

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO R577X DO GENE DA ACTN3 COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

ALICE KÜNZGEN SCHEER¹; HELLENA VIEIRA LANTERNA²; AMANDA BARBOSA ATRIB³, CLÉDIA FLORES⁴, CARLOS CASTILHO DE BARROS⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – alicekunzgen@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – hellenastvieira@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – amanda_b_atrib@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – clediajag@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barrosccpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Insuficiência renal crônica (IRC) é definida pela incapacidade dos rins em remover os produtos de degradação metabólica do corpo ou de realizar as funções reguladoras (WU et al., 2021). A etiologia da IRC pode ser devido a obstrução do trato urinário, diabetes mellitus, hipertensão arterial não controlada, distúrbios vasculares, entre outras (RIBEIRO et al., 2008). Porém, deve-se levar em consideração a contribuição genética tanto para a função renal na faixa saudável quanto para as doenças renais, a qual é apoiada por estimativas significativas de herdabilidade (TIN; KÖTTGEN, 2020).

Alguns estudos recentes mostraram uma associação do polimorfismo R577X (rs1815739) da alfa-actinina-3 (ACTN3) à rabdomiólise em atletas, lesão que pode levar à insuficiência renal aguda (HANSSON et al., 2020). O gene da ACTN3 codifica um membro da família de genes da proteína de ligação à alfa-actina, possuindo 23407 pares de bases e está localizado no cromossomo 11q13.2 do genoma humano (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*).

Embora o gene da ACTN3 seja expresso em células tubulares ascendentes de Henle nos rins, esse polimorfismo nunca foi estudado em pacientes submetidos a tratamento crônico de hemodiálise. Portanto, o objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência do polimorfismo R577X da ACTN3 em pacientes com insuficiência renal crônica em tratamento de hemodiálise (HD).

2. METODOLOGIA

Este é um estudo observacional transversal incluindo genotipagem do polimorfismo R577X da ACTN3 em 217 pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise no Hospital Universitário São Francisco de Paula,

localizado no município de Pelotas/RS, e 413 pessoas saudáveis morando no mesmo bairro do hospital. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAAE 64821816.0.0000.5339, “ Parecer ” nº 1.940.521) e todos os participantes assinaram o consentimento informado. Os critérios de inclusão adotados foram possuir idade igual ou superior a 18 anos e pelo menos 3 meses em tratamento de HD.

O DNA genômico (gDNA) foi extraído de amostras de sangue. Para isso, foram adicionados 500 microlitros de sangue a 1,5 ml de solução de lise de glóbulos vermelhos (Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl₂ 5 mM ; NaCl 10 mM) por 2' e lavados com ela 3 x por centrifugação. Para a pelota restante foram adicionados 1,5 ml de solução de lise central (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM pH 8,0; dodecilsulfato de sódio 0,5). O sobrenadante foi tratado com Proteinase K (INVITROGEN, cat. 25530-015) a 55°C por 4 horas. A precipitação de proteínas foi realizada adicionando 200 µl de Solução de Precipitação de Proteínas (QIAGEN, cat. 158912). O gDNA foi precipitado em isopropanol (1:1) e lavado com etanol a 70%. O gDNA foi hidratado com 50 µl de água isenta de nuclease.

Os quatro primers utilizados para as reações ARMS-PCR estão descritos na tabela 1. O protocolo descrito anteriormente por Schadock et al., 2015 funcionou bem com 2x GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA, cat M7122). Toda a reação foi repetida por dois pesquisadores diferentes até que o consenso fosse alcançado no resultado. A precisão do método foi verificada por PCR em tempo real usando o TaqMan® SNP Genotyping Assay baseado em fluorescência disponível comercialmente (Ensaio C_590093_1, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O teste revelou 100% de precisão comparando as duas técnicas.

Tabela 1. Sequências dos primers externos específicos do fragmento e dos primers internos específicos do alelo usados para genotipagem por PCR

Nome	Sequência	Tamanho do produto
hACTN3f	5'-CGCCCTTCAACAACCTGGCTGGA -3'	690 pb com hACTN3r
hACTN3r	5' - GATGAGCCCCGAGACAGGCAAGG -3'	
hACTN3Tif	5' - CAACACTGCCCGAGGCTGACTG -3'	318 pb com hACTN3r
hACTN3Cir	5' - CATGATGGCACCTCGCTCTCGG -3'	413 pb com hACTN3f

Quanto a parte estatística, para as análises de associações foram utilizadas a regressão linear multivariada e χ^2 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência do genótipo XX foi duas vezes maior em pacientes em hemodiálise em comparação ao grupo controle como mostra a tabela 2.

