

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS E NÚCLEOS GIGANTES EM CÉLULAS HELA TRATADAS COM VALPROATO DE SÓDIO

Palavras-Chave: ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS, CÉLULAS HELA, VALPROATO DE SÓDIO

Autores/as:

BEATRIZ PIERRE SFORÇA [UNICAMP]

MARINA AMORIM ROCHA [UNICAMP]

Prof.^a Dr.^a MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO (orientadora) [UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

O ácido valpróico em associação ao seu sal sódico (VPA) é uma droga antiepiléptica conhecida por inibir deacetilases de histonas (Phiel et al. 2001, Eyal et al. 2004, Romoli et al. 2019), provocando aumento da acetilação de histonas, que são proteínas componentes da cromatina, e alteração nos níveis de metilação do DNA e das histonas (Bialer e Yagen 2007, Chateauvieux et al. 2010, Mello 2021 – revisão). Também existe comprovação na literatura de que efeitos antitumorais sejam provocados por essa droga, reduzindo a proliferação celular e aumentando a taxa de anomalias e mortes celulares (Göttlicher et al. 2001, Blaheta e Cinatl 2002, Duenas-Gonzales et al. 2008, Heers et al. 2018, Li et al. 2019). Especificamente em células HeLa, linhagem celular proveniente de câncer cervical, embora existam dados sobre os efeitos do VPA sobre a acetilação de histonas, demetilação do DNA e alteração nos níveis de metilação/demetilação de histonas (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, 2022), são ainda necessários estudos adicionais que permitam melhor compreensão dos caminhos metabólicos da ação deste fármaco. No presente trabalho busca-se estudar a frequência de anomalias mitóticas e de núcleos gigantes em células HeLa cultivadas em presença de VPA 1 mM e 20 mM por 4 h e que possa ser associada a uma redução sobre a proliferação celular induzida pela droga (Sami et al. 2008).

METODOLOGIA:

Células

Foram utilizadas células HeLa cultivadas no Instituto de Biologia nas passagens 18, 21 e 23. Essas células foram adquiridas na passagem 10 do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) da Unicamp (Campinas, Brasil), validadas pela Diretoria Técnica de Suporte ao Ensino e Pesquisa da Fundação da Faculdade de Medicina da USP (São Paulo, Brasil) e semeadas sobre lamínulas redondas

em placas de 24 pocinhos, na concentração de 1×10^4 células/mL e sincronizadas na fase G1 do ciclo celular antes dos tratamentos com VPA. Os procedimentos de cultivo celular foram os mesmos reportados previamente (Rocha et al. 2022). Os tratamentos com VPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) nas concentrações de 1 mM e 20 mM foram efetuados por 4 h.

Citoquímica e observações

Os preparados celulares fixados em etanol absoluto-ácido acético glacial 1:1 (v/v) por 1 min foram submetidos à reação de Feulgen (Mello & Vidal 2017), contraincorados com *fast green* ácido e montados em bálsamo do Canadá. Detalhes destes procedimentos acham-se descritos em trabalho apresentado por Milena Gomes Santos neste mesmo Congresso.

As observações consistiram no estabelecimento da frequência por lâmina de mitoses anômalas englobando pontes cromossômicas, células em divisão com cromossomos perdidos e fusos tripolares ou multipolares em relação a mitoses morfolologicamente normais em células cultivadas na presença e na ausência de VPA. A frequência de núcleos gigantes foi igualmente estabelecida.

Estatística

As frequências de anomalias cromossômicas e de núcleos gigantes foram comparadas às dos respectivos controles. O cálculo e as análises estatísticas fizeram uso do software Minitab 12™ (State College, PA, USA). A significância estatística foi calculada pelo teste *t* e por teste não paramétricos Mann-Whitney, quando pertinentes, sendo $P_{0.05}$ considerada o nível crítico para rejeição da hipótese nula.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tabela 1. Frequência de mitoses anômalas e de núcleos gigantes por lâmina analisada

Tratamentos	Passagem	Total por lâmina							
		Mitoses anômalas	Mitoses normais	% mitoses anômalas	$\bar{x}$	SD	Núcleos gigantes	$\bar{x}$	SD
VPA 1 mM	18	15	40	27,27	36,44	10,46	10	13,67	4,04
	21	91	175	34,21			13		
	23	275	300	47,83			18		
VPA 20 mM	18	55	74	42,64	40,91	7,98	19	14,33	6,43
	21	159	173	47,89			7		
	23	96	197	32,21			17		
Controle VPA	18	56	65	46,28	43,91	4,79	11	6,33	4,04
	21	24	27	47,06			4		
	23	86	138	38,39			4		

