

PRECIL DIEGO MIRANDA DE MENEZES NEVES

**Glomerulopatia Colapsante Idiopática: bases moleculares e correlações entre  
parâmetros moleculares, proteômicos, clínicos e histológicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina

da Universidade de São Paulo para

obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

**São Paulo**

**2023**

PRECIL DIEGO MIRANDA DE MENEZES NEVES

**Glomerulopatia Colapsante Idiopática: bases moleculares e correlações entre  
parâmetros moleculares, proteômicos, clínicos e histológicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina

da Universidade de São Paulo para

obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

**São Paulo**

**2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Neves, Precil Diego Miranda de Menezes  
Glomerulopatia colapsante idiopática : bases  
moleculares e correlações entre parâmetros  
moleculares, proteômicos, clínicos e histológicos /  
Precil Diego Miranda de Menezes Neves. -- São  
Paulo, 2023.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Nefrologia.  
Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Glomerulopatia colapsante 2.Gene  
APOL1 3.Ancestralidade genética 4.Proteômica  
glomerular 5.Matriz extracelular

USP/FM/DBD-217/23

“Sonho que se sonha só. É só um sonho que se sonha só.

Mas sonho que se sonha junto é realidade”

*Raul Seixas*

*Dedicatória*

Dedico essa tese primeiramente a Deus, por me permitir alcançar sonhos que nunca pensei que fossem possíveis. Por zelar por mim e por todos que amo.

Aos meus pais Anibal e Eliete, pela vida, amor incondicional, carinho e exemplo.

Aos meus avós-pais Cecília e Jair Miranda (*in memorian*), pelos valores a mim ensinados e por moldarem a pessoa que hoje eu sou. O amor que tenho por vocês é infinito e infindável!

Aos meus irmãos Karine, Isabela, Pedro, Gustavo e Ricardo por me fazerem entender o real sentido de fraternidade, pelo acolhimento, torcida e pelas bagunças.

À minha esposa, Ramaiane Bridi, meu alicerce, maior incentivadora e grande amor da minha vida. Nada disso seria possível sem você ao meu lado. Amo muito você, minha polaca!

Ao queridos Robson e Marilda, pelo acolhimento e receptividade.

À minha família (avós, tios, primos, sobrinhos, afilhados, sogros e cunhados) por compreenderem a ausência frequente e por continuarem me apoiando e torcendo por mim em todas as etapas.

Aos meus “filhos” Nino (*in memorian*) e Tufa, por me ensinarem que o amor, para ser sentido, não precisa ser traduzido em palavras.

*Agradecimentos*

Agradeço primeiramente aos pacientes que, de forma voluntária, aceitaram participar do estudo e sempre me incentivaram. Conheci muitas pessoas e histórias inspiradoras.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic, por ver em mim um potencial que eu não enxergava, por todas as oportunidades tanto na vida acadêmica quanto profissional, pelas longas conversas sobre a vida e por ser exemplo de caráter, retidão e rigor científico. Quisera o mundo fosse repleto de pessoas como o senhor.

À Dra. Andréia Watanabe, querida amiga que esteve do meu lado desde a concepção do projeto, pela parceria e cumplicidade, ajuda inestimável e por todas as piadinhas que tornavam as exaustivas horas de experimento mais leves. Hi Bex!!!

Ao Dr. Elieser Watanabe, amigo por quem tenho muito apreço, pela disponibilidade, insights científicos, auxílio em todas as fases do projeto, pelo exemplo de caráter e de médico.

Ao Dr. Valkercyo Feitosa, médico brilhante e pessoa muito especial, por toda a ajuda, incentivo e parceria. Trabalhar com você foi uma honra e aprendizado imensuráveis.

