

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação de Mestrado

**Estudo de associação do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* com
variações da região promotora do gene *DPP3* em pacientes em
hemodiálise**

Alice Künzgen Scheer

Pelotas, 2025

Alice Künzgen Scheer

Estudo de associação do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* com variações da região promotora do gene *DPP3* em pacientes em hemodiálise

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição em Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

S314e Scheer, Alice Künzgen

Estudo de associação do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* com variações da região promotora do gene *DPP3* em pacientes em hemodiálise [recurso eletrônico] / Alice Künzgen Scheer ; Carlos Castilho de Barros, orientador. — Pelotas, 2025.

48 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Doença renal. 2. ACTN3. 3. DPP3. 4. Desequilíbrio de ligação. 5. rs1815739. I. Barros, Carlos Castilho de, orient. II. Título.

CDD 641.1

Elaborada por Simone Godinho Maisonave CRB: 10/1733

Alice Künzgen Scheer

Estudo de associação do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* com variações da região promotora do gene *DPP3* em pacientes em hemodiálise

Dissertação APROVADA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 14 de julho de 2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Castilho de Barros (Orientador)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes

Prof. Dr. Augusto Schneider

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Ines Claudia Schadock

Doutora em Ciências Biológicas pela Humboldt-Universität Zu Berlin

Prof^a. Dra. Simone Pieniz (Suplente)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

A Deus, por me conceder sabedoria e proteção durante esse período.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Barros, pela confiança, disponibilidade e valiosas contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho, sendo sua orientação fundamental para meu crescimento acadêmico e profissional.

Às minhas colegas de laboratório, Amanda Atrib e Clédia Flores por todo suporte no meu aprendizado.

À minha família, por todo apoio para que eu pudesse me dedicar exclusivamente ao mestrado acadêmico.

Ao meu namorado, pelo incentivo e companheirismo durante essa jornada.

Aos membros da banca examinadora, pela leitura atenta e pelas contribuições que enriqueceram esta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, pela estrutura e corpo docente qualificado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

Resumo

SCHEER, Alice Künzgen. **Estudo de associação do polimorfismo R577X do gene *ACTN3* com variações da região promotora do gene *DPP3* em pacientes em hemodiálise**. Orientador: Carlos Castilho de Barros. 2025. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

A Doença Renal Crônica (DRC) é um sério problema de saúde pública, com prognóstico preocupante. Embora diabetes e hipertensão sejam fatores centrais, a predisposição genética tem se destacado como elemento chave no risco e na progressão da doença. Estudos prévios conduzidos em nosso laboratório identificaram uma maior frequência do alelo “X” do polimorfismo R577X do gene (alfa-actinina-3) *ACTN3* em pacientes em hemodiálise. Dado que o gene *ACTN3* possui expressão limitada nos tecidos renais, levantou-se a hipótese de que essa associação pudesse decorrer de desequilíbrio de ligação com variantes em genes vizinhos, como o *DPP3*, localizado a aproximadamente 37 mil pares de base de distância e envolvido em vias de estresse oxidativo e regulação da pressão arterial. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar possíveis associações entre variações genéticas na região promotora do gene *DPP3* e o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com DRC em hemodiálise. Foram analisadas 20 amostras de DNA de pacientes homozigotos para o polimorfismo (10 RR e 10 XX), por meio de genotipagem e sequenciamento. A região de cobertura escolhida para análise foi a região promotora proximal, primeiro éxon e início do primeiro íntron do gene *DPP3*. A seleção dessa região teve como objetivo abranger elementos funcionais essenciais, como a caixa TATA e *Open Reading Frame*. Sete variações foram identificadas, das quais cinco são inéditas em bancos de dados públicos. As variações das posições -209 (rs2279863) e -61 (rs2279864) e seus respectivos polimorfismos já conhecidos apresentaram frequência suficiente para avaliação de associação com os genótipos do polimorfismo em estudo. Embora a variante rs2279864 (-61 G>A) tenha sido observada exclusivamente em indivíduos com o genótipo RR para *ACTN3*, a análise estatística (teste exato de Fisher) não indicou associação significativa ($p = 0,2105$), apesar da tendência observada. Já o polimorfismo rs2279863 (-209 G>T) apresentou distribuição simétrica entre os

genótipos RR e XX, sem qualquer indicação de associação ($p > 0,9999$). Apesar da ausência de associações estatisticamente significativas, os resultados indicam alta variabilidade genética local, sugerindo a necessidade de investigações adicionais em amostras ampliadas.

Palavras-chave: Doença renal; *ACTN3*, *DPP3*, desequilíbrio de ligação, rs1815739.

Abstract

SCHEER, Alice Künzgen. **Association study of the R577X polymorphism of the ACTN3 gene with variations in the promoter region of the DPP3 gene in hemodialysis patients**. Advisor: Carlos Castilho de Barros. 2025. Dissertation (Master's in Nutrition and Food) – Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2025.

Chronic Kidney Disease (CKD) is a serious public health problem with a worrying prognosis. Although diabetes and hypertension are central factors, genetic predisposition has emerged as a key element in disease risk and progression. Previous studies conducted in our laboratory identified a higher frequency of the "X" allele of the R577X polymorphism of the ACTN3 gene (Alpha-Actinin-3) in hemodialysis patients. Given that the ACTN3 gene has limited expression in renal tissue, we hypothesized that this association could result from linkage disequilibrium with variants in neighboring genes, such as DPP3, located approximately 37,000 base pairs away and involved in oxidative stress pathways and blood pressure regulation. Therefore, this study aimed to investigate possible associations between genetic variations in the promoter region of the DPP3 gene and the R577X polymorphism of the ACTN3 gene in CKD patients on hemodialysis. Twenty DNA samples from patients homozygous for the polymorphism (10 RR and 10 XX) were analyzed by genotyping and sequencing. The coverage region chosen for analysis was the proximal promoter region, the first exon, and the beginning of the first intron of the DPP3 gene. This region was selected to encompass essential functional elements, such as the TATA box and open reading frame. Seven variations were identified, five of which are new to public databases. Variations at positions -209 (rs2279863) and -61 (rs2279864) and their respective known polymorphisms presented sufficient frequency to assess their association with the genotypes of the polymorphism under study. Although the rs2279864 (-61 G>A) variant was observed exclusively in individuals with the RR genotype for ACTN3, statistical analysis (Fisher's exact test) did not indicate a significant association ($p = 0.2105$), despite the observed trend. The rs2279863 (-209 G>T) polymorphism showed a symmetrical distribution between the RR and XX genotypes, with no indication of association ($p > 0.9999$). Despite the absence of statistically significant associations, the

results indicate high local genetic variability, suggesting the need for further investigations in larger samples.

Keywords: Kidney disease; *ACTN3*, *DPP3*, linkage disequilibrium, rs1815739.

Sumário

1.Introdução	10
2. Revisão de literatura	12
2.1 Rins	12
2.2. Insuficiência Renal e Hemodiálise	13
2.3 Genética	14
2.4 <i>ACTN3</i>	16
2.5 <i>DPP3</i>	17
3. Objetivos	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4. Hipótese	21
5. Referências	22
6. Relatório de Campo	26
7. Artigo	28
8. Conclusão da Dissertação	44
9. Referências Bibliográficas	45

1. Introdução

A Insuficiência renal é definida pela incapacidade dos rins em remover os produtos de degradação metabólica do corpo ou de realizar as funções reguladoras, e em muitos casos para que o indivíduo consiga a sobrevivência é necessário se submeter ao tratamento de diálise, hemodiálise ou por fim o transplante renal (RIBEIRO et al., 2008). Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2022 o número estimado foi de 153.831 pacientes em hemodiálise/diálise, e os procedimentos de transplante renal chegaram aos 4.828 casos no ano de 2021, sendo o Brasil o país que ocupa a terceira posição mundial entre os maiores transplantadores de rim. Mesmo com a estimativa de que em 2040 a doença renal crônica possa ser a 5ª maior causa de morte no mundo, existe uma persistente lacuna de conhecimento sobre a doença que não tem sido preenchida (CENSO BRASILEIRO DE DIÁLISE, 2022; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2022).

A Insuficiência Renal Crônica (IRC) pode ser causada por obstrução do trato urinário, diabetes mellitus, glomerulonefrite crônica, hipertensão arterial não controlada, distúrbios vasculares, infecções, lesões hereditárias, entre outras (RIBEIRO et al., 2008). A contribuição genética tanto para a função renal na faixa saudável quanto para as doenças renais é apoiada por estimativas significativas de herdabilidade e por uma longa linha de estudos de agregação e ligação familiar (TIN; KÖTTGEN, 2020). Diante desse cenário, estudos vêm sendo desenvolvidos a respeito dessa doença em busca de novas descobertas que ajudem na prevenção, no diagnóstico e tratamento da IRC. Dados recentes do nosso grupo de pesquisa, através de um estudo com 217 pacientes em hemodiálise e 413 pessoas saudáveis, mostraram que os genótipos contendo o alelo “X” do polimorfismo R577X do gene Alpha-Actinina 3 (*ACTN3*) tem o dobro de incidência em pacientes em hemodiálise quando comparados com as frequências alélicas da população controle, e além disso entre os pacientes, os portadores do alelo “X” entram em insuficiência renal 10 anos antes em média do que os não portadores. Porém, o gene *ACTN3* quase não é expresso nos rins, apenas nas células da alça de Henle, abrindo muitas dúvidas sobre qual o mecanismo que justificaria estes resultados, podendo inclusive ser um efeito

sistêmico, como a rabdomiólise causada pelo exercício físico muito intenso que pode induzir a uma lesão renal. Além disso, uma hipótese importante seria a ligação genética do polimorfismo R577X com variações em genes próximos no cromossomo.

