

Efeito do Metotrexato na inibição da divisão celular em grandes longevos

*Julie Alvina Guss Patrício**

*Líliá Maria de Azevedo Moreira***

Resumo

O envelhecimento é influenciado por fatores genéticos, nutricionais, exposição a radicais livres, radiação e substâncias genotóxicas. A sensibilidade da célula às substâncias mutagênicas aumenta com a idade e pode contribuir para a aceleração do processo de envelhecimento. Esta investigação analisa o efeito do Metotrexato (MTX), agente indutor de quebras cromossômicas na inibição da reprodução celular em grandes longevos e em um grupo controle. A amostra foi constituída por dez idosos com idades entre 92 e 114 anos e doze controles de 20 a 25 anos. As células para análise foram obtidas por cultura temporária de linfócitos, com adição de MTX. A análise estatística foi realizada com as provas de Kruskal-Wallis e Friedman. O Metotrexato mostrou-se eficaz na redução da divisão celular com resultados estatisticamente significativos. O índice mitótico apresentou valores baixos nos idosos, mesmo sem o uso do MTX, mostrando que o processo de envelhecimento está relacionado com o decréscimo na capacidade de reprodução da célula.

Palavras-chave: Envelhecimento. Metotrexato. Divisão celular.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento não é apenas um produto das mudanças ao longo da vida e sim a manifestação de eventos biológicos que ocorrem em um período de tempo. Para se compreender o envelhecimento, seria necessário um estudo longitudinal em um determinado número de indivíduos durante todo o período de suas vidas. Esta forma de abordagem, embora seja a mais indicada para se entender os processos do envelhecimento normal, apresenta desvantagens em relação ao tempo necessário para a aquisição de algum dado confiável.

As teorias modernas do envelhecimento podem ser divididas em dois grandes grupos: as

que presumem a existência de um relógio biológico no qual o envelhecimento celular é programado, e as que postulam que o envelhecimento resulta de eventos aleatórios não programados (HAYFLICK, 1996). A teoria inicial sobre este fenômeno — a da Substância Vital — propõe que os animais começam suas vidas com uma substância que é consumida, levando ao envelhecimento e, na sua total exaustão, à morte. Strelher (1986) sugere que esta substância vital pode ser o DNA presente em diversas cópias nas células. Segundo o autor, estas cópias se perdem ao longo do tempo, uma vez que o reparo do DNA é um processo imperfeito, determinando as mudanças associadas à idade.

* Mestre em Patologia. Professora Substituta. Instituto de Biologia. UFBA.

** Doutora em Genética. Professora Titular. Instituto de Biologia. UFBA. Membro da Sociedade Brasileira de Genética.

Rua da Paz, 32, aptº 201 Graça
40150-140 - Salvador Bahia Brasil
E-mail: lazevedo@ufba.br

Dentre as teorias com bases genéticas para o envelhecimento destacam-se a Teoria do Desgaste e a Teoria dos Erros e Reparos. Segundo a Teoria do Desgaste, ocorreriam danos nos sistemas vitais pelo excesso de uso. Miquel e colaboradores (1986) propõem que estes danos poderiam ocorrer no DNA da mitocôndria pelo ataque dos radicais livres ao longo dos anos, pois seu DNA fica próximo do local de produção de energia e parece não haver um sistema de reparo eficiente para o DNA danificado. Com o passar do tempo, haveria uma menor produção de ATP, gerando uma perda progressiva da eficiência das células e levando os tecidos e o organismo como um todo a entrar no processo de envelhecimento.

Um fato que apóia a Teoria do Desgaste é que há indícios de que a longevidade, tanto em seres humanos como em animais, pode ser fortemente influenciada pela longevidade materna, fenômeno provavelmente associado à presença exclusiva de componentes celulares no zigoto, inclusive DNA mitocondrial, de fonte materna (HAYFLICK, 1996).

A Teoria dos Erros e Reparos é derivada da Teoria da Mutação Genética e propõe que erros na replicação do DNA e a ineficiência do mecanismo de reparo podem produzir mudanças associadas à idade. Hayflick (1996) refere que células retiradas de animais com maior longevidade mostram maior capacidade de reparar com eficiência o DNA danificado. Esta observação apóia a Teoria dos Erros e Reparos e sugere que animais que vivem mais poderiam ter mecanismos de reparo mais eficientes para corrigir os erros no seu DNA e, com isso, retardar o processo do envelhecimento.