Aos amigos Drs. Jukelson e Lucas, pela amizade, apoio, discussões e por auxiliarem tão bem na condução da operação clínica do grupo de Nefropatias Hereditárias do HC-FMUSP

Aos amigos do LIM29: Leandro, Fernanda, Vívian, Lívia Gilson, Jéssica, Eliene e Andressa, pelo companheirismo, carinho, ajuda, almoços no Burdog e pelo apoio irrestrito. Agradeço em especial à Talita por todo o carinho, cuidado e paciência nas análises proteômicas. Vocês com certeza fizeram com que tudo fosse mais fácil e sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao grupo de Glomerulopatias da Divisão de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-SP, Profa. Dra. Irene Noronha, Prof. Dr. Luis Yu, Dra. Viktoria Woronik, Dra. Cristiane Bitencourt e Dra. Lectícia Jorge por toda a ajuda, incentivo e ensinamentos. Agradeço em especial à Dra. Viktoria Woronik pelo carinho, cuidado, discussões de inúmeros casos desafiadores sempre acompanhados de um cafezinho e à Dra Lectícia Jorge, pelo carinho, apoio irrestrito e inúmeras parcerias na medicina e na vida.

À equipe do Laboratório Fleury, em especial à Dra. Maria Carolina Pintão por apostar num projeto com metodologia ainda não reproduzidos e padronizados no país. Ao Dr. Valdermir Melechko, pessoa e cientista de mais alto quilate, por toda a sua dedicação, incentivo e esforço



para que tudo transcorresse da melhor forma possível. Trabalhar com o senhor foi algo inspirador e muito prazeroso. À Dra. Jussara, pessoa tão querida e que me abriu tantas portas, pelo carinho e preocupação em sempre nos ajudar mesmo com todas as suas inúmeras atribuições.

À equipe do Centro Internacional de Pesquisas do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, em especial ao Prof. Dr. Álvaro Avezum, pelo apoio e incentivo, pelas conversas e discussões que vão muito além da medicina e pesquisa e por sempre apostar em mim e ao Dr. Gustavo Oliveira, grande amigo e parceiro de trabalho, pelo apoio irrestrito e inúmeras conversas sobre a vida e o trabalho.

Ao Dr. Chin Lin e Natalia Gonçalves pela dedicação, paciência e todo suporte na fase de treinamento e padronização das microdissecções a laser e pelo apoio nas adversidades.

Aos funcionários da Enfermaria e Ambulatório de Nefrologia do HC-FMUSP em especial à Gillene Santos, Adriana Fernandes, Lidiane Maranhão, Isis Ferreira, Ívina Santos, Mônica Canova e Débora Peres por toda a ajuda com a convocação dos pacientes e coleta de amostras. Sem a ajuda de vocês não teria conseguido!

Ao Prof. Dr. Antônio Lerário por todo o auxílio na realização das análises primárias e secundárias dos dados de genética, pela presteza e gentileza de sempre. À Amanda Narcizo pelo carinho, paciência e disponibilidade em nos orientar nas realizações dos sequenciamentos de nova geração. À Kelly Nunes, pelo imenso auxílio, insights e expertise nas análises de ancestralidade. Ao Frederico Moraes pela ajuda na realização das modelagens moleculares através dos modelos de predição de patogenicidade *in silico*.

À equipe de Clínica Médica e Nefrologia do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, Prof. Dr. Pedro Chocair, Drs. Américo Cuvello, Érico, Leonardo, Victor, Sara, Alessandra, Luciana, Bernadete, Jéssica, Carla, Muna, Bernardo, Luciana, Fernando e Sabrine pelo incentivo e por sempre “segurarem as pontas” quando precisei me ausentar por questões relacionadas ao doutorado. Agradeço em especial ao Dr. Pedro Chocair pelo exemplo e pela contagiante paixão pesquisa após tantos anos de carreira e ao Dr. Américo, por sempre estar junto no “*fronte de batalha*”, por valorizar a minha opinião, me incentivar e apoiar nas diversas pesquisas realizadas no HAOC. A todos os amigos do Centro de Nefrologia e Diálise do HAOC (enfermeiros, técnicos de enfermagem, nutricionistas, psicólogos, assistentes administrativos), que fazem os dias intensos de trabalho mais leves e prazerosos.

