

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

**Avaliação da Genotoxicidade Através do Teste de
Micronúcleos em Pacientes Renais Crônicos**

Mestranda: Juliana Martino Roth
Orientador: Gilberto de Lima Garcias

Pelotas/RS
2005

Eu amo o pensamento, e não a inteligência
Eu amo o mergulho, e não a medalha
Eu amo a alma, e não a pessoa
Eu amo a corrida, e não a linha de chegada
Eu amo a luta, e não a vitória

Paulinho Moska

Agradecimentos

Este trabalho foi possível devido a colaboração de muitas pessoas.

Ao Prof. Dr. Gilberto Lima Garcias, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular pela sua orientação, profissionalismo e amizade.

A minha mãe, Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Martino Roth do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, pela co-orientação nas atividades laboratoriais e estímulo para a realização deste trabalho.

Aos pacientes, da Clínica de Doenças Renais e do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, que participaram anonimamente deste estudo.

A equipe de enfermagem da Clínica de Doenças Renais e do hospital da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, pelo apoio e contribuições para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Alípio Coelho e todos os colegas da Clínica de Doenças Renais, pelas oportunas contribuições para o presente estudo.

Aos estagiários, Letícia, Rossana, Tainá, Hermes, Juliane, Míriam e Aline, que fizeram as atividades laboratoriais e o trabalho de campo com profissionalismo e dedicação.

A minha família: Anderson, Alessa e Lívia pelo apoio e compreensão.

A minha irmã Daniela, pelo incentivo e ajuda.

Conteúdo

- I. Projeto de pesquisa
- II. Anexos
 - 1. Consentimento informado
 - 2. Questionário
 - 3. Ensaio para avaliação de micronúcleos
 - 4. Artigo científico

Índice

1. Introdução.....	06
2. Fundamentação Teórica.....	18
3. Modelo teórico.....	22
4. Objetivos.....	24
5. Justificativa.....	24
6. Importância.....	25
7. Material e Métodos.....	26
8. Cronograma.....	29
9. Orçamento.....	30
10. Referências Bibliográficas.....	31
11. Anexos I	
Consentimento informado.....	36
12. Anexo II	
Questionário de saúde pessoal.....	39
13. Anexo III	
Ensaio para avaliação de micronúcleos.....	48
14. Anexo IV	
Artigo científico.....	50

Avaliação da Genotoxicidade Através do Teste de Micronúcleos em Pacientes Renais Crônicos

1. Introdução:

Em 31 de dezembro de 1999, neste país havia 47.063 pacientes em diálise. Sessenta e quatro por cento estavam em diálise na região Sudeste e Sul. Noventa por cento dos pacientes (n= 42.355) estavam em hemodiálise, e o restante (n= 4.708), em diálise peritoneal (contínua, automatizada ou intermitente). De 1994 a 1999, a prevalência de pacientes em diálise aumentou em média 12,6% ao ano. Nossas taxas de prevalência da insuficiência renal crônica (IRC) terminal tratada são cerca de 4 vezes menores que nos EUA e Japão e metade das taxas da Itália, França e Alemanha (Ajzen *et al.* 2002).

Segundo o Sistema de Informações sobre Atenção Básica, a prevalência de pacientes em diálise no Sistema Único de Saúde (SUS), em 2001, foi de 38 casos por 100 mil habitantes. As taxas são mais elevadas entre os homens e aumentam conforme a idade, passando de 8 por 100 mil habitantes, para aqueles com menos de 30 anos, para 132, entre os que têm 60 anos ou mais (<http://www.datasus.gov.br>).

No Brasil, segundo censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) em 2002, do total de pacientes mantidos em terapia de substituição renal, 54.523 (89,6%) permaneciam em hemodiálise. Apenas 7,61%, do total, não eram mantidos diretamente pelo Sistema Único de Saúde. De 1999 à 2002 houve um crescimento de 27,7% no número de clientes. A IRC é uma doença de alta morbidade e mortalidade. A incidência e a prevalência de pacientes com IRC terminal contínua tem aumentado progressivamente no Brasil e em todo mundo (<http://www.sbn.org.br>).

Barros *et al.* (1999) conceitua a IRC como uma perda progressiva da função renal de depuração, ou seja, da filtração glomerular. Independente da causa a IRC resulta da perda irreversível de grande número de néfrons funcionantes (Guyton *et al.* 2002). A IRC está associada com a síndrome multifatorial imuno-inflamatória, que ocorre precocemente durante a doença, piorando com o seu progresso (Kan *et al.*,

2002). Como consequência haverá elevação das concentrações séricas ou plasmáticas de todos os catabólitos, derivados principalmente do metabolismo protéico, tipificados pelo aumento da uréia (Valor Normal [VN]: 15 a 30 mg/dl) e da creatinina (VN: 0,8 a 1,2 mg/dl) (Ajzen *et al.* 2002). Os sintomas dessa síndrome começam a manifestar-se comprometendo vários sistemas e órgãos. Ocasionalmente a sintomatologia é variável e, em geral, progressiva. Alguns sinais e sintomas apresentados são: edema, hipertensão arterial, fraqueza, fadiga, náuseas, anorexia, prurido, impotência sexual, déficit de atenção, confusão, obnubilação, coma, entre outros (Barros *et al.* 1999).

Na fase inicial da IRC, o paciente é mantido em tratamento conservador, com restrição alimentar e uso de medicação anti-hipertensiva, entre outras medidas, com o objetivo de retardar o início da terapia dialítica (Fermi, 2003). Com a progressão, a doença evolui para sua fase terminal, independente da agressão inicial que a provocou, e que a velocidade de progressão de insuficiência renal varia de acordo com a doença de base e as características clínicas. A doença evolui para a fase terminal, tornando-se necessária a instituição de diálise terapêutica (Barros *et al.* 1999).

São encaminhados para a diálise pacientes com IRC terminal, que apresentem sintomas de uremia. Não existe um valor exato de uréia e creatinina que determine o início do programa crônico de diálise, entretanto, pode-se utilizar a média aritmética dos *clearances* de uréia e creatinina. Existem contra-indicações relativas à terapia dialítica crônica, entre elas a doença de Alzheimer, demência por multinfartos, síndrome hepatorenal, cirrose avançada com encefalopatia e doenças malignas avançadas (Ajzen *et al.* 2002).

Para Cintra *et al.* (2003), os fatores desencadeantes de IRC são a glomerulonefrite crônica, pielonefrite, hipertensão não controlada, lesões hereditárias, distúrbios vasculares, obstrução do trato urinário, diabetes, infecções, agentes tóxicos, ambientais e ocupacionais.

Em 1996/97, as principais doenças reportadas como causa de IRC terminal foram hipertensão arterial (24%), glomerulonefrite (24%) e diabetes mellitus (17%). Entretanto, a validade desses diagnósticos pode ser questionada devido à não comprovação histológica e a falta de seguimento anterior ao estágio terminal na maioria desses pacientes. Estudos epidemiológicos estabeleceram com clareza a relação entre a hipertensão arterial (sistólica e diastólica) e a insuficiência renal. A

prevalência de hipertensão arterial em adultos (18-50 anos) é de 18% em nosso meio: muitos não sabem que são hipertensos; entre os que sabem, estima-se que menos de 30% sejam tratados. Portanto, há grande potencial para que nos próximos anos a hipertensão arterial continue a ser causa da IRC (Ajzen *et al.* 2002).

Barros *et al.* (1999) entre as glomerulopatias, a glomeruloesclerose segmentar e focal e a glomerulonefrite membranoproliferativa são as que mais frequentemente conduzem a IRC. Destaque-se que a associação desta última com agentes infecciosos (estreptococos, vírus das hepatites C e B, *S. mansoni*, etc) faz com esta continue sendo um tipo histológico comum em nosso meio, ao contrário do que ocorre em outros países. Entre as glomerulopatias associadas a doença renal secundária pode-se citar o lúpus eritematoso sistêmico, granulomatose de Wegener e síndrome de Goodpasture; há ainda uma série de possíveis associações causais de relevância não bem definida entre glomerulonefrites/nefrites intersticiais e inúmeros agentes infecciosos, ambientais e de natureza genética.

Em dezembro de 1999, havia 7.878 (16,7%) pacientes diabéticos em diálise no Brasil. Nos EUA, mais de 40% dos pacientes novos em diálise têm nefropatia diabética (Ajzen *et al.* 2002). Em nossa realidade embora o número de pacientes diabéticos em diálise, tenha aumentado, há muitos deles que morrem de outras causas sem atingir a IRC terminal.

Estão disponíveis atualmente duas técnicas de diálise: hemodiálise (HD) e a diálise peritoneal (DP). Ambos os métodos utilizam um processo relativamente simples realizados pelas membranas celulares, a difusão, e o outro um pouco mais sofisticado, próprio dos capilares, a ultrafiltração. O princípio da DP é baseado no fato do peritônio normal comportar-se como uma membrana dialisante, que regula o equilíbrio hidroeletrólítico entre o meio interno e o líquido intraperitoneal. Portanto, diálise é um processo físico-químico pelo qual duas soluções separadas por uma membrana semipermeável influenciam na composição uma da outra.

Segundo Daugirdas *et al.* (2003) a HD é o processo se dá através de um sistema extracorpóreo, onde acontece a remoção de resíduos e de eletrólitos e líquidos excessivos do sangue para tratar a falência renal aguda ou crônica. Os mecanismos de transporte nesses processos são a difusão e a ultrafiltração (convecção). Para Riella (1996) e Barros *et al.* (1999), na HD, o sangue obtido de um acesso vascular (cateter venoso, fistulas artério-venosas ou próteses) é impulsionado

por uma bomba para o sistema extracorpóreo onde se encontra um filtro, através de uma membrana semipermeável, onde ocorrem as trocas entre o sangue e o banho de diálise (dialisato).

O dialisato é composto por sódio 135 - 145 mEq/l, potássio 1.0 – 3.0 mEq/l, bicarbonato 30 – 38 mEq/l, cálcio 2.5 – 3.5 mEq/l, magnésio 0.5 – 1.0 mEq/l, cloro 100 – 124 mEq/l, acetato 2.0 – 4.0 mEq/l. Os equipamentos de proporção permitem a variação de sódio durante a diálise de acordo com a necessidade do paciente. É importante ressaltar que os pacientes são expostos a aproximadamente 150 litros de água por sessão de hemodiálise. Essa água deve ser tratada preferencialmente com osmose reversa e sua qualidade monitorada continuamente. A presença de compostos orgânicos (bactérias e pirogênicos) e inorgânicos (alumínio, chumbo, flúor, cloramina, etc.) podem ser causa de sintomas durante o procedimento ou induzir alterações metabólicas (Ajzen *et al.* 2002).

Nas décadas de sessenta e setenta o procedimento da diálise era considerado de alto risco para os pacientes, mas atualmente os equipamentos de diálise possuem vários sensores (pressão, temperatura, presença de ar, condutividade do dialisato, volume do ultrafiltrado) que tornam o procedimento seguro e eficaz. O dialisador (filtro) é composto por dois compartimentos, um por onde circula o sangue e outro por onde circula o dialisato. De acordo com Bezerra *et al.* (2002), existem vários tipos de membranas: as de celulose, de celulose modificada e as sintéticas, variam de acordo a exigência de biocompatibilidade e permeabilidade. O tamanho do dialisador varia de acordo com a superfície de troca e deve-se usar o dialisador com a maior área tolerada (www.uff.br/nepae/hemodiálise.doc).