Desde Jacobs, Court Brown e Doll (1961) ficou demonstrado que é alta a proporção de células aneuplóides em cultura de linfócitos de pessoas idosas. Diversos pesquisadores observaram a perda preferencial dos cromossomos X e Y, respectivamente, em fêmeas e machos (CADOTTE; FRASER, 1970; JACOBS et al., 1963). Durante a metáfase, a distribuição dos cromossomos sexuais muitas vezes localiza-se na periferia da célula e, quando a membrana se rompe na hipotonização, existe a possibilidade de

perda desses cromossomos (MORISHIMA; GRUMBACH; TAYLOR, 1962). Considerando que os danos no DNA são acumulados de modo constante durante o envelhecimento, espera-se que uma variedade de alterações cromossômicas alcance seu auge em células de indivíduos centenários.

Por outro lado, indivíduos com cem anos ou mais não apresentam a maioria das doenças relacionadas à idade, inclusive o câncer, o que sugere que seus mecanismos de defesa são particularmente eficientes. Por esse motivo, os grandes longevos são considerados a “elite biológica” e, como tal, poderiam ter um mecanismo de defesa celular mais eficiente do que os demais indivíduos, assim como uma alta eficiência do mecanismo de reparo do DNA, o que reduziria consideravelmente o número de alterações no DNA em nível celular e molecular. Trabalhos realizados por Franceschi e colaboradores (1992) com troca de cromátides irmãs (TCI) demonstraram um baixo número de quebras em células de centenários, sugerindo que as células danificadas são eficientemente reparadas ou eliminadas. Outra hipótese seria a eliminação das células mutadas pelo fenômeno da apoptose ou morte celular programada (MONTI et al., 1972).

Alterações cromossômicas no envelhecimento podem ser avaliadas com a utilização de uma variedade de técnicas citogenéticas, incluindo o uso de substâncias que causam danos ao DNA. Dessa forma, o número de quebras observadas por células é proporcional à sensibilidade, e esta reação a substâncias genotóxicas poderia aumentar com a idade e, assim, contribuir para a aceleração dos processos de envelhecimento. Entre as substâncias utilizadas na avaliação dos danos citogenéticos, o Metotrexato (MTX), antimetabólico usado no tratamento de alterações neoplásicas, é considerado altamente apropriado. Quimicamente, o MTX é conhecido como ácido N 14-1 (2,4 diamino - 6 - pteridinil) metil (metilamino benzoil) - L - glutâmico. O MTX é um análogo estrutural de tetra-hidrofolato, e seu principal mecanismo de ação é a inibição competitiva da enzima que reduz o folato em ácido tetra-hidrofólico no pro-

cesso de síntese do DNA e na replicação celular (LEHNINGER, 1996).

Como o crescimento das células cancerosas é mais rápido do que o das células da maioria dos tecidos normais, elas têm uma maior necessidade de nucleotídeos para a síntese do DNA e RNA. Em decorrência disso, as células cancerosas são mais sensíveis aos inibidores da biossíntese de nucleotídeos (MIQUEL et al., 1986). Com isso, o Metotrexato inibe a redução do ácido fólico e interfere na reprodução celular, fenômeno altamente relacionado com o envelhecimento.

A produção de pesquisas básicas sobre o envelhecimento pode levar a um maior conhecimento do processo e garantir uma melhor qualidade de vida aos idosos e, talvez, um aumento na sua longevidade. O presente trabalho teve o objetivo de contribuir para o conhecimento dos eventos biológicos relacionados com o envelhecimento, através do estudo da reprodução celular em culturas de linfócitos sob a ação do Metotrexato.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da amostra

Foram estudados dois grupos amostrais: 1) Grandes longevos (10) com idade entre 92 e 114 anos, provenientes de três abrigos geriátricos; 2) Grupo controle (12) com idade entre 20 e 25 anos, estudantes universitários.

Anamnese

A avaliação dos fatores ambientais, como o hábito de fumar, de beber, a alimentação, a exposição a mutágenos, o uso de medicamentos e drogas, assim como da ocorrência de distúrbios hereditários e de distúrbios genéticos na família, foi feita através de entrevista, com o preenchimento de ficha específica, aplicada aos idosos e aos controles.

