

# CATÁSTROFE MITÓTICA: UMA FORMA DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS HELA

**Palavras-Chave:** CATÁSTROFE MITÓTICA, MORTE CELULAR, VALPROATO DE SÓDIO

**Autoras:**

**BEATRIZ PIERRE SFORÇA, IB – UNICAMP**

**CAMILA BORGES MARTINS DE OLIVEIRA, IB - UNICAMP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO (orientadora), IB - UNICAMP**

---

## INTRODUÇÃO:

O ácido valpróico e o seu sal valproato de sódio (VPA) compõem uma droga amplamente prescrita como anticonvulsivo e que também atua como moduladora da expressão gênica, inibindo deacetilases de histonas (HDAC), afetando a metilação de DNA e histonas, interagindo diretamente com as moléculas de DNA e histonas H1 e H3, e afetando a estrutura da cromatina (Göttlicher et al. 2001; Phiel et al. 2001; Chateauvieux et al. 2010; Felisbino et al., 2011; Veronezi et al., 2017; Rocha et al. 2019, 2023; Vidal & Mello 2020; Mello 2021; Baumann et al. 2021).

Há forte indicação de que o VPA altere o ambiente epigenético de células HeLa, modulando a expressão de muitos de seus genes (Dejligbjerg et al., 2008). Células HeLa constituem uma linhagem celular originária de câncer cervical, na qual há ocorrência de metilação em genes supressores de tumor ocasionada por uma maior atividade de uma enzima da família das DNA metiltransferases (DNMT1), inativando assim atividades endógenas silenciadoras de tumor. Deste modo, a redução ou inibição da atividade de DNMT1 sugere ser uma estratégia promissora para reduzir a hipermetilação do DNA e reativar genes supressores de tumor destas células (Zhang et al. 2011, Lyko 2018). Uma outra enzima da família das DNMT (DNMT3B) exerce também efeito sobre um gene supressor de tumor em células leucêmicas (Jiang et al., 2010), e também em células tumorais da próstata (Kobayashi et al., 2011), no aumento de microadenomas e na progressão neoplásica colo-retal (Lin et al., 2006; Ibrahim et al., 2011).

No entanto, o mecanismo de ação do VPA em diferentes tipos de células tumorais não ocorre por via única, sendo alterada a expressão de genes diversos através de diferentes processos de demetilação do DNA (Rocha et al., 2019) e induzindo respostas onco-supressivas que se complementam e resultam em morte celular ou senescência (Vitale et al. 2011; Zhang et al. 2011). Há relato de que em alguns tipos de células tumorais humanas o decréscimo na expressão de DNMT1 guarde uma relação com o aumento na incidência de catástrofes mitóticas (Chen et al. 2007).

A catástrofe mitótica é um mecanismo de morte celular desencadeado de modo diferente de apoptose e necrose, no qual ocorre multinucleação oriunda de desorganização mitótica, contribuindo para um processo onco-supressivo, e levando as células subsequentemente à morte celular apoptótica ou à senescência (Vitale et al. 2011; Galluzzi et al. 2012; Prokhorova et al., 2020; Sazonova et al. 2021). Segundo Castedo e colaboradores (2004), a catástrofe mitótica é um mecanismo que evita a sobrevivência de células que sejam incapazes de completar a mitose devido a defeitos da maquinaria mitótica, danos ao DNA e erros de checkpoints mitóticos, como a disfunção do checkpoint da fase-S do ciclo celular. Células HeLa se constituíram em um dos primeiros tipos celulares nos quais a forma de morte celular por catástrofes mitóticas foi definida (Swanson et al., 1995; Miranda et al., 1996).

## **OBJETIVO:**

Busca-se avaliar neste estudo a incidência de catástrofes mitóticas em células HeLa submetidas a um tratamento mais longo com VPA numa concentração mais elevada do que previamente investigada, e a sua relação com a frequência de anomalias mitóticas e de outro tipo de morte celular, visando ampliar a compreensão a respeito da diversidade de vias metabólicas envolvidas na atuação do fármaco.

