

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia

**PREVALÊNCIA DA DELEÇÃO 4977pb DO DNA MITOCONDRIAL
EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
TRATAMENTO CONSERVADOR OU SUBMETIDOS A
HEMODIÁLISE NO SUL DO BRASIL**

Liana Bertolin Rossato

Porto Alegre, janeiro de 2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia

**PREVALÊNCIA DA DELEÇÃO 4977pb DO DNA MITOCONDRIAL
EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
TRATAMENTO CONSERVADOR OU SUBMETIDOS A
HEMODIÁLISE NO SUL DO BRASIL**

Dissertação submetida à avaliação, como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Médicas:
Nefrologia.

Prof. Elvino José Guardão Barros
Orientador

Porto Alegre, janeiro de 2006

DEDICATÓRIAS

*Dedico este trabalho aos meus pais:
Jorge e Rose e as minhas irmãs: Tahiana,
Gianna e Bibiana pela força e incentivo nas
horas de incerteza.*

*Ao meu namorado Augusto pelo apoio e
compreensão nas diversas etapas do trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- Ao professor Doutor Elvino José Guardão Barros, com especial gratidão, por orientar com dedicação, compreensão e amizade;

- A Msc. Ane Nunes que com muito esmero e simpatia colaborou em todas as etapas do trabalho e pela amizade e incentivos constantes;

- A professora Doutora Maria Luiza Saraiva Pereira pelas críticas e sugestões técnicas que propiciaram a melhoria do trabalho;

- A Doutora Carolina Fischinger Moura de Souza pelas informações, incentivos e pela seriedade nas questões técnicas e científicas;

- Aos colegas do Laboratório: Vagner Milani, Daiana Porsh e Esther Dias pelo apoio e amizade;

- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, pelo estímulo e incentivo ao desenvolvimento a pesquisa.

- Aos médicos nefrologistas, enfermeiras e funcionários das Clínicas Renais que gentilmente coletaram amostras e informações utilizadas neste trabalho;

- Ao médico e colega de mestrado Claus Dummer pela coleta de amostras e dados dos pacientes do ambulatório;

- Aos estagiários que passaram pelo Laboratório e que de alguma forma contribuíram na realização das técnicas utilizadas no estudo;

- A secretária do curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia;

- A secretaria do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Insuficiência renal crônica.....	8
1.2 Estresse oxidativo.....	9
1.3 Mitocôndrias e DNA mitocondrial.....	13
1.4 Estresse oxidativo e danos no DNAm ^t em pacientes com Doença Renal Crônica.....	16
1.5 Análise da deleção 4977pb do DNAm ^t	19
1.6 Referências bibliográficas.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
3 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	27
3.1 Resumo.....	28
3.2 Introdução.....	29
3.3 Material e métodos.....	30
3.4 Resultados.....	33
3.5 Discussão.....	34
3.6 Referências Bibliográficas.....	38
4 ARTIGO EM INGLÊS.....	48
APÊNDICES.....	68
APÊNDICE A – Carta ao Editor.....	69
APÊNDICE B – Declaração de Conflito de Interesses.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AP-1	Fator indutor de apoptose
BN	Células binucleadas
CAT	Catalase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
Cu/Zn SOD	Superóxido dismutase cobre zinco
DNAmt	DNA mitocondrial
DNA _n	DNA nuclear
DRC	Doença renal crônica
GESF	Glomeruloesclerose segmentar focal
GPx	Glutatio \tilde{a} peroxidase
HM	Hemodiálise de manutenção
IRC	Insufici \tilde{e} ncia renal crônica
MN	Micronúcleos
Mns SOD	Superóxido dismutase dependente Mn ²⁺
NAD	Nicotinamida adenina-dinucleotídeo
NF-KB	Fator de transcri \tilde{c} o nuclear
8-OHdG	8- Hidróxido 2'- deoxiguanosina
pb	Pares de bases
PCR	Reaç \tilde{a} o em cadeia da polimerase
ROS	Esp \tilde{e} cies reativas de oxig \tilde{e} nio
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema ilustrativo das inter-relações entre estresse oxidativo, apoptose, mutações no DNAm e envelhecimento.....12
- Figura 2** – Mapa do DNAm humano..... 15

1 INTRODUÇÃO

1.1 Insuficiência renal crônica

A insuficiência renal crônica (IRC) é considerada uma síndrome causada por inúmeras doenças e pode resultar em perda progressiva e irreversível da função renal de depuração (1). A lesão renal progride com esclerose glomerular e fibrose intersticial, levando à perda progressiva da filtração glomerular, com reflexos variados e heterogêneos nas demais funções renais: tubulares, metabólicas, hormonais e homeostáticas em geral (2, 3). O estágio final da IRC provoca alterações qualitativas e quantitativas em todo o organismo, atingindo o sistema digestivo, neurológico, cardíaco, respiratório, imunológico, hematológico, endócrino metabólico, cutâneo e osteomuscular (4).

A partir da década de 1960, a manutenção da vida de muitos pacientes com IRC tornou-se possível pelo emprego dos processos de depuração artificial através da diálise, o que atualmente é uma rotina em todo o mundo. Hoje, no Brasil, aproximadamente 60.000 pessoas com função renal terminal são tratadas com algum tipo de diálise, particularmente a hemodiálise (5). Além disso, a diálise também possibilita a manutenção do paciente que aguarda a um transplante renal, sobretudo a pacientes jovens. Por outro lado, a sobrevivência do paciente com IRC parcialmente compensada pela diálise fez surgirem complicações crônicas da uremia. Dessa maneira, a mortalidade na IRC terminal permanece elevada.

Algumas complicações decorrentes da diálise, foram progressivamente sendo mais bem compreendidas nas últimas décadas (4). Exemplos de complicações que vêm sendo combatidas com sucesso são intoxicação por alumínio e sua prevenção com tratamento de

água, anemia e seu controle com eritropoetina recombinante e reposição de ferro, desnutrição e sua melhora com diálise de boa qualidade e orientação nutricional.

Entretanto, algumas complicações crônicas decorrentes da uremia ainda não são muito bem entendidas e controladas. Um exemplo disso é o estresse oxidativo e suas conseqüências para o organismo, o qual provoca danos em macromoléculas celulares, incluindo o DNA, proteínas e lipídios. Dentre essas macromoléculas, o DNA mitocondrial (DNAm) é o maior alvo desse estresse oxidativo (6).

1.2 Estresse oxidativo

A maior parte da energia celular é obtida com reações que utilizam como substrato o oxigênio molecular. A via através da qual a energia se torna utilizável é pela produção de ATP pela fosforilação do ADP. Esse processo é dividido em várias etapas e envolve uma sucessão de transportadores de elétrons, compostos que podem ser reduzidos, pelo ganho de elétrons do transportador precedente, e podem novamente se tornar oxidados, através da doação de elétrons para o transportador seguinte (7). As enzimas de fosforilação estão presentes na membrana interna mitocondrial. Os elétrons são transferidos através de agentes oxidantes cada vez mais fortes. A cadeia transportadora de elétrons (CTE) é codificada pelo DNA nuclear (DNAn) e DNAm. A cadeia completa é composta por 83 polipeptídeos, dos quais 13 são codificados pelo DNAm (8). No início da CTE estão os derivados de vitaminas, nicotinato e riboflavina, na forma de nicotinamida adenina-dinucleotídeo (NAD) e riboflavina-5-fosfato. Os transportadores posteriores são os citocromos, que são hemeoproteínas, terminando com o oxigênio molecular. Ao final do processo, tudo volta ao estado original, com exceção do substrato e do oxigênio, os quais foram convertidos em substrato oxidado e água, respectivamente (7).

Os oxidantes são produzidos pelas células de forma constante e numa alta escala como bioprodutos do metabolismo aeróbico. Esses oxidantes incluem o superóxido, radicais hidroxila e o oxigênio (9). As CTEs nas mitocôndrias deixam escapar esses radicais com capacidade oxidante. Em baixas concentrações, essas espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*) são importantes na regulação de muitas funções celulares e agem como um mensageiro secundário para ativar fatores de transcrição como o NF-κB (fator de transcrição nuclear) e AP-1 (fator indutor de apoptose) (6).

Por outro lado, quando os oxidantes se encontram em concentrações elevadas, produzem danos em macromoléculas celulares, incluindo o DNA, proteínas e lipídios. Dentre essas macromoléculas, o DNAm é o maior alvo do ataque de ROS (10). Pelo fato das mitocôndrias serem os locais celulares de maior concentração de ROS, as desordens mitocondriais são manifestadas, primeiramente, em órgãos ou tecidos que possuem uma maior demanda energética (6). Essas moléculas de DNAm com danos oxidativos ou mutações produzem subunidades protéicas defeituosas que são utilizadas para formar a CTE com defeito. A CTE danificada, além de trabalhar com uma menor eficiência na síntese de ATP, também produz maiores quantidades de ROS (Figura 1) (6).

Além disso, um aumento na produção de ROS pode promover a indução da apoptose, o que ocorre por mudanças no potencial de redox (redução/oxidação) celular, redução da glutatíon, redução dos níveis de ATP e diminuição de equivalentes redutores, tais como NADH e NADPH. Essas mudanças podem facilitar a peroxidação de lipídios e a abertura de poros de transição permeáveis, levando a uma subsequente liberação do citocromo “c”, o que acarreta um limiar mais baixo para a liberação de proteínas apoptogênicas no citosol (6). Dessa forma, o estresse oxidativo mitocondrial e um declínio na produção de energia mitocondrial podem levar a caminhos apoptóticos (6,11). A Figura

1 ilustra esquematicamente esse processo. A apoptose é induzida em células mesangiais glomerulares e em células musculares lisas dos vasos (12,13).

Além disso, a oxidação é o maior contribuinte para o envelhecimento celular e para doenças degenerativas associadas com o envelhecimento, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e declínio do sistema imunológico (9). Os agentes oxidantes estão envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças, entre as quais a diabetes melito, hipertensão, aterosclerose, amiloidose, má nutrição, anemia e infecções de pacientes em diálise, doenças inflamatórias crônicas e nefrites (14).