Ao observar a posição no genoma humano, nota-se que o gene Dipeptidyl-peptidase 3 (*DPP3*) está ao lado do gene *ACTN3* com apenas 37 mil pares de bases de distância. Isto torna a possibilidade de separação por *crossing over* pequena entre os dois genes, portanto indicando uma provável segregação como um haplótipo típico, onde uma mutação em um dos genes deve acompanhar as variações no outro gene. A DPP3 é uma aminopeptidase dependente de zinco que cliva especificamente dipeptídeos no terminal N de oligopeptídeos, variando de quatro a dez resíduos de aminoácidos (MALOVAN et al., 2022). Apesar deste conhecimento, pouco é descrito sobre a DPP3 e seu gene.

Quando considerado a família das dipeptidyl-peptidases, uma enzima que vem sendo bastante estudada é a dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4), expressa na superfície da maioria dos tipos de células, e que desativa uma variedade de peptídeos bioativos (ROCHA et al., 2022). Sua inibição tem sido associada a regulação da glicemia e também efeitos renais protetores, como o efeito de redução da albuminúria (KIM et al., 2016). Foi observado que pacientes com rejeição recorrente de transplante renal apresentam altos níveis de um fator circulante com massa molecular semelhante a albumina, tendo como suspeita que este fator possa ser a DPP4. A massa molecular da DPP4 é quase idêntica à da DPP3.

Tendo em vista uma proximidade do gene *DPP3* com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3*, e também percebendo importantes efeitos das DPPs sobre os rins, esse trabalho tem como objetivo verificar a existência de variações genéticas na região promotora do gene *DPP3*, tal região que está relacionada a expressão do gene, e suas associações com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com insuficiência renal crônica. Com essa descoberta, teremos como elucidar se o gene próximo ao polimorfismo anteriormente estudado pode estar relacionado com o mecanismo que leva a maior frequência do alelo X do gene *ACTN3* em pacientes com IRC.

2. Revisão de literatura

2.1 Rins

O sistema renal é composto por 2 rins, 2 ureteres, uma bexiga urinária e uma uretra. Os rins são órgãos excretores pares, em forma de feijão, que ficam no retroperitônio e estão situados na parte posterior do abdômen, suas extremidades superiores estão localizadas na altura dos arcos costais mais inferiores (10^a a 12^a costelas torácicas). Os rins ficam envolvidos por uma fina membrana chamada cápsula renal, e a gordura existente ao redor é a perirrenal, ainda acima, estão localizadas as glândulas suprarrenais. No hilo renal entram e saem uma série de estruturas como a artéria renal, a veia renal, o ureter, os nervos renais e os vasos linfáticos renais (RADI, 2019).

As unidades funcionais e estruturais produtoras de urina são os néfrons, os quais localizam-se tanto no córtex quanto na medula. O néfron consiste em glomérulos, túbulos renais (túbulos proximais, alça de Henle, túbulos distais, segmento de conexão, ductos coletores), interstício e aparelho justaglomerular. A porção inicial de filtração do plasma do néfron é o glomérulo, que está contido na cápsula de Bowman (RADI, 2019).

A função endócrina renal envolve a secreção de três hormônios principais: eritropoietina, calcitriol e renina. A renina é produzida nas células justaglomerulares dos rins após processamento e clivagem da pró-renina circulante, que é produzida no fígado. A redução da pressão de perfusão renal e a hiponatremia são os principais estímulos para a liberação de renina que atuam como sensores da pressão arterial, portanto o controle da pressão arterial sanguínea também é uma função dos rins, os quais controlam as concentrações de sódio e a quantidade de líquidos no corpo (RADI, 2019).

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano. Assim, a diminuição progressiva da função renal, implica no comprometimento de essencialmente todos os outros órgãos. A função renal é avaliada pela filtração glomerular e a sua diminuição é observada na Doença Renal Crônica (DRC), associada a perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas do rim. As funções primárias dos rins são: eliminação de toxinas do sangue por um sistema de filtração, regulação da formação do sangue e dos ossos, regulação da pressão sanguínea, controle do balanço químico e de líquidos do corpo (BASTOS, BREGMAN, KIRSZTAJN; 2010).

2.2 Insuficiência Renal e Hemodiálise

A etiologia da doença renal crônica pode estar envolvida com doenças primárias dos rins, doenças sistêmicas como diabetes mellitus e hipertensão arterial, glomerulonefrites crônicas, obstrução do trato urinário, lesões renais de causa hereditária, medicamentos, agentes tóxicos e ocupacionais, infecções, nefrectomia e distúrbios vasculares (GONÇALVES et al., 2015). O rim apresenta uma capacidade de adaptar-se, mesmo quando o órgão apresenta alguma disfunção, desse modo os sintomas podem levar anos para serem notados, levando progressivamente o portador da DRC a diminuir a função renal, até que chegue à condição de insuficiência que é menos de 10% da função renal total (BRITO et al., 2017).

O estadiamento da Doença Renal Crônica (DRC) segue a classificação proposta pela KDIGO 2024, que define cinco estágios com base na estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG). O estágio 1 corresponde a uma TFG igual ou superior a 90 mL/min/1,73 m², acompanhada de evidência de lesão renal, como proteinúria, hematúria ou alterações estruturais e histológicas. O estágio 2 inclui pacientes com TFG entre 60 e 89 mL/min/1,73 m², também com sinais persistentes de lesão renal. O estágio 3 é subdividido em 3a, com TFG entre 45 e 59 mL/min/1,73 m², indicando redução leve a moderada da função renal, e 3b, com TFG entre 30 e 44 mL/min/1,73 m², sugerindo redução moderada a grave. O estágio 4 envolve TFG entre 15 e 29 mL/min/1,73 m², caracterizando comprometimento severo da função renal. Por fim, o estágio 5 corresponde a TFG inferior a 15 mL/min/1,73 m², sendo considerado como falência renal, geralmente com necessidade de terapia renal substitutiva, como hemodiálise ou transplante (KDIGO 2024).

A insuficiência renal é definida por uma baixa taxa de filtração glomerular com sintomas urêmicos, sobrecarga de fluidos, distúrbios eletrolíticos ou ácido-básico que requerem terapia de reposição renal de manutenção (KUO et al., 2022). A insuficiência renal é um dos principais contribuintes para a incapacidade crônica, a qualidade de vida prejudicada e a morte prematura em pessoas com diabetes (WU et al., 2021). Como alternativa temos a terapia substitutiva renal indicada para os pacientes com DRC em estágio avançado que se subdivide em três tipos: hemodiálise, diálise peritoneal e transplante renal. A hemodiálise é um

dos métodos mais indicado, a qual consiste na remoção de solutos e fluídos com o auxílio de uma fístula arteriovenosa e de um filtro artificial, durante o tratamento o sangue flui por tubos para o dialisador e este filtra os resíduos e o excesso de líquido, a seguir o sangue flui por meio de outro tubo e volta para o organismo do paciente. Em outras palavras, é um procedimento no qual uma máquina limpa e filtra o sangue, fazendo parte do trabalho que o rim doente não consegue mais fazer. É realizada habitualmente três vezes por semana, com durações variadas de três a quatro horas em cada sessão, numa rotina rígida (GONÇALVES et al., 2015; RUDNICKI).

Estes desfechos indesejados podem ser prevenidos ou retardados se a DRC for diagnosticada precocemente, juntamente com implementação de medidas nefro e cardioprotetoras, mas infelizmente o cenário é outro, a DRC é subdiagnosticada e tratada inadequadamente, resultando na perda de oportunidade para um tratamento prévio (BASTOS, BREGMAN, KIRSZTAJN; 2010).

2.3 Genética

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram descobertos pela primeira vez no ano de 1980 e são a forma mais comum de variações genéticas no genoma humano, responsáveis por 90% das variações entre indivíduos (GRAY et al., 2000; WU et al., 2023). A identificação de SNPs 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).

Todavia, existem associações genéticas que podem justificar alguns acontecimentos e que embasam o presente estudo. No processo da meiose, fase da prófase 1, com o alinhamento dos cromossomos homólogos acontece o *crossing over*, que é um embaralhamento do material genético do pai e da mãe, nessa recombinação os cromossomos homólogos ficam tão próximos que podem trocar trechos de DNA das suas extremidades (MNEIMNEH, 2012). Portanto, um cromossomo de origem paterna pode conter em uma das cromátides irmãs um trecho do cromossomo materno ou vice-versa, ao final

quatro células diferentes em termos genéticos são geradas. Porém, quanto mais próximos dois genes estão, mais difícil do *crossing over* acontecer nesses trechos.

O desequilíbrio de ligação é uma associação não aleatória de alelos em diferentes loci e pode ajudar a identificar regiões cromossômicas que expliquem variações fenotípicas, e a distância de 1 milhão de pares de base entre um SNP para outro equivale a 1% de chance de ocorrer o *crossing over* e deles se separarem (HARTL; CLARK, 2010). Com isso, origina-se os haplótipos, que são regiões do nosso DNA que estão ligadas entre si, podem ser SNPs estatisticamente associados (DURAN et al., 2012). Abaixo na figura 1 pode-se observar o ponto vermelho a direita da ilustração que indica a posição aproximada do polimorfismo R577X da ACTN3. Ao menos 3 variações da DPP3 têm associação com este polimorfismo. Porém, não existem estudos específicos para a região promotora da DPP3 e sua associação ao polimorfismo R577X da ACTN3.

