem 286: 35977–35988, 2011.
- Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. Nature Biotechnol 33: 510–517, 2015.
- Hirano T, Kobayashi R, Hirano M. Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a Xenopus homolog of the Drosophila Barren protein. Cell 89: 511–521, 1997.
- Howes JM, Richardson VR, Smith KA, Schroeder V, Somani R, Shore A, Hess K, Ajjan R, Pease RJ, Keen JN, Standeven KF, Carter AM. Complement C3 is a novel plasma clot component with anti-fibrinolytic properties. Diab. Vasc. Dis. Res. 9: 216–225, 2012.
- Huang J, Berger SL. The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. Curr Opin Genet Dev 18: 152–158, 2008.
- Huang Y, Stewart TM, Wu Y, Baylin SB, Marton LJ, Perkins B, Jones RJ, Woster PM, Casero RA Jr. Novel oligoamine analogues inhibit lysine-specific demethylase 1 and induce reexpression of epigenetically silenced genes. Clin Cancer Res 15: 7217–7228, 2009.
- Huisinga KL, Brower-Toland B, Elgin SC. The contradictory definitions of heterochromatin: transcription and silencing. Chromosoma 115: 110–122, 2006.
- James TC, Elgin SC. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. Mol Cell Biol 6: 3862–3872, 1986.
- Javierre BM, Fernandez AF, Richter J, Al-Shahrour F, Martin-Subero JI, Rodriguez-Ubreva J, Berdasco M, Fraga MF, O'Hanlon TP, Rider LG, Jacinto FV, Lopez-Longo FJ, Dopazo J, Forn M, Peinado MA, Carreño L, Sawalha AH, Harley JB, Siebert R, Esteller M, Miller FW, Ballestar E. Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. Genome Res 20: 170–179, 2010.
- Jayaraman S, Patel A, Jayaraman A, Patel V, Holterman M, Prabhakar B. Transcriptome analysis of epigenetically modulated genome indicates signature genes in manifestation of type 1 Diabetes and its prevention in NOD mice. PloS One: e55074, 2013.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science 293: 1074–1080, 2001.

Jin C, Henao-Mejia J, Flavell RA. Innate Immune Receptors: Key Regulators of Metabolic Disease Progression. *Cell Metab* 17: 873-882, 2013.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816-821, 2012.

Jitrapakdee S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 44: 33-45, 2012.

Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 316: 1497-1502, 2007.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692, 2007.

Jost D, Carrivain P, Cavalli G, Vaillant C. Modeling epigenome folding: formation and dynamics of topologically associated chromatin domains. *Nucleic Acids Res* 42: 9553-9561, 2014.

Kamakaka RT, Biggins S. Histone variants: deviants? *Genes Dev* 19: 295-310, 2005.

Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov* 7: 854-868, 2008.

Keating ST, El-Osta A. Chromatin modifications associated with diabetes. *J Cardiovasc Trans Res* 5: 399-412, 2012.

Kelly TK, Carvalho D, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol* 28: 1069-1078, 2010.

Khan S, Jena G, Tikoo K, Kumar V. Valproate attenuates the proteinuria, podocyte and renal injury by facilitating autophagy and inactivation of NF- κ B/iNOS signaling in diabetic rat. *Biochimie* 110: 1-16, 2015.

Kleff S, Andrulis ED, Anderson CW, Sternglanz R. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem* 270: 24674-24677, 1995.

Kochar DK, Rawat N, Agrawal RP, Vyas A, Beniwal R, Kochar SK, Garg P. Sodium valproate for painful diabetic neuropathy: a randomized double-blind placebo-controlled study. *QJM* 97: 33-38, 2004.

Kondo Y, Shen L, Suzuki S, Kurokawa T, Masuko K, Tanaka Y, Kato H, Mizuno Y, Yokoe M, Sugauchi F, Hirashima N, Orito E, Osada H, Ueda R, Guo Y, Chen X, Issa JP, Sekido Y. Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 37: 974-983, 2007.

Kornberg RD. Structure of chromatin. *Ann Rev Biochem* 46: 931-954, 1977.

Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 184: 865-868, 1974.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705, 2007.

Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Kun HT, Al-Abdullah I, Kandeel F, Mullen Y, Pfeifer GP, Ferreri K. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One* 4: e6953, 2009.

Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 279:18851-18860, 2004

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.

Langst G, Manelyte L. Chromatin remodelers: from function to dysfunction. *Genes (Basel)* 6: 299–324, 2015.

Leoni F, Zaliani A, Bertolini G, Porro G, Pagani P, Pozzi P, Donà G, Fossati G, Sozzani S, Azam T, Bufler P, Fantuzzi G, Goncharov I, Kim SH, Pomerantz BJ, Reznikov LL, Siegmund B, Dinarello CA, Mascagni P. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2995-3000, 2002.

Li X, Zhu P, Ma S, Song J, Bai J, Sun F, Yi C. Chemical pulldown reveals dynamic pseudouridylation of the mammalian transcriptome. *Nature Chem Biol* 11: 592–597, 2015.

Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragozy T. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326: 289-293, 2009.

Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del Prato S. Epigenetic regulation of PPAR γ 1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 51: 615–622, 2008.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 \AA resolution. *Nature* 389: 251-260, 1997.

Lundh M, Galbo T, Poulsen SS, Mandrup-Poulsen T. Histone deacetylase 3 inhibition improves glycaemia and insulin secretion in obese diabetic rats. *Diabetes Obes Metab* 17: 703–707, 2015.

Lupiáñez DG, Kraft K, Heinrich V, Krawitz P, Brancati F, Klopocki E, Horn D, Kayserili H, Opitz JM, Laxova R, Santos-Simarro F, Gilbert-Dussardier B, Wittler L, Borschiwer M, Haas SA, Osterwalder M, Franke M, Timmermann B, Hecht J, Spielmann M, Visel A, Mundlos S. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. *Cell* 161: 1012-1025, 2015.

Ma J, Guo X, Zhang S, Liu H, Lu J, Dong Z, Liu K, Ming L. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses proliferation and promotes apoptosis of esophageal squamous cell lines. *Mol Med Rep* 11:4525–4531, 2015.

Ma W, Wong W. The analysis of ChIP-Seq data. *Methods Enzymol* 497: 51-73, 2011.

Maeshima K, Laemmli UK. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell* 4: 467–480, 2003.

Marinova Z, Leng Y, Leeds P, Chuang DM. Histone deacetylase inhibition alters histone methylation associated with heat shock protein 70 promoter modifications in astrocytes and neurons. *Neuropharmacol* 60: 1109–1115, 2011.

Markiewski MM1, Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol* 28:184-192, 2007.

Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1497–1511, 2005.

Meister P, Taddei A. Building silent compartments at the nuclear periphery: a recurrent theme. *Curr Opin Genet Dev* 23: 96-103, 2013.

Mello MLS. Heterocromatina. *Ciênc Cult* 30: 290-303, 1978.

Mello MLS, Aldrovani M, Moraes AS, Guaraldo AMA, Vidal BC. DNA content, chromatin supraorganization, nuclear glycoproteins and RNA amounts in hepatocytes of mice expressing insulin-dependent diabetes. *Micron* 40: 577-585, 2009.

Mello MLS, Moraes AS, Vidal BC. Extended chromatin fibers and chromatin organization. *Biotechn & Histochem* 86: 213-225, 2011.

Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3'UTRs and near stop codons. *Cell* 149: 1635–1646, 2012.

Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud PD, Yu RT, Alvarez JG, Downes M, Evans RM, Montminy M, Shaw RJ. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145: 607–621, 2011.

Milech A. Fisiopatologia do diabetes. In: Arduino, F. *Diabetes Mellitus*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 68-77, 1980.

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

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

Moraes AS, Guaraldo AMA, Mello MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes with development and aging. *Cytometry Part A* 71A: 28-37, 2007.

Moraes AS, Vidal BC, Guaraldo AMA, Mello MLS. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes following starvation and refeeding. *Cytometry Part A* 63A: 94-107, 2005.

Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23: 314–318, 1999.

Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320: 1344–1349, 2008.

Nakajima K, Yamauchi K, Shigematsu S, Ikeo S, Komatsu M et al. Selective attenuation of metabolic branch of insulin receptor down-signaling by high glucose in a hepatoma cell line, HepG2 cells. *J Biol Chem* 275: 20880–20886, 2000.

Nerup J, Pociot F. A genome wide scan for type 1-diabetes susceptibility in Scandinavian families: identification of new loci with evidence of interactions. *Am J Hum Genet* 69:1301-1313, 2001.

Niemitz EL, DeBaun MR, Fallon J, Murakami K, Kugoh H, Oshimura M, Feinberg AP. Microdeletion of LIT1 in familial Beckwith–Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 75: 844–849, 2004.

Oh KJ, Han HS, Kim MJ, Koo SH. Transcriptional regulators of hepatic gluconeogenesis. *Arch Pharm Res* 36: 189-200, 2013.

Oiso H, Furukawa N, Suefuji M, Shimoda S, Ito A, Furumai R, Nakagawa J, Yoshida M, Nishino N, Araki E. The role of class I histone deacetylase (HDAC) on gluconeogenesis in liver. *Biochem Biophys Res Commun* 404: 166–172, 2011.

Ong CT, Corces VG. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat Rev Genet* 15: 234-246, 2014.

Osborne, CS; Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genet* 36: 1065–1071, 2004.

Osley MA. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annu Rev Biochem* 60: 827–861, 1991.

Park PJ. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10: 669-680, 2009.

Patel BM, Raghunathan S, Porwal U. Cardioprotective effects of magnesium valproate in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 728: 128–134, 2014.

Patel T, Patel V, Singh R, Jayaraman S. Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. *Immunol Cell Biol* 89: 640–649, 2011.

Paulson JR, Laemmli UK. The structure of histone depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12: 817-828, 1977.

Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotech* 2011: 1-10, 2010.

- Peterson CL, Laniel MA Histones and histone modifications. *Curr Biol* 14: R546–R551, 2004.
- Petrif F, Giles RH, Dauwerse HG, Saris JJ, Hennekam RC, Masuno M, Tommerup N, van Ommen GJ, Goodman RH, Peters DJ, Breuning MH. Rubinstein–Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co- activator CBP. *Nature* 376: 348–351, 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.
- Phielers J, Garcia-Martin R, Lambris JD, Chavakis T. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases. *Semin Immunol* 25: 47–53, 2013.
- Pickersgill H, Kalverda B, de Wit E, Talhout W, Fornerod M, van Steensel B. Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nat Genet* 38: 1005–1014, 2006.
- Pieper HC, Evert BO, Kaut O, Riederer PF, Waha A, Wüllner U. Different methylation of the TNF-alpha promoter in cortex and substantia nigra: Implications for selective neuronal vulnerability. *Neurobiol Dis* 32: 521–527, 2008.
- Polo SE, Almouzni G. Chromatin assembly: a basic recipe with various flavours. *Curr Opin Genet Dev* 16: 104–111, 2006.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28: 1057–1068, 2010.
- Pueschel R, Coraggio F, Meister P. From single genes to entire genomes: the search for a function of nuclear organization. *Development* 143: 910–923, 2016.
- Qiao L, Schaack J, Shao J. Suppression of adiponectin gene expression by histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Endocrinology* 147: 865–874, 2006.
- Qin X, Gao B. The complement system in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 3: 333–330, 2006.
- Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameer A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, Wilcox S, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Dunham I, Komorowski J, Wadelius C. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res* 16: 708–719, 2007.
- Rafehi H, Balcerczyk A, Lunke S, Kaspi A, Ziemann M, Kn H, Okabe J, Khurana I, Ooi J, Khan AW, Du XJ, Chang L, Haviv I, Keating ST, Karagiannis TC, El-Osta A. Vascular histone deacetylation by pharmacological HDAC inhibition. *Genome Res* 24: 1271–1284, 2014.
- Rakyan VK, Beyan H, Down TA, Hawa MI, Maslau S, Aden D, Daunay A, Busato F, Mein CA, Manfras B, Dias KR, Bell CG, Tost J, Boehm BO, Beck S, Leslie RD. Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS Genetics* 7: e1002300, 2011.

