

O EFEITO DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM CROMOSSOMOS DE MULHERES COM ABORTO HABITUAL NA MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA, SALVADOR – BAHIA / BRASIL¹

Alephidaleth de Cerqueira Lordello²

1. INTRODUÇÃO

As aberrações cromossômicas são os eventos mais importantes em abortos de primeiro trimestre dentre as causas genéticas da mortalidade perinatal. Alguns autores concluíram que aberrações cromossômicas podem resultar da interação do DNA com produtos do metabolismo celular, sendo os mais importantes os radicais livres. O ácido ascórbico tem atividade antioxidante devido à sua capacidade de reação com radicais livres aquosos e espécies reativas de oxigênio – o que sugere que a mesma pode modular danos oxidativos do DNA em células de mamíferos.

Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) podem se originar do metabolismo do embrião. Vários fatores exógenos e condições de cultura podem aumentar a produção de ROS, os quais podem alterar a maioria das moléculas celulares que levam ao retardo ou bloqueio do desenvolvimento. A proteção externa contra o estresse oxidativo compreende antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico presente nos fluidos foliculares e tubários. Em estudos de fertilização *in vitro* é comum adicionar antioxidantes no meio de cultura para permitir ao embrião a aquisição do potencial para o seu desenvolvimento. Porém, a manutenção antioxidante nestes embriões através desta suplementação é um problema complexo que requer mais estudos, de modo a limitar o estresse oxidativo durante a cultura, pois o aumento de ROS leva a este estresse, o qual está envolvido na etiologia dos defeitos do desenvolvimento do embrião (GUÉRIN, 2001).

Os genomas maternos e paternos originam o genoma do embrião. Quando as constituições genéticas dos pais não são processadas e agrupadas adequadamente, pode ocorrer uma desordem do desenvolvimento embrionário e fetal, resultando em perda da gravidez. As aberrações cromossômicas fetais podem ocorrer no momento da fertilização ou resultarem da transmissão cromossômica paterna e materna.

As anomalias cromossômicas numéricas também são observadas com alto grau de prevalência em casais com abortamento recorrente e requer análise citogenética rotineiramente (JUNQUEIRA, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Este trabalho de pesquisa experimental teve como objetivo geral verificar se a dose de 1mg/10ml de ácido ascórbico pode ser utilizada como dose ideal *in vitro*, para prevenir as perdas gestacionais em mulheres que sofrem de aborto de repetição no primeiro trimestre, desde que estas estejam relacionadas com instabilidade cromossômica.

¹ Trabalho de conclusão de curso, realizado sob a orientação da Professora Dra. Neli de Almeida Melo, e colaboração da Dra. Olívia Lúcia Nunes Costa, Chefe do Ambulatório de Abortamento Habitual, Maternidade Climério de Oliveira / UFBA.

² Bióloga, egressa da Universidade Católica do Salvador – UCSal.

2.2. Específicos

Teve como objetivos específicos: 1. determinar a frequência de alterações cromossômicas constitucionais em mulheres com aborto de repetição; 2. determinar a frequência de alterações cromossômicas em mulheres com aborto de repetição, submetidas à ação do ácido ascórbico *in vitro*; 3. comparar as frequências de alterações cromossômicas nos dois experimentos (controle e teste) através de teste estatístico.

3. HIPÓTESES DO TRABALHO

As duas hipóteses do trabalho foram: **hipótese nula**: o antioxidante não enzimático – ácido ascórbico possui efeito protetor nos cromossomos das células de mamíferos; **hipótese alternativa**: o ácido ascórbico não tem efeito protetor externo contra o stress oxidativo das células de mamíferos.

4. AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS

Foram investigadas separadamente 9 mulheres com idade inferior a 35 anos, atendidas pelo Ambulatório de Abortamento de Repetição e pelo Serviço de Aconselhamento Genético (SAG) da Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, com pelo menos duas perdas espontâneas e sucessivas de 1^º trimestre, fator Rh positivo e sem história de consangüinidade identificada por meio de heredograma.