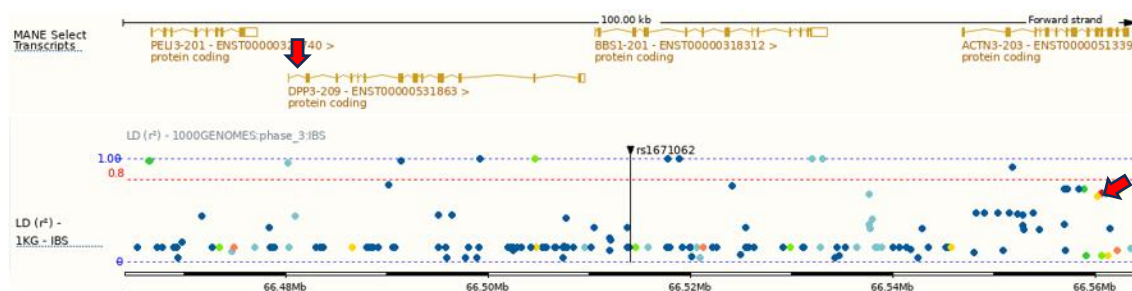


Figura 1 - Haplótipos conhecidos entre os genes da ACTN3 e DPP3.

Fonte: Site de bioinformática Ensembl.

Diante do exposto, podemos observar que a genética é uma ferramenta possibilitando encontrar formas de diagnosticar o risco de pacientes com doença renal antes de chegarem ao estágio final da doença, o que é extremamente importante devido aos desafios da terapia substitutiva e da qualidade de vida do paciente que fica prejudicada. Dessa forma, o uso de análises de polimorfismos e suas ligações possibilita um melhor entendimento da base, que é a genética, para futuras recomendações terapêuticas na prevenção e tratamento da doença renal crônica.

2.4 ACTN3

Este gene codifica um membro da família da proteína de ligação à alfa-actina, possuindo 23407 pares de bases e sua localização no genoma humano é no cromossomo 11q13.2 (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). A proteína codificada é expressa apenas em fibras musculares rápida (tipo 2) e funciona como um componente estrutural da linha Z sarcomérica e está envolvida na reticulação de actina contendo filamentos finos (YANG et al., 2003; ZOUHAL et al., 2023).

Existe um polimorfismo desse gene muito estudado, trata-se do polimorfismo R577X (rs1815739), tal variação genética recebe muita ênfase na área do esporte. Dentre os estudos, existem fortes associações do polimorfismo R577X com danos musculares e lesões musculares (SAITO et al., 2023). O polimorfismo R577X do gene *ACTN3* faz com que indivíduos com o genótipo XX sejam deficientes em α -actinina-3 funcional e isso os torna mais propensos a sofrer lesões musculares sem contato, em comparação com atletas RR e RX que produzem uma α -actinina-3 funcional em suas fibras de contração rápida (COSO et al., 2022). O genótipo XX também é associado negativamente com atividades de velocidade de elite e níveis mais baixos de força muscular básica em comparação com os genótipos RX e RR (DEMIRCI et al., 2023). Tantos são esses e outros estudos acerca desse polimorfismo no âmbito do esporte, mas dados de nosso grupo de pesquisa mostraram que o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* está associado à insuficiência renal. Sabendo que a rabdomiólise causada pelo exercício físico pode induzir a uma lesão renal, foi decidido estudar esse polimorfismo em pacientes em hemodiálise e observaram que pacientes com o genótipo X entravam em insuficiência renal 10 anos antes das pessoas não portadoras, sendo o genótipo RR protetor (HANSSON et al., 2020). Porém, um novo estudo é sugerido para analisar uma possível ligação genética, já que *ACTN3* é expresso apenas na alça de Henle. Ademais, outro gene muito próximo (*DPP3*), tendo apenas 37 mil pares de bases de distância, torna-se um possível gene a ser investigado, já que estudos não foram encontrados que estudem suas variações genéticas e pouco se sabe sobre ele. Abaixo na figura 2 podemos observar a distância entre o gene da *DPP3* e da *ACTN3*.

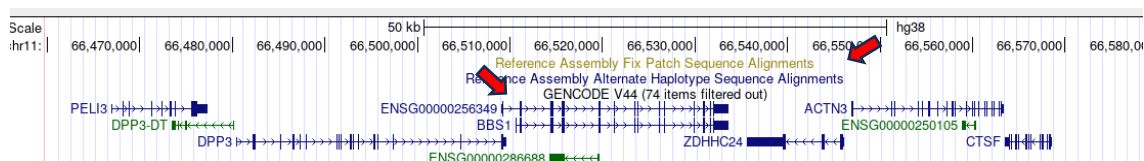


Figura 2 - Distância entre o gene *DPP3* e o gene *ACTN3* no cromossomo 11 do genoma humano

Fonte: UCSC Genome Browser.

2.5 *DPP3*

As dipeptidyl-peptidases (DPPs) formam uma classe de proteínas proteolíticas da família de enzimas envolvidas em quase todos os aspectos das atividades celulares, incluindo funções fisiológicas e patológicas. Existem subtipos distintos nesta família, incluindo a DPP1, DPP2, DPP3, DPP4, DPP5, DPP6, DPP8, DPP9 e DPP10 e DPP11 (YE et al., 2022; DIAZA et al., 2016).

O gene *DPP3* codifica uma proteína que é membro da família M49 de metalopeptidases. Esta proteína citoplasmática liga-se a um único íon de zinco com seu motivo de ligação ao zinco (HELLGH) e possui atividade dipeptidil-aminopeptidase pós-prolina, removendo dois resíduos de aminoácidos na região N terminal das proteínas. Sua localização genética é no cromossomo 11 q13.2 do genoma humano, com contagem de 18 éxons e 36251 pares de base (NCBI - *National Center for Biotechnology Information*). Como se pode ver na ilustração da Figura 3, o gene está localizado em uma região próxima ao centrômero do cromossomo 11, lugar com menor probabilidade de ocorrência de *crossing over*.

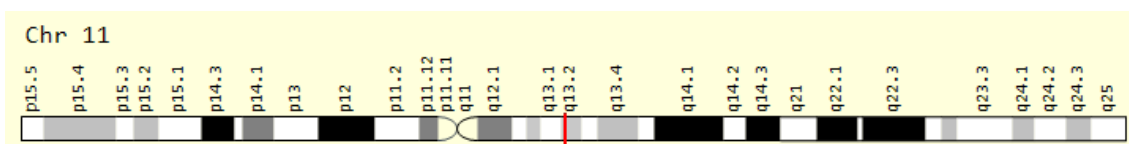


Figura 3 - Localização do gene *DPP3* no cromossomo 1

Fonte: GeneCards.

A DPP3 foi identificada pela primeira vez na hipófise bovina em 1967, sendo a terceira dipeptidyl-peptidase encontrada da família. É também a primeira peptidase dependente de zinco encontrada entre as DPPs, distribuída principalmente no citoplasma, com a sequência catalítica única HEXXGH,

associada à degradação de oligopeptídeos com 4 a 10 resíduos de aminoácidos (YE *et al.*, 2022). A DPP3 é expressa tanto em seres procariontes como em eucariontes, abundantemente expresso em todas células humanas (DIAZA *et al.*, 2016). A estrutura da DPP3 é ilustrada na figura 4.

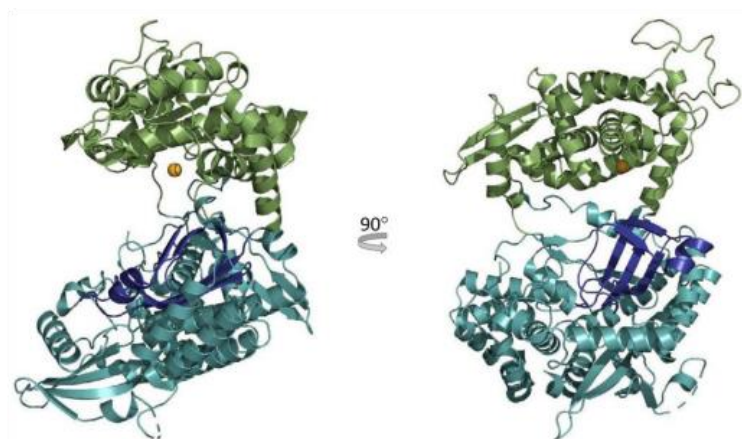


Figura 4 - Estrutura cristalina geral da DPP-3

Fonte: Malovan *et al.*, 2022.