Rao J, Bhattacharya D, Banerjee B, Sarin A, Shivashankar GV. Trichostatin-A induces differential changes in histone protein dynamics and expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 263-268, 2007.

Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Mochol I, Omer AD, Lander ES, Aiden A. 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159: 1665-1680, 2014.

Reddy P, Maeda Y, Hotary K, Liu C, Reznikov LL, Dinarello CA, Ferrara JL. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3921-3926, 2004.

Reddy P, Sun Y, Toubai T, Duran-Struuck R, Clouthier SG, Weisiger E, Maeda Y, Tawara I, Krijanovski O, Gatza E, Liu C, Malter C, Mascagni P, Dinarello CA, Ferrara JL. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent DC functions and regulates experimental graft versus-host disease in mice. *J Clin Invest* 118: 2562-2573, 2008.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093, 2001.

Reilly CM, Mishra N, Miller JM, Joshi D, Ruiz P, Richon VM, Marks PA, Gilkeson GS. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol* 173: 4171-4178, 2004.

Ricklin D, Lambris JD. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Therapeutic Interventions. *J Immunol* 190: 3839-3847, 2013.

Rosato RR, Grant S. Histone deacetylase inhibitors: insights into mechanisms of lethality. *Expert Opin Ther Targets* 9: 809-824, 2005.

Rossetti L. Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 18: 255-260, 1995

Roy S, Shor AC, Bagui TK, Seto E, Pledger WJ. Histone deacetylase 5 represses the transcription of cyclin D3. *J Cell Biochem* 104: 2143-2154, 2008.

Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 1996.

Saitoh N, Goldberg IG, Wood ER, Earnshaw WC. ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* 127: 303-318, 1994.

Schroeder TM, Nair AK, Staggs R, Lamblin AF, Westendorf JJ. Gene profile analysis of osteoblast genes differentially regulated by histone deacetylase inhibitors. *BMC Genomics* 8: 2164-2168, 2007.

Seitan VC, Faure AJ, Zhan Y, McCord RP, Lajoie BR, Ing-Simmons E, Lenhard B, Giorgetti L, Heard E, Fisher AG, Flicek P, Dekker J, Merkenschlager M. Cohesin- based chromatin

interactions enable regulated gene expression within preexisting architectural compartments. *Genome Res.* 23: 2066-2077, 2013.

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

Skipper M, Eccleston A, Gray N, Heemels T, Le Bot N, Marte B, Weiss U. Presenting the epigenome roadmap. *Nature* 518: 313, 2015.

Sofueva S, Yaffe E, Chan WC, Georgopoulou D, Vietri Rudan M, Mira-Bontenbal H, Pollard SM, Schroth GP, Tanay A, Hadjur S. Cohesin-mediated interactions organize chromosomal domain architecture. *EMBO J* 32: 3119-3129, 2013.

Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith–Wiedemann syndrome. *Nature Genet* 36: 958–960, 2004.

Squires JE, Patel HR, Nusch M, Sibbritt T, Humphreys DT, Parker BJ, Suter CM, Preiss T. Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 40: 5023–5033, 2012.

Sugimoto K, Itoh T, Takita M, Shimoda M, Chujo D, SoRelle JA, Naziruddin B, Levy MF, Shimada M, Matsumoto S. Improving allogeneic islet transplantation by suppressing Th17 and enhancing Treg with histone deacetylase inhibitors. *Transpl Int* 27:408–415, 2014.

Sun C, Zhou J. Trichostatin A improves insulin stimulated glucose utilization and insulin signaling transduction through the repression of HDAC2. *Biochem Pharmacol* 76: 120–127, 2008.

