
Artigo de Revisão

DANOS MOLECULARES EM PACIENTES URÊMICOS SUBMETIDOS À HEMODIÁLISE

MOLECULAR DAMAGE IN UREMIC PATIENTS ON HEMODIALYSIS

Liana Bertolin Rossato, Vagner Milani, Cristiane Bastos de Mattos, Daiana Benck Porsch, Elvino José Guardão Barros, Ane Cláudia Fernandes Nunes

RESUMO

Os efeitos tóxicos decorrentes do estado urêmico e do tratamento através de hemodiálise vêm sendo sugeridos como responsáveis por danos no DNA em pacientes com insuficiência renal crônica. Dessa forma, muitos trabalhos têm desenvolvido marcadores capazes de identificar esses danos através da análise cromossômica, teste de micronúcleos, teste do cometa, teste eletroquímico e, mais recentemente, análise do DNA mitocondrial. Considerando que esses danos podem aumentar a incidência de câncer, mais estudos devem continuar sendo desenvolvidos nesse sentido.

Unitermos: DNA mitocondrial, hemodiálise, danos moleculares, insuficiência renal crônica.

ABSTRACT

The toxic effects caused by the uremic state and hemodialysis have been suggested as being responsible for DNA damage in patients with chronic renal failure. Thus, many researchers have developed markers capable of identifying these damages using chromosome analysis, micronucleus test, comet assay, electrochemical test and, more recently, mitochondrial DNA analysis. Further studies must be undertaken, since these damages can increase the incidence of cancer.

Keywords: Mitochondrial DNA, hemodialysis, molecular damage, chronic renal failure.

Grupo de Estudos em Nefrogenética (GEN), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS.

Correspondência: Ane Nunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Hemodiálise, Rua Ramiro Barcelos, 2350, 2º andar, CEP 90035-003. Tel.: (51) 2101.8295, Fax: (51) 2101.8121. E-mail: ane.nunes@terra.com.br.

INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos decorrentes da insuficiência renal crônica (IRC) e do tratamento de hemodiálise vêm sendo sugeridos como responsáveis por danos no DNA em pacientes com IRC (1). Isso pode ocorrer devido a um aumento do estresse oxidativo, ao qual os pacientes urêmicos estão cronicamente expostos, pois esse estado da doença provoca um distúrbio no sistema antioxidante (2). A partir dessa hipótese, muitos trabalhos têm desenvolvido marcadores para identificar danos através da análise cromossômica, teste de micronúcleos (MN), teste do cometa, teste eletroquímico e, mais recentemente, análise do DNA mitocondrial (DNAmt).

DANOS NO DNA NUCLEAR

Dentre os diferentes marcadores que podem avaliar os efeitos tóxicos no DNA nuclear (DNA_n), em pacientes com IRC submetidos ao tratamento de hemodiálise, os mais antigos são aqueles que avaliam os danos cromossômicos. Os primeiros estudos que tiveram como objetivo demonstrar danos no DNA_n utilizaram como marcadores a análise cromossômica, o teste do MN, o teste do cometa e teste eletroquímico.

Análise cromossômica

A análise cromossômica visa identificar alterações numéricas e estruturais dos cromossomos. A técnica ge-

ralmente é realizada a partir da análise dos cromossomos em metáfase, obtidos através de linfócitos de sangue periférico.

O primeiro estudo que avaliou danos cromossômicos, como trocas de cromátides irmãs em pacientes urêmicos, foi realizado em 1988 (3). Nesse estudo, foram analisadas culturas de linfócitos do sangue periférico, em pacientes urêmicos e em controles, para detectar a presença de anormalidades cromossômicas e trocas de cromátides irmãs. As alterações cromossômicas mais encontradas foram fragmentos acêntricos, formação de “balões” centroméricos, quebras cromossômicas, *gaps*, cromossomos em anéis e cromossomos marcadores acrocêntricos longos. Dessa forma, o estudo mostrou que a ocorrência de anormalidades cromossômicas e trocas de cromátides irmãs devem ser consideradas, pois são fatores que podem aumentar a incidência do câncer (3).

Teste do MN

Os MN são observados como uma pequena massa nuclear que é separada do núcleo principal. Eles podem resultar de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Dessa forma, os MN representam a perda de cromatina como conseqüência do dano cromossômico.