## **METODOLOGIA:**

### *a. Linhagem celular e condições de cultura*

Foram usadas células HeLa (ATCC:CCL-2) adquiridas na passagem 10 do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes da Unicamp (Campinas, Brasil) e validadas na Diretoria Técnica para Suporte de Ensino e Pesquisa da USP (São Paulo). As células foram cultivadas em meio DMEM com alta glicose e suplementado com soro de feto bovino (FCS) (Nutricell Cellular Nutrients, Campinas, Brazil), penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA – 100 IU mL<sup>-1</sup> e 100 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente), e piruvato de sódio a 1% a 37 °C em atmosfera a 5% CO<sub>2</sub>. As células foram cultivadas em placas de 6-wells, na concentração de 1.5 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup>. A sincronização celular foi realizada como reportado previamente (Rocha et al. 2019). Visando se obter células paradas na fase G<sub>1</sub>, em ótima concentração celular, elas foram plaqueadas inicialmente e cultivadas em meio FCS a 1% contendo lovastatina 20 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) por 24 h. Foram então lavadas em tampão fosfato salina (PBS) e induzidas a ciclar, substituindo-se o meio por FCS a 10% contendo ácido mevalônico 6 mM (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) por 18 h para a obtenção de células na fase S. Nenhuma mudança na viabilidade celular é induzida pelo processo de sincronização celular conforme demonstrado com o teste de MTT (Rocha et al. 2019, 2023).

### *b. Tratamentos celulares e coloração*

As células proliferativas sincronizadas foram tratadas com solução aquosa de VPA 5 mM (Sigma-Aldrich) por 48 h. Os controles foram representados por células cultivadas na ausência da

droga. Em seguida, as células sobre lamínulas foram fixadas numa mistura de etanol absoluto-ácido acético glacial 3:1 (v/v), lavadas em etanol absoluto, secadas ao ar e submetidas à reação de Feulgen (Mello & Vidal, 2017). Para tal, foi realizada uma hidrólise ácida com HCl 4 M por 1 h a 25 °C, seguida por tratamento com reativo de Schiff por 40 min, três banhos de água sulfurosa (5 min cada) e um banho de água destilada. Logo após as células foram rapidamente contracoradas com fast green a pH 2,7 para identificação de individualidade celular. Os preparados foram a seguir lavados em água destilada, secados ao ar, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

#### *c. Análise celular*

Os preparados foram examinados em microscópio de luz Nikon (Tokyo, Japão) para detecção da frequência de imagens morfológicas típicas de catástrofes mitóticas e de células cuja condensação cromatínica em multinúcleos derivados de catástrofes mitóticas indicasse um destino apoptótico. A frequência de apoptoses típicas e de anomalias cromossômicas foi também estabelecida. Em todos os casos, as frequências foram estimadas para 2000 células selecionadas ao acaso para três preparados de cada tratamento experimental e controle. A documentação fotográfica das imagens celulares foi obtida num microscópio Axiophot com câmera AxioCamHRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

#### *d. Estatística*

Análise de variância ANOVA ou teste t de Student foram usados para comparações.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

Células HeLa tratadas com VPA a 5 mM não demonstraram aumento significativo na incidência de catástrofes mitóticas e de apoptoses isoladamente. No entanto, considerando somente a morfologia de catástrofe mitótica que demonstra ser uma etapa a ser seguida de apoptose (Figura 1), observou-se um aumento altamente significativo, com  $p < 0,01$  (Figura 2). Além disso, considerando-se o fenômeno total de morte celular incluindo apoptose e catástrofe mitótica com morfologia típica e atípica, observou-se um aumento de incidência, com  $p < 0,05$  (Figura 3), indicando efeito oncosupressor da droga. Além disso, observou-se uma redução significativa da incidência de anomalias cromossômicas, com  $p < 0,05$  (Figura 4), e que se relaciona ao aumento da incidência de morte das células anômalas induzido pela droga.