Szilard RK, Jacques PE, Laramée L, Cheng B, Galicia S, Bataille AR, Yeung M, Mendez M, Bergeron M, Robert F, Durocher D. Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX. *Nat Struct Mol Biol* 17: 299–305, 2010.

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.

Taddei A, Maison C, Roche D, Almouzni G. Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat Cell Biol* 3: 114-120, 2001.

Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K, Narahara H. Histone deacetylase inhibitors induce growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human choriocarcinoma cells. *Int J Mol Med* 21:109–115, 2008.

Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21: 1050-1063, 2007.

The ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489: 57-74, 2012.

Thomas AM, Hart SN, Li G, Lu H, Fang Y, Fang J, Zhong XB, Guo GL. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha and farnesoid X receptor co-regulates gene transcription in mouse livers on a genome-wide scale. *Pharm Res* 30: 2188-2198, 2013.

Thompson RF, Fazzari MJ, Niu H, Barzilai N, Simmons RA, Greally JM. Experimental intrauterine growth restriction induces alterations in DNA methylation and gene expression in pancreatic islets of rats. *J Biol Chem* 285: 15111–15118, 2010.

Towbin BD, Meister P and Gasser SM. The nuclear envelope - a scaffold for silencing? *Curr Opin Genet Dev* 19: 180-186, 2009.

Triebel RC. Structure and function of histone methyltransferases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 14: 147–169, 2004.

Tropberger P, Schneider R. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* 20: 657–661, 2013.

Tung EWY, Winn LM. Epigenetic modifications in valproic acid-induced teratogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 248: 201-209, 2010.

Urduinguio RG, Sanchez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol* 8: 1056–1072, 2009.

van Greevenbroek MM, Ghosh S, van der Kallen CJ, Brouwers MC, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Up-regulation of the complement system in subcutaneous adipocytes from nonobese, hypertriglyceridemic subjects is associated with adipocyte insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 4742-4752, 2012.

Verdel A, Jia S, Gerber S, Sugiyama T, Gygi S, Grewal SI, Moazed D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303: 672–676, 2004.

Villeneuve LM, Natarajan R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *AJP-Renal Physiol* 299: F14-F25, 2010.

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871–874, 2006.

Vlaicu S, Tatomir A, Boodhoo D, Vesa S, Mircea P, Rus H. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunol Res*, 2016 [Epub ahead of print]

Vojinovic J, Damjanov N, D'Urzo C, Furlan A, Susic G, Pasic S, Iagaru N, Stefan M, Dinarello CA. Safety and efficacy of an oral histone deacetylase inhibitor in systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 63:1452-1458, 2011.

Vos SM, Tretter EM, Schmidt BH, Berger JM. All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 827–841, 2011.

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

Wallis JW, Hereford L, Grunstein M. Histone H2B genes of yeast encode two different proteins. *Cell* 22: 799-805, 1980.

Wanczyk M, Roszczenko K, Marcinkiewicz K, Bojarczuk K, Kowara M, Winiarska M. HDACi going through the mechanisms. *Front Biosci* 16:340-359, 2011.

Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1775: 138–162, 2007.

Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, Liu Y, Byrum SD, Mackintosh SG, Zhong M, Tackett A, Wang G, Hon LS, Fang G, Swenberg JA, Xiao AZ. DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* 532: 329-333, 2016.

Xiang K, Wang Y, Zheng T, Jia W, Li J, Chen L, Shen K, Wu S, Lin X, Zhang G, Wang C, Wang S, Lu H, Fang Q, Shi Y, Zhang R, Xu J, Weng Q. Genome-wide search for type 2 diabetes/impaired glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24. *Diabetes* 53: 228–234, 2004.

Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26: 5541–5552, 2007.

Yang PK, Kuroda MI. Noncoding RNAs and intranuclear positioning in monoallelic gene expression. *Cell* 128: 777-86, 2007.

Yoshida M, Horinouchi S. Trichostatin and leptomycin inhibition of histone deacetylation and signal-dependent nuclear export. *Ann N Y Acad Sci* 886: 23-26, 1999.