Segundo Daugirdas *et al.* (2003) e Nuhad *et al.* (2001) durante a HD utilizando membranas feitas de celulose não-modificada, os grupos livres de hidroxila na superfície da membrana ativam o sistema de complemento no sangue que corre pelo dialisador. E o reuso do dialisador de celulose tem uma baixa capacidade de ativação do complemento. Com a técnica de reuso que utiliza e adição de formol remove a camada protéica da membrana, eliminando o potencial benéfico do reuso, mas o reuso com ácido peracético/peróxido de hidrogênio mantém a camada protéica, melhorando a biocompatibilidade desta membrana (www.uptupdate.com).

Os passos para o reprocessamento do dialisador são o enxágüe, a limpeza, a medida do desempenho, a desinfecção/esterilização e a remoção dos germicidas (hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, gluteraldeído e formol). O dialisador pode ser reutilizado doze vezes conforme a portaria nº 82, vigente pelo Ministério da Saúde, foi publicada e entrou em vigor em 03 de janeiro de 2000, revogando a portaria GM/MS nº, de 11 de novembro de 1996, estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços diálise.

A HD usada para compensar a função renal deficiente em paciente urêmicos pode ser danosa para as células sangüíneas, e há um consenso que este tipo de paciente tem um alto risco para o estresse oxidativo e em conseqüências danos no DNA. Markert *et al.* (1988) sugerem que em pacientes mantidos em tratamento de HD, o sangue interage com membranas biocompatíveis, onde os neutrófilos circulantes reagem com o oxigênio, incluindo anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, levando a um aumento no estado inflamatório. Ross *et al.* (1997) sugerem que provavelmente o mecanismo da diálise atua sobre as enzimas relacionadas com o glutation, removendo substratos e fatores atuantes.

Na DP, a introdução e manutenção de um corpo estranho (cateter flexível) no organismo e a distensão da cavidade abdominal, periódica ou permanente pelo líquido de diálise (por vezes com alta osmolaridade) e a utilização do peritônio para o transporte de água e solutos podem gerar complicações infecciosas, mecânicas e metabólicas (Riella, 1996). Ha *et al.* (2000) demonstraram *in vitro* que as soluções de DP com pH baixo ou altos níveis de produtos de glicose ou ambos, promovem no peritônio humano, morte das células mesoteliais e dano no DNA.

Wieczowska *et al.* (2001), referem que as causas potenciais da biocompatibilidade da solução de diálise peritoneal são os produtos degradantes de glicose e pH baixo. Realizaram cultura de células mesoteliais de rato *in vitro* e concluiu que a reação inflamatória intraperitoneal induzida pela diálise, como também a fibrose do peritônio diminui, quando utilizada solução de diálise com poucos produtos de glicose e pH fisiológico. Gotloib *et al.* (2003) utilizou altas concentrações de glicose em mesotélio de ratos, induzindo a peroxidação atípica, dano no DNA seguido de morte celular (mecanismo biológico).

No processo da diálise, uma das possíveis conseqüências é o estresse oxidativo, que pode resultar em dano no DNA, incluindo mutação de pontos por oxidação de bases, quebras de cadeia simples e dupla, instabilidade genômica e inibição do mecanismo de reparo (Stopper *et al.*, 2004; Tarng *et al.*, 2002). Estas quebras podem levar a formação de fragmentos ou cromossomos inteiros que não são corretamente distribuídos durante o processo de mitose, e na próxima interfase essas estruturas podem ser detectadas sob a forma de micronúcleos (MN) (Stopper *et al.*, 1999). As alterações no DNA podem induzir ao mecanismo de carcinogênese, bem com está relacionada com o processo de envelhecimento, doenças neurodegenerativas, diabetes e arteroesclerose (Stopper *et al.*, 2004).

Embora o estresse oxidativo possa ser uma conseqüência do processo da diálise, o dano no DNA, não deve estar envolvido com a etiologia da doença renal crônica. Mas, assim como as alterações no DNA, os problemas no mecanismo de reparo, prevalentes nos pacientes com doença renal crônica terminal em tratamento dialítico constante, podem contribuir para o desenvolvimento de muitas patologias relacionadas aos radicais livres de oxigênio, como a aterosclerose, doenças cardíacas, apoplexia e câncer (Anderson *et al.*, 1998).

Segundo Stopper *et al.* (2001) há um risco elevado para o desenvolvimento de câncer no paciente renal crônico. Este aumento na formação de tumores pode estar relacionado com falhas no mecanismo de reparo do DNA, visto que a capacidade de reparar o DNA alterado é a maior defesa contra o câncer. Estudos mostram que uma redução do mecanismo de reparo por estimulação ultravioleta (UV) em linfócitos isolados de pacientes renais crônicos, está relacionada com um número elevado de células com micronúcleos, que é uma conseqüência da falha do mecanismo de reparo do DNA. Conforme Maisonneuve *et al* (1999) o risco de câncer está aumentado em pacientes com IRC e os tipos de câncer são semelhantes aos encontrados nos transplantados.

A exposição a agentes físicos e químicos, nocivos, pode causar alterações no DNA e nos cromossomos, as quais potencialmente podem levar ao desenvolvimento, à longo prazo, de sérias conseqüências para a saúde. As conseqüências mais dramáticas são o câncer, as anomalias congênitas e as doenças genéticas (Crosby, 1998). A exposição crônica a substâncias tóxicas é considerada carcinogênica desde 1775, quando o médico inglês Percival Pott descobriu o aparecimento de câncer

escrotal em limpadores de chaminés (Arnaiz, 1997). Sabe-se que saúde dos indivíduos é influenciada por fatores hereditários, nutricionais e ambientais. Atualmente tem havido um grande esforço no mundo todo para determinar o impacto dos fatores ambientais, genéticos e do estilo de vida na estabilidade do genoma das populações humanas (Fenech, 2000).

O efeito mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos em populações humanas expostas no ambiente de trabalho, acidentalmente, por tratamento médico ou por seu estilo de vida, tem aumentado consideravelmente. Nas rotinas hospitalares muitos agentes mutagênicos são utilizados para a manutenção ou diagnósticos e tratamentos de pacientes. Para a maioria dos pacientes é óbvio o benefício. Entretanto, para alguns, esse benefício é apenas parcial (Maluf e Erdtmann, 2000).

Uma maneira de se estudar os efeitos genotóxicos em uma população, é conduzir estudos de monitoramento, utilizando parâmetros biológicos pertinentes, com manifestação à curto prazo, com os ensaios de micronúcleos, que podem identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos resultantes da exposição. A informação obtida pode ser usada como um aviso precoce do risco potencial para desenvolver à longo prazo, problemas de saúde (AU, 1991).

As alterações no material genético podem ser identificadas através de testes de mutagenicidade. Atualmente existe um grande número de testes, com modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo que o organismo de prova varia desde vírus, bactérias, fungos, plantas e insetos a mamíferos, incluindo o homem (De Flora, 1998). Dentre os testes que analisam mutações cromossômicas em mamíferos, destaca-se o teste de micronúcleos, que é um teste rápido e simples, e detecta quebras e perdas cromossômicas (Hayashi *et al.*, 1994).

Uma alta frequência de células com micronúcleos tem sido encontrada por alguns pesquisadores em pacientes renais crônicos que fazem hemodiálise por muito tempo (Stopper *et al.* 1999). Kan *et al.* (2002) realizaram uma avaliação da genotoxicidade através do ensaio cometa, em pacientes renais crônicos em programa de HD, encontraram um aumento significativo de dano no DNA (429 e 572) em comparação ao grupo controle (251 e 239) ($P < 0.001$). Esses resultados concordam com os de outros estudos, como: o de Stopper *et al.*, (2001) que também através do ensaio cometa, encontraram um aumento significativo de dano no DNA nos linfócitos de 23 pacientes com doença renal crônica. Eles sugerem que há uma

relação entre o tempo de tratamento hemodialítico e o dano causado no DNA destes pacientes.

A padronização de testes rápidos, realizados *in vitro*, para detecção de mutagenicidade, clastogenicidade, recombinogenicidade, conversão gênica, alterações e reparo do DNA, tem levado à descoberta de numerosas substâncias químicas genotoxicamente ativas e potencialmente carcinogênicas no ambiente. No entanto, os resultados obtidos de testes realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para tecidos humanos, os quais possuem sistemas específicos de ativação e inativação metabólica para substâncias pré-carcinogênicas. Deve-se, ainda, considerar que as particularidades dos mecanismos de absorção, acumulação e eliminação de xenobióticos e o grande número de possíveis interações entre as centenas ou milhares de compostos, os quais poderão levar a efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos *in vivo*, não podem ser simulados em um teste *in vitro*. Estes fatos levam a evidências de que o desenvolvimento desta área do conhecimento poderá ocorrer, principalmente pela padronização de testes que sejam aplicáveis diretamente ao homem (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

A utilização do teste do micronúcleo para detectar e quantificar a ação genotóxica, de carcinogênicos e mutagênicos foi bem estabelecida em vários sistemas, tanto *in vitro* como *in vivo*. A sensibilidade do teste do micronúcleo é comparável à da análise de quebras e trocas cromatídicas (Kliesch e Adler, 1980). Sendo que o ensaio do micronúcleo apresenta uma grande vantagem sobre as demais técnicas, a de não requerer cultivo celular, bem como preparações metafásicas (Titenko-Holland *et al.*, 1998).

Os micronúcleos –um ou mais por célula – são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos que se atrasam, em relação aos demais, em sua migração para os pólos do fuso na anáfase, sendo, portanto, excluídos do novo núcleo formado na telófase. Estes micronúcleos são corpúsculos contendo DNA Feulgen-positivo no citoplasma, sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal (Titenko-Holland *et al.*, 1994; Tussel *et al.*, 1995). Portanto, a formação de micronúcleos é decorrente das alterações cromossômicas, que de acordo com Fenech (2000) são manifestações e conseqüências diretas do dano à nível de DNA, por exemplo, quebras cromossômicas podem resultar de uma quebra na dupla hélice de DNA não reparada, e rearranjos cromossômicos podem acontecer

como consequência de um reparo errado na duas fitas que sofreram quebras, do DNA.

A formação do micronúcleo requer, pelo menos, uma divisão da célula depois que a quebra cromossômica ou cromatídica tenha ocorrido. Então, os micronúcleos observados nas células da superfície epitelial surgem em populações de células da camada basal em divisão e, antes que as células se tornem esfoliadas, migram desta camada para a superfície do epitélio (Rabello-Gay *et al.*, 1991).

O teste do micronúcleo pode ser *feito in vitro* ou *in vivo*. O teste *in vivo* oferece vantagens, pois não requer cultivo celular e pode ser usado para avaliar os efeitos genotóxicos em todos os tecidos humanos dos quais possa ser obtidas células esfoliadas, como células da mucosa bucal e nasal, esôfago, brônquios, bexiga urinária e cérvix.

Alguns testes para genotoxicidade têm seus resultados aumentados em função de fatores ambientais, dieta, estilo de vida, idade e tempo de exposição dos indivíduos avaliados. Portanto, com a finalidade de incrementar a relevância destes testes é de suma importância avaliar quais fatores contribuem significativamente na variação encontrada entre os indivíduos estudados (Fenech *et al.*, 2000).

A integridade genética de populações é uma questão que vem sendo tratada de maneira crescente, devido às atividades industriais que resultam em exposição a agentes tóxicos, químicos e físicos. Nas últimas décadas a quantidade de produtos químicos produzidos pelo homem aumentou muito. E técnicas para detectar alterações nas células dos indivíduos são importantes (Maluf *et al.*, 2000; Burkart e Jung, 1998).