Cada paciente foi submetida a um questionário de investigação das condições genéticas, história obstétrica, exposição a agentes mutagênicos e em torno de dezessete exames (anatômicos, sorológicos, bioquímicos e hormonais) para a constatação da inexistência de patologias implicativas. Foram realizadas trinta e seis culturas de linfócitos; o material utilizado foi linfócitos de sangue periférico, devido à sua capacidade de divisão rápida em cultura. Os 4 ml de sangue das pacientes foram coletados por punção venosa, em seringas heparinizadas, de modo a evitar a coagulação. O tempo entre a coleta e a preparação da cultura não ultrapassou 20h, evitando envelhecimento do material, sendo este refrigerado. A cultura foi preparada no fluxo laminar, seguindo as normas de segurança e a técnica de Moorhead e col. (1960), modificada.

Ao meio de cultura – RPMI (1640 GIBCO), foi acrescido o agente mitógeno – fito-hemaglutinina (200µl / 10ml do meio) para a estimulação mitótica; soro bovino fetal (20% do total do meio); e para evitar a contaminação, o antibiótico – estreptomina (0,7 ml). Essas culturas foram divididas em dois experimentos devidamente etiquetados; cultura controle negativo e cultura teste com adição de 1mg/10ml de ácido ascórbico (L (+) - Ascorbic acid (Vitamin C) - MERCK) diluído e esterilizado, por filtro MILLIPORE - 0,45 µM de poro. Ambos os experimentos foram duplicados, por medida de precaução. A incubação da cultura foi de 48 horas a 37° C, sendo que deste tempo, 1 hora foi de colchicinização com Colcemid (25µl, Karyo Max Solution – GIBCO, Cat. N^º 15210-040) para impedir a conclusão da divisão celular.

Iniciando a etapa citológica, a cultura foi hipotonizada com solução hipotônica - KCl 0.075M, causando a tumefação das células, possibilitando a lise destas de modo a liberar os cromossomos, porém, mantendo os centrômeros intactos. Na seqüência, a cultura foi centrifugada, para a sedimentação do material de estudo. No processo de fixação foi utilizado o Carnoy 3:1.

Foram confeccionadas cinco lâminas de cada experimento, estas foram coradas pela técnica de coloração convencional com Giemsa 1:8 (tampão fosfato 6.8).

De modo a facilitar o andamento da pesquisa, foram inicialmente marcados os pontos das metáfases das lâminas a serem analisadas. Foram analisadas 50 metáfases por cultura, ou seja, 25 metáfases de cada experimento (controle e teste). De cada experimento foram confeccionadas 5 lâminas e em cada uma destas lâminas foram analisadas 5 metáfases. Porém, devido a problemas

técnicos de análise foram computadas 425 metáfases (215 metáfases das culturas controle e 210 metáfases das culturas teste).

5. METODOLOGIA

O método de análise cromossômica utilizado foi o de análise cega, que consiste em analisar as lâminas codificadas, evitando assim a indução nos resultados do trabalho. Foram comparadas, através do teste estatístico, as frequências das aberrações cromossômicas numéricas e estruturais das culturas controle e teste.

Para efeito de elucidação dos resultados e ilustração das metáfases observadas, estas foram fotografadas em câmera digital, transferidas para o programa HP Photo Imaging Software e trabalhadas no programa de tratamento de imagens Adobe Photoshop 7.0, para uma melhor nitidez.

Todo o material de cultura foi acondicionado em *ependorfs* e guardados em *freezer* para eventuais necessidades. As lâminas que não apresentavam as cinco metáfases necessárias eram substituídas, bem como aquelas que durante a execução do trabalho foram quebradas. As lâminas cujas metáfases foram analisadas servem como material testemunho e encontram-se arquivadas num laminário próprio, devidamente identificado no Laboratório de Citogenética da Maternidade Climério de Oliveira, local de execução do trabalho.

Ainda para a execução deste trabalho, foi realizado um levantamento bibliográfico, em textos, artigos científicos, jornais, revistas e sites especializados.

6. RESULTADOS

Nos 7 grupos cromossômicos, a frequência de quebras centroméricas no experimento teste foi maior para o grupo A (38.70%), havendo um declínio à medida que diminui o tamanho cromossômico (B = 32.25%; C = 16%; E = 12.90%). Provavelmente o fenômeno poderia estar relacionado ao tamanho do cromossomo: quanto maior o centrômero, mais chances de sofrer a ação do ácido ascórbico, embora não tenham sido observadas nos grandes e pequenos acrocêntricos. O mesmo não se observa nas culturas controle, onde a frequência é ideal para os grupos A e C (33.33%) e E e F (3.7%).

