

ARTIGO ORIGINAL

Hiper-homocisteinemia em pacientes submetidos a transplante renal

Hyperhomocysteinemia in renal transplant recipients

Maria Paula Sanches de Alvarenga¹; Eny Maria Goloni Bertollo¹; Mário Abbud Filho^{2,3}; Maria Alice Sperto Ferreira Baptista^{2,3}; Renato Haddad⁴; Marcos Nogueira Eberlin⁵; Érika Cristina Pavarino Bertelli¹.

Departamento de Biologia Molecular¹ e de Medicina², FAMERP – São José do Rio Preto; Instituto de Urologia e Nefrologia³ – São José do Rio Preto; Faculdade de Ciências Médicas⁴ e Instituto de Química⁵ UNICAMP – Campinas.

Resumo A doença vascular do transplante apresenta fisiopatogenia semelhante a do processo de envelhecimento vascular e da aterosclerose. Conseqüentemente, genes cujas enzimas estão ligadas a esse processo, como a enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) que participa do metabolismo da homocisteína e formação da placa aterosclerótica, passaram a ser valorizados no processo etiopatológico da disfunção crônica do transplante (DCTx). Neste estudo, as frequências dos polimorfismos *MTHFR* (C677T e A1298C) e os níveis plasmáticos de homocisteína (Hcy) foram avaliados em 45 pacientes submetidos a transplante renal no mínimo há 12 meses, 21 com DCTx e 24 com função renal normal (FN). A quantificação da homocisteína foi realizada por cromatografia líquida/espectrometria de massas seqüencial (LC-MS/MS) e a investigação dos polimorfismos *MTHFR* pela análise de comprimento de fragmentos de restrição (*PCR-RFLP*). O genótipo 677CT/1298AC foi associado ao nível moderado de Hcy em pacientes com DCTx.

Palavras-chave MTHFR, Transplante renal, Polimorfismo, Homocisteína.

Abstract Vascular disease in renal transplant patients presents a similar physiopathology as vascular aging and atherosclerotic processes. Consequently, genes whose enzymes are linked to this process, such as methylenetetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) that participates in the metabolic degradation of homocysteine and the formation of the atherosclerotic lesion, are considered important in the etiopathic process of chronic renal failure (CAN). In this study, *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms frequencies and plasma homocysteine (Hcy) concentrations were analyzed in 45 renal transplant recipients, 21 with CAN and 24 with normal renal function (NFR), all of them underwent renal transplant at least 12 months earlier. Plasma homocysteine concentrations were measured by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LS-MS/MS) and *MTHFR* polymorphisms were investigated by restriction fragment length polymorphism (*PCR-RFLP*). The 677CT/1298AC genotype was associated with the moderate level of homocysteine in patients with CAN.

Keywords MTHFR, Renal transplant, Polymorphism, Homocysteine.

Introdução

A hiper-homocisteinemia pode ser resultante de alterações genéticas que modificam as enzimas necessárias para a remetilização ou transsulfuração da homocisteína (Hcy), um aminoácido derivado do catabolismo protéico. Fatores adquiridos, tais como a deficiência das vitaminas B₁₂ e B₆ e de folato também têm sido associados com o aumento da Hcy. Níveis elevados da Hcy podem ser classificados em moderados (15-30µmol/L), intermediários (31-100µmol/L) e graves (>100µmol/L)^{1,2}.

O nível moderado de Hcy plasmática é comumente associado à transição de citosina para timina (C → T) no nucleotídeo 677, da região codificadora do gene metilenotetrahidrofolato reduta-

se (*MTHFR*), resultando na substituição de alanina por valina na proteína produzida. Essa alteração está associada com o aumento da termolabilidade da enzima metilenotetrahidrofolato reductase que leva a uma redução de 50% de sua atividade normal². Um outro polimorfismo no gene *MTHFR*, uma substituição de adenina para citosina (A → C) no nucleotídeo 1298, com mudança de ácido glutâmico para alanina na proteína produzida, também tem sido associado com decréscimo da atividade enzimática^{3,4}.

A aterosclerose prematura e outros eventos degenerativos do endotélio podem ser conseqüentes da hiper-homocisteinemia. O mecanismo de lesões vasculares induzidos pela hiper-

homocisteinemia não está claro. Evidências experimentais sugerem que a Hcy pode estar envolvida na aterogênese e trombo-gênese levando à hiperplasia das células musculares e à fibrose, facilitando o processo oxidativo vascular, alterando o sistema de coagulação e reduzindo a regulação vasomotora do endotélio^{5,6}.