As alterações cromossômicas ocorrem espontaneamente na natureza e são induzidas por fatores ambientais. A frequência dessas alterações pode aumentar em um grupo específico, particularmente quando está exposto a agentes físicos ou químicos, tais como radiações ionizantes, certos pesticidas, benzeno, determinadas drogas, etc. (Santos-Mello e Cavalcante, 1992).

Além dos fatores ocupacionais ou devido a tratamentos médicos, contribuem para o aumento de alterações encontradas em indivíduos avaliados em testes de genotoxicidade, fatores como idade, sexo, raça, hábito alcoólico, fumo, tempo de exposição (tratamento), dieta e fatores ambientais em geral (Fenech *et al.*, 1994).

Muitos estudos sobre aneuploidias e idade têm demonstrado um aumento significativo na perda de cromossomos tanto em homens como em mulheres, relacionado ao aumento da idade (Au, 1991; Hando *et al.*, 1994; Richard *et al.*, 1994). Fenech *et al.* (1997) observaram que há uma correlação positiva entre a frequência de micronúcleos e a idade, tanto em homens como em mulheres, sendo nas mulheres significativamente mais alta do que nos homens. Esse trabalho concorda com o estudo de Zijno *et al.* (1996), que sugerem estar, esse evento, relacionado à perda do cromossomo X nas mulheres, devido a problemas de segregação ligados a perdas e não disjunção como principais mecanismos.

Bukvic *et al.* (2001) detectaram, usando o teste de micronúcleos com corantes fluorescentes, que a perda do cromossomo Y em homens é seis vezes maior em homens idosos do que em homens jovens. Esse evento é similar em mulheres, mas a incidência de aneuploidias do X em mulheres idosas é ainda maior do que em homens. Nas mulheres idosas a perda do X é doze vezes maior do que em mulheres jovens.

O “Grupo de Estudo Colaborativo para o Teste de Micronúcleos” demonstrou que pode haver diferenças entre os sexos quanto à frequência de micronúcleos, induzidas por diferentes drogas em eritrócitos de camundongos. Essas diferenças são específicas, ou seja, cada droga testada comporta-se de maneira diferente, dependendo dos mecanismos de interação das mesmas com o organismo. Portanto, o sexo é um fator que deve ser considerado na escolha dos indivíduos controle (Maluf *et al.*, 2000).

Outros estudos têm detectado uma associação entre sexo e aneuploidias. O cromossomo perdido mais frequentemente é o Y em homens e o X nas mulheres. Os autossomas também podem ser perdidos com a mesma frequência que os sexuais, mas sua perda pode levar a morte celular, pois possuem genes importantes para a sobrevivência da célula. Tem sido evidente o fato de que em mulheres a perda do cromossomo sexual ser bem maior do que em homens. Em homens jovens a perda do cromossomo Y ocorre em 1,6% das células e em homens idosos, em 10% delas, enquanto nas mulheres jovens a perda do X ocorre em 1,7% das células e nas mulheres idosas em 22% (Bukvic *et al.*, 2001).

Butler (1981) citado por Maluf *et al.* (2000), determinaram a frequência de trocas de cromátides irmãs entre diferentes grupos étnicos. Numa primeira análise

não foi encontrada diferença na frequência de trocas entre cromátides irmãs dos diferentes grupos estudados. Porém, mais tarde, uma análise estatística mais detalhada, pode detectar heterogeneidade entre os quatro grupos étnicos estudados. Estudos mais conclusivos devem ser realizados para elucidar a questão do fator étnico.

Evidências epidemiológicas têm demonstrado que o hábito de fumar causa uma variedade de problemas ao homem, podendo alterar a frequência de mutações. Vários estudos têm relacionado o fumo com o carcinoma bronquial (Maluf, *et al.*, 2000). Em muitas partes do mundo, 30-40% das neoplasias humanas estão relacionadas ao uso do tabaco (Weisburger 1998; Umadevi *et al.*, 2003).

O cigarro contém, aproximadamente, 3500 substâncias diferentes, muitas das quais são mutagênicas, como benzopireno, o óxido de etileno e o alcatrão. Mas, as mais abundantes são a nicotina e o monóxido de carbono e são, provavelmente, as que causam os piores efeitos (Bishop *et al.*, 1997).

Muitos trabalhos têm demonstrado um aumento na frequência de micronúcleos em indivíduos fumantes quando comparados com não fumantes (Stich e Rosin, 1983; Au, 1991; Anderson *et al.*, 1994; Cerqueira, 1996; Bishop *et al.*, 1997). Entretanto, Santos-Mello *et al.* (1996) não encontraram aumento significativo na frequência de aberrações cromossômicas entre fumantes, concordando com os achados de Stich e Rosin (1984).

Várias bebidas alcoólicas têm sido descritas como contendo substâncias mutagênicas, mas as evidências indicam que a atividade mutagênica associada a estes produtos não vem do etanol, mas preferencialmente de outros componentes derivados dos processos envolvidos na produção de bebidas (Maluf *et al.*, 2000). O hábito de beber bebidas alcoólicas, especialmente licores fortes, aumenta o risco de câncer na cavidade oral e especialmente do esôfago. O mecanismo pelo qual isso ocorre ainda requer mais estudos, entretanto, há evidências de que o acetaldeído está envolvido (Weisburg 1998). O álcool é reconhecido, há muito tempo, como uma substância teratogênica, causando a síndrome do álcool-fetal, que, além de outras alterações, leva à microcefalia e ao retardo mental. Porém, as evidências da mutagenicidade do álcool são limitadas a certos sistemas de testes ou a organismos testados. O etanol, geralmente, não é mutagênico em *Salmonella*. Em células de mamíferos *in vitro*, o etanol tem causado aberrações cromossômicas e trocas entre

cromátides irmãs, mas *in vivo* induz uma variedade de efeitos genéticos, mutação dominante letal, trocas entre cromátides irmãs e micronúcleos (Bishop *et al.*, 1997).

Este estudo pretende avaliar a genotoxicidade dos tratamentos dialíticos, hemodiálise e diálise peritoneal através do teste de micronúcleos nos pacientes renais crônicos do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Pelotas.

E muito embora se saiba que alguns resultados de investigações sistemáticas sobre as conseqüências no material genético de exposições à substâncias mutagênicas não podem ser generalizadas, este trabalho propõe aplicar a metodologia apropriada para demonstrar a prioridade e urgência em se tomar medidas que regulem o uso e a exposição humana à substâncias prejudiciais a sua saúde.

2. Fundamentação Teórica

2.1 Critérios de inclusão

Estudos com os doentes renais crônico ou mamíferos, *in vivo ou in vitro*, que analisaram a instabilidade do DNA, através de biomarcadores.

2.2 Critérios de exclusão

Estudos que focassem outros problemas de saúde dos doentes renais crônicos, como: osteodistrofia, intoxicação por alumínio, anemia, HIV/AIDS, diabetes, amiloidose, etc.

2.3 Bases eletrônicas

Realizou-se pesquisa em várias fontes de dados, com o objetivo de identificar estudos relevantes sobre o tema “doença renal crônica e dano no DNA”.

- Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>)
- Web of Science (<http://www.periodicos.capes.gov.br>)
- Lilacs (<http://www.bireme.br>)

Além da pesquisa em bases eletrônicas foram obtidas informações nos sites do Ministério da Saúde, Sociedade Brasileira de Nefrologia, Organização Mundial da Saúde, e utilizou-se referências cruzadas.

2.4 Estratégias de busca

Buscando identificar trabalhos importantes que subsidiassem o presente estudo, diversas estratégias de busca foram utilizadas. As buscas foram feitas 20 anos para trás.

2.5 Descritores utilizados

1) Micronucleus x renal failure

renal insufficiency

renal disease

hemodialysis

patients and hemodialysis

peritoneal dialysis

exfoliated buccal and patients

2) Genomic damage x renal failure

renal insufficiency

renal disease

hemodialysis

peritoneal dialysis

2.6 Artigos identificados como relevantes

A tabela abaixo mostra os artigos obtidos até o momento.

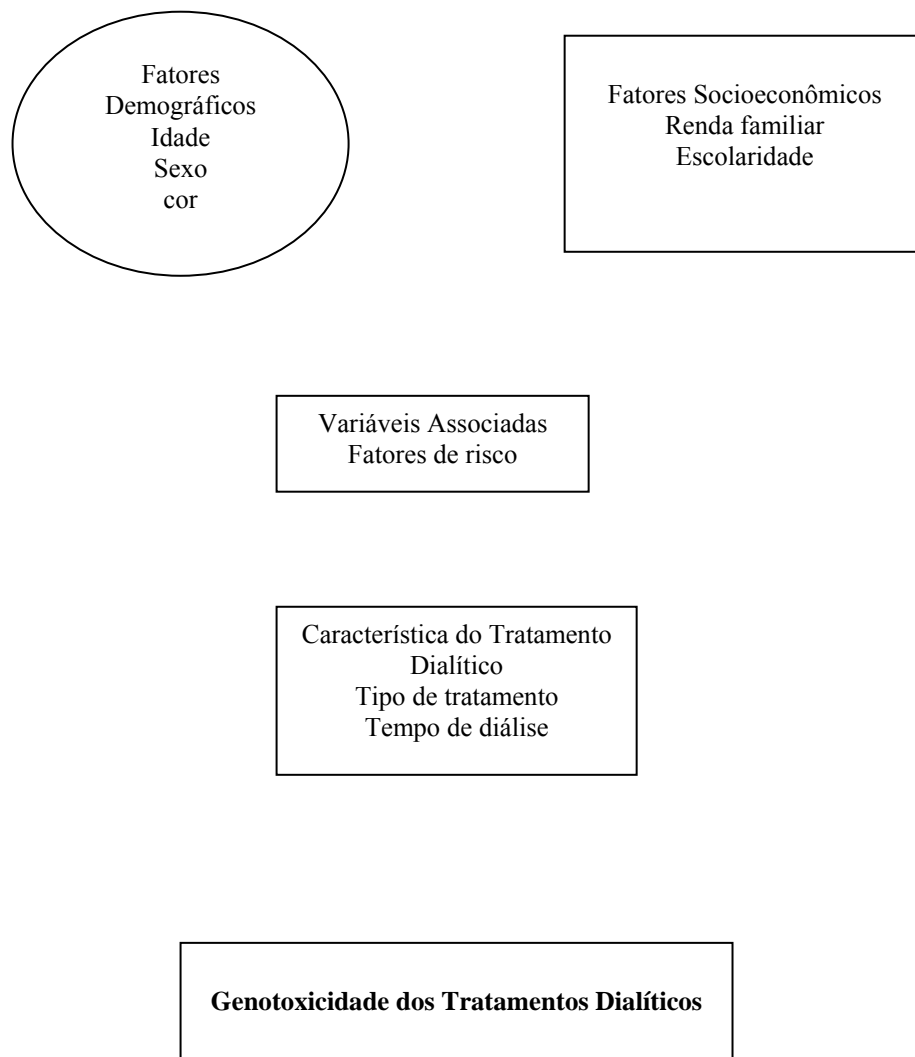
Autor/Local/Ano	Tipo de estudo	População	Resultados	Obs./Limites
Stopper et al. AJKD Würzburg, Alemanha, 1999	Caso-controle	Casos: 19 pacientes com IRC sem HD, 16 pacientes com IRC em HD. Controles: 23 pessoas saudáveis	Aumento da frequência de MN associado ao maior tempo de HD e a IRC avançada quando comparadas com o grupo controle (p<0,005)	MN de linfócitos periféricos
Stopper, et al. AJKD Würzburg, Alemanha, 2001	Caso-controle	Casos: 23 pré diálise (PD), 26 hemodiálise (HD), 15 hemodiafiltração (HDF) Controle: 21 pessoas saudáveis	Teve aumento de dano no DNA associado ao tempo de HD, (>10anos) e PD nível de creatinina >6 mg/dl (p<0,001). HDF não foi sig, menos 10anos. Média de células todos grupos comparado com controle, todos tiveram	Ensaio Cometa. Grupo controle não refere se foi pareado. Número de células foi o min. 50 por indivíduo