Evidências acumuladas demonstraram que a DPP3 desempenha um papel significativo em mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos, participando da renovação proteica, estresse oxidativo, inflamação, invasão do tecido de câncer de ovário, progressão do câncer colorretal, manutenção do osso e inflamação (YE *et al.*, 2022). Estudos acerca da DPP3 mostram também o papel dela em algumas doenças cardiovasculares, e dados mais recentes mostram uma interação com a pressão arterial por meio do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA). Grande parte dos estudos envolvendo o SRAA e a DPP3 são estudos experimentais em animais, deixando muitas lacunas sobre o real impacto no sistema renal de humanos (YE *et al.*, 2022). O SRAA desempenha um papel fundamental na modulação fisiopatológica dos processos renais e cardiovasculares e é ativado quando a secreção de renina no aparelho justaglomerular do rim é estimulada por hipotensão arterial renal. A renina cliva o angiotensinogênio produzido pelo fígado, gerando angiotensina I (Ang I). A angiotensina II (Ang II) é gerada pela clivagem da Ang I através da enzima conversora da angiotensina (ECA), e assim resulta-se a vasoconstrição, anti-natriurese, anti-diurese, liberação de vasopressina e aldosterona (GONSALEZ

et al., 2018). A angiotensina II é o substrato mais proeminente relatado para DPP3. A ang II regula a vasoconstrição e é responsável pela manutenção da homeostase no coração e rins, sendo o principal efetor do SRAA (JHA et al., 2020). Estudos têm mostrado uma relação da DPP3 com a Ang II, com impactos sobre a pressão arterial (PANG, et al. 2016; JHA et al., 2020).

Estudos com camundongos hipertensos infundidos com Ang II mostraram que a administração de DPP3 como tratamento teve um efeito renal protetor, diminuiu a excreção de albumina pela urina, a qual era aumentada pela Ang II, e foi associada com a diminuição da pressão arterial (PANG, et al. 2016). O excesso de Ang II pode danificar órgãos como o coração e os rins, nesse cenário a DPP3 age digerindo a Ang II, diminuindo seus níveis, além disso reduz as espécies reativas de oxigênio produzidas pela via de sinalização da Ang II-AT1R (PANG et al., 2016).

Já a deficiência de DPP3 pode causar alterações fisiológicas e bioquímicas, sua falta gerada pela depleção do gene *DPP3* em camundongos machos afetou a via SRAA, mas não foram observadas alterações morfológicas nos rins e a função renal não sofreu impacto (JHA et al., 2020). Este estudo sugeriu que a DPP3 regula a via homeostase da água, degradando os peptídeos circulantes da angiotensina II, e que níveis aumentados de angiotensina II elevam a pressão arterial e aumentam espécies reativas de oxigênio nos rins (JHA et al., 2020).

Outra parcela de estudos direciona-se para o papel da DPP3 circulante (cDPP3) em doenças cardiovasculares, a qual atualmente é usada como biomarcador de mau prognóstico. O nível circulatório de DPP3 de 174 pacientes foi medido e notou-se que essa enzima é um fator depressor do miocárdico, cujos níveis plasmáticos na admissão estão associados à mortalidade em pacientes com choque cardiogênico. Além disso, em estudos pré-clínicos, o excesso de cDPP3 provocou depressão cardíaca, enquanto a inibição da cDPP3 melhora a contração cardíaca em um modelo de insuficiência cardíaca em camundongos (DENIAU et al., 2020). Além disso, um rápido declínio no nível de DPP3 dentro de 24 horas após a insuficiência cardíaca aguda correlacionou-se com um melhor prognóstico (DENIAU et al., 2020).

Em análise de biomarcadores, a concentração plasmática de DPP3 na admissão foi associada a um risco aumentado de morte, insuficiência circulatória e lesão renal aguda (LRA) em pacientes gravemente queimados. A associação entre níveis de DPP3, insuficiência circulatória e LRA é consistente com o entendimento atual de LRA em pacientes críticos, associando fatores hemodinâmicos e inflamação/resposta imune (DÉPRET et al., 2020). Dados de mau prognóstico como esses vão ao encontro de outros estudos. Em um deles, 2156 pacientes com insuficiência cardíaca aguda tiveram uma concentração de DPP3 aumentada e com agravamento da doença (BOORSMA et al., 2021). Em outro estudo também foi encontrado o nível circulatório de DPP3 elevado em pacientes com insuficiência cardíaca aguda, o que pode servir de biomarcador de choque cardiogênico e identificar o estágio terminal (PAVO et al., 2022).

Existem estudos que retratam possíveis interações do gene da DPP3 com impactos renais, porém se direcionam especificamente ao gene, ou em outras patologias a dosar suas concentrações circulantes, entretanto pouco se sabe sobre seus polimorfismos e prováveis impactos nas diferenças individuais e consequentemente na saúde da população. Portanto, em relação as variações genéticas em humanos do gene *DPP3* não foram encontrados estudos na literatura.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Verificar a existência de variações genéticas na região promotora do gene *DPP3* e suas associações com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com insuficiência renal crônica.

3.2 Objetivos específicos

Identificar os polimorfismos genéticos da região promotora do gene *DPP3* dos pacientes em hemodiálise por sequenciamento genético.

Comparar os polimorfismos genéticos da região promotora do gene *DPP3* com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com insuficiência renal crônica.

4. Hipótese

Existe associação entre as variações genéticas da região promotora do gene *DPP3* com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com insuficiência renal crônica.

5. Referências bibliográficas

BASTOS, M.G; BREGMAN, R; KIRSZTAJN, G.M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev Assoc Med Bras.** 2010; 56(2): 248-53.

BOORSMA, E.M. et al. Dipeptidyl peptidase 3, a marker of the antagonist pathway of the renin–angiotensin–aldosterone system in patients with heart failure. **European Journal of Heart Failure.** (2021) 23, 947–953.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Brasil é o terceiro maior transplantador de rim do mundo. Brasília 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/03/brasil-e-o-terceiro-maior-transplantador-de-rim-do-mundo>.

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Nefrologia.** Saúde dos rins para todos: educando sobre a doença renal. SBN, 2022. Disponível em: <https://sbn.org.br/medicos/dia-mundial-do-rim/ano-2022/>.

BRITO, R.F. et al. A Experiência da primeira sessão de hemodiálise: uma investigação fenomenológica. **Rev. abordagem gestalt.** Goiânia abr. 2017 vol.23 no 1.

COSO, J. D. et al. Association of the **ACTN3** rs1815739 Polymorphism with Physical Performance and Injury Incidence in Professional Women Football Players. **Genes.** 2022, 13, 1635.

DEMIRCI, B. et al. Association of ACTN3 R577X Polymorphism with Elite Basketball Player Status and Training Responses. **Genes.** 2023, **14**(6), 1190.

DENIAU, B. et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. **European Journal of Heart Failure.** (2020) 22, 290–299.

DEPRET, F. et al. Circulating dipeptidyl peptidase-3 at admission is associated with circulatory failure, acute kidney injury and death in severely ill burn patients. **Critical Care.** (2020) 24:168.

DIAZ, N.C. et al. Identification of dipeptidyl peptidase 3 as the Angiotensin-(1-7) degrading peptidase in human HK-2 renal epithelial cells. **Peptides**. 2016 September; 83: 29–37.

DURAN, C.L. et al. Haplotipos del gen de la globina beta en portadores de hemoglobina S en Colombia. **Biomédica**. 2012; 32:103-11.

ENSEMBL. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html> .

GENECARDS®: **The Human Gene Database**. Disponível em: <https://www.genecards.org/> .

GONÇALVES, F.A. et al. Qualidade de vida de pacientes renais crônicos em hemodiálise ou diálise peritoneal: estudo comparativo em um serviço de referência de Curitiba – PR. **Brazilian Journal of Nephrology**. 2015;37(4):467-474.

GONSALEZ, S. R. et al. Atividade inadequada do sistema renina-angiotensina-aldosterona local durante período de alta ingestão de sal: impacto sobre o eixo cardiorrenal. **Brazilian Journal of Nephrology**. Apr-Jun 201840 (2).

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.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

JHA, S. et al. Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. **J Biol Chem**. 2020 Oct 2; 295(40): 13711–13723.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International. Suppl**. 2024 Apr;105(4S):S117–S314. DOI:10.1016/j.kint.2023.10.018.

KIM, Y.G. et al. Renal Protective Effect of DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Cohort Study. **Journal of Diabetes Research**. V. 2016, Article ID 1423191, 9 pages.

KUO, G. et al. Comparison between peritoneal dialysis and hemodialysis on kidney function recovery in incident kidney failure: A nationwide cohort study. **Seminars in Dialysis**. 2022;35: 278–286.

MALOVAN, G. et al. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. **The FEBS Journal**. 2022 march v.290 p 2201-2503.

MNEIMNEH, S. Crossing Over...Markov Meets Mendel. **Computational Biology**. May 2012 Volume 8 Issue 5 e1002462.

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

NERBASS, F.B. et al. Censo Brasileiro de Diálise 2022. **Braz. J. Nephrol**. 2024, 46(2):e20230062.

PANG, X. et al. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. **American Heart Association**. September 2016 v 68, p 630-641.

PAVO, N. et al. Dipeptidil peptidase circulante (cDPP3) – Um marcador para insuficiência cardíaca em estágio terminal? **Journal of Internal Medicine**. 2022, 291; 886–890.

RADI, Z.A. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. **Int J Toxicol**. 2019 May/Jun;38(3):215-227.

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.

ROCHA, K. N.S. et al. Efficacy of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v.5, n.1, p. 286-303 jan./feb. 2022.

RUDNICKI, T. Doença renal crônica: vivência do paciente em tratamento de hemodiálise. **Contextos Clínicos**. 2014 janeiro-junho. vol. 7, n. 1.

SAITO, M. et al. The Association between ACTN3 R577X Polymorphism and Range of Motion: A Systematic Review and Meta-analysis. **International Journal of Sports Medicine**. 2023 Jul;44(9):618-624.

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.

YANG, N. et al. ACTN3 Genotype Is Associated with Human Elite Athletic Performance. **American Journal of Human Genetics**. 2003 Sep; 73(3): 627–631.