Os agentes oxidantes ou radicais livres (recebem esta denominação porque podem existir de forma independente) são originados através do sistema “c” oxidase. A oxidação terminal da cadeia respiratória, que catalisa a transferência redutora do citocromo “c” para o oxigênio molecular (15). Uma parte do oxigênio usado no metabolismo é reduzida em etapas; o oxigênio molecular com um elétron transforma-se em radical superóxido, que é reduzido numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) e transforma-se em peróxido de hidrogênio (7). Este recebe mais um elétron, formando o radical hidroxila, que é altamente reativo, através de reações que envolvem metais como cobre e ferro (reação de Fenton) (7). Finalmente, é produzida água quando mais um elétron é recebido. Esses compostos intermediários à formação da água é que são altamente oxidantes (7).

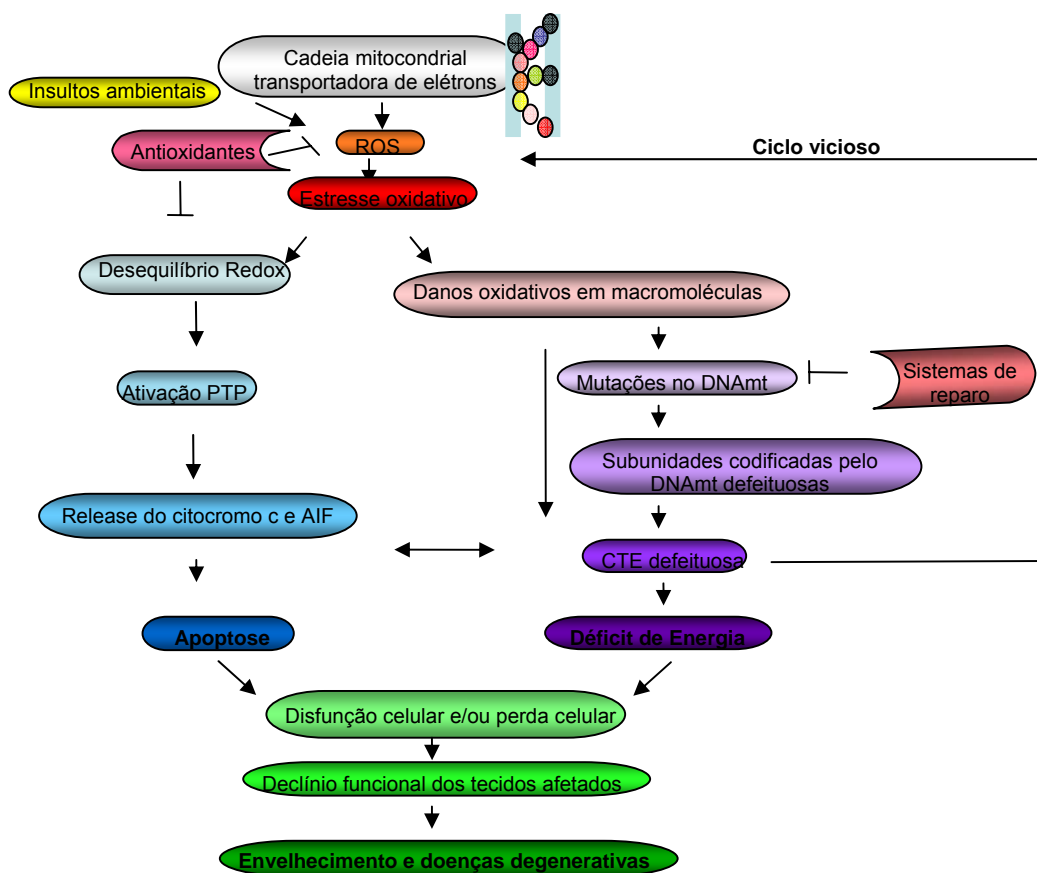


Figura 1. Esquema ilustrativo das inter-relações entre estresse oxidativo, apoptose, mutações no DNAm e envelhecimento (Modificado de Wei, 2002)

Esse processo ininterrupto de consumo de oxigênio, com resultante produção de energia (ATP) e água, produz continuamente ROS, que devem ser combatidas pelo sistema de defesa antioxidante. Existem substâncias antioxidantes que, em baixas concentrações, retardam ou evitam a oxidação de algum substrato. Elas mantêm sob controle a concentração de ROS e preservam a atividade celular. Podem ser enzimas que metabolizam radicais livres, como a própria superóxido dismutase dependente Mn^{2+} (MnsSOD), cobre

zinco (Cu/ZnSOD) e também a catalase (CAT) e as peroxidases, a glutatíon peroxidase (GPx) e glutatíon redutase. A MnSOD e Cu/ZnSOD convertem anions superóxidos para peróxido de hidrogênio, que é transformado em água pela GPx ou pela CAT (6). Um baixo nível de atividade da glutatíon peroxidase 1 em eritrócitos de pacientes com doença arterial coronariana está independentemente associado a risco aumentado de eventos cardiovasculares (16).

No entanto, a atividade das enzimas antioxidantes é alterada no processo de envelhecimento (6). Em condições normais, ocorre um equilíbrio entre os dois sistemas, porém, durante o envelhecimento ou durante algumas doenças com a IRC, ocorre um aumento de produção de oxidantes (espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e compostos clorinados) e a diminuição das defesas antioxidantes, gerando o estado chamado de “estresse oxidativo” (Figura 1).

1.3 Mitocôndrias e DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas intracelulares responsáveis pela produção de energia em forma de ATP através de um complexo de fosforilação oxidativa para a respiração celular (17). O papel destas organelas na bioenergia de células cancerígenas tem sido revisado (18). Aproximadamente 90% do oxigênio consumido pelas células humanas são utilizados na CTE mitocondrial (17). Cada mitocôndria apresenta uma matriz limitada por duas membranas, separadas pelo espaço intermembranoso: a membrana externa delimita a mitocôndria com o citosol e a membrana interna apresenta invaginações que formam cristas, as quais aumentam internamente a superfície mitocondrial total. (19).

A quantidade de mitocôndrias em cada célula pode chegar a algumas centenas, dependendo do tipo e da função das células nas quais estão presentes. Quanto maior é a

necessidade energética para a célula realizar suas funções, maior é a quantidade de mitocôndrias existentes no citoplasma celular. Células musculares e cerebrais, por exemplo, contêm uma grande quantidade de mitocôndrias (19). O funcionamento das mitocôndrias requer uma expressão coordenada de polipeptídios codificados pelo DNA_n e pelo DNA_{mt} (17).

As mitocôndrias desempenham uma função importante na manutenção da homeostasia intracelular de muitos metabólitos e íons importantes. Elas também protegem as células do efeito danoso de ROS criadas durante o processo de fosforilação oxidativa através da inativação desses bioprodutos altamente reativos e potencialmente danosos (20).

Uma outra particularidade das mitocôndrias é que elas constituem a única fonte de DNA extranuclear. Cada uma possui de duas a dez cópias de moléculas de DNA_{mt} localizado na matriz mitocondrial (10, 17, 21). O DNA_{mt} é uma molécula de DNA dupla fita, circular composta por 16.596 pares de bases (pb), e a sua seqüência completa foi determinada em 1981 (22). O genoma mitocondrial codifica 13 subunidades dos complexos da cadeia respiratória (subunidades I, II, III do citocromo “c” oxidase, citocromo “b”, subunidades 6 e 8 ATPases e subunidade 7 do NADH desidrogenase), 2 RNAs ribossomais e 22 RNAs transportadores, que são requeridos para síntese de proteínas nas mitocôndrias (10, 17, 18, 23).

O DNA_{mt} é muito econômico, pois praticamente cada par de bases participa da codificação de uma proteína ou de um RNA e, em alguns casos, a última base de um gene serve como primeira de outro (24). As fitas que formam o DNA podem ser distinguidas quanto à composição das bases G e T, que resultam em diferenças nas densidades das duas fitas (fita pesada H e fita leve L). Mais informações são codificadas na fita H, com genes para 2 RNAs ribossomais, 14 RNAs transportadores e 12 polipeptídeos. Apenas 8 RNAs

transportadores e um polipeptídeo são codificados na fita L (21). O mapa do DNAm humano está ilustrado na Figura 2.

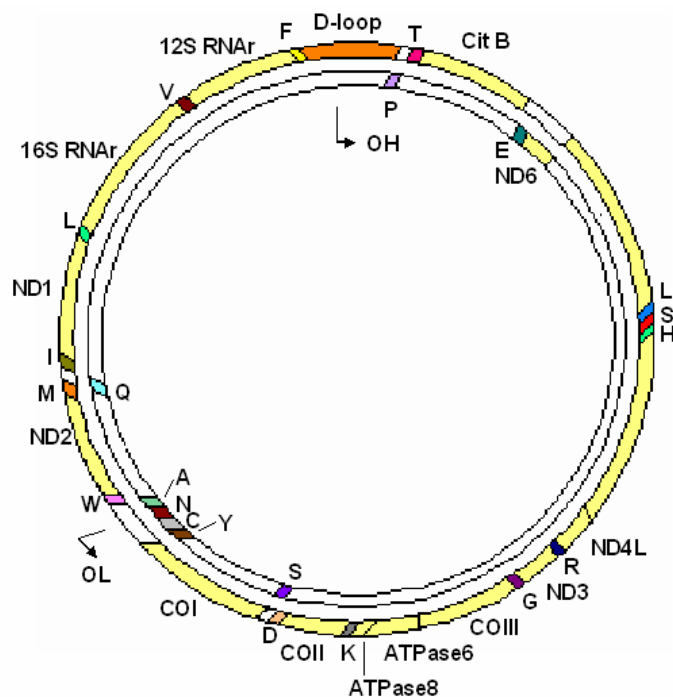


Figura 2. Mapa do DNAm humano. O círculo externo representa a fita H, que possui a maior parte dos genes, e o círculo interno representa a fita L. A região D-loop está representada pela cor laranja. As origens de replicação da fita H (OH) e da fita L (OL) estão marcadas com uma flecha. Os 22 genes de RNAt estão representados pelas regiões coloridas e pelo código da letra dos aminoácidos. Os genes dos dois RNAr (12S e 16S) e os 13 genes que codificam proteínas estão representados nas regiões de cor amarela. ND, CO e ATPases referem-se a genes que codificam subunidades do NADH, ao passo que CitB codifica apocitocromo *b* do ubiquinol. (Modificado de Taanman, 1999)

O DNAm apresenta algumas diferenças do DNAn, entre as quais a ausência de íntrons, histonas, *crossing-over* e sistema de reparo eficiente. Existem também algumas

diferenças no código genético do DNAMt: UGA codifica o aminoácido triptofano, em vez de códon finalizador do gene; AUA codifica metionina, não isoleucina; AGA e AGG são códons de finalização, não códons para arginina, e as bases da terceira posição são A ou G, mais freqüentemente, em vez de G ou T como no genoma nuclear (19).

