

APOPTOSE EM CÉLULAS HELA CULTIVADAS EM PRESENÇA DE VALPROATO DE SÓDIO E DE 5-AZA- DEOXCITIDINA

Palavras-Chave: APOPTOSE, CÉLULAS HELA, VALPROATO DE SÓDIO

Autores/as:

MARIANA MINSKI FURTADO [UNICAMP]

MARINA AMORIM ROCHA [UNICAMP]

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

INTRODUÇÃO:

A associação do ácido valproico e do valproato de sódio (VPA) tem sido recomendada como medicamento para o tratamento de epilepsia e de algumas outras doenças de caráter neurológico (Chateaufvieux et al. 2010, Romoli et al. 2019). Além dessa prescrição, o VPA tem se revelado um potente modulador da expressão gênica, pois inibe deacetilases de histonas (HDAC), o que pode favorecer a acetilação nos resíduos lisina das histonas H3 e H4 e afetar a transcrição gênica e a estrutura da cromatina (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001, Eyal et al. 2005, Mello 2021). Pode também inibir a proliferação celular em diversos tipos de tumores, o que tem levado muitos autores a propô-lo como droga antitumoral (Göttlicher et al. 2001, Blaheta e Cinatl 2002, Duenas-Gonzalez et al. 2008, Sun e Coy 2014).

Em células HeLa, derivadas de câncer cervical, o VPA induz não só inibição de HDAC, mas também afeta o nível de metilação do DNA e de histonas (Dejligbjerg et al. 2008, Felisbino et al. 2011, Veronezi et al. 2017, Rocha et al. 2019, 2022). Uma vez que nessas células o VPA possa afetar os níveis da DNA metiltransferase I (Rocha et al. 2019), o que poderia se refletir na indução de morte celular por catástrofe mitótica (Chen et al. 2007, Santos MG et al. 2022), o presente trabalho visa detectar se a morte celular por apoptose seria também induzida sob as condições experimentais usadas por Rocha et al. (2019).

METODOLOGIA:

Células

Células HeLa obtidas na passagem 10 do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) da Unicamp (Campinas, Brasil) e validadas pela Diretoria Técnica de Suporte ao Ensino e Pesquisa da Fundação da Faculdade de Medicina da USP (São Paulo, Brasil) foram cultivadas no Instituto de Biologia da Unicamp nas passagens 18, 21 e 23 e semeadas na concentração de 1×10^4 células/mL/pocinho. A

metodologia de cultivo celular e de sincronização do ciclo celular foi a mesma reportada previamente por Rocha et al. (2022) e se acha detalhada no trabalho de Milena Gomes Santos apresentado neste Congresso. Foram analisadas células cultivadas por 4 h em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino a 1% adicionado com VPA (Sigma-Aldrich®), Saint Louis, MI, USA) 1 e 20 mM e células cultivadas por 28 h em presença de 5-aza-CdR 5 µM (Millipore®, Billerica, MA, USA), uma droga conhecida por induzir demetilação predominantemente por via passiva (Rocha et al. 2019). Células cultivadas na ausência das drogas foram utilizadas como controles.

Citoquímica e observações

As células foram fixadas em etanol absoluto-ácido acético glacial 1:1 (v/v) por 1 min, lavadas em etanol a 70%, secados ao ar, armazenadas em ausência de luz e calor, e em seguida submetidas à reação de Feulgen, reação específica para DNA (Mello & Vidal 2017), a qual compreendeu hidrólise ácida em HCl 4 M por 60 min a 25°C (Felisbino et al. 2011). Em seguida, os preparados foram rapidamente contracolorados com fast green a pH 2,7, para melhor identificação da individualidade celular e montados em bálsamo do Canadá. As preparações coradas foram examinadas ao microscópio de luz Nikon, com objetiva de 40x e estabelecida a frequência de células com aspectos típicos de apoptose (vesículas apoptóticas) por lamínula. Três lamínulas foram examinadas para cada tratamento e controle. Os resultados obtidos foram plotados em gráfico com o aplicativo Microsoft Excel.

Estatística

As frequências de apoptose nos preparados tratados com VPA e 5-aza-CdR foram comparadas às dos respectivos controles com o teste t, sendo $P_{0.05}$ considerada o nível crítico para rejeição da hipótese nula, usando-se o software Minitab 12™ (State College, PA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Tratamentos	Passagens	Apoptose/lamínula
		Total
4h VPA 1mM	18	139
	21	466
	23	757
4h VPA 20mM	18	278
	21	417
	23	687
4h Controle	18	136
	21	149
	23	325
28h 5-aza-CdR	18	463
	21	883
	23	1103
28h Controle	18	324
	21	459
	23	516