YE, P. et al. DPP3: From biomarker to therapeutic target of cardiovascular diseases. **Front Cardiovasc Med**. 2022; 9: 974035.

ZOUHAL, H. et al. Association between ACTN3 R577X genotype and risk of non-contact injury in trained athletes: A systematic review. **Journal of Sport and Health Science**. 12 (2023) 359-368.

6. Relatório de Campo

Devido à limitação de recursos financeiros e à ausência de parcerias que viabilizassem o sequenciamento genético completo de todas as regiões de interesse do gene *DPP3* nas 20 amostras, optamos por reduzir a cobertura genômica, restringindo-a porção proximal do promotor, o primeiro éxon e parte do primeiro íntron. Essa decisão baseou-se no fato de que essa região compreende o ORF (Open Reading Frame) e a caixa TATA, elementos essenciais para a regulação e expressão gênica.

Para a análise estatística dos dados obtidos, utilizamos o teste exato de Fisher, por ser mais adequado à pequena dimensão amostral e à natureza categórica das variáveis envolvidas.

Mesmo diante de algumas intercorrências, pude aprender mais sobre a área da genética, compreendendo melhor os processos que a envolvem. Além disso conheci e explorei softwares de bioinformática, que se mostraram ferramentas fundamentais para a análise e interpretação de dados genômicos.

Paralelamente ao desenvolvimento do meu projeto, tive a oportunidade de participar de outros experimentos conduzidos pelo grupo de pesquisa. Embora eu já possuísse experiência prévia com modelos animais no biotério de nutrição experimental, adquirida durante a iniciação científica, foi no mestrado que pude participar de forma mais ativa de um experimento mais complexo, envolvendo manejo dietético em animais. Pude acompanhar algumas etapas, como a formulação e preparo das rações experimentais, controle de peso corporal, realização de testes glicêmicos, eutanásia e punção cardíaca para coleta de amostras biológicas.

Já na parte da genética, pude participar de métodos de genotipagem, os quais resultaram em quatro depósitos de patentes, sendo “Método para genotipagem do polimorfismo rs3813627 do gene *APOA2*”, “Método para genotipagem do polimorfismo rs11872992 do gene *MC4R*”, “Método para genotipagem do polimorfismo rs8111989 do gene *CKM*”, Método para genotipagem do polimorfismo rs10830963 do gene *MTNR1B*”.

Apresentei trabalho no Encontro de Pós-Graduação da 9ª e 10ª da Semana Integrada de Inovação, Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pelotas, o que me permitiu divulgar alguns de nossos estudos.

Além disso, pude coorientar uma aluna de Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: O papel das fibras alimentares no tratamento e evolução da artrite reumatoide juvenil. Também tive a oportunidade de receber e acompanhar uma estagiária voluntária em nosso laboratório, à qual ensinei tanto a técnica de PCR quanto os fundamentos teóricos que a embasam. Essas participações e orientações foram de extrema importância para que eu me desenvolvesse mais no meio acadêmico.

ARTICLE SUBMITTED TO BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY**Association study of the R577X polymorphism of the ACTN3 gene with variations in the promoter region of the DPP3 gene in hemodialysis patients**

Alice Künzgen Scheer¹, Hellena Storch Vieira¹, Larissa R. Ribeiro², Amanda Barbosa Atrib¹, Clédia Silveira Flores da Silva¹, Ines Schadock³, Augusto Schneider¹, Maristela Böhlke², Carlos Castilho Barros^{1,4}

1 Laboratory of Nutrigenomics and Metabolism, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

2 Catholic University of Pelotas, Pelotas, Brazil

3 Department of Experimental Toxicology, German Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany

4 Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany

Corresponding author:

Professor Dr. Carlos Castilho Barros

Address: Rua Gomes Carneiro 01, No. 239, Porto, Pelotas – RS, Brazil

ZIP code: 96010-610

E-mail: barrosccpel@gmail.com

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is one of the leading causes of global morbidity and mortality and is projected to become the fifth leading cause of death by 2040. Several factors, including diabetes mellitus, systemic arterial hypertension, and genetic predisposition, significantly contribute to the development and progression of the disease. Studies conducted in our laboratory have identified a twofold increase in the incidence of the "X" allele of the *ACTN3* R577X polymorphism among hemodialysis patients, suggesting a potential genetic association with CKD risk. However, the limited expression of *ACTN3* in renal tissue raises the hypothesis that the observed association may result from linkage disequilibrium with variants in neighboring genes, such as *DPP3*, located approximately 37 kb away. The *DPP3* gene encodes a dipeptidyl peptidase involved in pathways related to oxidative stress and blood pressure regulation—mechanisms closely linked to CKD pathophysiology. This study aimed to investigate possible associations between genetic variations in the promoter region of *DPP3* and the *ACTN3* R577X polymorphism in CKD patients undergoing hemodialysis. DNA samples from 20 patients homozygous for the R577X polymorphism were analyzed through genotyping and sequencing of the promoter region and first exon of *DPP3*. Seven variants were detected, five of which were previously unreported in public databases. Although no statistically significant associations were observed, our findings suggest high local genetic variability, highlighting the need for further investigations to elucidate the functional role of these variants in CKD susceptibility.

Keywords: chronic kidney disease; genetic polymorphism; linkage disequilibrium; *DPP3*; *ACTN3*; rs1815739

Introduction

Chronic Kidney Disease (CKD) is recognized as one of the major public health challenges of this century. Estimates suggest that by 2040, CKD may become the fifth leading cause of global mortality, surpassing infectious and cardiovascular diseases^{1,2}. According to the National Kidney Foundation, the global prevalence of CKD is approximately 10%³, representing a substantial burden for healthcare systems and significantly impacting the quality of life of affected individuals. In Brazil, recent epidemiological data estimate a prevalence of 6.7% in the adult population, with a marked increase among individuals over 60 years of age⁴.

The progression of CKD is multifactorial, involving environmental, clinical, and genetic components. Diabetes mellitus and systemic arterial hypertension are recognized as the main modifiable risk factors⁵. However, the influence of genetic predisposition has been increasingly acknowledged, contributing not only to the initial risk of the disease but also to disease progression⁶.

Recent studies from our group have shown that the "X" allele of the R577X polymorphism in the alpha-actinin-3 (*ACTN3*) gene is found at twice the frequency in hemodialysis patients compared to a geographically matched control population⁷. This finding is intriguing, considering that *ACTN3* expression is predominantly limited to skeletal muscle and is not significantly expressed in the kidneys^{8,9}. This raises the hypothesis that the association between the "X" allele and CKD may be indirect, potentially mediated by linkage disequilibrium with variants in neighboring genes.

The dipeptidyl peptidase 3 (*DPP3*) gene, located just 37 kilobases from *ACTN3* on chromosome 11q13.2, emerges as a plausible candidate for such a genetic interaction. *DPP3* encodes a metallopeptidase involved in the degradation of bioactive peptides, including angiotensin II, and plays roles in oxidative stress modulation and inflammatory processes^{10–12}. Recent studies have shown that circulating *DPP3* activity is a negative prognostic biomarker in various cardiovascular and renal diseases^{10,13}.

Furthermore, a recent study identified the rs2279863 polymorphism, located in the promoter region of *DPP3*, as being associated with altered methylation of telomere-related genes in CKD patients, suggesting a potential functional role in

the disease's pathogenesis¹⁴. Based on these findings, the present study aimed to investigate whether genetic variations in the promoter region of the *DPP3* gene are associated with the *ACTN3* R577X polymorphism in hemodialysis patients, in order to explore the possibility of a genetic link mediated by the physical proximity between these genes.

Methodology

Target Population

This cross-sectional observational study was conducted with a sample of 20 patients diagnosed with CKD undergoing hemodialysis at Hospital São Francisco de Paula, located in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. The hospital is accredited by the Brazilian Ministry of Health as a nephrology reference center.

Inclusion criteria were: (1) confirmed diagnosis of stage 5 CKD according to the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) classification; (2) current treatment with hemodialysis; (3) availability of a suitable biological sample; and (4) homozygosity for the R577X polymorphism in the *ACTN3* gene, selecting 10 patients with the RR genotype and 10 with the XX genotype. Patients with active infections, cancer, or a history of kidney transplantation were excluded.

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pelotas (CAAE 64821816.0.0000.5339, Approval No. 1.940.521), and all participants provided written informed consent.

Sample Collection and DNA Extraction

Biological material was collected during routine hemodialysis procedures. A volume of 2 mL of peripheral venous blood was collected from each patient in EDTA-coated tubes and stored at 4°C until processing. Genomic DNA (gDNA) was extracted using a differential lysis protocol. Initially, 500 µL of blood were washed three times with red blood cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaCl), followed by centrifugation. Nuclear lysis was performed using a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8.0; and 0.5% SDS. Protein digestion was carried out with Proteinase K (Invitrogen, cat. 25530-015) at 55°C for 4 hours. Protein precipitation was performed using a commercial Qiagen solution (cat. 158912), and DNA was recovered by isopropanol precipitation followed by a 70% ethanol wash. The

extracted DNA was hydrated in 50 µL of nuclease-free water. The integrity and concentration of gDNA samples were assessed by spectrophotometry (260/280 nm) and electrophoresis on a 1% agarose gel.