			elevado dano no DNA (p<0,001).	
Ha et al Perit Dial Int. Korea, 2000	Experimental	Células mesoteliais de peritônio Humano (CMPH)	<i>In vitro</i> Solução de DP com pH baixo, ou alto nível de produtos degradantes de glicose, ou ambos, promoveram a morte das CMPH e dano no DNA, e solução de DP com alta osmolaridade inibiu a proliferação celular. Soluções com pH neutro, amino-ácidos e baixo nível de produtos de glicose, pareceu mais biocompatível que as soluções convencionais.	Ensaio Cometa Não refere a diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa.
Wieczorowska <i>et al</i> Perit Dial Int. Polônia, 2001.	Experimental	DP em ratos	Usando a solução de DP com pH fisiológico e baixo nível de produtos degradantes de glicose, houve uma diminuição do processo inflamatório intraperitoneal e fibrosi peritoneal (p<0,005), quando comparada com a solução de DP com baixo pH e alto nível de produtos degradantes de glicose.	Cultura de células e estudo morfológico do peritônio.
Gotloib <i>et al.</i> Free Radic Biol Med Israel, 2003	Experimental	DP em ratos	Exposição de alta concentração de glicose-melhorada, por 2h <i>in vivo</i> aceleração do ciclo de vida das céls, 30 dias cultura em poucas céls, com formas nucleares e mitoses	Cultura de células mesoteliais de ratos Nº Amostra?

			atípicas devido ao dano do DNA	
Tarng, et al J Am Soc Nephrol Taiwan, 2002	Caso-controle	Casos: 22 doentes renais crônicos sem diálise, 42 doentes renais crônicos em diálise peritoneal. Controles: 24 pessoas saudáveis.	A média de 8-HO-dG mais alta foi encontrada nos pacientes DP, seguidos pelos pacientes renais crônicos e pelos controles (p<0,001).	Avaliaram o dano oxidativo no DNA de leucócitos de sangue periférico, quantificando 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-HO-dG), através de método eletro-químico
Kan <i>et al.</i> Mutat Res. Turkey, 2002	Caso-controle	Casos: 36 pacientes em HD Controles: 36 pessoas pareadas por sexo, idade e fumo.	Aumento significativo de quebras no DNA dos pacientes renais crônicos em hemodiálise, sem correlação positiva quanto ao tempo de tratamento quando comparados com o controle (p<0,001).	Ensaio Cometa
Liu <i>et al.</i> Nephrol Dial Transplant. Taiwan, 2001	Caso-controle	Casos: 125pacientes HD, 37 em DP Controles: 236 pessoas saudáveis	Aumento significativo de deleções de 4.977 bp no DNA mitocondrial dos pacientes renais crônicos em relação aos controles, correlação positiva com o aumento da idade (p<0,005).	Deleções do DNA mitocondrial de folículo capilar através de polimerase chain reaction (PCR)
Ishibashi <i>et al.</i> Perit Dial Int Japan, 2001	Experimental	Cultura de células mesoteliais de 10 pacientes longo tempo DP, 3 pacientes antes do início da DPe 5 pacientes não urêmicos	Observaram 8-HO-dG nas células mesoteliais peritoneal de pacientes que estavam iniciando a DP (3-5 meses), porém, em maior número nos pacientes de longo tempo de DP, usando alta dose de glicose no dialisato peritoneal	<i>In vitro</i> DNA mitocondrial Não informa o valor de p

3. Modelo teórico

Figura I – Modelo Teórico para Avaliação da Genotoxicidade através do Teste de Micronúcleos em Pacientes Renais Crônicos.



3.1 Descrição do modelo teórico

O modelo teórico foi construído com base na literatura e leva em conta a relação hierárquica entre as variáveis.

No primeiro nível encontram-se os fatores demográficos e os socioeconômicos. Essas variáveis podem sofrer influência de outras, do mesmo nível, e afetar as dos próximos níveis ou agir diretamente sobre o desfecho.

No segundo nível estão as variáveis associadas e os fatores de risco, representados pelos fatores ocupacionais, tratamentos médicos, idade, sexo, raça, hábito alcoólico, fumo, tempo de exposição ao tratamento, dieta e fatores ambientais, contribuem para o aumento de alterações encontradas em indivíduos avaliados em teste de genotoxicidade.

No terceiro nível encontram-se as características do tipo de tratamento dialítico, duração, quantas vezes por semana, tempo (anos), nível de creatinina, doença de base, que podem determinar diretamente o desfecho, genotoxicidade dos tratamentos diáliticos nos pacientes renais crônicos.

4. Objetivos:

4.1 Geral

- Este estudo tem por objetivo comparar a frequência de micronúcleos e outras alterações, como células binucleadas e com núcleos ligados, entre as células de pacientes com doença renal crônica, em tratamento hemodialítico e diálise peritoneal e dois grupos controle, visando detectar se há ou não efeito genotóxico relacionado com esses tratamentos.

4.2 Específicos

- Comparar os dois tipos de tratamento, a hemodiálise e a diálise peritoneal, com os grupos controle;

- Avaliar a influência de outros fatores, como: idade, sexo, tempo de tratamento, renda familiar, nível de creatinina, uso de fumo e bebidas alcoólicas na frequência de células com micronúcleos;

- Intervir, se for o caso, no sentido de orientar e buscar otimizar a terapia para reduzir o dano no DNA.

5. Justificativa

Com o avanço das técnicas de diálise, a reabilitação e a alta morbidade estão se tornando sérios problemas para os pacientes com insuficiência renal crônica (IRC). Muitas complicações crônicas podem ser encontradas no doente renal crônico, induzidas por substituição incompleta da função renal ou pela natureza da doença primária, ou ainda por exposição aos produtos químicos e infectantes, bem como o uso continuado das máquinas para hemodiálise, estes problemas clínicos são: cardiopatia, doença vascular periférica, intoxicação por alumínio, amiloidose, imunodepressão, doença cística adquirida, neoplasia e infecções virais e bacterianas. Sendo que, a anemia e a osteodistrofia renal estão entre as complicações metabólicas mais importantes e intensamente estudadas. Tem se observado, elevadas frequências de micronúcleos em grupos semelhantes de pacientes, expostos a agentes genotóxicos. E concomitantemente, um aumento de anomalias cromossômicas

pode ser observado em pessoas expostas a esses agentes. Essas alterações podem causar distúrbios na proliferação celular e na síntese de DNA, *in vivo*, que podem ser responsáveis por certos tipos de câncer e até a morte. Indivíduos que estão continuamente expostos a esses agentes precisam ser avaliados e monitorados, para se estabelecer condutas apropriadas e otimizar o tratamento realizado.

6. Importância

Considerando que a exposição a agentes genotóxicos pode causar alterações genéticas em células germinais levando a problemas reprodutivos (estima-se que 50% de perdas fetais, 30% dos retardos mentais, 20% dos defeitos congênitos e 2% da infertilidade em homens, estejam associados com anomalias cromossômicas) e a centenas de doenças humanas que são reconhecidamente determinadas por mutações gênicas (Keshava *et al.*, 1999), e que uma das conseqüências da doença renal crônica é o elevado risco para o câncer (Stopper *et al.*, 2001), as avaliações de genotoxicidade constituem uma forma de contribuir para a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos. Ao se estudar os efeitos genotóxicos em uma população e conduzir estudos de monitoramento, utilizando parâmetros biológicos pertinentes, com manifestação à curto prazo, tais como, ensaios de micronúcleos, que podem identificar danos no DNA e/ou nos cromossomos resultantes da exposição, se contribui na prevenção de doenças e problemas reprodutivos das pessoas. A informação obtida pode ser usada como um aviso precoce do risco potencial para desenvolver, à longo prazo, problemas de saúde. Pode-se, então orientar o paciente ou indivíduo, procurar maneiras de otimizar o tratamento e evitar doenças graves no futuro.

7. Material e Métodos

7.1. Dados de amostragem

O presente projeto será desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade Católica de Pelotas. A amostra será constituída por 80 pessoas, destes 20 pacientes com IRC em hemodiálise, 20 pacientes com IRC em diálise peritoneal, formando o grupo dos expostos. As outras 40 pessoas serão o grupo controle, as quais deverão ser híginas e sem exposição conhecida a fatores genotóxicos, pareados por faixa etária e sexo. A metade de cada grupo será do sexo masculino e a outra metade do sexo feminino.

Os pacientes renais deverão estar em um programa de hemodiálise de 3 vezes por semana de 4 horas, ou da diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD) ou diálise peritoneal automatizada (DPA) e deverão estar aderente ao tratamento efetuando a diálise conforme a sua prescrição individual. Todos os pacientes da amostra não deverão estar com qualquer processo infeccioso ou infamatório.

Todos responderão a um questionário (Anexo 1), conforme protocolo publicado pela Comissão Internacional para Proteção Ambiental a Mutágenos e Carcinógenos (ICPEMEC, 1988), para que se obtenha informações quanto à exposição ocupacional, não ocupacional, hábitos e dieta. Os entrevistadores serão estudantes de medicina, farmácia e biologia.

7.2. Coleta, coloração e análise

7.2.1 Descrição da técnica

7.2.1.1 Coleta

A coleta será realizada com o auxílio de um abaixador de língua de madeira, previamente umedecido em água mineral sem gás. Será feita a raspagem na cavidade oral, na região malar, para obtenção de células esfoliadas da mucosa bucal. A primeira raspagem será desprezada.

O abaixador de madeira, com o raspado serão colocados em tubo de centrifuga com tampão fosfato, pH 6,8. Serão utilizados dois tubos, um para o lado esquerdo e outro para o lado direito da mucosa oral. O material será, então, transportado até ao Laboratório, onde será processado.

7.2.1.2 Fixação

Serão retirados os abaixadores de madeira dos tubos e os mesmos serão centrifugados, durante dez minutos à 1.000 rpm. Retirar-se-á o sobrenadante, deixando-se 0,5 ml de sedimentado e solução. Colocar-se-á 12 ml de fixador (metanol; ácido acético 3/1) por 30 min, no freezer. Centrifugar-se-á novamente. Retirando-se o sobrenadante, deixando-se 0,5 ml. Colocando-se mais uma vez 8 ml de fixador. Centrifugar-se-á, retirando-se após o sobrenadante, deixando-se o mínimo de solução (0,3 ml).

7.2.1.3 Elaboração da lâmina

Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, ressuspender-se-á a solução e pingar-se-á na lâmina pré-aquecida a 37°C, 3 gotas. Levar-se-á até a chama de uma lamparina e flambar-se-á, deixando secar por toda a noite.

7.2.1.4 Hidrólise e Coloração

Na manhã seguinte, colocar-se-á a lâmina em HCl (1N), por 1 min, escorrer-se-á e colocar-se-á em HCl (1N) à 63°C, por 10 min, retirar-se-á, deixando escorrer e esfriar por 15 min. Colocar-se-á, novamente em HCl (1N), por 5 min. Lavar-se-á 3 vezes com água destilada, por 5 min cada lavagem. Deixar-se-á secar a lâmina, por 15 min e então serão colocadas no corante de Schiff, por 2h30min, no escuro total. Retirar-se-á o corante e colocar-se-á uma solução de 80 ml de água destilada e 20 ml de tampão fosfato, por 5 min (também no escuro). Após, lavar-se-á 3 vezes com água destilada, rapidamente. Deixando-se secar por toda a noite. Na manhã seguinte corar-se-á o citoplasma com fast-green.