A pesquisa de MN em pacientes com IRC tem relacionado os efeitos tóxicos dessa condição com a ocorrência de danos genômicos espontâneos. Um estudo, que avaliou o número de MN em pacientes com doença renal severa em estágio final e pacientes com hemodiálise de manutenção (HM) de longo prazo, relatou que a média de MN no grupo de pacientes em tratamento de HM de longo prazo foi significativamente maior ($44,3 \pm 13,7$ MN/1.000 células binucleadas ou BN) que no grupo-controle ($15,3 \pm 4,7$ MN/1.000 BN). Os pacientes com insuficiência renal avançada também apresentaram um aumento da freqüência de MN em relação aos controles. Segundo os autores, a elevada freqüência de MN em pacientes submetidos à hemodiálise de longo prazo e com IRC avançada é resultante de um precário reparo do DNA, podendo ocorrer um aumento na incidência de neoplasias nesses indivíduos (4).

Teste do cometa

O teste do cometa vem sendo utilizado para identificar lesões genômicas que, posteriormente, podem resultar em mutações. Basicamente, caso existam quebras na molécula de DNA, as células observadas na téc-

nica apresentam uma cauda, enquanto células sem ou com poucos danos não apresentam cauda.

Um estudo utilizou o teste do cometa (gel de eletroforese de célula simples) para detectar os danos genômicos em linfócitos de pacientes com IRC moderada a severa, pacientes submetidos ao tratamento de HM de longo prazo e terapia de hemodiafiltração. Foi encontrada uma maior média de danos nos pacientes com IRC moderada a severa e nos pacientes em HM de longo prazo e terapia de hemodiafiltração do que nos controles. Com base nessas constatações, os autores acreditam que futuramente seja necessário melhorar a atual terapia para reduzir os danos genômicos (5).

Teste eletroquímico

Um marcador que também está sendo utilizado para demonstrar danos oxidativos do DNA em pacientes com IRC é o conteúdo de 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). Esse marcador é detectado em DNA obtido a partir de leucócitos periféricos por um método de detecção eletroquímico. Um aumento dos níveis de 8-OHdG no DNA dos leucócitos periféricos ocorre com a perda crônica da função renal, sendo que esse aumento é gradual com a sua progressão e agravado ainda mais com a diálise peritoneal (6).

DANOS NO DNAmT

Atualmente, muitas pesquisas têm sido realizadas utilizando como ferramenta de estudo o DNAmT. As mitocôndrias são organelas intracelulares que produzem energia na forma de trifosfato de adenosina para a respiração celular. O funcionamento das mitocôndrias depende de genes do DNAn e do DNAmT (7).

O DNAmT é uma molécula dupla, circular, composta por 16.596 pares de bases (pb), que codifica 13 polipeptídeos da cadeia respiratória, dois RNA ribossomais (rRNA) e 22 RNA transportadores (tRNA) (8,9). A herança do DNAmT é transmitida exclusivamente por linhagem materna (9). O genoma mitocondrial é um exemplo de extrema economia, apresentando organização gênica compacta, sem íntrons (10). A quantidade de cópias do DNAmT em cada mitocôndria varia de duas a 10, enquanto que a quantidade de mitocôndrias em cada célula pode chegar a algumas centenas (11).

Quando comparado com o DNAn, o DNAmT é mais suscetível a danos, devido à perda da proteção das histonas e ao precário mecanismo de reparo de DNA (12). Além disso, o DNAmT está localizado na membrana mitocondrial interna, a qual é a maior fonte intracelular de espécies de oxigênio reativo (13,14).

No metabolismo aeróbico normal, aproximadamente 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é revertido em radicais livres (15). Esses radicais livres provocam danos oxidativos no DNAMt, ocasionando lesões e mutações (16-18). As mutações no DNAMt vão desde mudanças de base única a largas deleções e rearranjos (8).

O estudo do genoma mitocondrial, dentre outras coisas, tem sido útil para identificar mutações que podem contribuir para a suscetibilidade à hipertensão em negros americanos com doença renal terminal. Nesse sentido, foi realizada a análise sistemática do genoma mitocondrial de 58 pacientes com essas características e 58 indivíduos com pressão arterial normal, através de uma análise de restrição de alta resolução (19).