Yu S, Yang F, Shen WH. Genome maintenance in the context of 4D chromatin condensation. *Cell Mol Life Sci*, 2016 [Epub ahead of print].

Zacharias H. Emil Heitz (1892-1965): Chloroplasts, Heterochromatin, and Polytene Chromosomes. *Genetics* 141: 7-14, 1995.

Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 128: 763-776, 2007.

Zhang G, Huang H, Liu D, Cheng Y, Liu X, Zhang W, Yin R, Zhang D, Zhang P, Liu J, Li C, Liu B, Luo Y, Zhu Y, Zhang N, He S, He C, Wang H, Chen D. N6-methyladenine DNA modification in *Drosophila*. *Cell* 161, 893–906, 2015.

Zuin J, Dixon JR, van der Reijden MIJA, Ye Z, Kolovos P, Brouwer RW, van de Corput MPC, van de Werken HJG, Knoch TA, van IJcken WFJ, Grosveld FG, Ren B, Wendt KS. Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 996-1001, 2014.

Resumo de outras atividades desenvolvidas ao longo do período

- Co-orientação do projeto de Iniciação Científica intitulado “A metilação de DNA em células HeLa durante processo de remodelação cromatínica promovida pelo ácido valproico”, financiado pela Fapesp (Proc. 2012/15561-5) e desenvolvido por Giovana Maria Breda Veronezi.
- Colaboração em aulas práticas da disciplina BS111 – A Célula, para o curso de graduação em Medicina da Unicamp nos anos de 2012, 2014, 2015 e 2016 e da disciplina BS115 – Estrutura e função de células e tecidos, para o curso de graduação em Farmácia da Unicamp nos anos de 2014, 2015 e 2016.
- Participação como avaliadora de resumos e pôsteres no XI e XII Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia realizado nos anos de 2013 e 2015 respectivamente, na Universidade Estadual de Campinas.
- Participação como avaliadora de pôsteres do XXIII Congresso de Iniciação Científica/PIBIC da Unicamp em 2015.
- Participante da Rede de Blogs Científicos da Unicamp, iniciativa para a promoção da divulgação científica brasileira, com o Blog “Ciência Pelos Olhos Delas” <http://www.blogs.ea2.unicamp.br/cienciapelosolhosdelas/>
- Distinções acadêmicas e prêmios:
 - 2013 - Prêmio Crodowaldo Pavan -1º colocado, Sociedade Brasileira de Genética
- Participação em congressos, com apresentação de trabalho:
 1. Epigenetics & Chromatin: Interactions and processes, Boston- Harvard Medical School, USA - 10 a 12 de março de 2013, com apresentação do trabalho "Chromatin remodeling induced by histone deacetylase inhibitors (HDACis) in HeLa, NIH 3T3 and HepG2 cells"

2. 19th International Chromosome Conference, Bologna – 02 a 06 de setembro de 2013, apresentando o trabalho "Effects of VPA and TSA treatment on HepG2 cells under normoglycemic and hyperglycemic conditions".

3. 59o. Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia - 16 a 19 de setembro de 2013, apresentando o trabalho "Epigenetic activity of valproic acid and trichostatin A on NIH 3T3 cells" e participando como co-autora do trabalho " The role of DNA methylation on the chromatin remodeling promoted by valproic acid on HeLa cells".

4. XXI Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas - 23 de outubro de 2013, participando como co-autora do trabalho "A metilação de DNA em células HeLa durante processo de remodelação cromatínica promovida pelo ácido valproico".

5. 60o. Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá - setembro de 2014, participando como co-autora dos trabalhos “The part played by DNA demethylation in valproic acid-induced chromatin remodeling in HeLa cells” e “The heterochromatin of *Triatoma infestans* revisited: HP1-alpha signals.

6. Epigenetics & Chromatin, Cold Spring Harbor, USA – setembro 2014, participando como co-autora do trabalho “DNA demethylation and chromatin remodeling processes in response to valproic acid treatment in HeLa cells”.