Genotyping of the *ACTN3* R577X Polymorphism

Genotyping of the rs1815739 (R577X) polymorphism was performed using the ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System-PCR) technique, as described by Schadock et al. (2015)¹⁵. Four specific primers were used to differentiate alleles, as listed in Table 1. PCR reactions were performed in 20 µL volumes containing GoTaq® Green Master Mix (Promega, cat. M7122), specific primers, and 50 ng of genomic DNA. The thermal cycling protocol included an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 30 seconds, annealing at 60°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds, with a final extension at 72°C for 5 minutes.

Table 1 – Sequences of external fragment-specific primers and allele-specific internal primers used for PCR genotyping

Primer Name	Sequence (5' → 3')	Product Size
hACTN3f	5'-CGCCCTTCAACAACACTGGCTGGA -3'	690 bp with hACTN3r
hACTN3r	5' - GATGAGCCCGAGACAGGCAAGG -3'	
hACTN3Tif	5' - CAACACTGCCCCGAGGCTGACTG -3'	318 bp with hACTN3r
hACTN3Cir	5' - CATGATGGCACCTCGCTCTCGG -3'	413 bp with hACTN3f

Primer Design and Amplification of the *DPP3* Gene Region

For primer development, a region of the *DPP3* gene encompassing the proximal portion of the promoter, the first exon, and part of the first intron was selected. The goal of amplifying this specific area was to generate genomic DNA fragments suitable for subsequent Sanger sequencing. Initially, the genomic sequence corresponding to the region of interest was obtained using the BLAT tool (<https://genome.ucsc.edu/>). The retrieved sequence included approximately 1,000 base pairs, covering the target area and its flanking regions, allowing for a detailed analysis for primer design.

Using this sequence, the OligoPerfect™ Primer Designer software (ThermoFisher Scientific) was employed to generate initial primer candidates. During this step, parameters such as primer length, GC content, annealing temperature (T_m), and the absence of repetitive regions were considered to ensure high amplification efficiency and specificity.

Following the initial design, the proposed primers were evaluated for structural stability using the GeneRunner software. Unfavorable secondary structures—such as hairpin loops, self-dimers, bulge loops, and internal loops—were assessed, and primers with minimal tendency to form such structures were prioritized. Finally, a new specificity analysis was conducted using BLAT to confirm that the primer sequences were unique within the human genome, ensuring that amplification would occur exclusively in the desired region of the *DPP3* gene and avoiding the amplification of homologous regions. The selected primers are listed in Table 2.

Table 2 – Primer sequences used for PCR and sequencing

Primer	Sequence (5' → 3')	PCR Product Length
DPP3_F5 DPP3_R5	ACCGAGAGCTTTGCAACTTCCAA CGAGGTTTCGGAAAGGGCTGTAA	707 bp

bp = base pairs

For PCR amplification, samples were initially denatured at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 45 seconds, annealing at 60 °C for 1 minute, and extension at 72 °C for 30 seconds, with a final extension at 72 °C for 5 minutes.

To confirm the size of the amplified fragment, 10 µL of the PCR product were loaded onto a 1% agarose gel and subjected to horizontal electrophoresis in TBE running buffer. A 100 bp DNA Ladder® (Biolabs) was used as a molecular weight marker. DNA visualization was performed using SYBR Safe (Invitrogen®) under ultraviolet light on a transilluminator. The DNA amplification protocol was based on the method described by Cambien et al., 1992 ¹⁶.

PCR products were purified and prepared according to the instructions provided by the sequencing company. The sequencing results were aligned using the Geneious Prime software, version 2025.0.3.

Statistical Analysis

The most frequent *DPP3* gene variants identified were compared with the genotyping results of the *ACTN3* R577X polymorphism. The association analysis between genetic variants was performed using Fisher's exact test.

Results

Sequencing of the target region of the *DPP3* gene, which included part of the promoter region, the first exon, and the beginning of the first intron, revealed the presence of seven distinct genetic variants among the 20 individuals analyzed. These variants are distributed along the amplified sequence, and a summary is provided in Table 3.

Table 3 – Variations identified in the *DPP3* gene in subjects with XX and RR genotypes for the *ACTN3* R577X polymorphism

Subjects	Genotype	-341	-209	-150	-128	-107	-61	49
89	RR							
152	RR		K					
156	RR						R	
171	RR						R	
190	RR							
203	RR						R	
204	RR		K					
207	RR	S						
218	RR		K					
219	RR							
154	XX							
155	XX							
161	XX		K					
167	XX							
174	XX		K	K	K			
175	XX							
189	XX							
194	XX					S		R
199	XX							
216	XX		K					

Note: Nucleotide bases identified using IUPAC ambiguity codes: S = cytosine and guanine (CG); K = guanine and thymine (GT); R = adenine and guanine (AG).

Description of the Detected Variants

Of the seven identified variants, two correspond to polymorphisms previously described in international genetic databases:

rs2279863 (G>T variation at position -209)

rs2279864 (G>A variation at position -61)

These polymorphisms are located in the promoter region of the *DPP3* gene and are listed in both the dbSNP (NCBI) and UCSC Genome Browser databases. According to data from the Genome Aggregation Database (gnomAD), both exhibit moderate allele frequencies in the general population, suggesting they may represent common genetic variants, although their functional impact remains poorly understood.

The remaining five variants, found at positions -341, -150, -128, -107, and 49, have not been previously reported in major genetic variant databases (dbSNP,

gnomAD, Ensembl). These variants are considered potentially novel, although their formal classification as polymorphisms requires further analysis in larger populations to determine whether their allele frequency exceeds 1%.

A detailed characterization of each variant is provided below:

Position -341 (G>C): Detected in heterozygous form in one subject with the RR genotype for the *ACTN3* R577X polymorphism. Located far from the TATA box, this variant may affect the binding affinity of distal transcription factors¹⁴.

Position -209 (G>T, rs2279863): Found in heterozygous form in six subjects (3 XX and 3 RR). This polymorphism lies relatively close to the transcription start site and may theoretically impact secondary regulatory elements.

Position -150 (G>T): Heterozygous in one XX subject. Although distant from the critical TATA box region, variants at this position may influence proximal enhancer activity.

Position -128 (G>T): Observed in heterozygous form in one XX subject. Its proximity to the transcription start site suggests potential regulatory relevance.

Position -107 (C>A): Identified in one XX subject. Previous studies on other genes suggest that alterations in this region may modulate the recruitment of transcriptional coactivators¹⁷.

Position -61 (G>A, rs2279864): Found in three RR subjects. Located near the core promoter region, although outside the TATA box, this polymorphism may modulate transcription initiation efficiency.

Position 49 (G>A): An intronic mutation identified in one XX subject. As it lies within the first intron, it may potentially affect transcript stability or splicing efficiency, although functional studies are required for confirmation.

Association Analysis with the *ACTN3* R577X Polymorphism

Among the identified variants, only those at positions -209 and -61 occurred with sufficient frequency to allow statistical analysis.

At position -61 (rs2279864), the presence of the R variant (G/A) was observed in three RR subjects, while all XX subjects displayed the wild-type base (G/G). Fisher's exact test did not reveal a statistically significant association between this variant and the *ACTN3* genotype ($p = 0.211$), although a trend toward enrichment of the variant in the RR group was noted (Table 4).

At position -209 (rs2279863), the distribution of the K variant (G/T) was symmetrical between the RR and XX groups, with three cases in each group. Fisher's exact test confirmed the absence of association ($p > 0.999$) (Table 5).

The Figure 1 illustrates the genomic positions of these two polymorphisms within the human genome.

Table 4 – Distribution of Genotypes at Position -61 (rs2279864) According to *ACTN3* R577X Genotype

<i>ACTN3</i> Genotype	<i>DPP3</i> -61 Genotype		Total
	R	G	
RR	3	7	10
XX	0	10	10
Total	3	17	20
Fisher's exact test p value	> 0.2105		

Table 5 – Distribution of Genotypes at Position -209 (rs2279863) According to *ACTN3* R577X Genotype

<i>ACTN3</i> Genotype	<i>DPP3</i> -209 Genotype		Total
	K	G	
RR	3	7	10
XX	3	7	10
Total	6	14	20
Fisher's exact test p value	>0,9999		

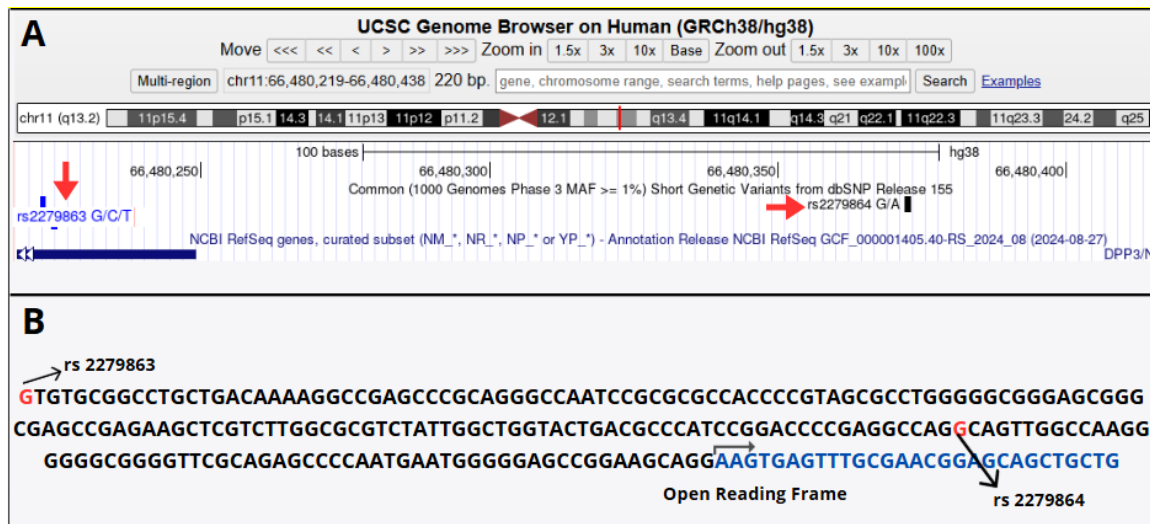


Figure 1 – Known Genetic Polymorphisms in the Promoter Region of the *DPP3* Gene. A) the positions of the known polymorphisms at -209 and -61 within the promoter region of the *DPP3* gene on chromosome 11. B) nucleotide sequence of the region and the corresponding polymorphic sites.