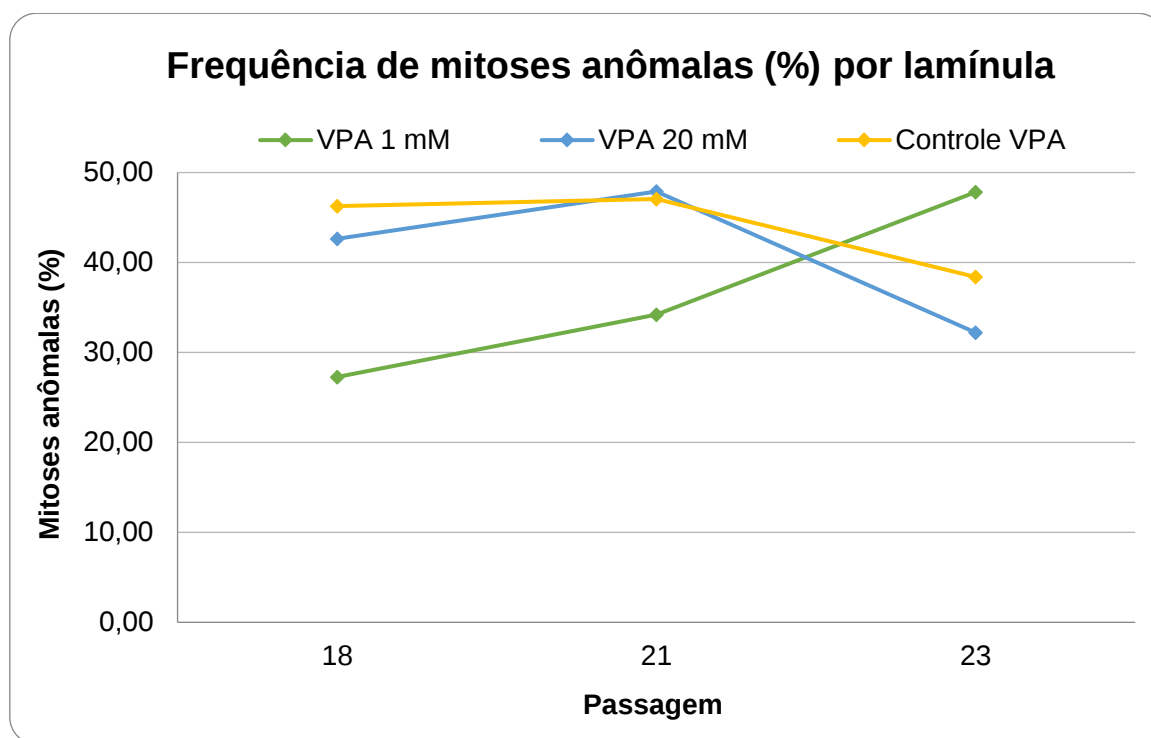


Figura 1. Frequência de mitoses anômalas em função da passagem por lamínula analisada