7.2.1.5 Análise

A análise das células será realizada em microscópio óptico comum, binocular, com objetiva de 100X e oculares de 10X. A frequência de micronúcleos e outras anomalias nucleares (células com núcleos ligados e células binucleadas), serão registradas em ficha específica (Anexo 2). Serão avaliadas 2.000 células por indivíduo. Serão consideradas somente células não fragmentadas e não amontoadas ou sobrepostas. Os critérios utilizados para a identificação de um micronúcleo serão os estabelecidos por Picker e Fox (1986): (a) o micronúcleo deverá ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma de uma célula; (b) o micronúcleo deve ser Feulgen-positivo e de intensidade igual ou menor, a mesma textura e refração do núcleo principal; (c) o micronúcleo deve ser menor que o núcleo principal, isto é, seu diâmetro deve ser 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) estar no mesmo plano de foco; e (e) o micronúcleo deverá estar claramente separado do núcleo principal. Serão registrados até três micronúcleos por célula, sendo que, micronúcleos questionáveis não serão registrados.

7.3 Análise Estatística:

Para a análise estatística será elaborado um banco de dados utilizando o programa estatístico SPSS 10.0 "for Windows", será utilizado o teste *t* de Student, bicaudal, o teste de Mann-Whitney U e o teste de correlação de Spearman, a nível de significância de $p < 0,05$.

7.4 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Pelotas e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (URGS). Os pacientes assinarão o termo de consentimento pós-informado (Anexo I) para a realização das entrevistas e coleta. Garantir-se-á a confiabilidade das informações.

8. Cronograma:

Atividades	06/03	07/03	08/03	09/03	10/03	11/03	12/03	01/04	02/04	03/04	04/04	05/04	06/04	07/04	08/04	09/04	10/04	11/04	12/04	01/05	02/05	03/05	04/05	05/05	06/05	
A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B		X	X	X																						
C					X	X	X	X	X	X	X															
D					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
E																	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
F																					X	X	X	X	X	X
G																							X	X	X	X

A. Revisão Bibliográfica

B. Estabelecimento da técnica para o ensaio de micronúcleos e seleção do grupo de trabalhadores de risco para realizar a investigação

C. Coleta do material para análise e aplicação do questionário

D. Avaliação dos micronúcleos

E. Elaboração do banco de dados

F. Análise estatística dos parâmetros avaliados

G. Elaboração e publicação dos resultados

9. Orçamento:

O material de consumo utilizado será o existente no Laboratório de Genética e Biologia Molecular: lâminas, soluções e corantes.

9.1. Local:

Laboratório de Genética e Biologia Molecular, UCPEL.

9.2. Pessoal auxiliar:

Técnico de laboratório.

Mestranda do Curso de Saúde e Comportamento.

Acadêmicos dos Cursos de Medicina, Farmácia, Biologia.

10. Referências Bibliográficas:

- Ajzen, H., Schor, N. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar** –UNIFESP/ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA. 1º ed. São Paulo: Manole, 2002. 478p.
- Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schmezer, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the comet assay. **Mutation Research**, 307:261-271, 1994.
- Anderson, D., Yu, T.W., Wright, J., Ioannides, C. An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patients. **Mutation Research**, 398:151-161, 1998.
- Arnaiz, R.R. **Las Toxinas Ambientales e Sus Efectos Genéticos**. 2ª ed. México: IEPSA, 95p., 1997.
- Au, W.W. Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. **Environ Mutagen Carcinogen Teratogen**, 236-245, 1991.
- Barros, E. *et al.* **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 2º ed. Porto Alegre: Artemed, 1999. 627p.
- Bezerra, R.G., Cruz, I.C.F.. Produção científica de enfermagem sobre hemodiálise: implicações para a (o) enfermeira (o) de métodos dialíticos. 2002. Especialização – Escola de Enfermagem. UFF., Rio de Janeiro. Disponível em : www.uff.br/nepae/hemodiálise.doc. Acesso em 15 out. 2004.
- Bishop, J.B., Witt, K.L., Sloane, R.A. Genetic toxicities of human teratogens. **Mutation Research**, 396:9-43, 1997.
- Brasil, **Ministério da Saúde**. Portaria nº 82 de 03 de janeiro de 2000. Estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas de cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da união, Brasília, 8 de fev. de 2000, seção 1, p.13.
- Burkart, W., Jung, T. Health risks from combined exposures: mechanistic considerations on deviations from additivity. **Mutation Research**, 411:119-128, 1998.
- Bukvic, N., Gentile, M., Susca, F., Fanelli, M., Serio, G., Buonadonna, L., Capurso, A., Guanti, G. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. **Mutation Research**, 498:159-167, 2001.

- Butler, M.G. Sister-chromatid exchange in 4 human races. **Mutation Research**, 91:377-379, 1981.
- Cerqueira, E. M., *et al.* Cytogenetic effects of smoking in exfoliated cells from the uterine cervix. In: 42° Congresso Nacional de Genética, 1996, Caxambú. **Anais do 42° Congresso Nacional de Genética**, Caxambú, MG: Sociedade Brasileira de Genética, 1996. p. 145.
- Cintra, E. A., Ninhide, V. M., Nunes, W. A.. **Assistência de enfermagem ao paciente gravemente enfermo**. 2° ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 671p.
- Crosby, D.G. **Environment Toxicology and Chemistry**. Nova Yorque: Oxford, xiv + 336p., 1998.
- Daugirdas, J.T., Blake, P.G.; Ing, T.S. **Manual de Diálise**. 3° ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 714p.
- De FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research**, 402:151-158, 1998.
- Fenech, M., Neville, S., Rinaldi, J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. **Mutation Research**, 313:203-207, 1994.
- Fenech M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455:81-95, 2000.
- Fenech, M. The advantages and disadvantages of the cytokinetics-block micronucleus method. **Mutation Research**, 302:11-18, 1997.
- Fermi, M. R. V. **Manual de Diálise para enfermagem**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 140p.
- Gotloib, L., Wajsbrot, V., Shostak, A.. Icodextrin-induce lipid peroxidação disrupts the mesothelial cell cycle engine. **Free Radic Biol Med**. 34(4):419-28, 2003.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 970p.
- Ha, H., Yu, M.R., Choi, H.N., Cha, M.K., Kong, H.S., Kim, M.H., Lee, H.B. Effects of conventional and new peritoneal dialysis solutions on human peritoneal mesothelial cell viability and proliferation. **Perit. Dial. Int.** 20:10-18, 2000.
- Hando, J.C., Nath, J., Tucker, J.D. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. **Chromosoma**, 103:186-192, 1994.
- Hayashi, M., Tice, R.R., Macgregir, J.T., *et al.* In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, 312:293-304, 1994.

- ICPEMC – International Commission For Protection Against Environmental Mutagens And Carcinogens, Finlândia. **Mutation Research**, 204:379-406, 1988.
- Ishibashi, Y., Sugimoto, T., Ichikawa, Y., Akatsuka, A., Miyata, T., Nangaku, M., Tagawa, H., Kurokawa, K.. Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells. **Perit Dial Int**, 22:11-21, 2002.
- Kan, E., Undeger, U., Bali, M., Basaran, N.. Assesment of DNA strand breakage by the alkaline comet assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. **Mutation Research**, 520(1-2):151-9, 2002.
- Keshava, C., Keshava, N., Ong, T., Nath, J. Protective effect of vanillin on radiation-induced micronuclei and chromosomal aberration in V79 cells. **Mutation Research**, 397:149-159, 1998.
- Kliesch, U., Adler, I.D. Sensitivity comparison of chromosome analysis and micronucleus test in mouse bone marrow. **Mutation Research**, 74:160, 1980.
- Liu, C., S.; Ko, L., Y.; Lim, P., S.; Kao, S., H.; Wei, Y., H.. Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. **Nephrol Dial Transplant**, 16(3):561-5, 2001.
- Maluf, S.W., Erdtmann, B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling anti-neoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel eletrophoresis assay. **Mutation Research**, 471:21-27, 2000.
- Maisonneuve, P., Agodoa, L., Gallert, R., Stewart, J. H., Buccianti, G., Lowenfels, A. B., Wolfe, R. A., Jones, E., Disney, A. P., Briggs, d., McCredie, M., Boyle, P. Cancer in patients on dialysis for end-estage renal disease: an international collaborative study. **Lancet**, 10;354(9173):93-9, 1999.
- Markert, M., Heterli, C., Kewahara, F., Fret, J., Wauters, J.P. Dialysed polymorphonuclear neutrophil oxidative metabolism during dialyses: a comparative study with 5 new reused membranes. **Clinical Nephrology**, 29:129-136, 1988.
- Ministério da Saúde. DATASUS. Sistema de Informação da Atenção Básica. Disponível: <http://www.datasus.gov.br> . Acesso em dez. 2003.
- Nuhad, I., Raymond, M. H. Biochemical mechanisms involved in blood-hemodialysis membrane interactions. Disponível em: www.uptupdate.com . Acesso em : 22 out. 2003.
- Picker, J.D., Fox, D.P. Do curried foods produce micronuclei in buccal epithelial cells? **Mutation Research**, 171:185-188, 1986.

- Rabello-Gay, M.N., Rodrigues, M.A.R., Monteleone-Neto, R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991. 246 p.
- Richard, F., Muleris, M., Dutrillaux, B. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. **Mutation Research**, 316:1-7, 1994.
- Riela, M.C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1996.
- Ross, E.A., Koo, L.C., Moberly, J.B. Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. **American Journal Kidney Diseases**, 30:489-494, 1997.
- Santos-Mello, R., Silva, J.C., Nunes, M.H., Braga, M.A. Cytogenetic study on coke oven workers with abnormal blood counts. **Mutation Research**, 280:261-269, 1992.
- Sociedade Brasileira de Nefrologia. Portal na Internet, disponível em <http://www.sbn.org.br>. Acesso em out. 2004
- Stich, H.F., Rosin, M.P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. **Cancer Letter**, 22:241-253, 1984.
- Stich, H.F., Rosin, M.P. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal cells. **Int. J. Cancer**, 31:305-308, 1983.
- Stopper, H., Meysen, T., Biockenförde, A., Bahner, U., Heidland, A., Vamvakas, S. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. **American Journal Kidney Diseases**, 34:433-437, 1999.
- Stopper, H., Boullay, F., Heidland, A., Vienken, J., Bahner, U. Comet assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. **American Journal Kidney Diseases**, 38:296-301, 2001.
- Stopper, H., Schupp, N., Bahner, U., Sebekova, K., Klassen, A., Heidland, A.. Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation end products carbonyl stress. **Seminars in Nephrology**, 24:474-478, 2004.
- Tarng, D. C., Chen, T. W., Huang, T. P., Chen, C. L., Liu, T. Y., Wei, Y. H.. Increase oxidative damage to peritoneal blood leucócitos DNA in chronic peritoneal dialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, 13: 1321-1330, 2002.