Considerando que a doença vascular do transplante apresenta fisiopatogenia semelhante a do processo de envelhecimento vascular e da aterosclerose, variantes genéticas do *MTHFR* que alteram o metabolismo da Hcy, podem estar relacionadas ao processo etiopatológico da disfunção crônica do transplante. Correlações positivas e negativas entre as variantes moleculares desse gene e a disfunção renal crônica têm sido relatadas na literatura em pacientes submetidos a transplante renal⁶. Há referência, ainda, do polimorfismo C677T no gene *MTHFR* como forte candidato para risco aumentado de doenças vasculares⁷, embora outros estudos não confirmam essa hipótese^{6,8}. Assim, é extremamente relevante a compreensão dos eventos que levam ao processo de degeneração crônica do sistema vascular.

Nosso estudo investigou as frequências dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* e avaliou o nível de Hcy em dois grupos de pacientes submetidos a transplante renal, no mínimo há 12 meses, um grupo com disfunção crônica do transplante renal (DCTx) e o outro com função renal normal (FN).

Casuística e Métodos

Trata-se de um estudo seccional cruzado, retrospectivo no qual os pacientes submetidos a transplante renal no mínimo há um ano foram classificados em dois grupos, FN e DCTx, de acordo com os níveis de creatinina e proteinúria.

Após consentimento livre e esclarecido, foram incluídos na pesquisa 45 indivíduos (média de idade = $38,9 \pm 12,7$ anos) submetidos a transplante renal (tempo médio de transplante = $5,9 \pm 2,8$ anos), sendo 24 com FN (média de idade = $38,5 \pm 15$ anos; tempo médio de transplante = $5,3 \pm 2,4$ anos) e 21 com DCTx (média de idade = $39,3 \pm 9,8$ anos; tempo médio de transplante = $6,7 \pm 3$ anos).

Os pacientes foram procedentes do Instituto de Urologia e Nefrologia de São José do Rio Preto – SP. De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP, CEP – FAMERP e pela Comissão

Nacional em Pesquisa de Brasília/DF – CONEP.

A extração de DNA de sangue periférico seguiu a técnica de Abdel-Rahman *et al.* (1994)⁹. As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e os linfócitos foram isolados com auxílio de Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). O DNA genômico foi obtido adicionando aos linfócitos isolados, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), proteínase K e RNase A. Após purificação com NaCl, o DNA foi precipitado com etanol e armazenado a -20°C em tampão Tris-EDTA para posterior análise.

O plasma foi obtido a partir das amostras de sangue periférico colhido após 12 horas de jejum. A separação do plasma foi realizada imediatamente por centrifugação (10 minutos, 3.000 rpm a 18°C). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da quantificação da Hcy que foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial (LS-MS/MS) e possível em 37 dos 45 pacientes incluídos na pesquisa^{10,11,12}.

A técnica de PCR-RFLP, que compreende a amplificação das seqüências polimórficas do DNA seguida de digestão por enzimas de restrição, foi realizada para investigar os alelos polimórficos do gene *MTHFR*, utilizando *primers* e condições, segundo Yi *et al.*¹³. Assim, a amplificação foi obtida por 40 ciclos que compreenderam etapas de desnaturação do DNA à 94°C por 60 segundos, de anelamento dos *primers* à 58°C por 60 segundos e de extensão das cadeias à 72°C por 60 segundos. Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HinfI* e *MboII* para a identificação dos polimorfismos C677T e A1298C, respectivamente, e os fragmentos foram visualizados em gel poliácridamida 6% corado com nitrato de prata.

A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher e Mann-Whitney e foi aceito erro a de até 5% com nível de significância para $P < 0,05$.

Resultados

Os resultados genotípicos e as frequências alélicas dos 45 pacientes investigados para ambos os polimorfismos avaliados encontram-se nas Tabelas 1 e 2. Os genótipos 677CT e 1298AC foram mais frequentes nos pacientes com DCTx. Além disso, a heterozigose para ambos os polimorfismos (677CT/1298AC) também foi mais freqüente neste grupo. A análise estatística dos 45 pacientes genotipados não mostrou diferenças significantes entre os grupos para os genótipos heterozigotos individuais ou

Tabela 1. Combinações genotípicas dos polimorfismos *MTHFR* C677T^a e A1298C^b em 21 pacientes submetidos a transplante renal com disfunção crônica do enxerto (DCTx).