No total, a frequência de aberrações foi maior no grupo experimental teste (53.44%) do que no controle (46.55%). Comparando-se as frequências de quebras centroméricas entre os grupos A e C do teste, não foi encontrada diferença significativa através do teste do qui-quadrado. Ao somarmos as frequências dos grupos A, B e E, que perfaz um total de 16 cromossomos, e comparando com o grupo C (que tem 16 cromossomos), também a aplicação do teste do qui-quadrado não mostra diferença estatisticamente significativa ($\chi^2 = 2.61$).

As ocorrências de quebras cromossômicas, aneuploidias e gaps foram aleatórias e ocorreram com frequências muito baixas, não permitindo a comparação estatística aos grupos entre os experimentos teste e controle.

Pôde-se observar uma diversidade dos tipos de aberrações nos dois experimentos, ressaltando que a ocorrência de quebras centroméricas foi o evento mais freqüente.

Os abortamentos que não envolvem o número de cromossomos são mais freqüentes após a 8ª semana de gestação e ocorrem devido a uma anomalia gênica ou devido a uma série de fatores maternos. Pinto (2002) afirma que os 60% dos abortos que têm como etiologia aberrações cromossômicas, mostram mais freqüentemente as triploidias, a monossomia do cromossomo X e as trissomias (normalmente a do cromossomo 16), que não foram encontradas no presente trabalho. Outras aberrações menos freqüentes, mas não menos importantes, são as alterações estruturais, como as translocações desequilibradas que são predominantemente responsáveis pelo abortamento habitual.

A ação não protetora do ácido ascórbico foi encontrada por Alves (2000), quando este avaliou a frequência de aberrações cromossômicas em células V79 de hamsters chineses, para esclarecer se a exposição concomitante do ácido ascórbico com a micotoxina patulina modula ou não a clastogenicidade da patulina.

Os resultados mostraram que a patulina induziu danos ao DNA, com uma quase completa anulação da clastogenicidade da patulina, na presença de 80 µM de ácido ascórbico ($p < 0.05$), assim, o ácido ascórbico poderia modular parcialmente o problema da clastogenicidade da patulina, embora um risco genético estivesse ainda presente.

Do mesmo modo, Neto (2001) demonstrou que o ácido ascórbico induz a formação de genotoxinas, que danificam o material genético, envolvendo reações químicas complexas, sugerindo deste modo um "lado maligno" para esta vitamina.

O emprego do ácido ascórbico na dose de 1mg/10ml em cromossomos de linfócitos periféricos, cultivados em 48h, de mulheres com aborto habitual mostrou que:

1º não tem efeito modulador quando se estuda gaps, quebras e aneuploidias;

2º embora sem significância estatística, a frequência de danos ao centrômero é maior nas culturas teste do que nos controles;

3º a frequência de quebras centroméricas nas culturas teste é maior nos cromossomos do grupo A, havendo declínio à medida que o tamanho do cromossomo diminui;

4º a ação da dose empregada *in vitro* não pode ser considerada como sugestão para um possível esquema terapêutico de prevenção de abortamentos espontâneos de primeiro trimestre.

Entretanto, vale ressaltar que embora o número amostral do presente trabalho tenha sido insuficiente para mostrar o efeito protetor *in vitro* do ácido ascórbico em cromossomos de mulheres com aborto habitual, na concentração empregada, os resultados indicam um caminho para a escolha em outros experimentos de doses menos elevadas do ácido ascórbico, como elemento modulador de aberrações cromossômicas, visando à busca da dosagem ideal para que se possa estabelecer um esquema terapêutico de prevenção de abortamentos espontâneos de primeiro trimestre.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, I. N.G. Oliveira, A. Laires, A.S. Rodrigues and J. Rueff. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity. *Mutagenesis*, v.15, 3, May 2000, pp. 229-234.

GUÉRIN, P. S. El Mouatassim and Y. Ménézo. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo its surroundings. *Human Reproduction Update*, v. 7, 2, 2001, pp. 175-189.

JUNQUEIRA, João P. C. et alii. **Ginecologia e Obstetrícia**. Manual para o TEGO. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 1997. 726p.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. O.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leucocytes cultures from human peripheral blood. *Exp. CellRes.*, 20, 1960, pp. 613-616p.

NETO, R. B. Vitamina C também pode induzir câncer. Folha de S.Paulo, São Paulo, 15 de jun. 2001.

PINTO, W. J. Abortamentos. Disponível em:

<<http://www.geneticamedica.com.br/portal/abortamentos.html>>. Acesso em: 21 nov. 2002.