Discussion

The primary objective of this study was to investigate whether genetic variations in the promoter region of the *DPP3* gene might be associated with the *ACTN3* R577X polymorphism in patients with Chronic Kidney Disease (CKD) undergoing hemodialysis. The rationale stemmed from previous observations in our research line indicating a higher frequency of the “X” allele in renal patients, coupled with the knowledge that *ACTN3* expression is predominantly restricted to skeletal muscle, with minimal expression in renal tissue, although it also is involved with metabolic profile^{18–22}.

Although we did not identify a statistically significant association between *DPP3* variants and the R577X genotype, the detection of novel variants, alongside the known polymorphisms rs2279863 and rs2279864, enhances our understanding of the genetic complexity in this region and underscores the importance of continued investigation. Variants located in promoter regions, especially those near the transcription start site, may influence gene expression by altering the affinity of transcription factor binding¹⁷. Although the detected variants lie outside the classical TATA box (located ~25–35 bp upstream of the Open Reading Frame), it is well established that both proximal and distal promoter elements play

key roles in transcriptional regulation. Thus, mutations such as those identified at positions -61 and -209 in *DPP3*, even if they do not result in drastic changes to gene structure, may influence expression levels^{13,23}. Under specific pathophysiological conditions such as CKD, such effects could be amplified.

Cellular models have shown that small variations in promoter regions can alter responses to inflammatory stimuli and oxidative stress¹¹. Given that *DPP3* is involved in the degradation of angiotensin II^{12,24}, a central molecule in blood pressure homeostasis and CKD pathogenesis, variations that modulate *DPP3* expression could theoretically influence disease progression²³.

The *DPP3* gene has emerged as a promising biomarker in cardiovascular and renal diseases^{10,23}. Elevated serum levels of *DPP3* have been associated with poor prognosis in heart failure and cardiogenic shock and have been implicated in modulating inflammatory responses and systemic oxidative stress^{10,25}.

In murine models, *DPP3* deficiency has been shown to exacerbate renal dysfunction and increase reactive oxygen species production^{23,26}. Moreover, the role of *DPP3* in regulating the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) suggests that variations in its expression could affect susceptibility to hypertension, one of the main risk factors for CKD progression²⁴.

It is important to note that genome-wide association studies (GWAS) focusing on *DPP3* remain scarce, and the polymorphisms rs2279863 and rs2279864 identified in our study have not yet been functionally characterized. However, a recent analysis suggested that rs2279863 may be involved in the epigenetic modulation of genes related to cellular aging and kidney failure¹⁴.

A study examining telomere-related genes identified several genes and their polymorphisms as being associated with end-stage renal disease, including rs2279863 in the *DPP3* gene¹⁴. The concept of linkage disequilibrium (LD) is central to the interpretation of our findings²⁷. LD refers to the non-random co-inheritance of alleles at nearby loci due to physical proximity on the chromosome. Thus, neutral polymorphisms may appear associated with disease due to LD with functional variants in neighboring genes²⁸.

The 37 kb distance between *ACTN3* and *DPP3* falls within the typical range of LD blocks observed in human populations⁶. Therefore, the hypothesis that the increased frequency of the *ACTN3* X allele in CKD patients may be explained by

nearby variants in *DPP3* is biologically plausible, although not confirmed in this study.

Several methodological limitations must be acknowledged. First, the small sample size limits the statistical power to detect modest associations between genetic variants. Furthermore, we analyzed only a portion of the *DPP3* gene, the proximal promoter region, first exon and part of the first intron, leaving out potentially relevant variants in other regulatory regions, such as distal enhancers or deep intronic elements. Additionally, the absence of functional assays (e.g., gene expression analysis or luciferase reporter assays) prevents direct inference of the impact of the identified variants on *DPP3* expression. Finally, the lack of ethnic diversity in the sample limits the generalizability of our findings to other populations.

Future studies should increase the number of participants, include ethnically diverse groups, and analyze the entire *DPP3* gene, complemented by functional investigations. Moreover, longitudinal cohort analyses could assess whether *DPP3* variants influence CKD progression rate or response to RAAS-inhibiting therapies. Another promising line of investigation would be to explore *DPP3* expression profiles in renal and plasma samples from patients, correlating them with specific genotypes.

Moreover, this study reinforces the importance of considering linkage disequilibrium as a potential confounding factor in genomic association studies, particularly when disease-associated variants are located in close physical proximity within the genome.

As future directions, we suggest conducting *DPP3* gene expression analyses, functional assays to characterize the detected variants, and studies in larger and more diverse cohorts. Such approaches may clarify whether *DPP3* represents a functional link in the genetic relationship between the *ACTN3* X allele and susceptibility to CKD.

Therefore, although no direct association was demonstrated, this study paves the way for new research on the genetics of CKD and contributes to the broader understanding of the complex gene–gene interactions involved in its pathogenesis.

Conclusion

This study investigated the potential genetic association between the *ACTN3* R577X polymorphism and variations in the promoter region of the *DPP3* gene in patients with Chronic Kidney Disease undergoing hemodialysis. Although no statistically significant associations were identified, the findings offer valuable insights into local genetic variability.

The detection of five previously unreported variants in the promoter region of the *DPP3* gene highlights the need to expand the current knowledge about the genetic architecture of this gene and its potential impact on the regulation of gene expression. Considering the emerging pathophysiological role of DPP3 in cardiovascular homeostasis, oxidative stress and inflammatory response, all key processes in the progression of CKD, further investigation is warranted.

Referências

1. Foreman, K. J. *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet* **392**, 2052–2090 (2018).
2. Soares, L. B. M., Soares, A. B. & Ferreira, J. B. B. Overview of global healthcare policies for patients with chronic kidney disease: an integrative literature review. *Einstein (Sao Paulo)* **22**, eRW0519 (2024).
3. Kovesdy, C. P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl (2011)* **12**, 7–11 (2022).
4. Silva, P. A. B., Silva, L. B., Santos, J. F. G. & Soares, S. M. Brazilian public policy for chronic kidney disease prevention: challenges and perspectives. *Rev Saude Publica* **54**, 86 (2020).
5. Zardosht, K. & Namayandeh, S. M. The Prevalence of Chronic Kidney Disease Risk Factors and their Population Attributable Risks in Yazd City, Iran: A Letter-to-Editor. *Int J Prev Med* **15**, 29 (2024).
6. Tin, A. & Köttgen, A. Genome-Wide Association Studies of CKD and Related Traits. *Clin J Am Soc Nephrol* **15**, 1643–1656 (2020).
7. Scheer, A. K. *et al.* ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO R577X DO GENE DA ACTN3 COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA.
8. Lee, F. X. Z., Houweling, P. J., North, K. N. & Quinlan, K. G. R. How does α -actinin-3 deficiency alter muscle function? Mechanistic insights into ACTN3, the 'gene for speed'. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1863**, 686–693 (2016).
9. Yang, N. *et al.* ACTN3 genotype is associated with human elite athletic performance. *Am J Hum Genet* **73**, 627–31 (2003).
10. Ye, P. *et al.* DPP3: From biomarker to therapeutic target of cardiovascular diseases. *Front Cardiovasc Med* **9**, 974035 (2022).
11. Arora, M. *et al.* Involvement of DPP3 in modulating oncological features and oxidative stress response in esophageal squamous cell carcinoma. *Biosci Rep* **43**, (2023).
12. Jha, S. *et al.* Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. *J Biol Chem* **295**, 13711–13723 (2020).
13. Malovan, G. *et al.* The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. *FEBS J* **290**, 2246–2262 (2023).
14. Hill, C. *et al.* Differential Methylation of Telomere-Related Genes Is Associated with Kidney Disease in Individuals with Type 1 Diabetes. *Genes (Basel)* **14**, (2023).