Os hábitos alimentares foram investigados por informações sobre a dieta na ocasião da pes-

quisa, coletados através de entrevista com os idosos; quanto à dieta anterior à internação, foi fornecida por nutricionistas da instituição geriátrica.

Testes citogenéticos

Foi utilizada a técnica de cultura temporária de linfócitos de sangue periférico, segundo Moorhead e colaboradores (1960), com modificação referente à aplicação do Metotrexato (MTX), em uma concentração de 1mg/ml MTX, 48 horas depois da semeadura. Para cada indivíduo, foram feitas duas culturas, uma com o MTX e a outra sem a substância. Os cromossomos foram corados em solução de Giemsa a 3% dissolvido em tampão fosfato (pH 6,8) ou solução de Orceína Acética a 1%.

Análise das células

A análise cromossômica foi realizada em microscópio óptico comum com objetiva de imersão (100 X). A taxa de divisão celular foi calculada de acordo com o Índice Mitótico, determinado com base no número de células em divisão por 1.000 células de cada amostra (com ou sem MTX).

Análise estatística

Foram utilizadas a Prova de Friedman e a de Kruskal-Wallis (SIEGEL, 1975). A primeira foi aplicada para a comparação do tratamento com MTX e a seguinte para comparar o Índice Mitótico de jovens e idosos.

RESULTADOS

De acordo com as informações obtidas pela anamnese, 83,3% dos idosos estudados eram do sexo feminino, e 16,7%, do sexo masculino. As cores predominantes foram negro (50%), seguida de mulato médio (25%) e mulato escuro (16,66%); somente 8,33% apresentavam a cor branca. Muitos tinham vindo do interior do Estado da Bahia e trabalharam como agri-

cultores (41,6%); os demais trabalharam como empregados domésticos ou possuíam subempregos autônomos. Os indivíduos investigados pertenciam às classes sociais média baixa e baixa, caracterizadas, respectivamente, de acordo com a renda correspondente a um salário mínimo ou abaixo deste valor. Desses idosos, 33,3% não tiveram filhos, 58,3% tiveram filhos que morreram cedo, e 8,4% tinham filhos, mas não mantinham contato com os mesmos.

Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, 58,4% nunca beberam, 25% bebiam socialmente em quantidades muito pequenas, e 16,6% bebiam regularmente. Grande parte dos idosos entrevistados não fumava (50%), alguns tinham o hábito de mascar fumo (16,6%) e 8,3% fumavam, mas não tragavam; os restantes fumavam cigarro ou cachimbo. Com relação a medicamentos, quando perguntados se tomavam algum remédio antes de ingressar na instituição geriátrica, todos responderam negativamente; disseram que tomavam chás específicos para o que estavam sentindo e “rezavam as dores”.

A alimentação à época da pesquisa era balanceada e sem excessos. A alimentação anterior, segundo relataram, era variada e constava de verduras e carnes, sem restrição de gordura e açúcar.

A Tabela 1 apresenta características relevantes dos idosos investigados, e a taxa de divisão celular (Índice Mitótico) correspondente. De uma forma geral, o processo de envelhecimento mostrou-se associado ao decréscimo da reprodução da célula. Além disso, o uso do Metotrexato reduziu significativamente o número de mitoses em culturas de jovens e idosos. Enquanto no grupo controle o Índice Mitótico médio foi de 61,50% (sem MTX) e 27% (com MTX), o grupo idoso revelou valores médios de 38% e 29,13%, respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O número elevado de mulheres no grupo amostral foi considerado uma consequência do fato de que, além de as mulheres viverem mais

do que os homens, os seus índices de sobrevivência são maiores em quase todas as idades.

Para avaliação do efeito citotóxico do Metotrexato, foi escolhida a concentração de 1,0mg/ml do MTX, como proposto por Petz e colaboradores (1988), uma vez que concentrações superiores de 10mg/ml, de acordo com Velissariou e colaboradores (1993), reduziriam consideravelmente o número de metáfases e danificariam os cromossomos, impedindo a análise.

