

## **PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS I/D DA ECA E R577X DA ACTN3 EM PACIENTES EM TRATAMENTO DE HEMODIÁLISE**

HENSE, Jéssica Damé<sup>1</sup>; VIGHI, Luiza<sup>2</sup>; RIBAS, Larissa<sup>3</sup>; BOHLKE, Maristela<sup>4</sup>; ORCY, Rafael Bueno<sup>5</sup>; BARROS, Carlos Castilho;<sup>6</sup>

<sup>1</sup>universidade federal de pelotas – [jeeh.hense@hotmail.com](mailto:jeeh.hense@hotmail.com)

<sup>2</sup> universidade federal de pelotas -- [lulu-vighi@hotmail.com](mailto:lulu-vighi@hotmail.com)

<sup>3</sup>universidade católica de pelotas – [laribasribeiro@hotmail.com](mailto:laribasribeiro@hotmail.com)

<sup>4</sup>universidade católica de pelotas – [maristela.bohlke@hotmail.com](mailto:maristela.bohlke@hotmail.com)

<sup>5</sup>universidade católica de pelotas – [rafaelbueno@hotmail.com](mailto:rafaelbueno@hotmail.com)

<sup>6</sup>universidade federal de pelotas – [barrosccpel@gmail.com](mailto:barrosccpel@gmail.com)

### **1. INTRODUÇÃO**

A doença renal crônica (DRC) é um importante problema de saúde pública devido ao número elevado de casos diagnosticados a cada ano, ao impacto do prognóstico negativo e ao elevado custo de seu tratamento. A doença renal crônica é caracterizada pela redução progressiva da taxa de filtração glomerular (PASSIGATTI et al., 2014). Diversos fatores estão envolvidos no desenvolvimento desta condição, inclusive a predisposição genética. Dentre estes fatores, variações nos genes da enzima conversora de angiotensina (ECA) e da actinina 3 (ACTN3) ainda não foram completamente estudados quanto sua associação ao risco do paciente se tornar hemodiálise (HD) dependente. Uma possível explicação para esses resultados negativos seria a heterogeneidade genética, como por exemplo, o polimorfismo no gene da enzima conversora da angiotensina (ECA). A ECA é a enzima responsável por sintetizar angiotensina I em angiotensina II, que atua no sistema renina-angiotensina-aldosterona causando contração vascular e aumento da pressão arterial (SESSO et. al., 2015). Este polimorfismo da ECA resulta de um elemento de inserção (alelo “I”) ou deleção (alelo “D”) no interior do íntron 16. A inserção causa a diminuição da atividade plasmática da enzima (CASTELLON e HAMDI, 2007).

Recentemente, outro polimorfismo, antes relacionado apenas ao desempenho atlético, tem sido muito estudado como provável fator de risco para síndrome metabólica. A alfa actinina-3 (ACTN3) é uma proteína que estabiliza filamentos de actina na linha Z do músculo esquelético, especificamente nas fibras musculares brancas do tipo 2b. polimorfismo R577X da ACTN3 ocorre pela troca de uma arginina na posição 577 (aleloR) por um código de parada (alelo X) (FERNANDES et al., 2015). Indivíduos que possuem ambos os alelos com a mutação (genótipo XX) apresentam ausência total de  $\alpha$ -actinina-3, mas são totalmente saudáveis. Já indivíduos heterozigotos apresentam uma redução na quantidade de  $\alpha$ -actinina-3 sintetizada no músculo esquelético em comparação com os indivíduos com genótipo RR (FRATTINI et al., 2016).

Apesar de diversos estudos que analisam estes polimorfismos em populações diversas, ainda a escassa literatura para se concluir o efeito destes polimorfismos com relação ao prognóstico e tratamento de pacientes com DRC em hemodiálise.

### **2. METODOLOGIA**

Um estudo de caráter transversal, onde a amostra foi constituída por pacientes adultos portadores de DRC em tratamento por HD há mais de 90 dias, no Centro de Diálise e Transplante Renal do Hospital Universitário São Francisco de Paula. Os critérios de inclusão foram: ter Idade igual ou maior a 18 anos; estar

em programa de diálise por mais de 90 dias; aceitar participar do estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A Coleta de sangue, seguiu a rotina de coleta mensal da unidade de diálise, o conteúdo coletado foi levado ao laboratório de nutrigenômica e metabologia da faculdade de nutrição para a extração do DNA genômico. Foi realizada a técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de DNA.