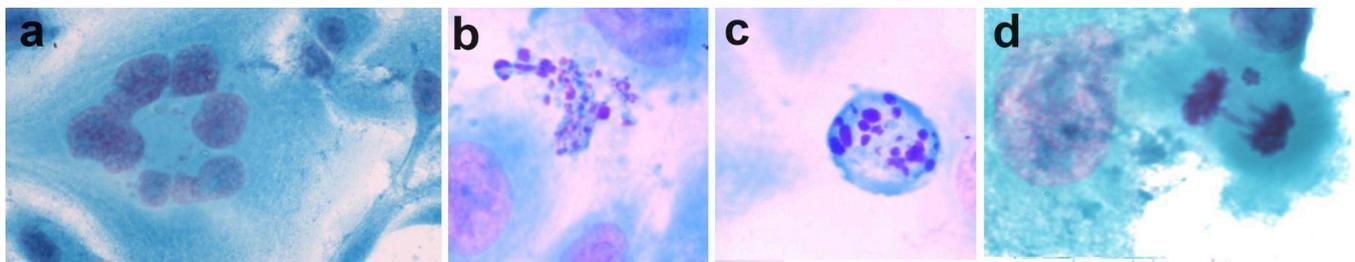


Figura 1. Imagens de morte celular e anomalias mitóticas em células HeLa submetidas à reação de Feulgen e contracoradas com Fast Green pH 2,7. Catástrofe mitótica típica (a), apoptose típica (b), catástrofe mitótica precedente à apoptose (c) e ponte cromossômica com cromossomos desgarrados (d).

Catástrofe mitótica precedente à apoptose

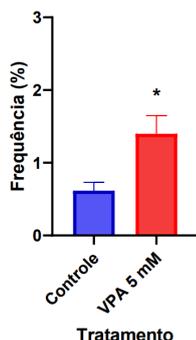


Figura 2. Incidência de catástrofe mitótica precedente à apoptose em células HeLa tratadas com 5 mM de VPA por 48 h

Morte celular total

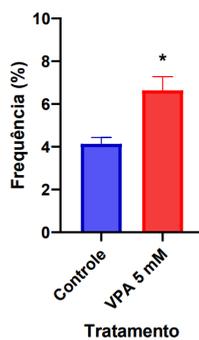


Figura 3. Incidência de morte celular total em células HeLa tratadas com 5 mM de VPA por 48 h

Anomalias mitóticas

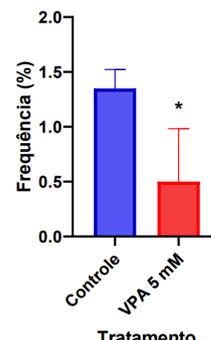


Figura 4. Incidência de anomalias mitóticas em células HeLa tratadas com 5 mM de VPA por 48 h

## CONCLUSÕES:

O estudo demonstra que o tratamento de células HeLa com VPA a 5 mM por 48 h apresenta efeito indutor de morte celular, provavelmente por via de catástrofe mitótica que leva à apoptose. Isso possibilita melhor compreensão sobre a via metabólica relacionada à atividade oncosupressora da droga, ligada à indução de morte celular em células anômalas.

## AGRADECIMENTOS:

FAPESP nº 2024/00772-8, CNPq.

## BIBLIOGRAFIA

- Baumann, C., Zhang, X., Zhu, L., Fan, Y., De La Fuente, R., 2021. Changes in chromatin accessibility landscape and histone H3 core acetylation during valproic acid-induced differentiation of embryonic stem cells. *Epigenetics & Chromatin* 14, 58 <https://doi.org/10.1186/s13072-021-00432-5>
- Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G., 2004. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23, 2825-2837.
- Chateaufieux, S., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M., 2010. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 479364. <https://doi.org/10.1155/2010/479364>
- Chen, T., Hevi, S., Gay, F., Tsujimoto, N., He, T., Zhang, B., Ueda, Y., Li, E., 2007. Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nature Genet.* 39, 391-396. <https://doi.org/10.1038/ng1982>
- Dejligbjerg, M., Grauslund, M., Litman, T., Collins, L., Qian, X., Jeffers, M., Lichenstein, H., Jensen, P.B., Sehested, M., 2008. Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol Cancer* 7, 70. doi:10.1186/1476-4598-7-70
- Felisbino, M.B., Tamashiro, W.M.S.C., Mello, M.L.S., 2011. Chromatin remodeling, cell proliferation and cell death in valproic acid-treated HeLa cells. *PLoS ONE* 6, e29144. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029144>
- Galluzzi, L. + 32 authors. 2012. Molecular definitions of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 19, 107-120. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>
- Göttlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., LoCoco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G., Heinzel, T., 2001. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 20, 6969-6978. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6969>
- Ibrahim, A.E.K., Arends, M.J., Silva, A.L., Wyllie, A.H., Greger, L., Ito, Y., Vowler, S.L., Huang, T.H.M., Tavaré, S., Murrell, A., Brenton, J.D., 2011. Sequential DNA methylation changes are associated with