O tempo de incubação das culturas foi de 72 horas, garantindo uma maior quantidade de células para análise, de acordo com Sinha e colaboradores (1984), que, em estudo com 20 indivíduos normais, demonstraram que o número de aberrações cromossômicas em culturas de 48 horas a 72 horas não apresentou diferenças estatisticamente significativas.

Os resultados obtidos mostraram redução do número de divisões celulares com o aumento da idade, concordando com o estudo clássico de Piscioti e colaboradores (1967), que também constatou variação do Índice Mitótico em função da idade.

A relação observada entre a reprodução celular e a idade mostra que há decréscimo deste fenômeno em função do envelhecimento, e que esta redução torna-se mais evidente com a adição de agentes como o Metotrexato, que prejudicam a síntese do DNA. Segundo Hayflick e Moorhead (1961), células normais têm capacidade de divisão limitada, tanto em cultura quanto *in vivo*. Além disso, células de indivíduos jovens têm maior capacidade de divisão do que células dos mesmos tecidos de doadores idosos. Quanto mais idoso o doador humano, menor o número de divisões das células cultivadas (KIRKWOOD; CREMER, 1982). A presente investigação corrobora os estudos relatados.

A perda da eficiência na reprodução celular nas culturas com adição do Metotrexato pode também estar relacionada com o fenômeno da apoptose, morte celular programada, que elimina células com comprometimento funcional e, conseqüentemente, reduz o número de células em divisão.

Tabela 1 - Identificação, hábitos de vida, distúrbios clínicos e índices mitóticos dos idosos estudados

Iniciais	Cor*	Sexo	Idade (anos)	Hábito de fumar	Hábito de beber	Distúrbios clínicos	Índice Mitótico
A.M.	MM	F	94	Não	Socialmente	Tumoração nasal Osteoporose Dificuldade auditiva	49
T.S.	ME	F	94	Não	Não	Catarata Hipertensão Cegueira	25
J.S.	P	F	114	Mascava	Não	Hipertensão arterial Dificuldade visual Glaucoma Asma brônquica Deformidade torácica Distúrbio comportamental	20
M.M.J.	MM	F	94	Cachimbo	Não	Dificuldade Visual Catarata Fratura de colo de fêmur Dificuldade auditiva Hipertensão arterial	68
J.V.A.	P	M	95	Não tragava	Não	Tremores generalizados Insônia Imobilidade parcial Déficit nas funções cognitivas Curvatura cervical e dorsal Redução visual intensa	41
M.B.	ME	F	92	Cigarro	Sim	Catarata Dores lombares Diabetes	45
M.M.J.	P	F	106	Mascava	Socialmente	Artrose Diabetes	28
J.A.M.	P	F	92	Não	Socialmente	Câncer de mama Dificuldade auditiva Dificuldade Visual	28
L.P.S.	MM	F	90	Não	Não	Artrose Dificuldade auditiva	44
A.R.C.	MC	F	92	Não	Sim	Dificuldade auditiva	57
<u>Média</u>							<u>40,5</u>

*Cor: P = preto (negro); ME = mulato escuro; MM = mulato médio; MC = mulato claro; B = branco.

Hábitos de vida, como o consumo de bebidas alcoólicas e o hábito de fumar, não revelaram associação com o decréscimo do Índice Mitótico. Quanto aos hábitos alimentares, embora os idosos tivessem uma alimentação variada e ingerissem gorduras e açúcares, possuíam, na verdade, uma dieta hipocalórica, pois as quantidades consumidas eram pequenas, com alternância de períodos de abundância e jejum. Como já foi observado, os idosos eram de classe média baixa, e a maioria de classe baixa; muitos revelaram ter passado fome, e outros diziam que a comida em casa “era pouca”. Além disso, quando entraram no centro geriátrico onde vivem, muitos estavam em estado de subnutrição.

O aumento da longevidade em associação com uma dieta hipocalórica concorda com os dados obtidos por Mc Cay e colaboradores (1939) em pesquisa com ratos alimentados com

teor extremamente baixo de calorias e quantidades normais de proteínas, minerais e vitaminas, que demonstrou um aumento da longevidade e uma diminuição da frequência de câncer e problemas cardíacos.