Genótipo <i>MTHFR</i>	677CC [n = 5 (23,8%)]	677CT [n = 16 (76,2%)]	677TT [n = 0 (0%)]
1298AA [n = 7 (33,3%)]	2 (9,5%)	5 (23,8%)	0
1298AC [n = 14 (66,7%)]	3 (14,3%)	11 (52,4%)	0
1298CC [n = 0 (0%)]	0	0	0

^a Frequência alélica de 677T é 0,38 (38%); ^b Frequência alélica de 1298C é 0,33 (33%).

Tabela 2. Combinações genotípicas dos polimorfismos *MTHFR* C677T^a e A1298C^b em 24 pacientes submetidos a transplante renal com função normal (FN).

Genótipo <i>MTHFR</i>	677CC [n = 6 (25%)]	677CT [n = 15 (62,5%)]	677TT [n = 3 (12,5%)]
1298AA [n = 14 (58,3%)]	2 (8,3%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)
1298AC [n = 10 (41,7%)]	4 (16,7%)	6 (25%)	0
1298CC [n = 0 (0%)]	0	0	0

^a Frequência alélica de 677T é 0,44 (44%); ^b Frequência alélica de 1298C é 0,21 (21%).

composto (teste exato de Fisher, 677CT P= 0,670; 1298AC P = 0,234; 677CT/1298AC P=0,073).

O nível da Hcy plasmática investigado em 37 pacientes apresentou médias de 42,64µmol/L no grupo com DCTx e de 25,47µmol/L no grupo com FN (teste de Mann-Whitney, P = 0,084). Hiper-homocisteinemia foi observada em 33 (89,2%) dos 37 pacientes que tiveram o nível de Hcy avaliados. Dois pacientes com DCTx mostraram níveis de Hcy acima de 100µmol/L (hiper-homocisteinemia grave) e apresentaram os genótipos 677CT/1298AC e 677CT/1298AA. Neste grupo com DCTx, dos oito pacientes que apresentaram o nível moderado de Hcy, seis (75%) mostraram a combinação genotípica 677CT/1298AC. No grupo com FN, dentre os 15 classificados neste nível de Hcy, apenas quatro (26,6%) apresentaram o genótipo composto. Desse modo, quando comparados os pacientes com nível de Hcy moderada entre os grupos (DCTx e FN), a frequência de cada heterozigoto (677CT; 1298AC), bem como do heterozigoto composto (677CT/1298AC) foi maior no grupo com DCTx. A análise estatística entre os dois grupos não mostrou diferença significativa quando avaliados os genótipos individualmente (teste de Mann-Whitney, 677CT P= 0,399; 1298AC P=0,052), mas a combinação genotípica dos heterozigotos (677CT/1298AC) mostrou um valor de P significativo (P=0,039).

A correlação dos níveis de Hcy com os genótipos *MTHFR* está apresentada nas Tabelas 3 e 4.

Discussão

Não existem dados sobre a frequência dos polimorfismos *MTHFR* em pacientes transplantados no Brasil e a disponibilidade de informações sobre estes polimorfismos na população geral brasileira é escassa. O polimorfismo C677T, investigado em grupos étnicos distintos da população brasileira, apresenta

uma distribuição étnica heterogênea, com uma baixa prevalência na população negróide^{14,15}. Outros estudos realizados na população brasileira em pacientes com risco para trombose vascular revelam níveis elevados de Hcy em pacientes com genótipo *MTHFR* 677TT, entretanto não associam o genótipo ao risco aumentado da doença^{16,17,18,19,20}.

Neste estudo, os polimorfismos *MTHFR* (C677T e A1298C) não diferenciam pacientes com DCTx daqueles com FN, exceto para o genótipo 677CT/1298AC presente, preferencialmente, em pacientes DCTx com nível moderado de Hcy.

