

Proliferação celular e quebras cromossômicas em células submetidas à ação da Dolomita brasileira (*Gran-White*) *in vitro*

Ana Patrícia Barros Cordeiro¹

Lília Maria Azevedo Moreira²

Resumo

A Dolomita brasileira (*Gran-White*) é um suplemento alimentar mineral utilizado como coadjuvante na prevenção e tratamento da osteoporose, com efeito no aumento da massa óssea. Esta investigação foi realizada com o objetivo de analisar a ação da Dolomita Brasileira em células obtidas por cultura convencional de linfócitos quanto à ocorrência de aberrações cromossômicas, micronúcleos e ao índice mitótico, podendo contribuir para o conhecimento de aspectos citogenéticos no processo de envelhecimento. Foi realizado estudo caso-controle em amostra composta por 2 grandes longevos, 2 idosos mais jovens e 2 estudantes na faixa de 20-30 anos. O estudo *in vitro* foi feito com aplicação da substância em 3 concentrações diferentes (1,0mg, 3,0mg e 5,0mg), além de experimentos-controle histórico, negativo e positivo (sem acréscimo de substância, com Vitamina C e com ciclofosfamida, respectivamente). Em cada tratamento, foram analisadas 50 células em microscopia óptica comum. Os resultados evidenciaram ação da Dolomita no aumento do índice mitótico nos experimentos realizados, em concentrações correspondentes à administração *in vivo*. A taxa espontânea de micronúcleos e as alterações cromossômicas tiveram aumento significativo nas diferentes dosagens da substância nos idosos, e em menor proporção nos indivíduos mais jovens. Os resultados obtidos evidenciam o efeito positivo do Gran White na taxa de reprodução celular, podendo estar associado com as descrições clínicas de aumento da massa óssea. Não foi verificado, entretanto, efeito protetor da substância para agentes clastogênicos.

Palavras-chave: Envelhecimento. Osteoporose. Dolomita brasileira (*Gran-White*). Alterações cromossômicas. Dolomita brasileira (*Gran-White*)-Micronúcleos.

INTRODUÇÃO

A osteoporose é definida pela Organização Mundial de Saúde como uma enfermidade metabólica esquelética sistêmica, caracterizada por baixa massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo (CAMPOS et al., 2003). O processo de perda óssea é mais comum em vértebras, pernas e quadril e pode se iniciar precocemente, de forma silenciosa, conduzindo à fragilidade do osso e ao aumento do risco de fratura.

Sabe-se que a genética desempenha um papel fundamental na predisposição à osteoporose (LANZILLOTTI et al., 2003). Entretanto, a idade é o mais importante determinante na diminuição da densidade óssea, que está associada a diversos fatores como raça, sexo, atividade física e à ingestão inadequada de cálcio por períodos prolongados (LERNER et al., 2000). Junqueira (2001) aponta que a frequência de fraturas aumenta

¹ Bióloga. Laboratório de Genética Humana. Instituto de Biologia - UFBA.

² Professora Titular de Genética. Laboratório de Genética Humana. Instituto de Biologia - UFBA

Correspondência para / Correspondence to:

Lília Maria Azevedo Moreira

Rua da Paz, 32, apt. 201- Graça

40.150-140 Salvador-Bahia-Brasil

E-mail: lazevedo@ufba.br

exponencialmente com a idade, principalmente após os 70 anos, e Costa-Paiva e colaboradores (2003) mencionam que metade das fraturas de fêmur por osteoporose culmina em incapacidade total ou parcial.

Dados do IBGE (Censo 2000) demonstram aumento da expectativa de vida da população brasileira, o que confere maior importância às pesquisas relacionadas à osteoporose, principalmente por se tratar de uma enfermidade que gera invalidez e custos elevados ao Estado. Carvalho, Fonseca e Pedrosa (2004) constataram que, no Brasil, a população propensa a desenvolver a osteoporose aumentou de 7,5 milhões (1980) para 15 milhões em 2000.