Os genes de ACTN3 foram amplificados utilizando combinações de primers para a obtenção de três diferentes tamanhos de fragmentos. As concentrações finais utilizadas foram 0,5  $\mu$ M para os primers externos e 0,125 e 0,25  $\mu$ M para os primers internos. Na prática, os iniciadores de 5  $\mu$ M foram misturados em um tubinho adicionando 4 volumes de cada iniciador externo, um volume do iniciador de sentido interno e 2 volumes do iniciador anti-sense interno. Foram adicionados 5C da mistura de iniciadores 10  $\mu$ l GoTaq® Master Mix (Promega®, Cat. M7122 Madison, WI, EUA) e 5  $\mu$ l da amostra de DNA, para dar um volume de reação de 20  $\mu$ l. Em um termociclador, os genes foram amplificados com o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial, 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturação à 95 °C durante 0,5 min, anelamento à 68 °C durante 1 min e extensão à 72 °C durante 1 min; e extensão final, para 72 °C 5 min.

Já para a amplificação do DNA do gene da ECA foram utilizados os primers específicos, usando estes primers para a PCR pode-se detectar dos alelos deleção (D = 190 pares de bases) e inserção (I com 490 pares de bases). Os produtos amplificados pela PCR foram analisados juntos em gel de agarose a 1% após eletroforese.

No entanto os resultados dos dois polimorfismos foram combinados para se construir um perfil genético, onde os genótipos foram combinados formando 5 categorias de acordo com o risco para hipertensão, sendo as categorias com valores mais baixos as que tem maior risco, conforme Tabela 1.

**Tabela 1.** Combinação do perfil genético de pacientes em hemodiálise

Perfil	Combinação de genótipos
1	DD e RR;
2	DD e RX, ID e RR;
3	ID e RX, DD e XX, II e RR;
4	ID e XX, II e RX;
5	II e XX;

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amostra composta por 130 pacientes, com média de idade de 56,9  $\pm$ 17,6, onde 106 foram genotipados para o polimorfismo da ECA e 72 para o polimorfismo da R577X da ACTN3. A distribuição do genótipo para os dois polimorfismos estudados nos pacientes em hemodiálise é apresentada na Tabela 2. Como resultado principal encontramos diferenças nas distribuições dos polimorfismos I/D da ECA e R577X da ACTN3 nos pacientes quando comparados com a distribuição esperada para nossa região. Conforme estudo realizado por (INÁCIO, J. et al. 2004), foi analisado o polimorfismo do gene I/D da ECA em cinco regiões do Brasil, em uma população normal, onde houve pouca variação do genótipo entre as regiões brasileiras, não havendo diferença significativa de

outras populações normais já estudadas. O maior número de ocorrências do genótipo DD no polimorfismo I/D da ECA nos pacientes em hemodiálise sugere que este genótipo aumenta o risco para os pacientes com DRC ficarem dependentes da hemodiálise. Nosso trabalho, diferentemente do que foi mostrado anteriormente, indica um aumento na frequência do genótipo DD nos pacientes em hemodiálise confirmando assim que este genótipo está associado ao risco do paciente renal se tornar dependente deste tratamento. Isso pode ser explicado pelo fato das pessoas deste genótipo terem uma maior atividade da ECA no plasma convertendo assim mais rapidamente a angiotensina 1 (inativa) em angiotensina 2, a qual está relacionada a vasoconstrição e aumento do estresse oxidativo nos rins e inflamação renal (FRANKEN et al., 2004).

Quanto ao polimorfismo R577X da ACTN3, foi observado um desequilíbrio da distribuição quanto a análise para Hardy-Weinberg. Isso mostra uma pressão de seleção a qual pode ser relacionada ao risco de se ter doença renal crônica, característica essencial da população estudada no presente trabalho.