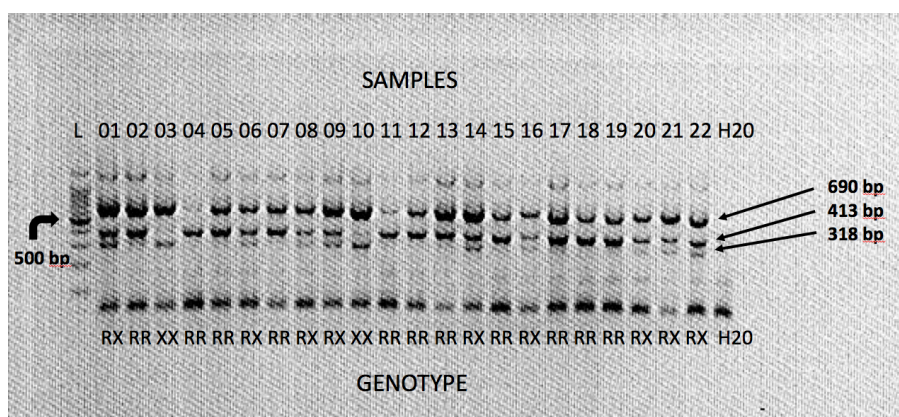
Tabela 2. Distribuição e análises do genótipo ACTN3-R577X

Genótipo	Hemodiálise		Controle		Tabela de contingência valor p
	Observado %(n)	Esperado %(n)	Observado %(n)	Esperado %(n)	
ACTN3-R577X					
RR	16,3(30)	18,0(33,1)	35,6(147)	35,6(143,0)	<0,0001
RX	52,1(96)	48,9(89,9)	46,5(192)	48,4(200,0)	
XX	31,5(58)	33,2(61,1)	17,9(74)	16,9(70,0)	
Frequência do alelo X	0,576		0,412		
HWA	Valor P = 0,355		Valor P = 0,414		

ACTN3-R577X = polimorfismo alfa-actinina-3 R577X ;
HWA = análise para equilíbrio de Hard-Weinberg.

Portadores do alelo X iniciaram HD até 11 anos antes em comparação aos pacientes com genótipo RR, e indivíduos heterozigotos iniciaram HD apenas 1 ano depois daqueles portadores do genótipo XX. Embora os pacientes com o alelo X tenham desenvolvido insuficiência renal mais precocemente, não houve influência do polimorfismo R577X na sobrevida dos pacientes em HD após início do tratamento, indicando que apesar da maior predisposição à insuficiência renal crônica, não há diferença no prognóstico entre genótipos após início do tratamento de HD.

Figura 1. Análise de genotipagem ACTN3. As bandas de comprimento de 413 e 318 pb são produtos de primers específicos refratários internos e confirmam a presença dos alelos "R" e "X", respectivamente.



4. CONCLUSÕES

Os resultados sugerem associação do alelo X do polimorfismo R577X da ACTN3 com a insuficiência renal e a idade em que a hemodiálise foi necessária, sendo o genótipo RR protetor. Porém a ligação genética do polimorfismo ACTN3 R577X deve ser verificada. A identificação de polimorfismos se torna importante, visto que, podem servir como importantes marcadores genéticos para diagnóstico clínico precoce, tratamentos eficazes e melhor compreensão da função genética e da saúde de um indivíduo (GRAY et al., 2000; WU et al., 2023).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GRAY, I.C; CAMPBELL, D.A; SPURR, N.K. Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Human Molecular Genetics**. 2000 October v 9 p. 2403–2408.

HANSSON, E. et al. Pathophysiological Mechanisms by which Heat Stress Potentially Induces Kidney Inflammation and Chronic Kidney Disease in Sugarcane Workers. **Nutrients**. 2020, 12, 1639.

NATIONAL Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

RIBEIRO, R.C.H.M. et al. Caracterização e etiologia da insuficiência renal crônica em unidade de nefrologia do interior do Estado de São Paulo. **Acta Paul Enferm**. 2008;21(Número Especial):207-11.

SCHADOCK, I. et al. Método simples para genotipar o polimorfismo ACTN3 r577x. **Biomarcadores Genet Test Mol**. 2015;19(5):253–7.

TIN, A.; KÖTTGEN, A. Genome-Wide Association Studies of CKD and Related Traits. **Clin J Am Soc Nephrol**. 2020 Nov 6; 15(11): 1643–1656.

WU, H. et al. Trends in kidney failure and kidney replacement therapy in people with diabetes in Hong Kong, 2002-2015: A retrospective cohort study. **The Lancet Regional Health - Western Pacific**. 11 (2021) 100165.

WU, K. et al. Recent Progress in Single-Nucleotide Polymorphism. **Biosensors**. 2023, 13, 864.