Mulheres são mais suscetíveis à osteoporose que os homens, e estima-se que uma em cada duas mulheres apresentará uma fratura osteopórica em algum momento da vida (ZANETTE; STRINGARI; MACHADO, 2003). Novos estudos, entretanto, demonstram que essa enfermidade vem sendo diagnosticada cada vez mais em homens em todo o mundo (RIBEIRO; SERAKIDES; NUNES, 2003).

Somente através da dieta o organismo humano pode dispor de cálcio em quantidade mínima para o completo crescimento e maturação dos ossos. Entretanto, estudos sugerem que a quantidade de cálcio retido pelos ossos é mais importante do que a consumida (SALGADO, 2000). Uma adequada absorção de cálcio necessita de um suprimento constante de cálcio dietético biodisponível, além da Vitamina D, que é obtida através da alimentação, na presença da radiação ultravioleta da luz solar. A atividade física também é necessária para a aquisição e a manutenção da massa óssea. (JUNQUEIRA; FONSECA; ALDRIGHI, 2001).

A Dolomita Brasileira, registrada com o nome comercial de *Gran-White* (GW), é um suplemento alimentar formado por 27 minerais, principalmente Cálcio e Magnésio, utilizado como coadjuvante na prevenção e tratamento da osteoporose, com aumento comprovado da massa óssea (LEV-RAN et al., 1998). É encontrado em uma única mina, no município de Iporanga, em São Paulo. Quimicamente, trata-se de um carbonato duplo de Cálcio e

Magnésio (Ca, Mg) CO₃. Estudos realizados no *Weizmann Institute of Science*, de Rehovot, em Israel, sob a coordenação do professor Edelstein, indicaram efeito benéfico desse agente no tratamento da osteoporose, por meio da melhoria na condição dos rins para produzir o hormônio Calcitriol – 1.25 (OH)₂ D₃ – que é o metabólito ativo da vitamina D e ajuda na absorção do Cálcio pelos intestinos. As pesquisas realizadas para investigar a forma de ação do GW no corpo humano consistiram do acompanhamento de pacientes com medição de massa óssea, sem, entretanto, avaliar o efeito genotóxico ou modificações na taxa de reprodução celular, particularmente em idosos, nos quais o seu uso é mais freqüente. (EDELSTEIN et al., 2001)

De acordo com a Associação Internacional de Gerontologia (PAULING, 1988), é considerado idoso o indivíduo com idade superior a 65 anos. No Brasil, entretanto, conforme a Lei nº 8.842 (BRASIL, 1994), regulamentada pelo Decreto nº 1948 (BRASIL, 1996), é atribuída ao idoso uma idade igual ou superior a 60 anos. Pessoas com mais de 80 anos são consideradas muito idosas ou grandes longevos. Ocorrem ainda indivíduos centenários, com freqüência mais reduzida, cerca de dois ou três por cem mil habitantes. (HAYFLICK, 1996)

Franceschi e colaboradores (1992) observam que danos no DNA são acumulados de modo contínuo durante a vida, esperando-se que uma grande variedade de alterações cromossômicas alcance seu auge em células de indivíduos grandes longevos. Jacobs et al. (1963) demonstraram alta proporção de células aneuplóides em culturas de linfócitos de pessoas idosas. Guttenbach, Schakowski e Schmid (1994) corroboram esses dados e excluem a eliminação dos cromossomos sexuais em micronúcleos espontâneos. Franceschi e colaboradores (1992) sugerem, entretanto, que os centenários formam um grupo selecionado, que escapa da maioria das doenças da velhice, apresentando baixa freqüência de danos cromossômicos, como consequência de eficientes mecanismos antimutagênicos.

Alterações cromossômicas espontâneas, no processo de envelhecimento, podem ser avaliadas com a utilização de uma variedade de técnicas

citogenéticas, incluindo-se o uso de substâncias que causam danos no DNA. O número de quebras observadas por células é proporcional à sensibilidade individual, e essa reação a substâncias genotóxicas pode aumentar com a idade, contribuindo, assim, para a aceleração do processo de envelhecimento.