Este estudo foi o primeiro relato de um aumento na prevalência de variantes do genoma mitocondrial em indivíduos com hipertensão. Apesar de a replicação e avaliação futuras serem necessárias, os resultados atuais dão respaldo à hipótese de que o DNAMt pode ser considerado um bom marcador molecular para diversos casos de hipertensão nos negros americanos com IRC terminal (19).

Uma pesquisa (20) avaliou a relação de mutações no DNAMt com a glomeruloesclerose segmentar focal (GESF). Para isso, foi realizado o mapeamento das mutações do DNAMt em biópsia renal de pacientes com GESF primária e pacientes com nefropatia por IgA. O DNAMt extraído de biópsia renal foi amplificado para o estudo das seguintes mutações de ponto do DNAMt: 3.243A → G, 3.271T → C, 8.344A → G, e 8.993T → G/C e deleção comum (4.977 pb).

A mutação que mais ocorreu nos tecidos renais dos pacientes foi a deleção comum, aparecendo em 12 e sete pacientes com GESF e nefropatia por IgA, respectivamente. A deleção comum foi principalmente distribuída entre as células glomerulares epiteliais. Dessa forma, acredita-se que essas mutações estejam relacionadas com danos celulares epiteliais glomerulares (20).

Em uma outra pesquisa, que teve como objeto de estudo o DNAMt (21), foram relacionados os danos no DNA e o desenvolvimento de tumores no estágio final da doença renal, com os efeitos tóxicos do estado urêmico ou do tratamento dialítico. Para isso, foram realizadas análises das alterações do DNAMt de amostras de seis rins comprometidos pela doença renal terminal e em nove tipos de culturas de células renais tumorais. Além disso, todo genoma mitocondrial (16.569 pb) foi seqüenciado.

Utilizando essas técnicas, foram encontrados os seguintes resultados: 94 variações seqüenciais no tecido normal e no tecido tumoral e nove mudanças nucleotídicas somáticas em sete dos nove tumores ana-

lisados. Como conclusão, o estudo revelou um aumento mutacional do DNAMt de tumores, o qual pode corresponder ao nível aumentado de espécies de reatividade oxidativa nas células do parênquima renal de pacientes no estágio final da doença renal (21).

Além dessas pesquisas relacionadas ao DNAMt, alguns relatos de casos têm demonstrado a associação do DNAMt com algumas complicações renais. Um exemplo foi o relato de um caso de uma paciente de 27 anos com surdez sensorial e disfunção renal, em que a análise do seu DNAMt revelou uma mutação de A para G do tRNA Leu (UUR) na posição 3.243 do gene. Os autores concluíram que a mutação desse gene do DNAMt tinha relação com a nefropatia (22).

Um outro relato de caso foi o de dois indivíduos aparentados, que apresentavam um genitor comum. Um dos dois indivíduos manifestou insuficiência renal e hepática precoce, e os dois desenvolveram proeminente neuropatia sensomotora periférica. O exame do DNAMt revelou a presença de uma deleção de 4.977 pb (23).

Análise da deleção de 4.977 pb do DNAMt

A mutação mais comum do DNAMt é uma deleção de 4.977 pb, chamada de deleção comum. Essa deleção ocorre entre as posições de nucleotídeos 8.469 a 13.447 (24) e é flanqueada por uma seqüência de repetição direta de 13 pb (25). Diversos estudos têm relacionado a presença dessa deleção com a toxicidade do estado urêmico.

Em um estudo (26) que testou a hipótese de que o estado urêmico pode causar danos severos no DNAMt, a ferramenta utilizada foi a análise da deleção de 4.977 pb do DNAMt no músculo esquelético de pacientes no estágio final da doença renal.

Como resultado, os pesquisadores encontraram a deleção de 4.977 pb no DNAMt em 77% (17-22) dos pacientes, enquanto apenas 22% dos controles pareados por idade apresentaram a mesma deleção. Usando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR) semiquantitativo, foi observado que as proporções do DNAMt deletado no músculo também foram significativamente maiores nos pacientes do que nos controles. Os autores concluíram que o enfraquecimento de sistemas de limpeza de radicais livres e a acumulação de toxinas urêmicas podem aumentar o estresse oxidativo em pacientes com doença renal terminal e, como consequência, levar às mutações associadas com a idade do genoma mitocondrial (26).