- Titenko-Holland, N., Jacob, R.A., Shang, N., Balaraman, A., Smith, M.T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutation Research**, 417:101-114, 1998.
- Titenko-Holland, N., Moore, L.E., Smith, M.T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutation Research**, 312:39-50, 1994.
- Tusell, L. et al. Human origin of micronuclei in human x hamster two-cell embryos. **Cytogenetic Cell Genet**, 70:41-44, 1995.
- Umadevi, B., Swarna, M., Padmavathi, P., Jyothi, A., Reddy, P.P. Cytogenetic effects in workers occupationally exposed to tobacco dust. **Genetic toxicology and Environmental Mutagenesis**, 535:147-154, 2003.
- Weisburger, J.H. Worldwide prevention of cancer and other chronic diseases based on knowledge of mechanisms. **Mutation Research**, 402:331-337, 1998.
- Wieczorowska-Tobis, K., Polubinska, A., Schaub, T. P., Schilling, H., Wisniewska, J., Witowski, J., Passlick-Deetjen, J., Breborowicz, A.. Influence of neutral-pH dialysis solutions on the peritoneal membrane: a long-term investigation in rats. **Perit. Dial. Int.**, 3:S108-13, 2001.
- Zijno, A., Leopardi, P., Marcon, F., Crebelli, R. Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. **Chromosoma**, 104:461-467, 1996.

ANEXO I
CONSENTIMIENTO INFORMADO

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
ESCOLA DE MEDICINA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PÓS-INFORMADO

*AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE ATRAVÉS DE TESTE DE MICRONÚCLEOS EM
PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS*

Juliana Martino Roth

Este estudo servirá para tomar conhecimento e avaliar os efeitos nocivos da doença renal e seu tratamento, bem como, a influência de outros fatores, como: idade, sexo, tempo de tratamento, uso de fumo e bebidas alcoólicas na frequência de células com micronúcleos. As pessoas expostas aos riscos (por exemplo, chumbo, medicamentos, fumo, outras substâncias tóxicas) podem aumentar a frequência de alterações em suas células. Normalmente ocorrem poucas alterações nas células de todas as pessoas, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e do câncer.

Caso não se encontre diferença significativa, entre pessoas expostas ao risco e outras não expostas, poderemos concluir que os itens de segurança são efetivos neste aspecto. Isto servirá de estímulo para continuar tomando cuidados.

A coleta dos dados durará aproximadamente 30 minutos, para responder um questionário de informações gerais sobre a sua saúde e dieta, como também, será realizada uma coleta de células da boca, através de uma raspagem com espátula de madeira, para estudo das células.

Fui informado que: a coleta de células da boca poderá oferecer um leve desconforto; não terei que pagar pelo exame das células da boca; poderei desistir em qualquer momento da participação deste estudo; minha identidade permanecerá confidencial; será fornecido o resultado do exame realizado em minhas células para o conhecimento do risco que poderá estar correndo e, se for o caso, ter orientações sobre algumas medidas para reduzi-lo.

Recebi claras explicações sobre o estudo e este formulário de consentimento. Os pesquisadores responderam a todas as minhas perguntas até minha completa satisfação. Fui informado da disponibilidade dos pesquisadores de fornecer qualquer outra informação que eu desejar, sobre o estudo. Entendo as implicações da minha participação no estudo. Estou de acordo em autorizar a minha participação neste estudo. Recebi uma cópia deste consentimento e uma cópia assinada por mim será mantida na instituição.

NOME DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL:

ASSINATURA DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL:

DATA: _____ / _____ / _____

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR

Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O paciente compreendeu minha explicação e deu seu consentimento.

NOME DO PESQUISADOR:

Para ser preenchido pelo pesquisador:

Código n.: _____

Data: _____

Essa folha será destacada das demais do questionário e arquivada.

Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaços adicionais forem necessários para completar uma resposta, por favor, escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

ANEXO II
QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS
QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

(De acordo com modelo recomendado por: International Comission for Protection against
 Enviromental Mutagens and Carcinogens (ICCP EMC) Mutation Research, 204:379-406, 1988)

FICHA DE SAÚDE CÓD. n°: _____ Página 1

HISTÓRIA PESSOAL

3.Data de hoje: _____/_____/_____

4.Qual a sua idade ? _____(em anos)

5.Sexo: () Masculino () Feminino

6.A qual grupo étnico você pertence:

() Caucasiano () Negro () Chinês () Japonês

() Outro. Qual ? _____

7.Qual o seu estado civil ?

() Casado () Solteiro () Separado () Divorciado () Viúvo

8.De quantos filhos você é pai natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que moram separadamente) ? _____

9.Qual é a renda mensal de sua família ? _____ Salários

HISTÓRIA OCUPACIONAL

10.Qual o seu local de trabalho? _____

11.Há quanto tempo você trabalha neste local? _____

12.Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo? _____

13.a)Que tipo de trabalho você faz? _____

13.b)Qual é a carga horária semanal de trabalho? _____

- d) -Você fuma charutos? Sim Não
 Se sim, quantos charutos por dia ? 1 charuto
 2 a 3 charutos
 4 ou mais charutos. Quantos ? _____
- e) -Você fuma cachimbo ? Sim Não
 Se sim, quantas vezes por dia ? 1 vez
 2 a 3 vezes
 4 ou mais vezes. Quantas ? _____
- f) -O que você fumava no passado ? Cigarros
 Charutos
 Cachimbo
- g) -Você mastiga tabaco ? Sim Não

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

17.Você tem tomado algum medicamento transcrito pelo médico, no último ano (por exemplo, comprimidos para pressão, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, etc.)? Sim Não

Se sim, por favor, indique:

Período:

Tipo de medicamento:	Dose:	Quantos por dia:	Início (mês):	Término(mês):
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

18.Você tem tomado algum medicamento não prescrito por médico no último ano (por exemplo, aspirina, anti-ácidos, anti-histaminicos, sedativos ou outras drogas) ?

Sim Não

FICHA DE SAÚDE

CÓD. n.º: _____

Página 4

Se sim, por favor, indique:

Período:

Tipo de medicamento:	Dose:	Quantos por dia:	Início (mês):	Término (mês):
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

19. Você tomou alguma vitamina nos últimos 6 meses ?

 Sim Não

Se sim, por favor indique:

Tipo de vitamina:	Dose:	Quantas vezes por semana:
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

20.a) - Você teve ou tem alguma dessas doenças ?

Câncer Sim Não

Tipo _____

Hepatite Sim Não

Tipo _____

Mononucleose Sim NãoHerpes Sim NãoAIDS Sim NãoMeningite Sim NãoInfecção bacteriana ou viral Sim NãoDoença cardiovascular Sim NãoDiabete Sim NãoDoença renal crônica Sim Não

b) -Indique:

Tipo de tratamento:**Duração:****Quantas vezes por semana:**

Tempo (anos):

Tipo de dialisador:

Esterilizante:

Nível de creatinina:

Tratamentos anteriores:

Doença de base:

Outras doenças importantes

() Sim

() Não

c) - Se sim, indique abaixo:

Doença:

Período da doença:

Tratamento:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

d) - Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina:

Data:

_____	_____
_____	_____
_____	_____

e) - Liste os raios-X diagnósticos e terapêuticos, recebidos nos últimos 12 meses.

Razão para o raio-X:

Data (ano):

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

f) - Você fez alguma cirurgia durante o último ano ?

Data:

Razão:

_____	_____
_____	_____
_____	_____

FICHA DE SAÚDE CÓD. nº: _____ Página 6

g) - Dê as datas de quando você teve febre nos últimos 12 meses.

Data (mês):

Doença associada:

Medicamento tomado:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

DIETAS

(deve refletir apenas os hábitos frequentes)

21. Você come apenas vegetais ? () Sim () Não

22. Você come carne ? () Sim () Não

a) - Se sim, com que frequência você come o seguinte:

Dias por semana

	1 a 2	3 a 4	5 a 6	todos os dias
Carne bovina	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Galinha	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outras	()	()	()	()

b) - Como você prefere sua carne ?

() Mal passada () No ponto () Bem passada

23. Você usa adoçantes ? () Sim () Não

Quantos por dia ? _____

24. Você bebe refrigerantes ? () Sim () Não

Quantos por dia ? _____

25. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.).

26. Você bebe café ? () Sim () Não

Quantas xícaras pequenas por dia ? _____

27. Você bebe chá ? () Sim () Não

Quantas xícaras por dia ? _____

28. Você toma chimarrão ? () Sim () Não

Com que frequência ? _____

29. Você bebe cerveja ? () Sim () Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

() Menos de uma garrafa por semana

() 1-6 garrafas por semana

() 7-12 garrafas por semana

() 13-24 garrafas por semana

() Mais de 24 garrafas por semana. Quantas ? _____

30. Você bebe vinho ? () Sim () Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1-4 copos por semana ou menos

() 5-8 copos por semana

() 9-16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana. Quantos ? _____

31. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho) ?

() Sim () Não

Se sim, qual ou quais ? _____

Por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1-4 copos por semana ou menos

() 5-8 copos por semana

() 9-16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana. Quantos ? _____

HISTÓRIA GENÉTICA

32. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos ? () Sim () Não

Se sim, por favor, especifique: _____

FICHA DE SAÚDE CÓD. n.º: _____ Página 8

33. Você ou sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar ? () Sim () Não

Se sim, por favor, especifique: _____

34. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado ?

() Sim () Não

35. Você tem um gêmeo idêntico vivo ?

() Sim () Não

ANEXO III
ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS

ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE MICRONÚCLEOS

CÓDIGO N°:

DATA:

ANALISADO POR:

Observações:

	Lâmina n°1 (Coordenadas)	Lâmina n° 2 (Coordenadas)
0 MN/célula		
1 MN/célula		
2 MN/célula		
3 MN /célula		
Cel. binucleadas		
Cél.c/núcleos ligados		
Total		

ANEXO IV
ARTIGO CIENTÍFICO

Genotoxicity evaluation in renal chronic patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis through the micronucleus test

J.M. Roth¹, G.L. Garcias^{2, 3}, M.G. Martino-Roth², R.G. Restani², T.T.S. Gonçalves², S.L.S.Sphor², A.B. Ness².

¹Mestranda em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, RS, Brasil.

²Laboratório de Genética, Escola de Medicina, Universidade Católica de Pelotas, RS, Brasil.

³Departamento de Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

Running title: Genotoxicity evaluation in hemodialysis and peritoneal patients.

Keywords: Micronucleus, mutagenicity, hemodialysis patients, peritoneal patients, renal chronic disease

* Corresponding author: Juliana Martino Roth.

Mailing address: Rua Visconde de São Gabriel, 131, Bairro Areal, Pelotas-RS, Brasil 96077-260 . e-mail: juroth@terra.com.br, fone:053 – 32286933.

Abstract

Patients with renal chronic disease have an increased incidence of cancer. It is well known that long periods of hemodialysis treatment are linked to DNA damage due to the oxidative stress. This genotoxic effect may cause loss of chromosome fragments, or even entire chromosomes, which form micronucleus (MN) after cell division, and can be detected by the micronucleus test. In the present case-control study we evaluated the genotoxic effect of hemodialysis treatment in 20 patients undergoing hemodialysis (HD), and 20 subjected to peritoneal dialysis (DP), matched for sex and age with 40 controls. Genetic damage was assessed by examining the frequency of micronuclei in 2,000 exfoliated buccal cells per individual. Our results revealed that patients undergoing hemodialysis treatment have a significantly higher frequency of micronucleated cells (5.60 ± 5.31 MNC) compared to control subjects (1.50 ± 2.01 MNC, $p < 0.01$). Interestingly, the same was not observed for the peritoneal dialysis patients, who presented no significant differences in MNC (2.85 ± 2.96) frequency compared to control individuals (3.25 ± 3.85). In addition, we evaluated the possible association between creatine levels, smoking, alcoholic intake, age, time of treatment, incomes of the individuals (separately analyzed according to their gender) and the frequency of micronuclei. The results reported here indicate that the period of treatment is the only factor associated with increased MNC frequency among HD patients (Spearman coefficient 0.414, $p = 0.01$). The number of MN cells found in individuals under six years or less of treatment was significantly lower (2.91 ± 2.74 MN) compared to patients under seven or more years of treatment (8.89 ± 5.96 MN, $p < 0.05$). Overall, peritoneal dialysis may be a safer choice of treatment, but further studies need to be performed to investigate the risks and benefits of both treatments.