Além da alimentação hipocalórica, o aumento da longevidade pode ser também atribuído ao fato de não terem tido vida sedentária, pois sempre trabalharam muito em casa ou na lavoura, além de consumirem poucos produtos industrializados e utilizarem chás de ervas naturais em vez de medicamentos.

Os grandes longevos entrevistados mostraram-se lúcidos; nenhum deles tinha problemas cardíacos e somente dois apresentavam câncer. Em sua maioria, eram alegres e bem dispostos, aparentando idade mais baixa do que a sua idade real.

The Methotrexate effect in the inhibition of cell divisions in the elderly

Abstract

The aging is influenced by genetic and nutritional factors as well as by the exposition to free radicals, radiation and genotoxic substances. The cell sensitivity to mutagenic substances increases as the individual grows old and may contribute to accelerate his/her aging process. This paper analyzes the Methotrexate (MTX) effect, an agent which induces chromosomal breaks in the inhibition of the cell reproduction in old people and in a control group. The sample comprised 10 elderly people, from 92 to 114 years old, and 12 members of the control group, 20 to 25 years old. The cells for analyses were obtained from lymphocytes temporary culture, together with MTX. Statistical analysis was carried out with Kruskal-Wallis and Friedman tests. MTX was efficient to reduce cell divisions with significant statistical results. The mitosis rate was low as far as the old people were concerned, even when not treated with MTX, what showed that the aging process has to do with the reduction of the cell reproductive capacity.

Keywords: *Aging. Methotrexate. Cell division.*

REFERÊNCIAS

CADOTTE, M.; FRASER, D. Étude de l'aneuploidie observée dans des cultures de sang et de moelle en fonction du nombre et de longueur des chromosome de chaque groupe et de l'âge et du sexe des sujets. **Union Méd. Can.**, Montreal, v.99, n.11, p.2003-2007, 1970.

FRANCESCHI, C. et al. Genomic instability and aging. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v.663, p.4-16, 1992.

HAYFLICK, L. **Como e porque envelhecemos**. Rio de Janeiro: Campus, 1996.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v.25, p.585-621, 1961.

- JACOBS, P. A. et al. Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex difference. *Nature*, London, v.197, p.1080-1081, 1963.
- JACOBS, P. A.; COURT BROWN, W. M.; DOLL, R. Distribution of human chromosome counts in relation to age. *Nature*, London, v.191, p.1178-1180, 1961.
- KIRKWOOD, T. B. L.; CREMER, T. Cytogerontology since 1881. *Hum. Genet.*, Berlin, v.60, p.101-121, 1982.
- LEHNINGER, A. L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1996.
- MCCAY, C. M. et al. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat breeding diets restricted in calories. *J. Nutr.*, Bethesda, v.18, 1939.
- MIQUEL, J. et al. Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.*, Tarrytown, v.15, p.575, 1986.
- MONTI, D. et al. Apoptosis: programmed cell death: a role in the aging process? *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.55, p.12085-12145, 1972.
- MOORHEAD, P. S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v.20, p.613-616, 1960.
- MORISHIMA, A.; GRUMBACH, M. M.; TAYLOR, J. H. Asynchronous duplication of human chromosomes and the origin of sex chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, DC, v.48, p.756-763, 1962.
- PETZ, L. et al. Increased methotrexate induced-chromosome breakage in patients with free trisomy 21 and their parents. *Hum. Genet.*, Berlin, v.81, p.38-40, 1988.
- PISCIOTA, A. et al. Mitogenic effect of phytohaemagglutinin at different ages. *Nature*, London, v.215, n.97, p.193-194, 1967.
- SIEGEL, S. *Estatística não-paramétrica*. New York: McGraw-Hill, 1975.
- SINHA, A. K. et al. The incidence of spontaneous cytogenetic aberrations in lymphocytes cultured from normal humans for 48 and 72 hours. *Can. J. Genet. Cytol.*, Ottawa, v.26, p.528-531, 1984.
- STREHLER, B. L. Genetic instability as the primary cause of human aging. *Exp. Gerontol.*, Tarrytown, v.21, p.283-319, 1986.
- VELISSARIOU, V. et al. Chromosome breakage in individuals with single-cell structural aberrations and habitual abortions. *Ginecol. Obstet. Invest.*, Basel, v.36, p.71-74, 1993.