O DNAMt, por ser desprotegido de proteínas como as histonas, sofre uma alta exposição aos radicais livres de oxigênio, fato que pode ocasionar danos ao DNA. A freqüência de mutações no DNAMt é de 10 a 1000 vezes maior (10). Outro fator que torna o DNAMt mais vulnerável a mutações é a sua localização na membrana mitocondrial interna, a qual é a maior fonte intracelular de ROS (25, 26). As mutações no DNAMt podem ser mudanças de base única (mutações de ponto) ou associadas a grandes deleções e rearranjos.

Durante a divisão celular, as mitocôndrias são distribuídas randomicamente para as células-filhas. Em condições normais, essas mitocôndrias são compostas por uma única espécie de DNAMt, no entanto danos resultam em heteroplasmia, na qual cada célula contém moléculas de DNAMt com variadas seqüências (27, 28). Dessa forma, o DNAMt mutante coexiste com o DNAMt selvagem dentro de uma mesma célula (29). O grau de heteroplasmia pode ser variado em diferentes tecidos no mesmo indivíduo (9).

1.4 Estresse oxidativo e danos no DNAMt em pacientes com Doença Renal Crônica

A doença renal crônica está associada a diversas alterações no sistema antioxidante, as quais aumentam gradualmente com o grau de insuficiência renal, culminando com o processo de hemodiálise (30). Diversos estudos demonstram que há estresse oxidativo em pacientes com IRC terminal. (14, 31). A capacidade total antioxidante determinada através

do plasma humano é diminuída durante a sessão de diálise, indicando possíveis mecanismos de modificação de antioxidantes endógenos e a interação de lipídeos e água solúvel antioxidante (32). Níveis espontâneos e estimulados de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio intracelulares estão aumentados na IRC (14, 16). Esses agentes oxidantes provocam danos em macromoléculas celulares, como proteínas, lipídios e DNA.

Alguns estudos têm demonstrado as conseqüências desses danos em macromoléculas em pacientes com IRC. Em análises de culturas de linfócitos de sangue periférico em pacientes urêmicos, foram encontradas diversas alterações cromossômicas, como fragmentos acêntricos, formação de balões centroméricos, quebras cromossômicas, gaps, cromossomos em anéis e cromossomos marcadores acrocêntricos longos. Essas alterações podem ser resultantes do estado urêmico e são fatores que podem aumentar a incidência do câncer (33). A pesquisa de micronúcleos (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 é significativamente maior ($44,3 \pm 13,7$ MN/1.000 células binucleadas -BN) que no grupo de controle ($15,3 \pm 4,7$ MN/1.000 BN). Os pacientes com insuficiência renal avançada também apresentam um aumento da freqüência de MN em relação aos controles. A elevada freqüência de MN em pacientes submetidos a hemodiálise de longo prazo e com IRC avançada é resultante de um precário reparo do DNA (34). Um marcador que também está sendo utilizado para demonstrar danos oxidativos do DNA em pacientes com IRC é o conteúdo de 8-Hidróxido 2'-deoxiguanosina (8-OHdG), 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, o qual é gradual com a sua progressão e agravado ainda mais com a diálise peritoneal (35).

Entretanto, a macromolécula celular que é o maior alvo do estresse oxidativo resultante do estado urêmico é o DNAm. O estudo do genoma mitocondrial 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 de 58 indivíduos com pressão arterial normal, através de uma análise de restrição de alta resolução (36). Este estudo foi o primeiro relato de um aumento na prevalência de variações do genoma mitocondrial em indivíduos com hipertensão. Portanto, o DNAm pode ser considerado um bom marcador molecular para diversos casos de hipertensão nos negros americanos com IRC terminal (36). Também foram encontradas relações de mutações no DNAm com a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (37). Para isso, foi realizado o mapeamento das mutações do DNAm em biópsia renal de pacientes com GESF primária e de pacientes com nefropatia por IgA. A mutação que mais ocorreu nos tecidos renais dos pacientes foi uma deleção de 4977pb, chamada de “deleção comum” (37).

Vários relatos descrevem alterações renais em pacientes que apresentam mutações no DNAm. As síndromes são multissistêmicas, com diversos fenótipos distintos. Há mais de 100 tipos de mutações já descritas no DNAm, muitas delas, como a A3243G e a deleção 4977pb podem estar relacionadas com danos renais.

Além disso, têm sido feitas associações entre 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. Análises das alterações do DNAMt em amostras de rins comprometidos pela doença renal terminal e em células renais tumorais demonstraram um aumento mutacional do DNAMt de tumores, o qual pode corresponder ao nível aumentado de ROS nas células do parênquima renal de pacientes no estágio final da doença renal (38). De fato, diversos estudos têm demonstrado a presença de mutações no DNAMt em células cancerígenas. Alterações na atividade respiratória e anormalidades no DNAMt parecem ser uma característica geral de células malignas. Assim, a presença de mutações no DNAMt no câncer é consistente com a suscetibilidade intrínseca de danos no DNAMt e estresse oxidativo constitutivo (7). As mutações no DNAMt podem iniciar eventos em cascata, levando a um contínuo aumento na produção de ROS, uma condição que provavelmente favorece o desenvolvimento de tumores. Dessa forma, a alta frequência de alterações no DNAMt em células cancerígenas e sua presença no estágio inicial de doenças poderiam, provavelmente, servir como um marcador clínico para a detecção precoce do câncer (39).

1.5 Análise da deleção 4977pb do DNAMt

A mutação envolvendo rearranjos no DNAMt mais comum do DNAMt é a deleção de 4977pb, chamada de “deleção comum”, que ocorre entre as posições de nucleotídeos 8469 a 13447 (28) e é flanqueada por uma sequência de repetição direta de 13pb (40). Essa mutação remove cinco genes de tRNA e sete genes que codificam subunidades da citocromo c oxidase, complexo I e ATPases. Essa mutação cria uma molécula de DNAMt normal, embora ainda seja capaz de se replicar (18, 40, 41). Os mecanismos responsáveis por deleções no DNAMt ainda permanecem indefinidos. A recombinação via

flanqueamento direto de repetição tem sido sugerida como a principal causa de deleções (42).

A deleção 4977pb do DNAm tem sido encontrada em diversos tecidos humanos, como sistema hematopoético (43), pele (44, 45), rim (37), e coração (46). Além disso, diversos estudos têm relacionado a presença dessa deleção com a toxicidade do estado urêmico. Num estudo (17) que analisou a deleção 4977pb do DNAm no músculo esquelético de pacientes no estágio final da doença renal encontrou-se a deleção em 77% (17/22) dos pacientes, enquanto apenas 22% dos controles pareados por idade apresentaram a deleção. Utilizando o método de PCR (Reação em cadeia da polimerase) semiquantitativo, foi observado que as proporções do DNAm deletado no músculo também foram significativamente maiores nos pacientes do que nos controles (17).

Liu e colaboradores (2001) desenvolveram um estudo sobre danos de DNA em pacientes no estágio final de doença renal através da análise da deleção comum do DNAm (27). Nesse trabalho, foram detectadas deleções no DNAm usando folículos capilares de 162 pacientes. A incidência da deleção 4977pb do DNAm nos folículos capilares foi maior nos pacientes em estágio final da doença renal do que nos normais. Além disso, a incidência dessa deleção estava associada com a idade dos pacientes. Dessa forma, os autores acreditam que a deleção 4977pb do DNAm dos folículos capilares pode servir como um biomarcador da instabilidade molecular do genoma mitocondrial de pacientes em estágio final da doença renal (44).

Entretanto, as causas de estresse oxidativo no paciente urêmico, suas inter-relações com outros fatores endógenos, exógenos e inflamatórios são complexas e pouco esclarecidas, assim como as conseqüências desse estresse oxidativo, como mutações no DNAm, ainda permanecem por ser elucidadas. Desse modo, o objetivo deste estudo é

testar a hipótese de que o estado urêmico pode aumentar os danos no DNAm através da análise da prevalência da deleção 4977pb do DNAm em células sanguíneas de pacientes com IRC em tratamento conservador e de pacientes com IRC submetidos a hemodiálise no sul do Brasil.

1.6 Referências bibliográficas

1. Thomé FS, Gonçalves LFS, Manfro RC, Barros EJG, Prompt CA, Karohl C. Insuficiência Renal Crônica. In Barros E, Manfro RC, Thomé FS, Gonçalves LFS. Eds. Nefrologia, Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2^a ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda. 1999; cap.30, 423-40.
2. Mitch WE. The Progressive Nature of Renal Disease. Contemporary Issues in Nephrology, vol.14. Brenner BM, Stein JH. Eds. New York: Churchill Livingstone Inc. 1986; 293p.
3. Avram MM, Klahr S. Eds. Renal Disease Progression and Management, Role of Vasoactive Agents, Cytokines, Lipids and Nutrition. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1996; 363 p.
4. Brenner BM. Ed. Brenner and Rector's The Kidney 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2000; 2800 p.
5. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo - 2004/2005. <http://www.sbn.org.br> (acessado em agosto de 2005).
6. Wei YH. Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. Proc Soc Exp Biol Med 1998; 217: 53-63.
7. McGilvery RW. Bioquímica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 1972; 789 p.
8. Carew JS, Huang P. Mitochondrial defects in cancer. Mol Cancer 2002; 9: 1-12.
9. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. Oxidative damage and mitochondrial delay in aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 10771-8.
10. Prithivirajsingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. FEBS Lett 2004; 571: 227-32.
11. Cortopassi GA, Wong A. Mitochondria in organismal aging and degeneration. Biochim Biophys Acta 1999; 1410: 183-93.
12. Lodha S, Dani D, Mehta R, Bhaskaran M, Reddy K, Ding G, Singhal PC. Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis: role of oxidative stress. Mol Med 2002; 8 (12): 830-40.

13. Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2001; 49(1): 135-45.
14. Tepel M, Echelmeyer M, Orie NN, Zidek W. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58: 867-72.
15. Rotig A. Renal disease and mitochondrial genetics. *J Nephrol* 2003; 16: 286-92.
16. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003; 349 (17): 1605-13.
17. Lim PS, Cheng YW, Wei YH: Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 454-63.
18. Dani MAC, Dani SU, Lima SPG, Martinez A, Rossi BM, Soares F, Zago MA, Simpson AJG. Less Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ than normal in various types of tumours suggest that cancer cells are essentially free of this mutation. *Genet Mol Res* 2004; 3 (3): 395-409.
19. Borges-Osório MR, Robinson WM. *Genética Humana*. 2^aed. Porto Alegre: Editora Artmed. 2001; 459p.
20. Dahl HHM, Thorburn DR. Mitochondrial disease: Beyond the magic circle. *Am J Med Genet* 2001; 160: 1-3.
21. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replicatioion. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410(2): 103-23.
22. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-65.
23. Hamblet NS, Castora FJ: Elevated levels of the Kearns-Sayre syndrome mitochondrial DNA deletion in temporal cortex of Alzheimer's patients. *Mutat Res* 1997; 379: 253-62.
24. Ferreira HB. Organização Gênica de Eucariotos. In Zaha A .Coord. *Biologia Molecular Básica*. 3^aed. Porto Alegre: Editora Mercado Aberto. 2001; cap. 4, 78-92.
25. 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: 979-85.

26. Ozawa T. Mitochondrial DNA mutations and age. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 128-54.
27. Carakushansky G. *Doenças Genéticas em Pediatria*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001; 503p.
28. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP. Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation* 1999; 99: 807-12.
29. Dinour D, Mini S, Polak-charcon S, Lotan D, Holtzman EJ. Progressive nephropathy associated mitochondrial tRNA gene mutation. *Clin Nephrol* 2004; 62(2): 149-54.
30. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Gluthathione antioxidant system as marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 845-53.
31. Morena M, Cristol JP, Senécal L, Leray-Moragues H, Krieter D, Canaud B. Oxidative stress in hemodialysis patients: is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney Int* 2002; 61: S109-S114.
32. Malliaraki N, Mpliamplias D, Kampa M, Perakis K, Margiots AN, Castanas E. Total corrected antioxidant capacity in hemodialyzed patients. *BMC Nephrol* 2003; 4(1): 4.
33. Cengiz K, Block AMW, Hossfeld DK, Anthonie R, Anthonie S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 36: 55-67.
34. 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.
35. Tarnag DC, Chen TW, 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: 1321-30.
36. Watson BJr, 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.
37. Yamagata K, Muro K, Usui J, et al. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1816-23.

38. Nagy A, Wilhelm M, Sukosd F, Ljungberg B, Kovaes G. Somatic mitochondrial DNA mutations in human chromophobe renal cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35(3): 256-60.
39. Copeland WC, Wachsmann JT, Johnson FM, Penta JS. Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest* 2002; 20(4): 557-69.
40. Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS* 1992; 297: 34-8.
41. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC. Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 1994; 23: 471-6.
42. Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Frabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon E. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human DNA. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 561-7.
43. Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, Kabelitz D, Oehmichen M, Meissner C. Detection of the 4977bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. *Exp Gerontol* 2004; 30: 181-8.
44. 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: 561-5.
45. Krishnan KJ, Lindsay J, Lusher M, Lowes S, Birch-Machin MA: Current pitfalls in the measurement of the 4977bp mitochondrial DNA common deletion in human skin. *J Invest Dermatol* 2003; 981-2.
46. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, Ciofini E, Biagini A, Andreassi MG. Detection of mtDNA with 4977bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570: 81-8.

2 OBJETIVOS

Geral

-Identificar a frequência da deleção 4977pb do DNAm em pacientes com Doença Renal Crônica.

Específicos

- Identificar a frequência da deleção 4977pb do DNAm em pacientes com Doença Renal Crônica em tratamento de hemodiálise.

- Identificar a frequência da deleção 4977pb do DNAm em pacientes com Doença Renal Crônica em tratamento conservador.

- Avaliar a associação do tempo de exposição dos pacientes à hemodiálise com a frequência da ocorrência da deleção 4977pb do DNAm

- Avaliar a associação da idade dos pacientes com a presença da deleção 4977pb do DNAm.

3 ARTIGO EM PORTUGUÊS

Prevalência da deleção 4977pb do DNA mitocondrial em pacientes com doença renal crônica em tratamento conservador ou submetidos a hemodiálise no sul do Brasil

Liana Bertolin Rossato¹, Ane Cláudia Fernandes Nunes¹, Maria Luiza Saraiva Pereira², Claus Dummer¹, Vagner Milani¹, Daiana Benck Porsch¹ e Elvino José Guardão Barros¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Departamento de Genética - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
Porto Alegre – Rio Grande do Sul
Brasil

Endereço para correspondência:

Liana Rossato
Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Serviço de Hemodiálise
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 2º andar
CEP: 90035-003
Telefone: + 55-51- 2101-8295
Fax: + 55-51-2101-8121
E-mail: liana_rossato@yahoo.com.br

Running title: *Mitochondrial DNA mutation and chronic renal disease*

Submitted to **Nephrology Dialysis Transplantation** – Impact Factor: **2.607**

3.1 Resumo

Introdução. Danos no DNA mitocondrial (DNAMt) têm sido descritos em pacientes com doença renal crônica (DRC). Estes danos podem ser avaliados através da deleção 4977pb do DNAMt em diversos tecidos.

Métodos. Identificamos a prevalência da deleção 4977pb do DNAMt através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) no sangue de pacientes com DRC em tratamento conservador (creatinina >2mg/dl) ou submetidos a hemodiálise.

Resultados. A frequência da ocorrência da deleção do DNAMt foi de 73.1% (38/52) nos pacientes com DRC submetidos a hemodiálise, 57.1% (27/42) nos pacientes com DRC em tratamento conservador e 27.8% (15/54) nos controles ($P < 0.001$). Não encontramos aumento da frequência desta deleção em relação a idade dos pacientes com DRC ($P = 0.54$) ou ao tempo de diálise ($P = 0.70$).

Conclusão. Danos no DNAMt podem ser induzidos pela DRC em especial nos pacientes submetidos a hemodiálise. Desta forma, a deleção 4977pb do DNAMt pode servir como um marcador de danos moleculares em pacientes com DRC.

Palavras-chave: Doença renal crônica, deleção 4977pb, DNA mitocondrial.

3.2 Introdução

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é mais suscetível a danos, quando comparado com o DNA nuclear (DNAn), em virtude da perda da proteção das histonas e do precário mecanismo de reparo de DNA (1). Além disso, o DNAm_t está localizado na membrana interna mitocondrial, a qual é a maior fonte intracelular de espécies de oxigênio reativo (ROS- *reactive oxygen species*) (2, 3).

No metabolismo aeróbico normal aproximadamente 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é revertido em radicais livres (4), os quais provocam danos oxidativos no DNAm_t, ocasionando, dessa forma, mutações (5, 6, 7). Esses danos no DNAm_t podem também inibir a fosforilação oxidativa e, assim, contribuir para o envelhecimento celular (8,9). As mutações no DNAm_t podem ser mudanças de base única ou associadas a grandes deleções e rearranjos (10).

O rearranjo mais comum do DNAm_t é uma deleção de 4977pb, chamada de “deleção comum”, que ocorre entre os nucleotídeos 8469 e 13447 (11). Essa deleção por ser cumulativa, tem sido encontrada em diversos tecidos humanos, como pele (12, 13), sistema hematopoético (14), rim (15) e coração (16).

A deleção comum pode ser induzida em células de tecidos que são expostos aos metabólitos tóxicos relacionados com o estágio final da doença renal (17). Isso pode ocorrer em razão de um aumento do estresse oxidativo ao qual os pacientes urêmicos estão cronicamente expostos, pois este estado da doença provoca um distúrbio no sistema antioxidante (18).

No entanto, até hoje, nenhum estudo identificou a deleção 4977pb do DNAMt em células sanguíneas de pacientes com DRC. Assim, para testar a hipótese de que o estado urêmico pode aumentar os danos no DNAMt, investigou-se a prevalência da deleção 4977pb do DNAMt em células sanguíneas de pacientes com doença renal crônica (DRC) em tratamento conservador e pacientes submetidos a hemodiálise.

3.3 Material e Métodos

Pacientes

Trata-se de um estudo transversal realizado no período de março de 2004 a dezembro de 2005. Foram avaliados 148 pacientes de centros de hemodiálise no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Amostras de sangue periférico foram coletadas de 52 pacientes com DRC submetidos a hemodiálise três vezes por semana para manter um mínimo de K_T/V de uréia de 1.2 por sessão. Além disso, foram coletadas amostras de sangue periférico de 42 pacientes com DRC em tratamento conservador que apresentavam níveis de creatinina acima de 2mg/dl. A doença de base dos dois grupos de pacientes estão descritas na Tabela 1. O grupo controle foi composto por amostras de sangue periférico de 54 amostras de indivíduos saudáveis do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Os pacientes submetidos à hemodiálise e os pacientes com DRC em tratamento conservador foram pareados com os controles quanto ao sexo, etnia e ajustados quanto a idade.

O protocolo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e o consentimento informado foi obtido de todos os participantes do estudo.

Extração de DNA

O DNA genômico foi isolado de leucócitos pela técnica de desproteinização diferencial (19), método que se baseia na lise das células sanguíneas através de detergente não iônico (Surfact-Amps NP-40 – Pierce), desnaturação das proteínas com sulfato de sódio (SDS) a temperatura adequada (50 – 60 °C), precipitação das proteínas com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl 6M) e precipitação do DNA utilizando etanol absoluto. As amostras de DNA foram quantificadas no aparelho Gene Quant-Pro Amersham Pharmacia Biotech Inc. (Cambridge, UK) e diluídas a uma concentração final de 100 ng/μl.

Síntese de oligonucleotídeos

A síntese dos oligonucleotídeos foi realizada pela Integrated DNA Technologies, Inc. (USA) Os *primers* utilizados nesse estudo são: DELCOM_1 (sense) 5'ACTACCACCTACCTCCCTCACC3' e DELCOM_2 (antisense) 5'GCTTGTCAGGGAGGTAGCGATG3', conforme previamente foi descrito por Yamagata *et al*, 2002.