15. Schadock, I. *et al.* Simple method to genotype the ACTN3 R577X polymorphism. *Genet Test Mol Biomarkers* **19**, 253–257 (2015).
16. Cambien, F. *et al.* Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* **359**, 641–644 (1992).
17. Altendorfer, E., Mundlos, S. & Mayer, A. A transcription coupling model for how enhancers communicate with their target genes. *Nat Struct Mol Biol* **32**, 598–606 (2025).
18. Garton, F. C. & North, K. N. The Effect of Heterozygosity for the ACTN3 Null Allele on Human Muscle Performance. *Med Sci Sports Exerc* **48**, 509–520 (2016).
19. Aranalde, L. C. R. *et al.* The ACTN3 R577X polymorphism affects the lipid profile and the prognosis of nutritional intervention in HIV-positive patients. *Nutrition Research* **36**, 564–574 (2016).
20. Riedl, I., Osler, M. E., Benziene, B., Chibalin, A. V. & Zierath, J. R. Association of the ACTN3 R577X polymorphism with glucose tolerance and gene expression of sarcomeric proteins in human skeletal muscle. *Physiol Rep* **3**, 1–10 (2015).
21. Moran, C. N. *et al.* Association analysis of the ACTN3 R577X polymorphism and complex quantitative body composition and performance phenotypes in adolescent Greeks. *European Journal of Human Genetics* **15**, 88–93 (2007).
22. Costa, P. B. *et al.* Combination of ACTN3 R577X and ACE I/D polymorphisms as a tool for prediction of obesity risk in children. *International Journal of Obesity* vol. 45 337–341 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41366-020-00668-3> (2021).
23. Dépret, F. *et al.* Circulating dipeptidyl peptidase-3 at admission is associated with circulatory failure, acute kidney injury and death in severely ill burn patients. *Crit Care* **24**, 168 (2020).
24. Picod, A. *et al.* Circulating Dipeptidyl Peptidase 3 Modulates Systemic and Renal Hemodynamics Through Cleavage of Angiotensin Peptides. *Hypertension* **81**, 927–935 (2024).
25. Sato, A. & Ogita, H. Pathophysiological Implications of Dipeptidyl Peptidases. *Curr Protein Pept Sci* **18**, 843–849 (2017).
26. Menale, C. *et al.* Absence of Dipeptidyl Peptidase 3 Increases Oxidative Stress and Causes Bone Loss. *J Bone Miner Res* **34**, 2133–2148 (2019).
27. Huang, Y.-T., Chang, C.-J. & Chao, K.-M. The extent of linkage disequilibrium and computational challenges of single nucleotide polymorphisms in genome-wide association studies. *Curr Drug Metab* **12**, 498–506 (2011).
28. Collins, A. Allelic association: linkage disequilibrium structure and gene mapping. *Mol Biotechnol* **41**, 83–9 (2009).

8. Conclusão da dissertação

Este estudo teve como objetivo investigar a presença de variações genéticas na região promotora do gene *DPP3* e suas possíveis associações com o polimorfismo R577X do gene *ACTN3* em pacientes com doença renal crônica (DRC) em tratamento de hemodiálise. A análise do sequenciamento de DNA permitiu identificar sete variantes distintas na região alvo do gene *DPP3*, abrangendo a região promotora proximal, o primeiro éxon e o início do primeiro íntron. Dentre essas, duas variantes correspondem a polimorfismos previamente descritos em bancos de dados internacionais (rs2279863 e rs2279864), enquanto as demais cinco são potencialmente inéditas, não tendo sido previamente relatadas nas principais bases genômicas.

Apenas as posições -209 e -61 apresentaram frequência suficiente para avaliação estatística. Embora a variante rs2279864 (-61 G>A) tenha sido observada exclusivamente em indivíduos com o genótipo RR para *ACTN3*, a análise estatística (teste exato de Fisher) não indicou associação significativa ($p = 0,2105$), apesar da tendência observada. Já o polimorfismo rs2279863 (-209 G>T) apresentou distribuição simétrica entre os genótipos RR e XX, sem qualquer indicação de associação ($p > 0,9999$).

Apesar das limitações, como o tamanho reduzido da amostra e a ausência de análises funcionais complementares, os resultados obtidos indicam a presença de variantes potencialmente relevantes na região promotora de *DPP3*. A ausência de associação estatisticamente significativa com o polimorfismo R577X de *ACTN3* sugere que, nesta amostra, as variações observadas não estão diretamente relacionadas à composição genotípica da *ACTN3*, embora a possível influência funcional de algumas dessas variantes sobre a expressão gênica do *DPP3* não possa ser descartada.

Futuros estudos com amostras mais amplas e diversificadas, além de análises funcionais são recomendados para elucidar o papel regulatório das variantes identificadas e sua eventual contribuição para os processos fisiopatológicos da DRC.

9. Referências bibliográficas

BASTOS, M.G; BREGMAN, R; KIRSZTAJN, G.M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev Assoc Med Bras.** 2010; 56(2): 248-53.

BOORSMA, E.M. et al. Dipeptidyl peptidase 3, a marker of the antagonist pathway of the renin–angiotensin–aldosterone system in patients with heart failure. **European Journal of Heart Failure.** (2021) 23, 947–953.

BRASIL. **Ministério da Saúde.** Brasil é o terceiro maior transplantador de rim do mundo. Brasília 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/saude-e-vigilancia-sanitaria/2022/03/brasil-e-o-terceiro-maior-transplantador-de-rim-do-mundo>.

BRASIL. **Sociedade Brasileira de Nefrologia.** Saúde dos rins para todos: educando sobre a doença renal. SBN, 2022. Disponível em: <https://sbn.org.br/medicos/dia-mundial-do-rim/ano-2022/>.

BRITO, R.F. et al. A Experiência da primeira sessão de hemodiálise: uma investigação fenomenológica. **Rev. abordagem gestalt.** Goiânia abr. 2017 vol.23 no 1.

COSO, J. D. et al. Association of the **ACTN3** rs1815739 Polymorphism with Physical Performance and Injury Incidence in Professional Women Football Players. **Genes.** 2022, 13, 1635.

DEMIRCI, B. et al. Association of ACTN3 R577X Polymorphism with Elite Basketball Player Status and Training Responses. **Genes.** 2023, **14**(6), 1190.

DENIAU, B. et al. Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics. **European Journal of Heart Failure.** (2020) 22, 290–299.

DEPRET, F. et al. Circulating dipeptidyl peptidase-3 at admission is associated with circulatory failure, acute kidney injury and death in severely ill burn patients. **Critical Care.** (2020) 24:168.

DIAZ, N.C. et al. Identification of dipeptidyl peptidase 3 as the Angiotensin-(1-7) degrading peptidase in human HK-2 renal epithelial cells. **Peptides**. 2016 September; 83: 29–37.

DURAN, C.L. et al. Haplotipos del gen de la globina beta en portadores de hemoglobina S en Colombia. **Biomédica**. 2012; 32:103-11.

ENSEMBL. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html> .

GENECARDS®: The Human Gene Database. Disponível em: <https://www.genecards.org/> .

GONÇALVES, F.A. et al. Qualidade de vida de pacientes renais crônicos em hemodiálise ou diálise peritoneal: estudo comparativo em um serviço de referência de Curitiba – PR. **Brazilian Journal of Nephrology**. 2015;37(4):467-474.

GONSALEZ, S. R. et al. Atividade inadequada do sistema renina-angiotensina-aldosterona local durante período de alta ingestão de sal: impacto sobre o eixo cardiorrenal. **Brazilian Journal of Nephrology**. Apr-Jun 201840 (2).

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.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

JHA, S. et al. Dipeptidyl peptidase 3 modulates the renin-angiotensin system in mice. **J Biol Chem**. 2020 Oct 2; 295(40): 13711–13723.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International. Suppl**. 2024 Apr;105(4S):S117–S314. DOI:10.1016/j.kint.2023.10.018.

KIM, Y.G. et al. Renal Protective Effect of DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: A Cohort Study. **Journal of Diabetes Research**. V. 2016, Article ID 1423191, 9 pages.

KUO, G. et al. Comparison between peritoneal dialysis and hemodialysis on kidney function recovery in incident kidney failure: A nationwide cohort study. **Seminars in Dialysis**. 2022;35: 278–286.

MALOVAN, G. et al. The emerging role of dipeptidyl peptidase 3 in pathophysiology. **The FEBS Journal**. 2022 march v.290 p 2201-2503.

MNEIMNEH, S. Crossing Over...Markov Meets Mendel. **Computational Biology**. May 2012 Volume 8 Issue 5 e1002462.

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

NERBASS, F.B. et al. Censo Brasileiro de Diálise 2022. **Braz. J. Nephrol**. 2024, 46(2):e20230062.

PANG, X. et al. Novel Therapeutic Role for Dipeptidyl Peptidase III in the Treatment of Hypertension. **American Heart Association**. September 2016 v 68, p 630-641.

PAVO, N. et al. Dipeptidil peptidase circulante (cDPP3) – Um marcador para insuficiência cardíaca em estágio terminal? **Journal of Internal Medicine**. 2022, 291; 886–890.

RADI, Z.A. Kidney Pathophysiology, Toxicology, and Drug-Induced Injury in Drug Development. **Int J Toxicol**. 2019 May/Jun;38(3):215-227.

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.

ROCHA, K. N.S. et al. Efficacy of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Brazilian Journal of Health Review**. Curitiba, v.5, n.1, p. 286-303 jan./feb. 2022.

RUDNICKI, T. Doença renal crônica: vivência do paciente em tratamento de hemodiálise. **Contextos Clínicos**. 2014 janeiro-junho. vol. 7, n. 1.

SAITO, M. et al. The Association between ACTN3 R577X Polymorphism and Range of Motion: A Systematic Review and Meta-analysis. **International Journal of Sports Medicine**. 2023 Jul;44(9):618-624.

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.

YANG, N. et al. ACTN3 Genotype Is Associated with Human Elite Athletic Performance. **American Journal of Human Genetics**. 2003 Sep; 73(3): 627–631.

YE, P. et al. DPP3: From biomarker to therapeutic target of cardiovascular diseases. **Front Cardiovasc Med**. 2022; 9: 974035.

ZOUHAL, H. et al. Association between ACTN3 R577X genotype and risk of non-contact injury in trained athletes: A systematic review. **Journal of Sport and Health Science**. 12 (2023) 359-368.