A presente investigação teve como objetivo principal analisar a ação do *Gran White* no aumento da taxa de divisão celular em células obtidas por cultura convencional de linfócitos. Foi também estudada a ocorrência de aberrações cromossômicas e micronúcleos em indivíduos de diferentes faixas etárias, o que pode, assim, contribuir para o conhecimento de alterações citogenéticas no processo de envelhecimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização dos experimentos

Para os experimentos, foram tomadas amostras de sangue periférico de seis indivíduos, sendo dois longevos (> 80 anos), dois idosos (entre 65 e 79 anos) e o mesmo número de jovens (20 a 30 anos) com réplicas.

Testes citogenéticos

As células foram obtidas pela técnica de cultura convencional de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960). As amostras de sangue foram incubadas com três concentrações de *Gran White* (1,0mg, 3,0mg e 5,0mg), a 37°C. As quantidades foram calculadas de acordo com a administração *in vivo* (3,0g diárias para prevenção e 5,0g para tratamento da osteoporose), e os tratamentos foram feitos 5 horas antes do início da colheita. Em cada sistema, foram realizados experimentos-controle (histórico, sem substâncias; negativo, com Vitamina C; e positivo, com o agente radiomimétrico ciclofosfamida) em cada grupo amostral. O tratamento com a Vitamina C e com a ciclofosfamida foi feito 5 horas antes do início da colheita.

Análise das células

A identificação de alterações cromossômicas foi feita de acordo com os critérios clás-

sicos de Evans (1970), considerando as alterações cromatídicas (quebras e gaps cromatídicos) e alterações na morfologia dos cromossomos (inversões, anéis, dicêntricos, policêntricos e translocações). Todos os resultados foram ordenados em fichas de análises.

Na análise de micronúcleos, foram adotados os critérios de Guttenbach, Schakowski e Schmid (1994), que consideram essa estrutura como uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal, não ultrapassando 1/3 do seu tamanho.

Foram consideradas outras aberrações nucleares, de acordo com os critérios de Tolbert, Shy e Allen (1991, 1992): células binucleadas (com dois núcleos dentro de cada célula) e broken-egg (núcleos que apresentam banda feulgen-negativa).

A análise cromossômica foi conduzida em microscópio óptico comum, com objetiva de imersão (100 X). Para a detecção de alterações cromossômicas, foram analisadas 50 células de cada tratamento, perfazendo 300 células por sistema. O Índice Mitótico foi calculado com a análise de 1000 células para cada tratamento. O Teste do Micronúcleo foi também realizado, com observação em microscópio óptico comum, com objetiva de 40X. De cada tratamento foram observadas 3.000 células, verificando-se a presença ou não de micronúcleos.

Análise estatística

A análise estatística dos tratamentos foi aplicada segundo o teste de probabilidade de Friedman (RODRIGUES, 2002), adotando-se significância de 5% e considerando-se o total de células.

RESULTADOS

Nos grandes longevos, e principalmente nos idosos, observou-se um aumento significativo do índice mitótico, em relação aos tratamentos-controle, nas diferentes concentrações da Dolomita. O aumento da taxa de divisão celular em decorrência do tratamento *in vitro* do *Gran White* não ocorreu, entretanto, no experimento com indivíduos jovens (Figura 1).

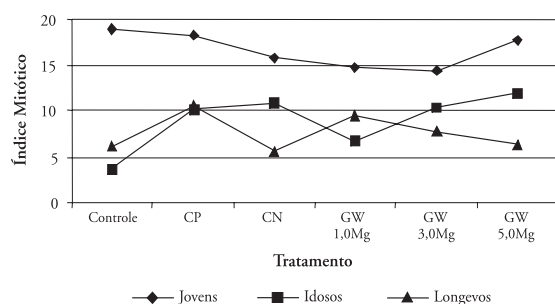


Figura 1 - Índice Mitótico das diferentes amostras estudadas

Notas: Controle – sem acréscimo de substância
 CP – Controle Positivo (Ciclofosfamida)
 CN – Controle Negativo (Vitamina C)
 GW – *Gran White*

No grupo dos idosos, observou-se aumento na taxa de micronúcleos em todos os tratamentos, enquanto que, nos longevos, foi verificada a redução no número de micronúcleos na concentração de 3mg de GW, quando comparada ao experimento controle negativo. Nos indivíduos jovens, entretanto, foi observado aumento de micronúcleos nessa concentração (Figura 2).