Já na tabela 3, analisando a combinação dos genótipos no perfil genético destes pacientes, vemos que mais de 90% dos pacientes em hemodiálise se encontram nos perfis de 1 a 3. Estes dados reforçam que os alelos D e X dos polimorfismos estudados são fatores de risco para pacientes com DRC se tornarem dependentes da hemodiálise

**Tabela 2.** Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos I/D ECA e R577X ACTN3 em pacientes em hemodiálise

Polimorfismo	Genótipo	Frequência Observada n (%)	Frequência esperada n (%)	Valor de
I/D ECA	DD	43 (40,5%)	40,5	0.2987
	ID	45 (42,4%)	50,1	
	II	18 (16,9%)	15,1	
	<b>Total</b>	106		
R577X ACTN3	RR	12 (16,6%)	7,3	0.0116
	RX	22 (30,5%)	31,3	
	XX	38 (52,8%)	33,3	
	<b>Total</b>	72		

**Tabela 3.** Distribuição dos pacientes no perfil genético

Perfil genético	Frequência observada n	Percentual	Cumulativos
1	15	23,8	23,08
2	22	33,85	56,92
3	22	33,85	90,77
4	5	7,69	<b>98,46</b>
5	1	1,54	100
<b>Total</b>	65	100	

#### 4. CONCLUSÕES

Foi encontrada uma frequência aumentada do genótipo DD nos pacientes em hemodiálise, sugerindo que este genótipo aumenta o risco para os pacientes a ficarem dependentes deste tratamento. Quanto ao polimorfismo R577X da ACTN3, o genótipo XX teve a maior prevalência numa frequência muito acima do esperado comparando a controles históricos. A distribuição dos genótipos deste polimorfismo na população estudada está em desequilíbrio quanto a Hardy-Weinberg indicando uma pressão de seleção, e o risco do genótipo XX para pacientes com DRC se tornarem dependentes da hemodiálise.

Se confirmada, estas informações poderão ajudar os profissionais de saúde no prognóstico de pacientes com DRC, ajudando nas decisões quanto a implementação de tratamentos mais efetivos para evitar que estes pacientes se tornem dependentes da hemodiálise.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTELLON, Raquel; HAMDÍ, Hamdi K. Demystifying the ACE polymorphism: from genetics to biology. **Current pharmaceutical design**. Vol. 12. N. 13. Pág. 1191-8. 2007.

FRANKEN, R.A.; BELLESSO, M.; CAVAZIN, A.M.; POLÔNIO, I.B.; MATTHEUCCI, E.; VARGA, J. Associação do polimorfismo do gene da enzima conversora de angiotensina com dados ecocardiográficos em jovens normotensos filhos de hipertensos. **Rev Assoc Med Brás**. 50(1): 62-7, 2004.

FRATTINI, Isabele Rissatto; FERRARI, Gustavo Duarte; FERREZIN, Letícia Perticarrara; HOTT, Sara Cristina; GOMES, Matheus Machado; JÚNIOR, Carlos Roberto Bueno. Associação de polimorfismos genéticos da ECA e da ACTN3 com capacidade funcional e prevalência de quedas em mulheres no final da idade adulta e início da terceira idade. **Journal of Physical Education**. Vol. 27, e2713, 2016.

INÁCIO J, GOULART FILHO L. R., VIEIRA G. S. Consequências genotípicas e alélicas do gene do polimorfismo da ECA I/D na população brasileira. **Biosci. J., Uberlândia**, v.20, n.1, p.47-51, Jan.-Apr. 2004.

SCHADOK, Ines; SCHNEIDER, Augusto; SILVA, Elton Dias; BUCHWEITZ, Marcia Rubia; CORREA, Marcio Nunes; PESQUERO, João Bosco; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; ARAUJO, Ronaldo Carvalho; BARROS, Carlos Castilho. Simple method to genotype the ACTN3 r577x polymorphism. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**. V. 19. N.5. Pág. 253-7. 2015.

SESSO, Ricardo Cintra; LOPES, Antonio Alberto; THOMÉ, Fernando Saldanha; LUGON, Jocemir Ronaldo; MARTINS, Carmen Tzanno. Inquérito Brasileiro de Diálise Crônica 2014. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. Vol. 38. N. 1. Pág. 54-61. 2016.