Amplificação por PCR

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 25 μl, contendo aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 20 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 1.25 U de *Taq* DNA polimerase.

As condições de amplificação adequadas ao polimorfismo estudado foram as seguintes: 94 °C por 10 minutos, 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto (desnaturação), 67 °C por

30 segundos (anelamento) e 72° C por 30 segundos (extensão) e um ciclo de 72 °C por 5 minutos.

Uma amostra de DNA (extraído de tecido muscular) de um paciente com deleção 4977pb do DNAm_t confirmada pela técnica de Southern Blot, o qual apresenta uma doença mitocondrial, foi usada em cada reação de PCR. Dessa forma, pôde-se concluir que o fragmento de DNA amplificado pelo PCR realmente representava o fragmento mutante gerado pela deleção 4977pb do DNAm_t. Além disso, para confirmar os resultados obtidos, as amostras foram feitas em duplicata. A amplificação de 160pb representava o fragmento mutante.

As reações de amplificação foram realizadas num termociclador automático MJ Research, Inc, modelo PTC-100 (Watertown, USA). O produto de amplificação foi verificado em gel de agarose 1.5 % corado com solução de brometo de etídeo, o qual foi fotografado pelo programa Kodak Digital Science® (Rochester, USA).

Análise estatística

Foram avaliadas as freqüências, contagens e percentuais para as variáveis categóricas e média e desvio-padrão para as variáveis quantitativas. Na presença de assimetria utilizaram-se mediana e amplitude interquartil. Variáveis quantitativas foram comparadas pela análise de variância seguida de teste de Tukey. Para comparar a ocorrência da deleção entre os três grupos foi utilizado inicialmente o teste de qui-quadrado seguido de um teste de post-hoc específico segundo proposto por Zar. Para ajustar para o potencial efeito de confusão da idade na relação entre freqüência da deleção 4977pb do DNAm_t e grupos de função renal foi elaborado um modelo de regressão logística. Todos os

cálculos foram processados pelo software SPSS 8.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). O valor $p < 0.05$ foi considerado significativo.

3.4 Resultados

Os grupos estudados são homogêneos em relação ao gênero e composição étnica (Euro-Brazilian or Afro-Brazilian), não se observando nenhuma diferença relevante em termos estatísticos, apresentando os respectivos valores $p = 0.08$ e $p = 0.3$.

Utilizando a técnica de PCR com os primers descritos anteriormente, a deleção 4977pb do DNAm_t no DNA total de células sanguíneas foi demonstrada pela presença de um fragmento mutante de 160pb. Nos indivíduos que não apresentaram a deleção esta banda não foi observada (Fig. 1).

A frequência da deleção 4977pb do DNAm_t calculada pelo teste de tendência linear ajustado para a idade foi diferente nos três grupos avaliados ($P < 0.001$). Sendo maior nos pacientes com DRC em hemodiálise (73.1%), seguida pelos pacientes com DRC em tratamento conservador (57.1%) e dos controles (27.8%) (Fig. 2).

No que se refere ao impacto da idade, nos vários grupos estudados, observamos, através do modelo logístico, que há um aumento da ocorrência da deleção 4977pb do DNAm_t nos grupos de pacientes submetidos a hemodiálise e também naqueles em tratamento conservador em relação ao grupo controle. Não foi observado aumento da mutação em relação à idade dos pacientes avaliados ($P = 0.54$).

O modelo de regressão logística também mostrou que o *odds* de ocorrência no grupo de pacientes com DRC submetidos ao tratamento de hemodiálise e de pacientes com DRC em tratamento conservador foi 6.4 e 3.1 vezes maior em relação ao grupo de controle,

respectivamente. A Tabela 1 mostra as características e a detecção da deleção 4977pb do DNAmT na população em estudo.

Dentro do grupo de pacientes submetidos a hemodiálise, foi avaliado se o tempo de exposição ao tratamento (maior ou menor que 24 meses) poderia influenciar na prevalência da mutação. Apesar de ter sido observado uma tendência do aumento da frequência da deleção em pacientes com DRC submetidos a hemodiálise há mais de 24 meses, a diferença não foi significativa ($p= 0.7$).

3.5 Discussão

Neste estudo encontrou-se que a frequência da deleção 4977pb do DNAmT acumulada em células sanguíneas é maior nos pacientes com DRC submetidos a hemodiálise e mesmo nos pacientes em tratamento conservador do que nos controles saudáveis pareados pela idade, sexo e etnia.

Esses achados podem ser em decorrência de danos oxidativos no genoma mitocondrial que têm sido indicados como um dos maiores fatores contribuintes para o declínio funcional da fosforilação oxidativa (1). O paciente com DRC pode ser caracterizado por apresentar alterações qualitativas e quantitativas em todos os sistemas orgânicos. As alterações mais pronunciadas ocorrem nos sistemas cardiovascular, neuromuscular, osteoarticular, hematológico e imunológico. A síndrome urêmica resulta num desequilíbrio entre os sistemas antioxidante e oxidante, levando a um estado de estresse oxidativo (18). A retenção de substâncias potencialmente tóxicas, como compostos orgânicos no soro urêmico, pode ser responsável pela toxicidade clínica, visto que esses compostos tendem a gerar radicais livres orgânicos durante o metabolismo oxidativo (17).

O distúrbio entre os sistemas antioxidante e oxidante ocorre no início do curso da DRC, aumentando gradualmente com a sua progressão e sendo exacerbado pela diálise. Isso ocorre porque a hemodiálise gera espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*) e, por isso, age como um promotor do estresse oxidativo. De fato, tem sido demonstrado que a enzima antioxidante superóxido dismutase CuZn não é afetada em pacientes com DRC não dialisados, mas é profundamente diminuída em pacientes dialisados. Essa constatação sugere que a diálise promove um estresse oxidativo adicional (18).

Alguns estudos têm demonstrado que alterações no DNAn estão presentes no sangue e em tecidos de pacientes urêmicos e podem desempenhar um papel importante na patogênese desta doença (20, 21, 22, 23, 24). Além disso, um aumento na incidência dessas alterações pode provocar um maior risco de desenvolvimento de câncer (20, 23). O DNAm apresenta uma alta razão mutacional. Quando comparado com o DNAn, a frequência de mutações do DNAm é de 10 a 1000 vezes maior (25), o que se deve ao fato de poder ser facilmente danificado por radicais livres em virtude de sua localização na membrana interna mitocondrial, da perda da proteção das histonas e do precário mecanismo de reparo de DNA (1, 10).

A acúmulo da deleção 4977pb do DNAm em pacientes no estágio final da doença renal foi demonstrada anteriormente em um estudo que analisou DNAm extraído de músculo esquelético (17) e em folículos capilares (13). Lim e colaboradores demonstraram a deleção 4977pb do DNAm em 77% dos pacientes no estágio final da doença renal, ao passo que apenas 22% dos controles normais pareados por idade eram portadores da deleção. Assim como no nosso estudo, no estudo de Liu e colaboradores a incidência dessa deleção também foi maior nos pacientes no estágio final da doença renal do que nos controles.

Este é o primeiro estudo que detectou a presença da deleção 4977 pb do DNAMt em células de sangue periférico de pacientes com DRC ambulatoriais e em pacientes com IRC submetidos ao tratamento de hemodiálise. Em contraste com as observações de que células sanguíneas periféricas proliferativas têm porcentagens mais baixas de DNAMt mutado em relação a tecidos pós-mitóticos como músculo esquelético (17, 26), tem sido demonstrado que danos no DNAMt podem ocorrer também em células sanguíneas que sobrevivam tempo suficiente para acumular mutações no DNAMt (16, 27). É bem conhecido que cerca de 49% dos linfócitos circulantes têm uma vida que excede seis meses e alguns estudos têm demonstrado que alguns linfócitos persistem por mais de trinta anos (27).

Os mecanismos responsáveis por deleções no DNAMt ainda permanecem indefinidos. A recombinação via flanqueamento direto de repetição tem sido sugerida como a principal causa de deleções (28). A deleção 4977pb do DNAMt ocorre entre as posições de nucleotídeos 8482 e 13459. Esta mutação remove cinco genes de tRNA e sete genes que codificam subunidades do citocromo c oxidase, complexo I e ATPases. A mutação cria uma molécula de DNAMt anormal, embora ainda seja capaz de se replicar (8, 29, 30).

Concordando com os resultados de Zhang e colaboradores, o presente estudo mostrou que é possível detectar um fragmento específico mutante gerado pela deleção 4977pb do DNAMt com apenas um par de primer. Neste estudo, 100ng de DNA total em cada amostra foram suficientes para detectar o fragmento de 160pb gerado pela deleção 4977pb do DNAMt.

No estudo de von Wurmb e colaboradores, para cada amostra analisada, 500ng do DNA total foram utilizados para a detecção de quatro diferentes fragmentos específicos de deleção. Os fragmentos menores apresentaram uma maior eficiência de amplificação que os maiores, fragmentos específicos de deleção foram demonstrados em 52% das amostras de

doadores saudáveis e de indivíduos que morreram por causas agudas sem achados patológicos em órgãos.

Nossos resultados sugerem que uma proporção do DNAm existente em células do sangue periférico de pacientes com DRC em tratamento conservador e em pacientes submetidos a hemodiálise pode apresentar danos moleculares. Também foram observadas diferenças significativas na frequência da deleção 4977pb do DNAm entre os grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

Conseqüentemente, estudos futuros com pacientes com DRC, incluindo a investigação de outras mutações do DNAm e análise de DNAm em outros tecidos, são necessários para investigar o papel da disfunção mitocondrial na patogênese da DRC assim como o possível papel de marcador de danos moleculares secundários ao estresse oxidativo que essas mutações tenham, possibilitando seu uso diagnóstico e/ou prognóstico.