Embora estudos demonstrem que a variante *MTHFR* 1298CC não altera a função catalítica ou regulatória da enzima, que se apresenta termoestável e inalterável pela variação na concentração de folato *in vitro*^{21,22}, a alteração A1298C resulta em redução da atividade enzimática em 60% quando combinada com o polimorfismo heterozigoto C677T²³. A frequência do genótipo homozigoto 1298CC é comparável ao genótipo 677TT (aproximadamente 10% dos indivíduos) e estima-se que aproximadamente 15 a 20% da população apresenta o genótipo heterozigoto composto (677CT / 1298AC)^{3,22}. A concentração de homocisteína plasmática é significativamente mais elevada em indivíduos heterozigotos para ambos os polimorfismos (C677T e A1298C), quando comparados a indivíduos heterozigotos somente para a variante A1298C, sugerindo que o polimorfismo A1298C sozinho não afeta significativamente a homocisteína plasmática, mas pode exercer um efeito moderado na presença da variante C677T^{22,24}. Em estudo realizado por Föding *et al.*, (2000)²⁵ em pacientes submetidos a transplante renal, foi demonstrado uma forte influência dos genótipos *MTHFR* 677TT/1298AA e 677CT/1298AC nos níveis de Hcy e folato.

Estudos relatam que o nível elevado da Hcy no plasma pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares em pacientes com

Tabela 3. Distribuição genotípica em relação aos níveis de homocisteína (Hcy) em 17 pacientes com disfunção crônica do transplante (DCTx).

Genótipos <i>MTHFR</i>	Hcy normal	Hcy moderada	Hcy intermediária	Hcy grave
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
677CC	1 (5,9%)	2 (11,8%)	1 (5,9%)	0
677CT	1 (5,9%)	6 (35,2%)	4 (23,5%)	2 (11,8%)
677TT	0	0	0	0
1298AA	1 (5,9%)	0	2 (11,8%)	1 (5,9%)
1298AC	1 (5,9%)	8 (47%)	3 (17,6%)	1 (5,9%)
1298CC	0	0	0	0

Hcy normal: < 15µmol/L; Hcy moderada: 15 a 30µmol/L; Hcy intermediária: > 30 a 100µmol/L; Hcy grave: > 100µmol/L

Tabela 4. Distribuição genotípica em relação aos níveis de homocisteína (Hcy) em 20 pacientes com função renal normal (FN).

Genótipos <i>MTHFR</i>	Hcy normal	Hcy moderada	Hcy intermediária	Hcy grave
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
677CC	0	6 (30%)	0	0
677CT	2 (10%)	8 (40%)	2 (10%)	0
677TT	0	1 (5%)	1 (5%)	0
1298AA	1 (5%)	7 (35%)	2 (10%)	0
1298AC	1 (5%)	8 (40%)	1 (5%)	0
1298CC	0	0	0	0

Hcy normal: < 15µmol/L; Hcy moderada: 15 a 30µmol/L; Hcy intermediária: > 30 a 100µmol/L; Hcy grave: > 100µmol/L

glomerulopatias²⁶ e naqueles submetidos a transplante renal^{27,28}. Em nosso estudo, embora com casuística reduzida, a hiper-homocisteinemia foi observada em 33 pacientes (89%), concordante com Marcucci *et al.*²⁹ (2001) em estudo de pacientes transplantados (90%). Considerando a associação observada entre o genótipo e hiper-homocisteinemia, é de extrema relevância intensificar os estudos nesta área buscando identificar possíveis

biomarcadores de susceptibilidade ao desenvolvimento desta disfunção com o benefício potencial para a sociedade de proporcionar o conhecimento de novos fatores responsáveis pela disfunção do transplante, a melhoria do tratamento e o aumento da expectativa de vida dos pacientes submetidos a transplante renal, refletindo em redução de custos médico-hospitalares.