Introduction

In Brazil, according to the Brazilian Nephrology Society (SBN) census in 2002, from a total of patients undergoing renal substitution therapy, 54.523 (89.6%) remained in hemodialysis. Only 7.61%, from the total, were not kept directly by the Unique Health System. From 1999 to 2002 there was an increase of 27.7% in the number of clients. Our rates of prevalence of terminal renal chronic insufficiency (IRC) treated are about 4 times lower than in the USA and Japan and half the rates in Italy, France and Germany (Ajzen *et al.*, 2002).

Barros *et al.* (1999) describes the IRC as a progressive loss of the renal function of depuration, which means glomerular filtration. Independent of the cause, IRC results from the irreversible loss of a high number of functional nephrons (Guyton *et al.*, 2002). IRC is associated with the immunoinflammatory multifactorial syndrome which occurs precociously during the disease, getting worse as it progresses (Kan *et al.*, 2002). In 1996/97, the main diseases reported as causes of terminal IRC were arterial hypertension (24%), glomerulonephritis (24%) and diabetes mellitus (17%) (Ajzen *et al.*, 2002).

The hemodialysis (HD) used to compensate the deficient renal function in uremic patients can be harmful to the blood cells and there is a consensus that this type of patient has a high risk of oxidative stress and, as a consequence, damage to the DNA. Markert *et al.* (1988) suggest that, in patients kept in HD treatment, the blood interacts with biocompatible membranes where the circling neutrophiles use oxygen and generate reactive species of oxygen such as super oxide which leads to an increase of the inflammatory state. Ross *et al.* (1997) say that it is probable that the dialysis mechanism acts on the enzymes related to the glutation, removing substrates and acting factors.

In the dialysis process, one of the possible consequences is oxidative stress, which can result in damage to the DNA, including mutation of points by basis oxidation, breaks of simple and double chain, genomic instability and inhibition of the repair mechanism (Stopper *et al.*, 2004; Tarng *et al.*, 2002). These breaks can lead to the formation of fragments or losses of whole chromosomes that are not correctly distributed along the mitosis process, and in the next interphase these structures can be detected under the form of micronucleus (MN) (Stopper *et al.*, 1999). The MN frequency, the comet assay in peripheral lymphocytes, as well

as 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) found in the leukocytes, DNA mitochondrial in skeletal muscle and capillary follicles have been used as biomarkers of damage in the DNA of chronic renal patients. According to Stopper *et al.* (2004) the alterations in the DNA can induce the carcinogenesis mechanism, being related to the aging process, neurodegenerative diseases, diabetes and arteriosclerosis.

In peritoneal dialysis (DP), the introduction and maintenance of a strange body (flexible catheter) in the organism and the distention of the abdominal cavity, periodical or permanent by the dialysis liquid (sometimes with high osmolarity) and the use of the peritoneum for the water and solute transport can generate infectious, mechanical and metabolite complications (Riella, 1996). Ha *et al.* (2000) have shown *in vitro* that solutions of DP with low pH or high levels of products of glucose metabolism or both promote in the human peritoneum the death of mesothelial cells and DNA damage. Gotloieb *et al.* (2003) exposing mesothelial cells of rats in high glucose concentrations that are more biocompatible, for 2h *in vivo*, have found an acceleration of the life cycle of the cells and in 30 days of culture fewer cells were left with nuclear forms and uncommon mitosis due to DNA damage. In agreement with the study of Wieczorowska *et al.* (2001) who used a DP solution with physiological pH and low levels of glucose products in the peritoneum of rats for 6 weeks, there was a fall in the intraperitoneal inflammatory process and peritoneal fibrosis ($p < 0,005$), when compared to a DP solution with low pH and high levels of glucose products.

The mutagenic and carcinogenic effect of genotoxic agents in human populations exposed to the work environment accidentally, by medical treatment or by their lifestyle, has increased considerably. In hospital routines, many mutagenic agents are used for maintenance or diagnosis and treatment of patients. For most of the patients the benefit is obvious but, however, for some this benefit is only partial (Maluf e Erdtmann, 2000).

A way of studying the genotoxic effects in a population is to conduct monitoring studies, using pertinent biological parameters with short term manifestation and with micronucleus rehearsals which can identify damages in the DNA and/or in the chromosomes resultant from the exposure. The information obtained can be used as a precocious warning of the potential risk of developing long term health problems (Au, 1991).

Nowadays there are many tests, with *in vivo* models as well as *in vitro*, so that the test organisms varies from virus, bacterium, fungus, plants and insects to mammals, including humans (De Flora, 1998). Among the tests which analyze chromosomal mutations in

mammals, the micronucleus test stands out, as it is a simple and quick test which detects chromosomal breaks and losses (Hayashi *et al.*, 1994).

A high frequency of cells with micronucleus has been found by some researchers in chronic renal patients who have been undergoing hemodialysis for a long time (Stopper *et al.*, 1999). Kan *et al.* (2002) carried out an evaluation of the genotoxicity through the comet assay in chronic renal patients in HD programs and have found a significant DNA damage increase in comparison with the control group ($P < 0.001$). These results agree with the ones from other studies, such as the one from Stopper *et al.* (2001) that also used the comet assay and have found significant DNA damage increase in the lymphocytes of 23 patients with chronic renal disease, suggesting that there is a relation between the hemodialysis treatment time and the damage caused in the DNA of these patients.

This study aims to compare the frequency of micronucleus and other alterations such as broken egg nucleus and binuclear cells to the cells of patients with chronic renal disease, in hemodialysis treatment and peritoneal dialysis and two control groups, aiming to detect if there is or not any genotoxic effect related to these treatments.

Material and Method

The current study was developed in the Genetic Laboratory of the Catholic University of Pelotas. The sample was made up of 80 people, including 20 patients with IRC in HD, 20 patients in DP, who formed the exposure group, and a control group made up of 40 healthy people without known exposure to genotoxic factors. The sample was hospitalized in the Santa Casa de Misericórdia of Pelotas Hospital, to undergo elective surgery and be matched for age and sex. Half of each group was male and the other half female.

The renal patients were in a program of HD for 4 hours three times a week, continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) or automated peritoneal dialysis (DPA) and adherent to the treatment carrying out dialysis and its individual prescription. All the patients from the sample did not have any infectious or inflammatory process.

The project was approved by the Ethics Committee in Research at the Santa Casa de Misericórdia of Pelotas Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The patients signed a post informed consent term in order to be interviewed and for the collection of the buccal mucosa cells. All of them answered the questionnaire, according to

the protocol published by the International Commission for Environmental Protection of Mutagens and Carcinogens (ICPEMEC, 1988). The information reliability was guaranteed.

The collection was carried out using the help of a wooden tongue depressor, previously moistened in still mineral water. The erosion in the oral cavity was made in the molar region in order to obtain abraded cells in the buccal mucosa. The first erosion was discarded. The wooden tongue depressor, with the scraping was put in a centrifuge tube with buffer phosphate, pH 6,8. Two tubes were used, one for the left side and the other for the right side of the oral mucosa. The material was then transported to the lab where it was processed.

Having being removed from the tubes, the wooden tongue depressors were centrifuged for 10 minutes at 1.000 rpm. The supernatants were retreated, leaving 0.5 ml of sediment and solution. 12 ml of fixative were added (methanol; acetic acid 3/1) and kept for 30 minutes in the freezer. It was then centrifuged again. The supernatant was discarded, leaving 0.5 ml of suspension. The procedure was repeated adding 8 ml of fixative and leaving at the end 0.3 ml of suspension. With the help of a Pasteur pipette, the solution was resuspended and 3 drops were dripped in a pre heated lamina at 37°C. Afterwards, it was flambada and kept at room temperature for the whole night in order to dry. After the drying was done, the following sequence of hydrolysis was carried out: the lamina was put for 1 min in HCl (1N), drained and put in HCl (1N) at 63°C for 10 min, taken out and left to drain and cool down for 15 min. Once again, it was put in HCl (1N) for 5 min. It was washed 3 times with distilled water for 5 min each washing, kept at room temperature for 15 min and then put in Schiff dye for 2h30min in the dark. Having been removed from the dye, a solution of 80 ml of distilled water and 20 ml of buffer phosphate was added for 5 min (also in the dark). Afterwards, it was washed 3 times with distilled water, quickly and left to dry for a whole night. The following morning, the cytoplasm was dyed with fast-green.

The analysis of the cells was made using a common optic microscope, binocular, with objective of 100X and oculars of 10X. The macronucleus frequency and other nuclear anomalies (cells with broken eggs nucleus and binuclear cells), were registered in specific files. 2.000 cells per person were evaluated, with only the non-fragmented cells and non-crowding or overlapped being considered. The criteria used for the identification of a micronucleus were established by Picker and Fox (1986): (a) the micronucleus must have a regular contour, round or oval and must be inside the cytoplasm of a cell; (b) the micronucleus must be Feulgen-positive and of an equal or lower intensity, the same texture and refraction of the principal nucleus; (c) the micronucleus must be smaller than the

principal one, that is, its diameter must be 1/3 of the diameter of the principal nucleus; (d) be in the same focus plan; and (e) the micronucleus must be clearly separated from the principal nucleus. It was registered up to three micronuclei per cell, questionable micronuclei were not registered. For the statistics analysis a database was created using the statistics program SPSS, 10.0 "for Windows", the Student *t* test, two-tailed, the Mann-Whitney test and the Spearman correlation test, at a significant level of $p < 0.05$.

Results

This study tried to evaluate the mutagenic potential determined by HD and DP treatment, to which the chronic renal patients are subjected. Table 1 shows the main characteristics which show the profile of the evaluated individuals and their controls that were matched for age and sex. The studied individuals were classified by type of treatment, sex, age, time of treatment, more frequent diseases, levels of creatine, salary group, use of smoking and alcoholic intake.

Table 2 shows the averages of the number of cells (in 2,000 cells analyzed) with micronucleus (MNC), binucleated (BNC), and broken egg nucleus (BEC) and total of micronuclei (TMN) of patients HD and DP, as well as the control groups, evaluated in this work. A significant difference ($p < 0.01$) was found in patients HD (5.60 ± 5.31 MNC; 5.60 ± 5.30 TMN) and the control group (1.50 ± 2.01 MNC; 1.76 ± 2.24 TMN) in relation to the number of MNC and of TMN, but differences between the DP patients and its control group were not found.

Comparisons were made between the variables of sex, age (in the intervals: ≤ 50 e ≥ 51 years old), family wages (≤ 1 salary, from 2 to 4 salaries and ≥ 5 salaries), creatine level (≤ 10 and $\geq 10,01$ mg/dl), use of smoking and alcoholic intake among the patients HD, DP and the control groups. The results found suggest that there is no association between these variables and the number of nuclear anomalies (Table 3 and Table 4).