7. XXII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, Campinas - 22 a 24 de outubro de 2014, participando como co-autora dos trabalhos "A metilação de DNA na remodelação cromatínica promovida pelo ácido valproico em células HeLa” e “Identificação da proteína HP1-alfa na heterocromatina de *Triatoma infestans*”.

8. 21st International Chromosome Conference, Foz do Iguaçu – 10 a 13 de julho de 2016, apresentando o trabalho “Glucose level of culture medium affects the response of HepG2 cells chromatin to histone deacetylase inhibitors” e participando como co-autora dos trabalhos “Effects of epigenetic modulator drugs on DNA methylation of HeLa cells” e “Fourier

transform-infrared (FT-IR) microspectroscopy of chromatin DNA from valproic acid-treated HeLa cells”

9. XVIII Congress of The Brazilian Society For Cell Biology, São Paulo – 13 a 16 de julho de 2016, apresentando o trabalho “Hepatocyte chromatin alterations promoted by VPA and TSA under hyperglycemia may be a function of the different nuclear domains involved and genes regulated rather than of global remodeling”

- Apresentação oral de trabalhos e palestras

1. 1º Workshop em Epigenética, Instituto de Biologia, Unicamp. “Ação de inibidores de deacetilases de histonas sobre a supraorganização da cromatina”. 2013. Palestra.

2. 59o. Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindoia, SP. “Epigenetic activity of valproic acid and trichostatin A on NIH 3T3 cells”. 2013. Apresentação oral de trabalho.

3. Semana de Estudos de Biomedicina, Faculdade de Americana. “Epigenética: Conceitos e aplicações”. 2013. Mini-curso.

4. XI Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia, Unicamp. “Epigenética: Conceitos e aplicações”. 2013. Palestra.

5. Disciplina de Pós-Graduação NC743/B - Tópicos em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Unicamp. “Efeito de drogas moduladoras epigenéticas sobre a cromatina de hepatócitos e sua relação com a glicemia do meio”. 2015. Palestra.

6. Disciplina de Pós-Graduação Tópicos Avançados em Ciências da Saúde. Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP. “Efeito de drogas moduladoras epigenéticas sobre a cromatina de hepatócitos e sua relação com a glicemia do meio”. 2015. Palestra.

- Publicações

Artigos

1. Felisbino MB, Gatti MSV, Mello MLS. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *Journal of Cellular Biochemistry* 115:1937-47, 2014. (Artigo derivado de trabalho de Mestrado)
2. Alvarenga EM, Rodrigues VLCC, Moraes AS, Naves LS, Mondin M, Felisbino MB, Mello MLS. Histone epigenetic marks in heterochromatin and euchromatin of the Chagas' disease vector, *Triatoma infestans*. *Acta Histochem* 118: 401-412, 2016.
3. Felisbino MB, Alves da Costa T, Gatti MS, Mello ML. Differential response of human hepatocyte chromatin to HDAC inhibitors as a function of microenvironmental glucose level. *J Cell Physiol* 231: 2257-2265, 2016.

Capítulo de Livro

1. Vidal, BC; Felisbino, MB, Mello, MLS. Image Analysis of Chromatin Remodelling. *Methods in Molecular Biology*. 1ed. Vol 1094. New York: Humana Press 99-108, 2014.



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



DECLARAÇÃO

Em observância ao **§5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15**, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **“AÇÃO DO ÁCIDO VALPROICO E DA TRICOSTATINA A NA ORGANIZAÇÃO CROMATÍNICA E SUA REGULAÇÃO POR FATORES EPIGENÉTICOS EM CÉLULAS HEPG2 SOB CONDIÇÕES DE HIPERGLICEMIA”**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Marina Barreto Felisbino
Nome do(a) aluno(a): Marina Barreto Felisbino

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


Data: 21 de junho de 2016

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

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Ação do ácido valproico e da tricostatina A na organização cromatínica e sua regulação por fatores epigenéticos em células HepG2 sob condições de hiperglicemia**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 20 de junho de 2016

Assinatura : Marina Barreto Felisbino
Nome do(a) autor(a): **Marina Barreto Felisbino**
RG n.º 43680913-8

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