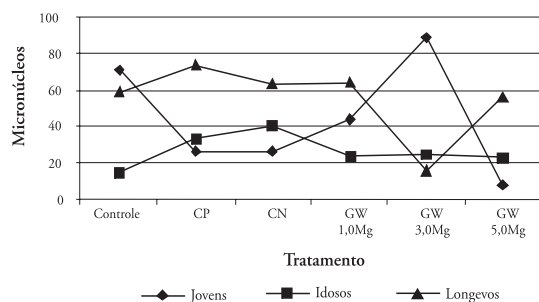


Figura 2 - Número de Micronúcleos nas diferentes amostras estudadas

Notas : Controle – sem acréscimo de substância
 CP – Controle Positivo (Ciclofosfamida)
 CN – Controle Negativo (Vitamina C)
 GW – *Gran White*

Além de micronúcleos, a análise da morfologia do núcleo revelou a presença de células binucleadas e broto nuclear nos três sistemas estudados (Figura 2; Figura 4). Segundo Tolbert, Shy e Allen (1992), células binucleadas não indicam diretamente alterações no material genético,

mas sua ocorrência pode estar relacionada com retardo no processo de divisão celular. As consequências da presença de células binucleadas são ainda desconhecidas.

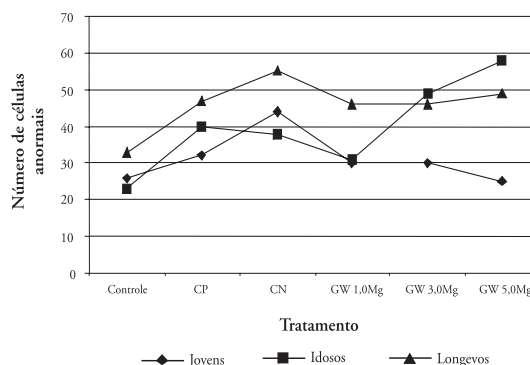


Figura 3 - Total de células anormais nas três amostras estudadas

Notas : Controle – sem acréscimo de substância
 CP – Controle Positivo (Ciclofosfamida)
 CN – Controle Negativo (Vitamina C)
 GW – *Gran White*

A análise estatística revelou não haver diferenças significativas ($p < 0,05$) no total de aberrações cromossômicas ($c^2 = 9,71$), de micronúcleos ($c^2 = 4,57$) e no índice mitótico ($c^2 = 2,62$) entre os diferentes tratamentos, independentemente do grupo estudado.

A análise do efeito clastogênico (quebras) revelou células portadoras de alterações cromossômicas e cromatídicas nos três grupos estudados, tendo os longevos apresentado o maior número de células anormais em todos os tratamentos (Figura 3; Figura 5). Além disso, somente esse grupo apresentou trocas cromatídicas. Nos demais grupos, apenas as células tratadas com *Gran White* na concentração de 5mg, nos idosos, apresentaram valores maiores de rearranjos cromossômicos.

DISCUSSÃO

Hayflick e Moorhead (1961) afirmam que as células diplóides humanas apresentam um número de divisões limitadas. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram ação do *Gran White* no aumento do índice



Figura 4 - Alterações nucleares observadas em linfócitos tratados com *Gran White*.

Notas: A - Micronúcleo
B - Célula binucleada
C - Célula com formação de broto

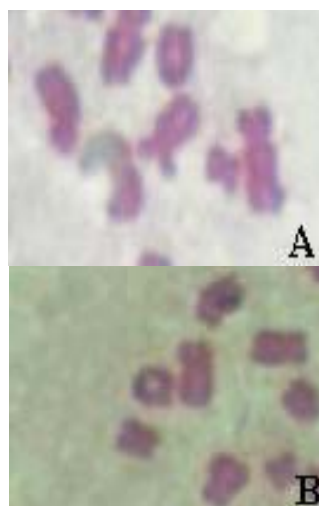


Figura 5 - Alterações cromossômicas observadas em células tratadas com *Gran White*.