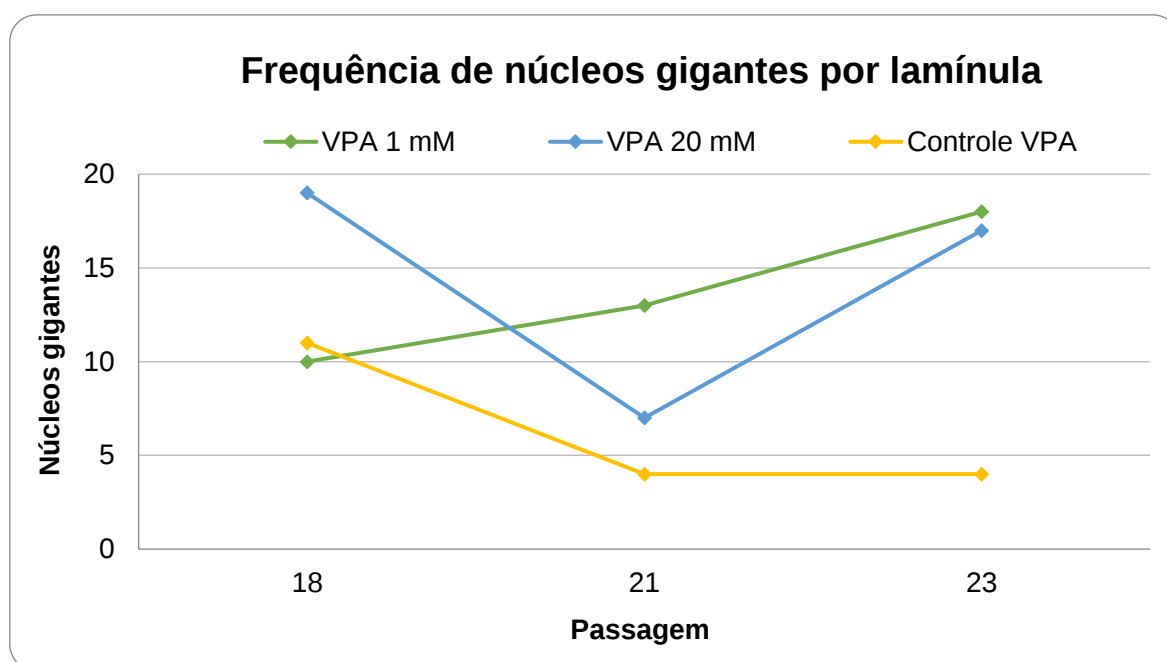


Figura 2. Frequência de núcleos gigantes em função da passagem por lamínula analisada

Os dados obtidos não indicaram alterações estatisticamente significantes com o tratamento pelo VPA, o que estaria de acordo com observações anteriores para um curto tempo de exposição à droga (Felisbino et al. 2011). Não se descarta, porém, a tendência à redução do percentual de mitoses anômalas em presença de VPA 20 mM na passagem 23 do cultivo celular, o que se esperaria da ação do VPA possivelmente por indução e morte celular conforme apresentado neste Congresso (Furtado et al. 2022). Os presentes resultados serão reavaliados em um procedimento no qual se compare a frequência dos mesmos itens para um total de 2000 células/preparado, escolhidas ao acaso.

CONCLUSÕES:

Embora se suspeite que o VPA venha a ter um efeito redutor da frequência de mitoses anômalas em células HeLa, a escolha de outra metodologia de análise dos preparados poderá trazer resultados de maior significância.

REFERÊNCIAS:

- Bialer M, Yagen B. Valproic acid: Second generation. *Neurotherapeutics* 4: 130-137, 2007.
- Blaheta RA, Cinatl J. Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. *Med Res Rev* 22: 492-511, 2002.
- Chateauvieux S et al. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotechnol* 2010: 479364, 2010.
- Duenas-Gonzales A et al. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 34: 206-222, 2008.
- Eyal S et al. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45: 737-744, 2004.
- Felisbino MB et al. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS ONE* 6: e29144, 2011.
- Furtado MM et al. Apoptose em células HeLa cultivadas em presença de valproato de sódio e de 5-azadeoxicitidina. XXX Congr Iniciação Científica Unicamp, Campinas 2022. Resumos, 2022.
- Göttlicher M et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969-6978, 2001.
- Heers H et al. Valproic acid as an adjunctive therapeutic agent for the treatment of breast cancer. *Eur J Pharmacol* 835: 61-74, 2018.
- Li H et al. Combination chemotherapy of valproic acid (VPA) and gemcitabine regulates STAT3/Bmi1 pathway to differentially potentiate the motility of pancreatic cancer cells. *Cell Biosci* 9: 50, 2019.
- Mello MLS. Sodium valproate-induced chromatin remodeling. *Front Cell Dev Biol* 9: 645518, 2021.
- Mello MLS, Vidal BC. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives. *Acta Histochem* 119: 603-609, 2017.
- Phiel CJ et al. Histone deacetylases is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734-36741, 2001.
- Rocha MA et al. Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Sci Rep* 9: 18236, 2019.
- Rocha MA et al. Sodium valproate modulates the methylation status of lysine residues 4, 9 and 27 in histone H3 of HeLa cells. *Curr Mol Pharmacol* (in press), 2022.
- Romoli M et al. Valproic acid and epilepsy: from molecular mechanisms to clinical evidences. *Curr Neuropharmacol* 17: 926-946, 2019.

Sami S et al. Valproic acid inhibits the growth of cervical cancer both *in vitro* and *in vivo*. J Biochem 144: 357-362, 2008.

Veronezi GMB et al. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. PLoS ONE 12: e0170740, 2017.

FINANCIAMENTO:

FAPESP – Proc. 2015/10356-2

CNPq – Proc. 421299/2018-5

– Proc. 304797/2019-7

CAPES