3.6 Referências Bibliográficas

1. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN: Oxidative damage and mitochondrial delay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10771-10778.
2. 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: 979-985.
3. Ozawa T: Mitochondrial DNA mutations and age. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 128-154.
4. Ritcher C, Park JW, Ames BN: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467.
5. Liu VWS, Zhang C, Nagley P: Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1268-1275.
6. Wei YH: Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 53-63.
7. Cortopassi GA, Wong A: Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Bochim Biophys Acta* 1999; 1410: 183-193.
8. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC: Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 1994; 23: 471-476.
9. Hamblet NS, Castora FJ: Elevated levels of the Kearns-Sayre syndrome mitochondrial DNA deletion in temporal cortex of Alzheimer's patients. *Mutat Res* 1997; 379: 253-262.

10. Clayton DA: Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inherit Metab Dis* 1992; 14(4): 439-447.
11. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP: Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation* 1999; 99: 807-812.
12. Krishnan KJ, Lindsay J, Lusher M, Lowes S, Birch-Machin MA: Current pitfalls in the measurement of the 4977bp mitochondrial DNA common deletion in human skin. *The Society Investigative Dermatology* 2003; 981-982.
13. 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: 561-565.
14. Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, Kabelitz D, Oehmichen M, Meissner C. Detection of the 4977bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. *Exp Gerontol* 2004; 30: 181-188.
15. Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi m, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 1816-1823.
16. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, Ciofini E, Biagini A, Andreassi MG. Detection of mtDNA with 4977bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570: 81-88.
17. Lim PS, Cheng YW, Wei YH: Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 454-463.

18. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Gluthathione antioxidant system as marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 845-853.
19. Lahiri, DK & Nurberger, JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFPLs studies. *Nucleic Acid Res* 1981; 19:5444.
20. Cengiz K, Block AMW, Hossfeld DK, Anthone R, Anthone S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 36: 55-67.
21. Tarng DC, Chen TW, 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: 1321-30.
22. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuba A, Miyata T, Nangaku M, Tagawa H, Kurokawa K. Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells *Perit Dial Int* 2002; 22(1): 11-21.
23. 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.
24. 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; 30(2): 296-301.

25. Prithivirajasingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* 2004; 571: 227-32.
26. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320: 1293-1299.
27. Von Wurmb N, Oehmichen M, Meissner C. Demonstration of the 4977 bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood. *Mutat Res* 1998; 422: 247-254.
28. Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Frabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon E. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human DNA *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 561-567.
29. Dani MAC, Dani SU, Lima SPG, Martinez A, Rossi BM, Soares F, Zago MA, Simpson AJG. Less Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ than normal in various types of tumours suggest that cancer cells are essentially free of this mutation *Genet Mol Res* 2004; 3 (3): 395-409.
30. Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS* 1992; 297:34-38.

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1 – Doenças de base dos pacientes com DRC submetidos a hemodiálise e pacientes em tratamento conservador.....	43
Tabela 2 – Características e detecção da deleção 4977pb do DNAm _t na população em estudo.....	44

Tabela 1. Doença de base dos pacientes com DRC submetidos a hemodiálise e pacientes com IRC em tratamento conservador

Doença de Base	Pacientes em	
	hemodiálise N (%)	tratamento conservador N (%)
Diabetes	8 (19.0)	23 (44.2)
Hipertensão	6 (14.3)	11 (21.1)
Glomerulonefrites	8 (19.0)	2 (3.9)
ADPKD	1 (2.4)	2 (3.9)
Uropatia obstrutiva	7 (16.7)	1 (1.9)
Outras	9 (21.4)	9 (17.3)
Causa desconhecida	3 (7.2)	4 (7.7)

Tabela 2. Características da população em estudo e detecção da deleção 4977pb do DNAm.

	Controles (n=54)	TC (n=42)	HD (n=52)	p-valor
Idade (anos) media ± DP	40 ± 17	55 ± 16	54 ± 14	< 0.001
Sexo, <i>n</i> (%)				0,08
Feminino	26 (48)	25 (60)	19 (37)	
Masculino	28 (52)	17 (40)	33 (63)	
Etnia				0,3
Euro-Brazilian	37 (68)	33 (79)	34 (65)	
Afro-Brazilian	17 (32)	9 (21)	18 (35)	
Deleção 4977pb				
Detecção, <i>n</i> (%)	15 (28)	24 (57)	38 (73)	< 0.001*

TC = pacientes com DRC em tratamento conservador

HD = pacientes com DRC submetidos a hemodiálise

* Dado ajustado para a idade.

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figura 1** - Gel de agarose dos produtos do PCR amplificados do DNAm_t para análise da deleção 4977pb em células sanguíneas..... 46
- Figura 2** - Comparação da frequência da deleção 4977pb do DNAm_t em células sanguíneas nos três grupos em estudo..... 47

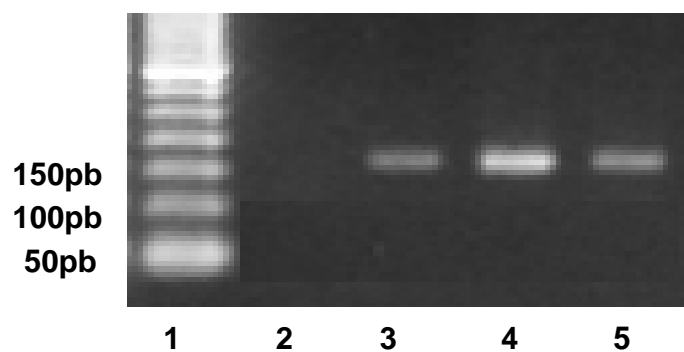


Fig 1. Gel de agarose dos produtos do PCR amplificados do DNAMt para análise da deleção 4977pb em células sanguíneas. Linha 1 é um ladder de 50-pb; linha 2 controle normal (sem fragmento mutante de 160pb gerado pela deleção); linha 3-5 pacientes com a banda de 160pb; indicando a presença da deleção 4977pb do DNAMt.

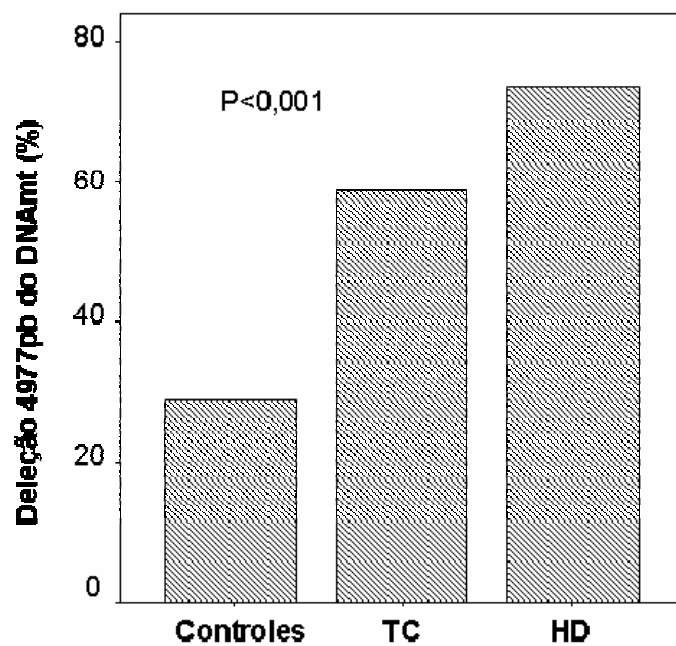


Fig 2. Comparação da frequência da deleção 4977pb do DNAmT em células sanguíneas nos três grupos em estudo. Controles (sujeitos saudáveis), TC (pacientes com DRC em tratamento conservador) e HD (pacientes com DRC submetidos a hemodiálise). O valor p foi obtido pelo teste de qui-quadrado. Nas comparações post-hoc foi observado: controles vs TC $P < 0,05$; controles vs HD $p < 0,001$ e TC vs HD $p > 0,05$.

4 ARTIGO EM INGLÊS

Prevalence of 4977bp deletion in mitochondrial DNA from patients with chronic renal disease receiving conservative treatment or hemodialysis in southern Brazil

Liana Bertolin Rossato¹, Ane Cláudia Fernandes Nunes¹, Maria Luiza Saraiva Pereira², Claus Dummer¹, Vagner Milani¹, Daiana Benck Porsch¹ and Elvino José Guardão Barros¹

¹ Graduate Program in Medical Science: Nephrology – Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Genetics Department - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Porto Alegre – Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Liana Rossato

Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Hemodialysis Service

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 2º andar

CEP: 90035-003

Telephone: + 55-51- 2101-8295

Fax: + 55-51-2101-8121

E-mail: liana_rossato@yahoo.com.br

Running title: *Mitochondrial DNA mutation and chronic renal disease*

Submitted to **Nephrology Dialysis Transplantation** – Impact Factor: **2.607**

4.1 Abstract

Background. Damage to mitochondrial DNA (mtDNA) has been described in patients with chronic renal disease (CRD). The presence of mtDNA 4977bp deletion in many different tissues can serve as a marker of this damage.

Methods. Polymerase chain reaction techniques (PCR) were used to identify the prevalence of 4977bp deletion in mtDNA from the blood of hemodialysis patients or patients with CRD receiving conservative treatment.

Results. The frequency of 4977bp deletion in mtDNA was 73.1% (38/52) in patients undergoing hemodialysis, 57.1% (27/42) in patients with CRD receiving conservative treatment and 27.8% (15/54) in control samples ($P < 0.001$). Higher frequencies of this mutation were not associated with patient age ($P = 0.54$) or time on dialysis ($P = 0.70$).

Conclusion. Damage to mtDNA can be induced in CRD, especially in patients undergoing dialysis. Thus, mtDNA with 4977bp deletion can serve as a marker of molecular damage in patients with CRD.

Key words: Chronic renal disease, 4977bp deletion, mitochondrial DNA.

4.2 Introduction

Mitochondrial DNA (mtDNA) is more susceptible to damage than is nuclear DNA (nDNA) due to its lack of histone protection and poor DNA repair mechanisms (1). In addition, mtDNA is located on the inner membrane of mitochondria, site of the principle intracellular source of reactive oxygen species (2, 3).

In normal aerobic metabolism, approximately 5% of the oxygen consumed by mitochondria is converted in free radicals (4), which provoke oxidative damage to mtDNA and lead to mutations (5,6,7). This damage can also inhibit oxidative phosphorylation, contributing to the cellular aging process (8,9). Mutations in mtDNA can be single base changes, but large-scale deletions and rearrangements can also occur (10).