Minha eterna gratidão a todos vocês!

## RESUMO

Neves PDMM. *Glomerulopatia colapsante idiopática: bases moleculares e correlações entre parâmetros moleculares, proteômicos, clínicos e histológicos* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

A glomerulopatia colapsante (GC) é uma doença glomerular grave, que se apresenta frequentemente como síndrome nefrótica com proteinúria maciça e rápida evolução para doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva (DRC-TRS). Seu diagnóstico é histológico e consiste na identificação de colapso e perda de patência das alças capilares glomerulares em associação com hiperplasia e hipertrofia de podócitos. Dados prévios de estudos brasileiros sugerem uma prevalência relativa notadamente maior de GC em nosso país comparada às de casuísticas estrangeiras. Formas secundárias de GC são comuns, como em associação com infecções por HIV e COVID-19; entretanto, em casos em que não se identifica uma condição potencialmente associada à sua patogênese, a doença é denominada GC idiopática (GCI). Aspectos genético-moleculares participam ativamente da patogênese da GC, incluindo maior suscetibilidade determinada por genótipo de alto risco de *APOL1* (GAR) e associação com variantes mendelianas patogênicas em genes associados à estrutura e função do podócito. A compreensão acerca das vias de sinalização alteradas nesta doença, contudo, ainda é precária. Diante desse cenário, procuramos ampliar o entendimento da patogênese da GCI por meio da caracterização de aspectos genético-moleculares e proteômicos e do estabelecimento de associações com perfis fenotípicos clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos. Nosso estudo incluiu 70 pacientes com diagnóstico de GCI. Cerca da metade deles evoluiu para DRC-TRS 36 meses após o diagnóstico. Variantes mendelianas (VM) causativas ou GAR foram identificados em 41 (58,6%) pacientes, 33 (47,1%) dos quais com GAR e 8 (11,5%) com VM. A prevalência de GAR foi maior no grupo autodeclarado não-branco e pacientes com GAR apresentaram maior frequência de história familiar de doença renal. Não identificamos parâmetros histológicos específicos capazes de prever evolução para DRC-TRS ou a natureza do genótipo do paciente. Maior idade à biópsia renal foi fator de risco independente para evolução para DRC-TRS aos 36 meses pós-biópsia renal. A presença de VM também foi fator de risco independente para DRC-TRS aos 36 meses pós-biópsia renal e ao fim do seguimento, e atingir qualquer tipo de remissão foi fator protetor contra esses desfechos. Além disso, a probabilidade da GCI se manifestar da 2ª à metade da 5ª década de vida em pacientes com GAR mostrou-se substancialmente maior que em pacientes com genótipo de baixo risco de *APOL1* (GBR). Pacientes com GAR apresentaram maior proporção de ancestralidade genética africana que pacientes com GBR. Identificamos novas VM causativas nos genes *COL4A5*, *COQ2* e *PLCE1* e variantes previamente descritas nos genes *COL4A3*, *MYH9*, *TRPC6*, *COQ2* e *TTC21B*. Variantes de significado incerto (VSI) nos