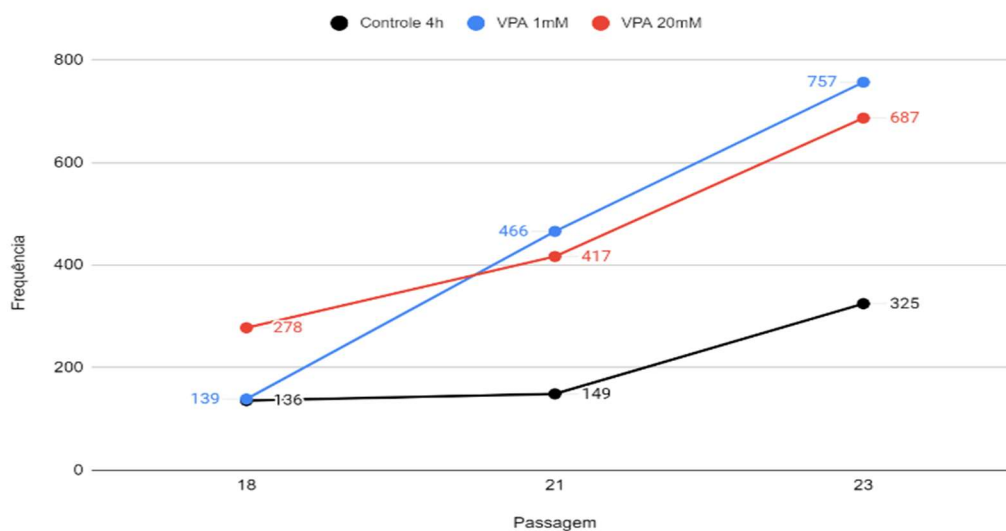


Gráfico 1. Frequência de apoptoses em função da passagem por lamínula analisada

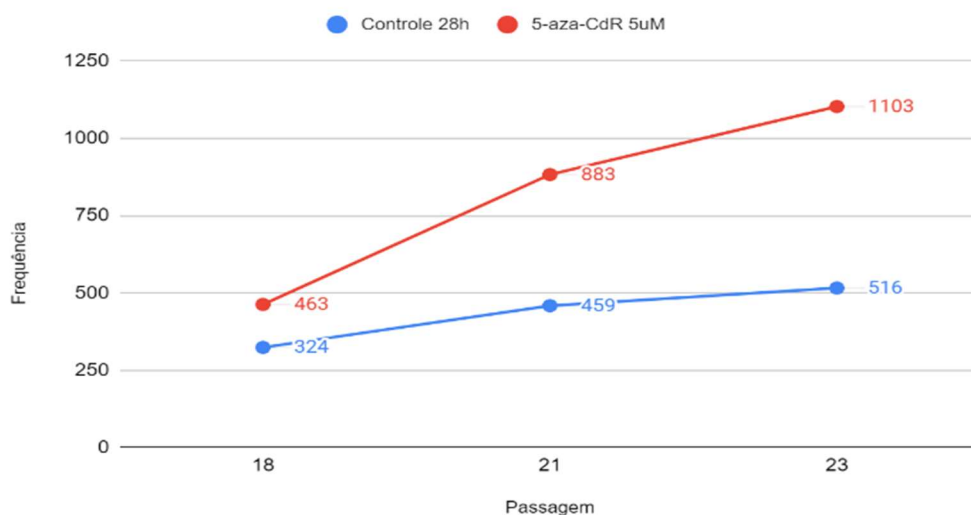


Gráfico 2. Frequência de apoptoses em função da passagem por lamínula analisada

Embora a análise estatística dos valores de frequência de apoptose reunidos das três diferentes passagens das células HeLa tratadas pelas drogas em relação aos respectivos controles, usando-se o teste t, não tenham salientado diferenças significativas, há uma tendência de aumento nessas frequências com o tratamento pelas drogas (Tabela e Gráficos acima), o que estaria de acordo com relatos da ação do VPA sobre a indução de morte celular em células HeLa sob outras condições experimentais. Explicaria também os resultados de redução em anomalias cromossômicas detectadas com o VPA em concentrações mais elevadas, conforme relatado por Sforça et al. neste Congresso (2022). Possivelmente, resultados avaliados com uma comparação de frequências de apoptose induzida num total de 2000 células/preparado, escolhidas ao acaso, sejam mais eficientes em demonstrar essas alterações.

CONCLUSÕES:

A avaliação da frequência de morte celular por apoptose induzida pelo VPA em células HeLa por preparado em cultura pode ter sido prejudicada por variação na proliferação celular conforme a passagem do cultivo considerada. A escolha de uma avaliação por um número fixo de células, examinadas ao acaso, poderá trazer resultados mais robustos do ponto de vista de significância estatística.

REFERÊNCIAS:

- Blaheta RA, Cinatl J Jr. 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.
- Chen TP et al. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature Genet* 39: 391–396, 2007.
- Dejligbjerg M et al. Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol Cancer* 7: 70, 2008.
- Duenas-Gonzalez 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.
- Göttlicher M et al. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969-6978, 2001.
- 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.
- Santos MG et al. Catástrofes mitóticas em células HeLa cultivadas em presença de valproato de sódio e de 5-aza-deoxicitidina. XXX Congr Iniciação Científica Unicamp, Campinas 2022. Resumos, 2022.

Sforça BP et al. Anomalias cromossômicas e núcleos gigantes em células HeLa tratadas com valproato de sódio. XXX Congr Iniciação Científica Unicamp, Campinas 2022. Resumos, 2022.

Sun L, Coy DHC. Anti-convulsant drug valproic acid in cancers and in combination anti-cancer therapeutics. Mod Chem Appl 2: 1000118, 2014.

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