Notas: A - Cromossomo dicêntrico
B - Cromossomo em anel.

mitótico nos idosos e longevos, nas três concentrações da substância testada.

A taxa espontânea de micronúcleos revelou-se aumentada nas diferentes dosagens da substância nos idosos, o que corrobora a investigação de Guttenbach, Schakowski e Schmid (1994), que demonstra um aumento na frequência de micronúcleos em idosos com mais de 70 anos. O mesmo não foi, entretanto, observado entre os grandes longevos, que não apresentaram alterações na taxa de micronúcleos na maioria das concentrações estudadas. Uma possível explicação para o ocorrido é que essas alterações estariam relacionadas ao fenômeno da morte celular programada ou apoptose, que estaria atuando eficientemente nos grandes longevos, eliminando, assim, as células danificadas (WARNER; HODES; POCINKI, 1997).

Entre os três sistemas estudados, especialmente nas células dos idosos, a análise citogenética das alterações citogenéticas revelou o maior número de células anormais para todos os tratamentos no grupo dos longevos, corroborando as teorias atuais que afirmam ser esperado um acúmulo crescente de erros cromossômicos no processo do envelhecimento (FRANCESCHI et al., 1992). Os cromossomos dicêntricos, rearranjos instáveis, verificados em frequência aumentada em outros estudos citogenéticos em idosos (PATRICIO; MOREIRA, 2003), constituíram as alterações estruturais mais frequentes.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta investigação evidenciam o efeito do *Gran White* no aumento da taxa de reprodução celular, podendo estar associado ao efeito clínico de aumento da massa óssea em indivíduos submetidos a esse tratamento. Não foi, entretanto, verificado efeito anticlastogênico dessa substância, que pudesse indicar ação protetora de eventuais danos cromossômicos estruturais.

Cellular proliferation and structural cromosomal aberrations in cells submitted to the action of Brazilian dolomita (Gran-White) in vitro

Abstract

The Brazilian dolomite (Gran White) is a mineral alimentary supplement used as adjuvant in the prevention and treatment of the osteoporosis, because it increases the bone mass. This investigation was accomplished with the purpose of analyzing Brazilian dolomite action in cells obtained by conventional culture of lymphocytes with relationship to the occurrence of chromosomal aberrations, micronuclei and to the mitotic index. Study of case-control was made in composed sample by 2 elders, 2 younger seniors and 2 students in the 20-30 year-old group. The study in vitro was accomplished with application of the substance in 3 different concentrations (1,0mg, 3,0mg and 5,0mg), besides the historical, negative and positive controls (without substance increment, with Vitamine C and with ciclofosfomide, respectively). In each treatment 50 cells were analyzed in common optical microscope. The results showed action of dolomite in the increase of the mitotic index on the experiments, in concentrations corresponding to the administration in vivo. However, the spontaneous rate of micronuclei and the chromosomal changes had significant increase in the different doses of the substance in seniors, and a smaller proportion in the youngest. The obtained results show the positive effect of Gran White in the rate of cellular reproduction, agreeing with clinical descriptions of increase of the bone mass. However, it could not be attributed to the substance a protecting effect against clastogenic agents.

Keywords: *Aging. Osteoporosis. Brazilian Dolomite (Gran-White). Chromosoma aberrations. Brazilian Dolomite (Gran-White) - Micronuclei.*