genes *ITGB4*, *LAMA5* ou *PTPRO* foram identificadas em três pacientes do grupo GAR e detectamos uma VSI no gene *MAGI2* em um paciente do grupo GBR. Análises proteômicas de matriz extracelular (MEC) glomerular de tecido renal normal e de biópsias renais de pacientes com GAR, GBR e glomeruloesclerose segmentar e focal variante “*not-otherwise specified*” (GESF-NOS) revelaram um padrão de deposição de proteínas consistente com ativação de vias inflamatórias, imunológicas e pró-fibróticas em pacientes com GCI associada a GAR, um perfil qualitativo e predominantemente reproduzido no grupo GBR. Um achado extremamente relevante foi a identificação de uma importante participação do sistema complemento na patogênese da GCI em pacientes com GAR, uma vez que tais achados não foram observados em pacientes com GCI associada a GBR ou GESF-NOS. Nosso estudo revelou que o status genético desempenha um papel fundamental na patogênese da GCI, responsabilizando-se por mais da metade dos casos em uma população brasileira altamente miscigenada, e mostrou que GAR de *APOLI* se constituiu na principal base genética para essa doença. Nossas análises proteômicas, por sua vez, revelaram que rins GAR-*APOLI* apresentam um padrão de proteínas de matriz extracelular glomerular associado a vias de inflamação, ativação imunológica e fibrose, e que inclui componentes do sistema complemento.

**Descritores:** Glomerulopatia colapsante; Gene *APOLI*; Variantes mendelianas, Ancestralidade genética; Proteômica glomerular; Matriz extracelular

## ABSTRACT

Neves PDMM. *Idiopathic collapsing glomerulopathy: molecular basis and correlations among molecular, proteomic, clinical and histological parameters* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Collapsing glomerulopathy (CG) is a severe glomerular disease that frequently presents as nephrotic syndrome with massive proteinuria and rapid progression to chronic kidney disease requiring renal replacement therapy (CKD-RRT). Its diagnosis is established by kidney histology with collapse and loss of patency of glomerular capillary loops associated with podocyte hyperplasia and hypertrophy. Previous data from Brazilian studies suggest a higher relative prevalence of CG in our country compared to other foreign series. Secondary forms of CG are common, such as in association with HIV and COVID-19 infections; however, in cases where a condition potentially associated with its pathogenesis is not identified, it is named idiopathic CG (ICG). Molecular genetic aspects actively participate in the pathogenesis of CG, including increased susceptibility to developing the disease in patients with *APOLI* high-risk genotype (HRG) and its association with pathogenic Mendelian variants in genes involved in podocyte structure and function. The understanding about the altered signaling pathways in CG, however, is still precarious. Given this scenario, we aimed to expand the comprehension of ICG pathogenesis through the characterization of molecular genetic and proteomic aspects as well as the establishment of associations with clinical, laboratory and anatomopathological phenotypic profiles. Our study included 70 patients diagnosed with ICG. Approximately half of them progressed to CKD-RRT 36 months after the diagnosis. Causative Mendelian variants (MV) or HRG were identified in 41 (58.6%) patients, 33 (47.1%) of whom with HRG and 8 (11.5%) with MV. The prevalence of HRG was higher in the non-White self-declared group and patients with HRG had a higher frequency of family history of kidney disease. We did not identify specific histological parameters that predicted progression to CKD-RRT nor the nature of the patient's genotype. Older age at kidney biopsy was an independent risk factor for progression to CKD-RRT at 36 months post-renal biopsy. The presence of MV was also an independent risk factor for CKD-TRS at 36 months post-kidney biopsy and at the end of the follow-up, and achieving any type of remission was a protective factor against such outcomes. In addition, the probability of ICG to manifest from the 2<sup>nd</sup> to the middle of the 5<sup>th</sup> decade of life in patients with HRG was substantially higher than in patients with an *APOLI* low-risk genotype (LRG). Patients with HRG presented a higher proportion of African genetic ancestry than patients with LRG. We identified new causative MV in the *COL4A5*, *COQ2* and *PLCE1* genes and previously described variants in *COL4A3*, *MYH9*, *TRPC6*, *COQ2* and *TTC21B*. Variants of uncertain significance (VUS) in the *ITGB4*, *LAMA5* or *PTPRO* genes were identified in three patients harboring HRG and we