Referências bibliográficas

1. Arnadottir M, Hultberg B, Vladov V, Nilsson-Ehle P, Thysell H. Hyperhomocysteinemia in cyclosporine-treated renal transplant recipients. *Transplantation* 1996;61:509-12.
2. Sunder-Plassmann G, Floth A, Födinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000;10:87-94.
3. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 1998;64:169-72.
4. van der Put NM, Gabreëls F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51.
5. Welch GN, Upchurch G Jr, Loscalzo J. Hyperhomocyst(e)inaemia and atherothrombosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997;811:48-58.
6. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354:407-13.
7. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-3.
8. Brattstrom L, Wilcken DEL, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease. *Circulation* 1998;98:2520-6.
9. Abdel-Rahman SZ, Nouraldeen AM, Ahmed AE. Molecular interaction of 2,3-[14C]-acrylonitrile with DNA in gastric tissues of rat. *J Biochem Toxicol* 1994;9:121-8.
10. Haddad R, Mendes MA, Höehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst* 2001;126:1212-5.
11. Haddad R, Hoer NF, Eberlin MN. Homocysteine quantitation in plasma via liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*. No Prelo 2003.
12. Vellasco AP, Haddad R, Eberlin MN, Höehr NF. Combined cysteine & homocysteine quantitation in plasma by trap & release membrane introduction mass spectrometry. *Analyst* 2002;127:1050-3.
13. Yi P, Pogribny IP, James SJ. Multiplex PCR for simultaneous detection of 677 C\square T and 1298 A\square C polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene for population studies of cancer risk. *Cancer Letters* 2002;181:209-13.
14. Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, Von Zubem PM, Soares MC, Menezes R et al. Prevalence of mutation C677\square T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene distinct ethnic groups in Brazil. *Am J Med Genet* 1998;78:332-5.
15. Franco RF, Araújo AG, Guerreiro JF, Zago MA. Analysis of the 677C\square T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. *Thromb Haemost* 1998;79:119-21.
16. Andrade FL, Annichino-Bizzacchi JM, Saad ST, Costa FF, Arruda VR. Prothrombin mutant, factor V Leiden and thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase among patients with sickle cell disease in Brazil. *Am J Hematol* 1998;59:46-50.
17. Arruda VR, Belangero WD, Ozelo MC, Oliveira GB, Pagnano RG, Volpon JB et al. Inherited risk factors for thrombophilia among children with Legg-Calve-Perthes disease. *J Pediatr Orthop* 1999;19:84-7.
18. Torresan M, Machado TF, Siqueira LH, Ozelo MC, Arruda VR, Annichino-Bizzacchi JM. The impact of the search for thrombophilia risk factors among antiphospholipid syndrome patients with thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000;11:679-82.
19. Voetsch B, Damasceno BP, Camargo ECS, Massaro A, Bacheschi LA, Scaff M et al. Inherited thrombophilia as a risk factor for the development of ischemic stroke in young adults. *Thromb Haemost* 2000;83:229-33.
20. Morelli VM, Lourenço DM, D'Almeida V, Franco RF, Miranda F, Zago MA et al. Hyperhomocysteinemia increases the risk of venous thrombosis independent of the C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Brazilian patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:271-5.
21. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:14853-8.
22. Bailey L, Duhaney RL, Maneval DR, Kauwell GPA, Quinlivan EP, Davis SR et al. Vitamin B-12 status is inversely associated with plasma homocysteine in young women with C677T and/or A1298C methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Hum Nutr Metabol* 2002;132:1872-8.
23. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D et al. Cloning and mapping of cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3059-64.
24. Weisberg I, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Ellison RC et al. The 1298A\square C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis* 2001;156:409-15.
25. Födinger M, Buchmayer H, Heinz G, Papagiannopoulos M, Kletzmayer J, Rasoul-Rockenschau S et al. Effect of MTHFR 1298 A\square C and MTHFR 677C\square T genotypes on total homocysteine, folate, and vitamin B12 plasma concentrations in kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1918-25.
26. Gupta A, Robinson K. Hyperhomocysteinemia and end stage renal disease. *J Nephrol* 1997;10:77.
27. Bostom AG, Gohh RY, Tsai MY, Hopkins-Garcia BJ, Nadeau MR, Bianchi LA et al. Excess prevalence of fasting and postmethionine loading hyperhomocysteinemia in stable renal transplant recipients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1894.

28. Bertoni E, Marcucci R, Zanazzi M, Rosati A, Brunelli T, Fedi S et al. Hyperhomocysteinemia in renal transplant patients: an independent factor of cardiovascular disease. *J Nephrol* 2001;14:36-42.
29. Marcucci R, Fedi S, Brunelli T, Pepe G, Prisco D, Rosati A et al. High cysteine levels in renal transplant recipients. *Transplantation* 2001;71:746-51.

Endereço para correspondência:

Maria Paula Sanches de Alvarenga
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM)
Av. Brigadeiro Faria Lima, n.º 5416
CEP: 15090-000 – São José do Rio Preto – SP
Telefone: 17-2105700 ramal 5811
e-mail: mpaula@famerp.br