REFERÊNCIAS

- RASIL. Decreto nº 1.948, de 4 de julho de 1996. Regulamenta a Lei nº 8.842, de 4 de janeiro, que dispõe sobre a política nacional do idoso, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jul. 1996. Seção 1, p.12277-12279.
- BRASIL. Lei nº 8.842, de 4 de janeiro de 1994. Dispõe sobre a política nacional do idoso, cria o Conselho Nacional do Idoso e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 4 jul. 1994. Seção 1, p.12277-12279.
- CAMPOS, L.M.A. et al. Osteoporose na infância e na adolescência. *J.Pediatr. (Rio J.)*, Porto Alegre, v.79, n.6, p.481-488, 2003.
- CARVALHO, C.M.R.G. de; FONSECA, C.C.C.; PEDROSA, J.I. Educação para a saúde em osteoporose com idosos de um programa universitário: repercussões. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.20, n.3, p.719-726, 2004.
- COSTA-PAIVA, L. et al.. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. **R. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v.25, n.7, p.507-512, 2003.
- EDELSTEIN, S. et al. Epidemiology of osteoporosis in Brazil and the efficacy of a unique and natural dolomite in the treatment of the disease. **Bone**, New York, v.28, n.5, p.S184, May, 2001. Supplement 1.
- EVANS, H.J. Population cytogenetics and environmental factors. In: JACOBS, P.A.; PRICE, W.H.; LAW, P. **Human population cytogenetics**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1970. p.191-216.
- FRANCESCHI C. et al. Genomic instability and aging: studies in centenarians (successful aging) and in patients with Down's syndrome (accelerated aging). **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v.663, p.4-16, 1992.

- GUTTENBACH, M.; SCHAKOWSKI, R., SCHMID, M. Aneuploidy and ageing: sex chromosome exclusion into micronuclei. *Hum. Genet.*, Berlin, v.94, p.295-298, 1994.
- HAYFLICK, L. **Como e por que 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.
- JUNQUEIRA, P.A.de A. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *R. Assoc. Méd. Bras.*, São Paulo, v.47, n.4, p.290-291, 2001.
- JUNQUEIRA, P.A.de A; FONSECA, A.M. da; ALDRIGHI, J.M. Osteoporose: diretrizes futuras. *R. Assoc. Méd. Bras.*, São Paulo, v.47, n.1, p.14, 2001.
- LANZILLOTTI, H. S. et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. *R. Nutr.*, Campinas, v.16, n. 2, p.181-193, 2003.
- LERNER, B.R. et al. O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. *R. Nutr.*, Campinas, v.13, n.1, p.57-63, 2000.
- LEV-RAN, M. et al. Effects of a natural dolomite on calcium metabolism and osteoporosis. *Bone*, New York, v.22, n.4, p.423, Apr. 1998.
- MOORHEAD, P.S. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v.20, p.613-616, 1960.
- PATRICIO, J.A.G., MOREIRA, L. M. A. Efeito do metotrexato na inibição da divisão celular em grandes longevos. *R. Ci. Méd. Biol.*, v.2, n.2, p.185-191, 2003.
- PAULING, L. **Como viver mais e melhor: o que os médicos não dizem sobre a sua saúde**. São Paulo: Best Seller, 1998.
- RIBEIRO, A.F.C.; SERAKIDES, R.; NUNES, V.A. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, Rio de Janeiro, v.47, n.3, p.228-236, 2003.
- RODRIGUES, P.C. **Bioestatística**. 3.ed. Niterói: EDUFF, 2002.
- SALGADO, J.M. **Previna doenças: faça do alimento o seu medicamento**. 5.ed. São Paulo: Madras, 2000.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol.*, Cary, v.134, n.8, p.840-850, 1991.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.271, n.1, p.69-77, 1992.
- WARNER, H.R.; HODES, R.J.; POCINKI, K. What does cell death have to do with aging? *J. Am. Geriatr. Soc.*, Malden, v.45, p.1140-1146, 1997.
- ZANETTE, E.; STRINGARI, F.F.; MACHADO, F. Avaliação do diagnóstico densitométrico de osteoporose/osteopenia conforme o sítio ósseo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, Rio de Janeiro, v.47, n.1, p.30-36, 2003.

Recebido em / Received: 19/07/2004

Aceito em / Accepted: 27/09/2004

Agradecimentos

Aos jovens, idosos e longevos que, acreditando no valor desta investigação, cederam amostras de sangue para o estudo. A equipe do Laboratório de Citogenética e Genética Humana, cujo apoio foi fundamental para a realização do trabalho, em especial para Fabiana Rocha, Viviane Conceição, Alex Klautau e Vanesca Reis.