The comparison between the variable time of treatment was also made, in the interval between ≤ 6 and ≥ 7 years old. The results have shown that there is an influence of the length of treatment and the number of alterations analyzed. The number of MNC (2.91 ± 2.74) in the interval of ≤ 6 years old was significantly ($p < 0.05$) lower than the value found (8.89 ± 5.96 MNC) in the interval of ≥ 7 years old of treatment. Also significant were the differences for

the number TMN (≤ 6 years old: 3.09 ± 3.08 ; ≥ 7 years old: 10.11 ± 7.04 ; $p < 0.05$) and for BEC (≤ 6 years old: 1.00 ± 3.00 ; ≥ 7 years old: 3.78 ± 5.09 ; $p < 0.05$) for the patients in HD. The Spearman correlation coefficient (0.414) with $p = 0.01$, has shown a positive correlation between length of treatment and the number of cells with MN. The same was not verified for the DP patients.

The possible influence of the level of creatine, use of smoking and alcoholic intake, age, and family wages were considered in the frequency of the nuclear alterations in relation to the sex in both types of treatment and in the controls. No relation was detected.

Discussion

According to Stopper *et al.* (2001), one of the consequences of chronic renal disease is the high risk of cancer. This happens in patients with IRC without dialysis treatment as well as in those who are kept in hemodialysis (Goodkin *et al.*, 2004). This fact can be related to failures in the repair mechanism and, in the latest studies, to the high frequency of MN found in these patients. The results of this study are in agreement with the findings of Stopper *et al.*, mentioned above. On one occasion, a number of cells were found with MN significantly higher among the patients in HD than in the control individuals as well as the number of TMN.

In a previous investigation, Stopper *et al.* (1999) evaluated 19 patients in the final stages of renal insufficiency as well as 20 control individuals, observing a slight increase in the MN frequency, not significant, in these patients. Nevertheless, in this study the controls were not matched for age. In a second study, 16 patients with IRC in hemodialysis treatment were selected, 19 patients without dialysis treatment and 23 control individuals matched for age. In this evaluation the frequency of MN in BNC was analyzed obtained in the lymphocyte cultivation and a number significantly higher of MN among the patients kept in HD in comparison to the control group was observed.

In another study, Stopper *et al.* (2001) evaluated 26 chronic renal patients involved in treatment of HD, using the comet assay and also obtained significant differences between patients and controls.

Liu *et al.* (2001) carried out a study which evaluated the deletion of 4,977 bp of DNA mitochondrial of 162 patients with chronic renal disease, 125 patients being in HD and 37 in

DP. They classified the studied individuals in age groups of 20-30, 31-40, 41-50, 51-60 and 61-70 years old and found in the chronic renal patients, at these age groups an incidence of deletion of 4,977 bp, respectively of 30.0%, 31.9%, 40.0%, 43.9% e 44.8%. In the controls the incidence was of 8.6%, 14.0%, 14.3%, 20.4% e 31.6%, respectively. The study showed, according to the authors, that there was a significant increase of deletions of 4,977 bp in DNA mitochondrial of the chronic renal patients in relation to the controls, due to the existence of factors that promoted genomic instability, leading to the occurrence of mutation.

Kan *et al.* (2002) using the comet assay, carried out a study about the DNA damage of patients kept in hemodialysis and found a significant increase in the breaks of DNA of chronic renal patients in hemodialysis. However, they did not find a positive correlation between the length of time (3.5 years) of hemodialysis treatment and the DNA damage that was found in the study of Stopper *et al.* (2001).

In this study, significant differences were found in the frequency of cells with MN, as well as in the number TMN in relation to the length of hemodialysis treatment. There was a significant increase ($p=0.038$) from 6 years of treatment onwards, confirmed by Spearman's coefficient of correlation ($p=0.01$). Kan *et al.* (2002) conclude that the length of treatment of the patients evaluated by them is very small, approximately 3.5 years, while Stopper *et al.* (2001) detected in their patients this increase from 10 years of treatment onwards.

This correlation between length of treatment and nuclear alterations can be explained by the fact that the blood of these patients, kept in hemodialysis treatment cycles, interacts with biocompatible membranes and in this process many reactive species of oxygen can be produced. It is also suggested that the dialysis process acts on the enzymes related to glutation, removing substrates and acting factors (Kan *et al.*, 2002).

Among the factors which were evaluated for their influence on the formation of MNC, BNC, BEC and TMN, one of the most relevant was the creatine level, as it is related to the severity level of chronic renal disease (Combe *et al.*, 2004). The patients were classified in two levels of ≤ 10.00 mg/dl and ≥ 10.01 mg/dl. The results analyzed did not show differences in the number of nuclear anomalies. However, some studies report that the increase in the level of creatine is related to the number of MNC. Stopper *et al.* (2001) found a correlation between the level of creatine (severity of the disease) and the DNA damage, estimated using the comet assay. Nevertheless, Stopper *et al.* (1999) did not find this correlation. In this second study, similar to this one, the level of creatine of the patients was very high, indicating the gravity of the disease in most of the patients.

Contrary to the results found in the patients in hemodialysis, significant differences were not found in DP patients. This fact can be due to the fact that all the patients were under treatment for a short time, at most for 6 years, which has limited this study. However, differences were not detected between the patients in HD and DP in relation to the cell alterations observed. It can be considered that the patients in DP were in a better general state of health than the ones in hemodialysis and that possibly the peritoneal dialysis plays a smaller genotoxic role.

Tarng *et al.* (2002) evaluated the oxidative DNA damage of leukocytes of peripheral blood, quantifying 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-HO-dG), using the electric chemical method in 24 control individuals, 22 patients with chronic renal disease without dialysis treatment and 42 patients in peritoneal dialysis. The highest average of 8-HO-dG was found in the DP patients, followed by the chronic renal patients and by the controls. The authors concluded that a significant increase in the level of 8-HO-dG occurs with chronic renal disease and that this level tends to increase the progression of the disease, meaning that the peritoneal dialysis treatment exacerbated this increase. Ishibashi *et al.* (2001) observed 8-HO-dG in the patients that were starting DP (3-5 months). However, 8-HO-dG was observed in higher numbers of mesothelial cells of patients of long term DP.

Concluding, the patients under hemodialysis treatment have shown more cells with micronuclei than their controls, indicating that there exist factors related to their condition that are increasing the nuclear anomalies, which are a consequence of alterations in the genetic material as well as failures in the repair mechanism. According to Stopper *et al.* (2004), the formation of reactive species to oxygen, due to chronic renal disease and the reactions of biocompatibility with the dialysis membranes, as well as a reduced antioxidant defense of these patients, can also contribute to the increase of chromosomal and/or genomic damage, taking into account that the formation of the micronucleus can result in breaks of the genetic material, as well as the loss of whole chromosomes which were not well distributed among the daughter cells during the mitosis process.

This fact was confirmed by the correlation between the length of treatment and the number of MNC, showing that the longer the treatment, the higher the genotoxic effect.

Factors, like levels of creatine, sex, age, family wages, use of smoking and alcohol do not influence the probable genotoxic action of the hemodialysis treatment.

The patients in DP did not present differences in the number of MNC in comparison with the control individuals, which suggest that this treatment is possibly less harmful for the

patient. However, due to the short length of treatment of these patients, it is necessary to continue this study.

Acknowledgements

The authors are very grateful to Dr. Alípio D'Oliveira Coelho, Nefrologista Doctor, and the 80 individuals who spontaneously took part in this study. This research was supported by the Universidade Católica de Pelotas.

References

- Ajzen H, Schor N (2002) Guias de medicina ambulatorial e hospitalar –UNIFESP/Escola Paulista De Medicina. 1° ed. São Paulo: Manole, 478p.
- Au WW (1991) Cytogenetic assays in monitoring human exposure and prediction of risk. *Environ Mutagen Carcinogen Teratogen*, 236-245.
- Barros E, *et al.* (1999) Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento. 2° ed. Porto Alegre: Artemed, 627p.
- Combe C, Mccullough KP, Asano Y, Ginsberg N, Maroni BJ, Pifer TB (2004) Kidney disease outcomes quality initiative (K/DOQI) and the dialysis outcomes and practice patterns study (DOPPS): nutrition guidelines, indicators, and practices. *American Journal of Kidney Diseases*, 44:39-46.
- De FLORA S (1998) Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutation Research*, 402:151-158.
- Goodkin DA, Young EW, Kurokawa K, Prütz KG, Levin NW (2004) Mortality among hemodialysis patients in Europe, Japan, and the United states: case-mix effects. *American Journal of Kidney Diseases*, 44:16-21.
- Gotloib L, Wajsbrodt V; Shostak, A (2003) Icodextrin-induce lipid peroxidação disrupts the mesothelial cell cycle engine. *Free Radic Biol Med*. 34(4):419-28.
- Guyton AC, Hall JE (2002) Tratado de Fisiologia Médica. 10° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 970p.
- Ha H, Yu MR, Choi HN, Cha MK, Kong HS, Kim MH, Lee HB (2000) Effects of conventional and new peritoneal dialysis solutions on human peritoneal mesothelial cell viability and proliferation. *Perit. Dial. Int.* 20:10-18.
- Hayashi M, Tice RR, Macgregir JT, et al. (1994) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, 312:293-304.
- ICPEMC - International Commission For Protection Against Environmental Mutagens And Carcinogens (1988) Finlândia. *Mutation Research*, 204:379-406.
- Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuka A, Miyata T, Nangaku M, Tagawa H, Kurokawa K. (2002) Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells. *Perit. Dial. Int.* 22:11-21.

- Kan E, Undeger U, Bali M, Basaran, N (2002) Assesment of DNA strand breakage by the alkaline comet assay in dialysis patients and the role of vitamin E supplementation. *Mutation research*, 520(1-2):151-9.
- Liu CS, Ko LY, Lim PS, Kao SH, Wei YH (2001) Biomarkers of DNA damage in patients with end-stage renal disease: mitochondrial DNA mutation in hair follicles. *Nephrol Dial Transplant*, 16(3):561-5.
- Maluf SW, Erdtmann B (2000) Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling anti-neoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel eletrophoresis assay. *Mutation Research*, 471:21-27.
- Markert M, Heterli C, Kewahara F, Fret J, Wauters JP (1988) Dialysed polymorphonuclear neutrophil oxidative metabolism during dialyses: a comparative study with 5 new reused membranes. *Clinical Nephrology*, 29:129-136.
- Picker JD, Fox DP (1986) Do curried foods produce micronuclei in buccal epithelial cells? *Mutation Research*, 171:185-188.
- Riela MC (1996) *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ross EA, Koo LC, Moberly JB (1997) Low whole blood and erythrocyte levels of glutathione in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *American Journal Kidney Diseases*, 30:489-494.
- Stopper H, Meysen T, Biockenförde A, Bahner U, Heidland A, Vamvakas S (1999) Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *American Journal Kidney Diseases*, 34:433-437.
- Stopper H, Boullay F, Heidland A, Vienken J, Bahner U (2001) Comet assay analysis identifies genomic damage in lymphocytes of uremic patients. *American Journal Kidney Diseases*, 38:296-301.
- Stopper H, Schupp N, Bahner U, Sebekova K, Klassen A, Heidland A (2004) Genomic damage in end-stage renal failure: potential involvement of advanced glycation end products carbonyl stress. *Seminars in Nephrology*, 24:474-478.
- Tarng DC, Chen TW, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH (2002) Increase oxidative damage to peritoneal blood leucóctos DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 13: 1321-1330.

Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, Schaub TP, Schilling H, Wisniewska J, Witowski J, Passlick-Deetjen J, Breborowicz A (2001) Influence of neutral-pH dialysis solutions on the peritoneal membrane: a long-term investigation in rats. *Perit. Dial. Int.*, 3:S108-13.