The most frequent mtDNA mutation is deletion of 4977bp, called the “common deletion,” which occurs between nucleotides 8469 and 13447 (11). This deletion has been found in many human tissues, such as skin (12,13), the hematopoietic system (14), kidney (15) and heart (16).

The common deletion can be easily induced in tissues exposed to the toxic metabolites associated with end stage renal disease (17). This is due to an increase in oxidative stress provoked by disruption of the antioxidant system in uremic patients (18).

To date, however, no studies of this nature have been conducted in blood cells. Therefore, to test the hypothesis that the uremic state can increase the rate of mtDNA damage in blood cells, the prevalence of mtDNA 4977bp deletion in blood cells was investigated in patients with chronic renal disease (CRD) undergoing either conservative treatment or hemodialysis.

4.3 Subjects and methods

Patients

A transverse study was carried out between March 2004 and December 2005, in which 148 patients from different hemodialysis centers in the Brazilian state of Rio Grande do Sul were evaluated. Peripheral blood samples were collected from 52 patients with CRD who were undergoing hemodialysis three times per week to maintain a minimum K_T/V urea index of 1.2 per session. In addition, peripheral blood samples were collected from 42 patients with CRD (creatinine $>2\text{mg/dl}$) under conservative treatment. The underlying diseases of patients in these two groups are described in Table 1. The control group was made up of peripheral blood samples from 54 healthy individuals. The patients undergoing hemodialysis and the patients with CRD under conservative treatment were matched with controls for sex and ethnicity and adjusted for age.

The Graduate Studies and Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre had previously approved the research protocol and written informed consent was obtained from all study participants.

DNA Extraction

Genomic DNA was isolated from leucocytes using the differential deproteinization method (19). In this technique, a non-ionic detergent (Surfact-Amps NP-40 – Pierce) is used to lyse blood cells, after which proteins are denatured with sodium sulfate at a temperature of 50-60°C and precipitated using a saturated sodium chloride solution (NaCl 6M). Finally, DNA is precipitated with absolute ethanol. DNA samples were quantified

using a Gene Quant-Pro Amersham Pharmacia Biotech Inc. instrument (Cambridge, UK) and diluted to a final concentration of 100 ng/ μ l.

Oligonucleotide synthesis

Oligonucleotide synthesis was performed by Integrated DNA Technologies, Inc. (USA). The primers used in this study were: DELCOM_1 (sense) 5'ACTACCACCTACCTCCCTCACC3' and DELCOM_2 (antisense) 5'GCTTGTCAGGGAGGTAGCGATG3', as previously described by Yamagata *et al* (2002).

PCR amplification

Amplification reactions were performed on a final volume of 25 μ l, containing approximately 100 ng of genomic DNA, 10 pmol of each primer, 0.2 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM of KCl, 3 mM of MgCl₂ and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase.

The following conditions were used for adequate amplification of the polymorphism under study: 94 °C for ten minutes, 30 cycles of 94°C for one minute (denaturation), 67°C for 30 seconds (annealing) and 72°C for 30 seconds (elongation) and one cycle of 72°C for five minutes.

A DNA sample from a patient with mtDNA deletion 4977bp confirmed by Southern Blot was used in each PCR to verify that the DNA fragment amplified represented the mtDNA 4977bp deletion mutation. As further confirmation of the results, each sample was processed twice.

The amplification reactions were performed in an MJ Research, Inc. automatic thermocycler, model PTC-100 (Watertown, USA). The amplification product was verified in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and photographed using Kodak Digital Science® (Rochester, USA).

Statistical analysis

The frequencies, counts and percentages were evaluated for categorical variables, with averages and standard deviations calculated for quantitative variables. In the case of asymmetric samples, median and interquartile amplitude values were used. Quantitative variables were compared using variance analysis and the Tukey test. To compare the occurrence of deletion between the three groups, the chi-squared test was used, followed by a specific post-hoc test, as was proposed by Zar. To adjust for the potential confusion factor of age in the relationship between 4977bp deletion frequency in mtDNA and the different groups of renal function, a logistical regression model was developed. All of the calculations were performed using SPSS 8.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL). P-values less than 0.05 were considered significant.

4.4 Results

The groups studied were considered statistically homogeneous in terms of sex ($p=0.08$) and ethnicity (Euro-Brazilian or Afro-Brazilian) ($p=0.3$).

Using PCR techniques with the primers previously described, mtDNA deletion 4977bp was demonstrated by the presence of a mutant fragment of 160bp. This band was not observed in samples from individuals who did not present the deletion (Fig. 1).

The frequency of mtDNA deletion 4977bp calculated by the age-adjusted linear tendency test was different for the three groups studied ($p < 0.001$): 73.1% for patients undergoing hemodialysis, 57.1% for patients with CRD in conservative treatment and 27.8% for the control group (Fig. 2). Patient age was not associated with an increase in the frequency of the mutation ($p = 0.54$).

The logistical regression model also showed that the odds of mutation occurring in the group of patients undergoing hemodialysis was 6.4 times greater than for the control group, and 3.1 times greater for patients under conservative treatment. Table 1 shows the characteristics and finding of mtDNA 4977bp deletion for the study population.

Within the group of hemodialysis patients, it was hypothesized that the length of time in treatment (longer than or less than 24 months) could influence the prevalence of the mutation. However, despite a numerical increase in the frequency of deletion in patients undergoing dialysis for more than 24 months, the difference was not significant ($p = 0.7$).

4.5 Discussion

In this study, the frequency of mtDNA 4977bp deletion in blood cells was much higher in patients with CRD on hemodialysis, as well as in patients under conservative treatment, when compared to healthy controls paired for age, sex and ethnicity.

These findings may be due to oxidative damage to the mitochondrial genome, which has been indicated as one of the primary contributing factors to functional decline in respiration and oxidative phosphorylation (1). Patients with CRD can be characterized by the presence of qualitative and quantitative changes in all organic systems. The most pronounced of these changes occur in the cardiovascular, neuromuscular, skeletal,

hematologic and immunologic systems. Uremic syndrome results in an imbalance between the processes of oxidation and antioxidation, leading to a state of oxidative stress (18). The retention of potentially toxic substances, such as organic compounds in uremic plasma, may be responsible for clinical toxicity, since these compounds tend to generate organic free radicals during oxidative metabolism (17).

The imbalance between antioxidation and oxidation occurs early in the course of CRD, gradually increasing as the disease progresses and exacerbated by dialysis. This happens because hemodialysis generates reactive oxygen species which promote oxidative stress. In fact, it has been shown that the antioxidative enzyme Cu/Zn superoxide dismutase is not altered in patients with CRD who do not undergo dialysis, but is drastically reduced in dialysis patients. This suggests that dialysis itself provokes additional oxidative stress (18).

Some studies have demonstrated that blood and tissues of uremic patients present changes in nDNA that may play an important role in the pathogenesis of this disease (20-24). In addition, an increase in the incidence of these changes may increase the risk for developing cancer (20,23). Mitochondrial DNA has a high mutational ratio – 10 to 1000 times higher than for nDNA (25). This is due to mtDNA's proximity to free radicals on the inner mitochondrial membrane, the lack of histone protection and poor DNA repair mechanisms (1, 10).

The accumulation of mtDNA deletion 4977bp in patients with end stage renal disease has been previously demonstrated in skeletal muscle (17) and in hair follicles (13). Lim et al. demonstrated 4977bp deletion in 77% of patients in end stage renal disease, compared with only 22% of age-paired normal controls. Liu et al.'s study on the incidence

of this deletion also showed higher rates in patients with end stage renal disease than in controls.

This is the first study to detect mtDNA deletion 4977bp in peripheral blood cells of ambulatory CRD patients and patients with chronic kidney failure undergoing hemodialysis. Contrasting with observations that proliferative peripheral blood cells have lower proportions of mutant mtDNA than post-mitotic tissues such as skeletal muscle (17,26), it has been demonstrated that mtDNA damage can also occur in blood cells that survive long enough to accumulate mtDNA mutations (16,27). About 49% of circulating lymphocytes live more than 6 months, and studies show that some lymphocytes last more than 30 years (27).

The mechanisms responsible for mtDNA deletions are still undefined. Recombination via flanking direct repeats have been suggested as the main cause of deletions (28). Deletion of 4977bp in mtDNA occurs between nucleotide positions 8482 and 13459. This mutation removes five RNAt genes and seven genes that codify cytochrome and oxidase subunits, complex I and ATPases. The mutation creates an abnormal mtDNA molecule, although it is still capable of replication (8, 29, 30).

Our results agreed with those of Zhang et al., showing that it is possible to detect a specific mutant fragment generated by the deletion of 4977bp in mtDNA with a single primer pair. In this study, 100ng of total DNA in each sample were sufficient to detect the 160bp fragment generated by the mtDNA 4977bp deletion.

In von Wurmb et al., for each sample analyzed, 500ng of total DNA were used to detect four different specific deletion fragments. The smaller fragments presented a greater amplification efficiency than the bigger ones, and specific deletion fragments were found in

52% of samples from both healthy donors and individuals who died of acute causes without pathological findings in organs.

Our results suggest that a proportion of mtDNA from peripheral blood cells of patients with CRD under conservative treatment and those undergoing dialysis present molecular damage. Significant differences in the frequency of mtDNA deletion 4977bp were also observed between the patient groups and the healthy controls.

As a result, future studies with CRD patients, including investigation of other mtDNA mutations, should be carried out to investigate the role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of CRD, as well as the possible diagnostic and/or prognostic role of these mutations as markers of molecular damage secondary to oxidative stress.

Conflict of interest declaration

The corresponding author affirms that none of the contributing authors has any association with any of the companies acknowledged in this paper, nor any personal interest in the outcomes of the study.

4.6 References

1. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN: Oxidative damage and mitochondrial delay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10771-10778.
2. 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: 979-985.
3. Ozawa T: Mitochondrial DNA mutations and age. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 128-154.
4. Ritcher C, Park JW, Ames BN: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6465-6467.
5. Liu VWS, Zhang C, Nagley P: Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 1268-1275.
6. Wei YH: Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 53-63.
7. Cortopassi GA, Wong A: Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Bochim Biophys Acta* 1999; 1410: 183-193.
8. Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, McKee AC, Beal MF, Graham BH, Wallace DC: Marked changes in mitochondrial DNA deletion levels in Alzheimer brains. *Genomics* 1994; 23: 471-476.
9. Hamblet NS, Castora FJ: Elevated levels of the Kearns-Sayre syndrome mitochondrial DNA deletion in temporal cortex of Alzheimer's patients. *Mutat Res* 1997; 379: 253-262.