Uma outra pesquisa também desenvolveu um estudo sobre danos de DNA em pacientes no estágio final de doença renal, através da análise da deleção comum do DNAMt (27). Nesse trabalho, foram detectadas

deleções no DNAm usando folículos capilares de 162 pacientes.

Como resultado, a incidência da deleção de 4.977 pb do DNAm nos folículos capilares foi maior nos pacientes em estágio final da doença renal do que nos indivíduos normais. Além disso, a incidência dessa deleção aumentava com a idade dos pacientes. Dessa forma, a deleção de 4.977 pb do DNAm dos folículos capilares pode servir como um biomarcador da instabilidade molecular do genoma mitocondrial de pacientes em estágio final da doença renal (27).

CONCLUSÕES

Os diversos estudos que encontraram índices de danos no DNAn e no DNAm em pacientes com IRC, em tratamento através da hemodiálise, demonstraram que esses danos são uma consequência do estresse oxidativo e de um precário reparo do DNA em pacientes com essas condições.

Esses danos podem aumentar a incidência de neoplasias. As mutações do DNAm, por exemplo, iniciam eventos em cascata, que levam a um contínuo aumento na produção de espécies de oxigênio reativo, uma condição que pode favorecer o desenvolvimento de tumores (28).

Dessa forma, mais estudos devem ser realizados nesse sentido, na tentativa de descobrir novas informações sobre como isso ocorre e descrever a real incidência dessas neoplasias em pacientes com IRC submetidos ao tratamento através da hemodiálise.

REFERÊNCIAS

- Nagy A, Wilhelm M, Kovacs G. Mutations of mtDNA in renal cell tumours arising in end-stage renal disease. *J Pathol.* 2003;199(2):237-42.
- Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):845-53.
- Cengiz K, Block AM, Hossfeld DK, Anthone R, Anthone S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988;36(1):55-67.
- Stopper H, Meysen T, Bockenforde A, Bahner U, Heidland A, Vamvakas S. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis.* 1999;34(3):433-7.
- Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U. Comet-assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(2):296-301.
- Tarng DC, Wen Chen T, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH. Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(5):1321-30.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981;290(5806):457-65.
- Clayton DA. Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inher Metab Dis.* 1992;15(4):439-47.
- Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):103-23.
- Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 2003;88(1):41-56.
- Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem.* 1974;249(24):7991-5.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(23):10771-8.
- Hayakawa M, Hattori K, Sugiyama S, Ozawa T. Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;189(2):979-85.
- Ozawa T. Mitochondrial DNA mutations and age. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854:128-54.
- Ritcher C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(17):6465-7.
- Liu VW, Zhang C, Nagley P. Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res.* 1998;26(5):1268-75.
- Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217(1):53-63.
- Cortopassi GA, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1410(2):183-93.
- Watson B Jr, Khan MA, Desmond RA, Bergman S. Mitochondrial DNA mutations in black

- Americans with hypertension-associated end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(3):529-36.
20. Yamagata K, Muro K, Usui J, et al. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(7):1816-23.
 21. Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, Ljungberg B, Kovacs G. Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;35(3):256-60.
 22. Hirano M, Konishi K, Arata N, et al. Renal complications in a patient with A-to-G mutation of mitochondrial DNA at the 3243 position of leucine tRNA. *Intern Med.* 2002;41(2):113-8.
 23. McDonald DG, McMenamin JB, Farrell MA, Droogan O, Green AJ. Familial childhood onset neuropathy and cirrhosis with the 4977bp mitochondrial DNA deletion. *Am J Med Genet.* 2002;111(2):191-4.
 24. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation.* 1999;99(6):807-12.
 25. Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS Lett.* 1992;297(1-2):34-8.
 26. Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(5):454-63.
 27. Liu CS, Ko LY, Lim PS, Kao SH, Wei YH. Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(3):561-5.
 28. Copeland WC, Wachsmann JT, Johnson FM, Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest.* 2002;20(4):557-69.