- DNMT3B overexpression in colorectal neoplastic progression. *Gut* 60, 499-508. doi: 10.1136/gut.2010.223602
- Jiang, S., Ma, X., Huang, Y., Xu, Y., Zheng, R., Chiao, J.W., 2010. Reactivating aberrantly hypermethylated p15 gene in leukemic T cells by a phenylhexyl isothiocyanate mediated inter-active mechanism on DNA and chromatin. *J. Hemat. Oncol.* 3, 48.
- Kobayashi, Y., Absher, D.M., Gulzar, Z.G., Young, S.R., McKenney, J.K., Peehl, D.M., Brooks, J.D., Meyers, R.M., Sherlock, G., 2011. DNA methylation profiling reveals novel biomarkers and important roles for DNA methyltransferases in prostate cancer. *Genome Res.* 21, 1017-1027.
- Lin, H., Yamada, Y., Nguyen, S., Linhart, H., Jackson-Grusby, L., Meissner, A., Meletis, K., Lo, G., Jaenisch, R., 2006. Suppression of intestinal neoplasia by deletion of Dnmt3b. *Mol. Cell Biol.* 26, 2976-2983.
- Lyko, F., 2018. The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Rev. Genet.* 19, 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Mello, M.L.S., 2021. Sodium valproate-induced chromatin remodeling. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 645518. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.645518>
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 2017. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives. *Acta Histochem.* 119, 603-609. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>
- Miranda El, Santana C, Rojas E, Hernández S, Ostrostry-Wegman P, García-Carranca A., 1996. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-Ha-ras. *Mut Res* 349,173-182.
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogene. *J. Biol. Chem.* 276, 36734-36741.
- Prokhorova, E.A., Egorshina, A.Y., Zhivotovsky, B., Kopeina, G.S., 2020. The DNADamage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death. *Oncogene* 39, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0980-6>
- Rocha, M.A., Oliveira, C.B.M., Mello, M.L.S., 2021. Sodium valproate cytotoxicity effects as assessed by the MTT assay. *Repositório de Dados de Pesquisa da Unicamp*, version 1. <https://doi.org/10.25824/redu/XPTX4F>
- Rocha, M.A., Veronezi, G.M.B., Felisbino, M.B., Gatti, M.S.V., Tamashiro, W.M.S.C., Mello, M.L.S., 2019. Sodium valproate and 5-aza-2'-deoxycytidine differentially modulate DNA demethylation in G1 phase-arrested and proliferative HeLa cells. *Sci. Rep.* 9, 18236. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-54848-x>
- Rocha, M.A., Vidal, B.C., Mello, M.L.S., 2023. Sodium valproate modulates the methylation status of lysine residues 4, 9 and 27 in histone H3 of HeLa cells. *Curr. Mol. Pharmacol.* 16, 197-210. doi: 10.2174/1874467215666220316110405
- Sazonova, E., Petrichuk, S., Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B., 2021. A link between mitotic defects and mitotic catastrophe: detection and cell fate. *Biol. Direct* 16, 25. <https://doi.org/10.1186/s13062-021-00313-7>
- Swanson, P.E., Carroll, S.B., Zhang, X.F., Mackey, M.A., 1995. Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation, and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. Ultrastructural observations. *Am. J. Pathol.* 146, 963-971. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7717463>
- Veronezi, G.M.B., Felisbino, M.B., Gatti, M.S.V., Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 2017. DNA methylation changes in valproic acid-treated HeLa cells as assessed by image analysis, immunofluorescence and vibrational microspectroscopy. *PLoS ONE* 12, e0170740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170740>
- Vidal, B.C., Mello, M.L.S., 2020. Sodium valproate (VPA) interactions with DNA and histones. *Int. J. Biol. Macromol.* 163, 219-231. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.265
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., Kroemer, G., 2011. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 385-392. <https://doi.org/10.1038/nmr3115>
- Zhang, Y., Chen, F.Q., Sun, Y.H., Zhou, S.Y., Li, T.Y., Chen, R., 2011. Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. *J. Expt. Clin. Cancer Res.* 30, 98. <http://www.jeccr.com/content/30/1/98>