10. Clayton DA: Structure and function of the mitochondrial genome. *J Inherit Metab Dis* 1992; 14(4): 439-447.
11. Bhat HK, Hiatt WR, Hoppel CL, Brass EP: Skeletal muscle mitochondrial DNA injury in patients with unilateral peripheral arterial disease. *Circulation* 1999; 99: 807-812.
12. Krishnan KJ, Lindsay J, Lusher M, Lowes S, Birch-Machin MA: Current pitfalls in the measurement of the 4977bp mitochondrial DNA common deletion in human skin. *The Society Investigative Dermatology* 2003; 981-982.
13. 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: 561-565.
14. Mohamed SA, Wesch D, Blumenthal A, Bruse P, Windler K, Ernst M, Kabelitz D, Oehmichen M, Meissner C. Detection of the 4977bp deletion of mitochondrial DNA in different human blood cells. *Exp Gerontol* 2004; 30: 181-188.
15. Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi m, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002;13: 1816-1823.
16. Botto N, Berti S, Manfredi S, Al-Jabri A, Federici C, Clerico A, Ciofini E, Biagini A, Andreassi MG. Detection of mtDNA with 4977bp deletion in blood cells and atherosclerotic lesions of patients with coronary artery disease. *Mutat Res* 2005; 570: 81-88.
17. Lim PS, Cheng YW, Wei YH: Large-scale mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of patients with end-stage renal disease. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 454-463.

18. Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, Nguyen AT, Thevenin M, Jaudon MC, Zingraff J, Verger C, Jungers P, Descamps-Latscha B. Gluthathione antioxidant system as marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 845-853.
19. Lahiri, DK & Nurberger, JL. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFPLs studies. *Nucleic Acid Res* 1981; 19:5444.
20. Cengiz K, Block AMW, Hossfeld DK, Anthone R, Anthone S, Sandberg AA. Sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in uremic patients *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 36: 55-67.
21. Tarng DC, Chen TW, 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: 1321-30.
22. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuba A, Miyata T, Nangaku M, Tagawa H, Kurokawa K. Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells *Perit Dial Int* 2002; 22(1): 11-21.
23. 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.
24. 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; 30(2): 296-301.

25. Prithivirajasingh S, Story MD, Bergh SA, Geara FB, Ang KK, Ismail SM, Stevens CW, Buchholz TA, Brock WA. Accumulation of the common mitochondrial DNA deletion induced by ionizing radiation. *FEBS Lett* 2004; 571: 227-32.
26. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 1989; 320: 1293-1299.
27. Von Wurmb N, Oehmichen M, Meissner C. Demonstration of the 4977bp deletion in human mitochondrial DNA from intravital and postmortem blood. *Mutat Res* 1998; 422: 247-254.
28. Mita S, Rizzuto R, Moraes CT, Shanske S, Arnaudo E, Frabrizi GM, Koga Y, DiMauro S, Schon E. Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human DNA *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 561-567.
29. Dani MAC, Dani SU, Lima SPG, Martinez A, Rossi BM, Soares F, Zago MA, Simpson AJG. Less Δ mtDNA⁴⁹⁷⁷ than normal in various types of tumours suggest that cancer cells are essentially free of this mutation *Genet Mol Res* 2004; 3 (3): 395-409.
30. Zhang C, Baumer A, Maxwell RJ, Linnane AW, Nagley P. Multiple mitochondrial DNA deletions in an elderly human individual. *FEBS* 1992; 297:34-38.

LIST OF TABLES

Table 1 – Underlying diseases of patients with chronic renal disease undergoing hemodialysis and in conservative treatment.....	63
Table 2 - Characteristics of the study population and presence of 4977bp deletion.....	64

Table 1. Underlying diseases of patients with chronic renal disease undergoing hemodialysis and in conservative treatment

Underlying disease	Patients in	
	hemodialysis N (%)	conservative treatment N (%)
Diabetes	8 (19.0)	23 (44.2)
Hypertension	6 (14.3)	11 (21.1)
Glomerulonephritis	8 (19.0)	2 (3.9)
ADPKD	1 (2.4)	2 (3.9)
Obstructive uropathy	7 (16.7)	1 (1.9)
Other	9 (21.4)	9 (17.3)
Unknown cause	3 (7.2)	4 (7.7)

Table 2. Characteristics of the study population and presence of 4977bp deletion of mtDNA

	Controls (n=54)	CT (n=42)	HD (n=52)	P-value
Age (years) average \pm SD	40 \pm 17	55 \pm 16	54 \pm 14	< 0.001
Sex, <i>n</i> (%)				0.08
Female	26 (48)	25 (60)	19 (37)	
Male	28 (52)	17 (40)	33 (63)	
Ethnicity				0.3
Euro-Brazilian	37 (68)	33 (79)	34 (65)	
Afro-Brazilian	17 (32)	9 (21)	18 (35)	
Deletion 4977bp				
Detected, <i>n</i> (%)	15 (28)	24 (57)	38 (73)	< 0.001*

CT = patients with CRD in conservative treatment

HD = patients with CRD undergoing hemodialysis

* Data adjusted for age.

LIST OF FIGURES

- Figure 1** - Agarose gel of PCR amplification products of mtDNA for analysis of 4977bp deletion in blood cells..... 66
- Figura 2** - Comparison of the frequency of mtDNA 4977bp deletion in blood cells from the three study groups..... 67

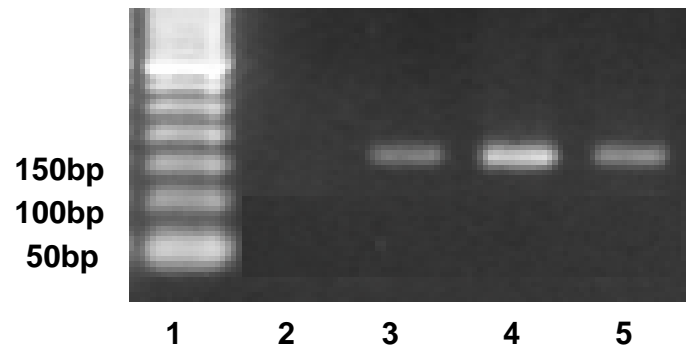


Fig 1. Agarose gel of PCR amplification products of mtDNA for analysis of 4977bp deletion in blood cells. Line 1 is a 50-bp ladder; line 2 is normal control (with no 160bp mutant fragment generated by deletion); lines 3-5 present the 160bp band, indicating the presence of mtDNA 4977bp deletion.

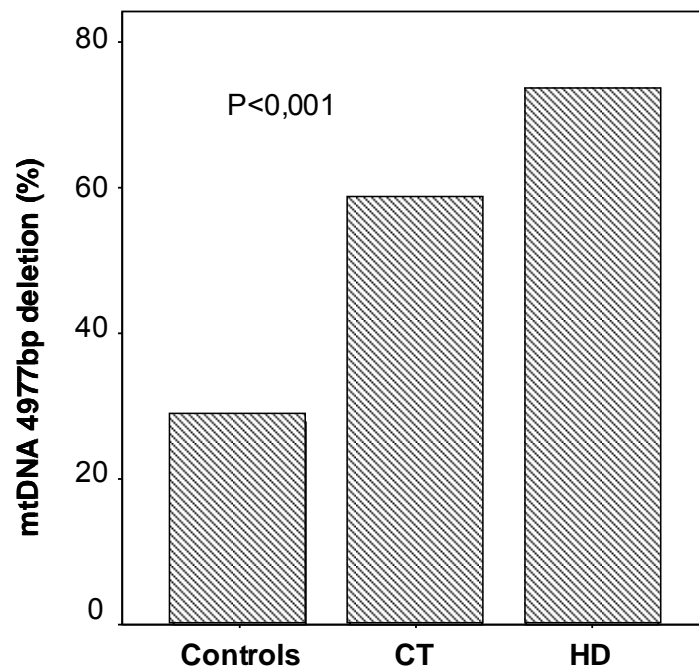


Fig 2. Comparison of the frequency of mtDNA 4977bp deletion in blood cells from the three study groups. Controls (healthy individuals), CT (patients with CRD in conservative treatment) and HD (patients with CRD undergoing hemodialysis). The p-value was obtained by the chi-squared test. Post-hoc comparisons showed controls vs. CT $p < 0.05$; controls vs. HD $p < 0.001$ and CT vs. HD $p < 0.05$.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CARTA AO EDITOR

Porto Alegre, January 26, 2006

Nephrology, Dialysis, Transplantation
Oxford Journals, Oxford University Press
Great Clarendon Street
Oxford, OX2 6DP
United Kingdom

Dear editor:

Please accept for consideration for publication the enclosed manuscript, titled “Prevalence of 4977bp deletion in mitochondrial DNA from patients with chronic renal disease receiving conservative treatment or hemodialysis in southern Brazil.” The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract form.

The contributions of individual authors are listed below:

- Liana Bertolin Rossato: primary author, participated in all phases of the study: conception, data collection, data analysis and writing.
- Ane Cláudia Fernandes Nunes: manuscript revision
- Maria Luiza Saraiva Pereira: assistance with standardizing PCR technique
- Claus Dummer: data collection and interpretation
- Vagner Milani: manuscript revision
- Daiana Benck Porsch: assistance with DNA extraction
- Elvino José Guardão Barros: all phases of study: conception, data collection, analysis and revision

Please address correspondence regarding this manuscript to

Liana Rossato
Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Hemodialysis Service
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – 2nd Floor
CEP 90035-003
Porto Alegre, RS – Brazil
Fax: + 55 51 2101-8121
Email: liana_rossato@yahoo.com.br

Sincerely,

Liana Rossato

APÊNDICE B – DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

We, the undersigned, formally declare that we have no affiliation, paid or unpaid, with any of the organizations identified in this paper, nor any personal interest in the outcome of the study.

Liana Bertolin Rossato

Ane Cláudia Fernandes Nunes

Maria Luiza Saraiva Pereira

Claus Dumme

Vagner Milani

Daiana Benck Porsch

Elvino José Guardão Barros

Porto Alegre, January 26, 2006