detected a VUS in *MAGI2* in one LRG patient. Proteomic analyses of glomerular extracellular matrix (ECM) in normal kidney tissue and kidney biopsies from patients with HRG, LRG and focal segmental glomerulosclerosis variant “*not-otherwise specified*” (FSGS-NOS) revealed a pattern of protein deposition consistent with activation of inflammatory, immunological and pro-fibrotic pathways in patients with GAR-associated ICG, a profile qualitatively and predominantly reproduced in the LRG group. An extremely relevant finding was the identification of pivotal participation of the complement system in the pathogenesis of ICG in patients with HRG, since such findings were not observed in patients with ICG associated with LRG or FSGS-NOS. Our study revealed that the genetic status plays a fundamental role in the pathogenesis of ICG, accounting for more than half of the cases in a highly admixed Brazilian population, and showed that *APOLI*-HRG constitutes the main genetic basis for this disease. Our proteomic analyses, in turn, revealed that *APOLI*-HRG kidneys display a pattern of glomerular extracellular matrix proteins associated with inflammation, immunologic activation and fibrosis pathways, which includes components of the complement system.

**Descriptors:** Collapsing glomerulopathy; *APOLI* gene; Mendelian variants, Genetic ancestry; Glomerular proteomics; Extracellular matrix

# SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de abreviações, símbolos e siglas

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1 Glomerulopatia Colapsante: Aspectos Históricos e Epidemiologia .....	24
1.2 Glomerulopatia Colapsante: Apresentação Clínica, Evolução e Tratamento .....	26
1.3 Caracterização Histológica da Glomerulopatia Colapsante .....	28
1.4 Patogênese da Glomerulopatia Colapsante Idiopática: Aspectos Genético-Moleculares .....	30
1.5 Patogênese da Glomerulopatia Colapsante: Vias de sinalização e Perfis de Expressão Proteica Glomerular .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	39
2.1. Central .....	40
2.2. Específicos .....	40
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	41
3.1. Aspectos éticos .....	42
3.2 Seleção e Caracterização de Pacientes .....	42
3.3. Análise de Resposta Terapêutica .....	43
3.4. Protocolo de Realização de Biópsia Renal .....	44
3.5. Análise Histopatológica .....	45
3.6. Coleta de Sangue, Extração de DNA genômico e Armazenamento das Amostras .....	46
3.7. Protocolos de sequenciamento .....	46
3.7.1. <i>Preparo de bibliotecas e sequenciamento dos painéis customizados</i> .....	47
3.7.2. <i>Preparo de biblioteca e sequenciamento de exoma completo</i> .....	48
3.8. Análise Primária dos Dados .....	49
3.9. Análise Secundária dos dados .....	49
3.10. Análise de Ancestralidade .....	53
3.11. Preparo de Fragmentos Renais Parafinizados para Microdissecção .....	53
3.12. Protocolo de Descelularização .....	54
3.13. Análise Proteômica .....	55
3.14 Processamento dos Dados e Análise In Silico .....	56
3.15. Análise Estatística .....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	58
4.1 Caracterização clínica, laboratorial e histológica de pacientes com GCI .....	59
4.2. Análise genética e correlações genótipo-fenótipo .....	64
4.3. Contribuição do GAR de <i>APOL1</i> para o desenvolvimento de GCI .....	69

4.4. Efeito da miscigenação sobre a distribuição de genótipos de alto risco de <i>APOLI</i> em pacientes brasileiros com GCI.....	72
4.5. Variantes mendelianas patogênicas associam-se a GCI em pacientes adultos e pediátricos.....	76
4.6. Associação de variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas com GAR- <i>APOLI</i> .....	78
4.7 Microdissecção glomerular a laser de biópsias renais.....	83
4.8. Caracterização das proteínas do proteoma de matriz extracelular glomerular .....	84
4.9. Identificação de proteínas da MEC glomerular e construção do matrissoma do estudo .....	89
4.10. O perfil de abundância das proteínas da matriz extracelular glomerular difere entre os grupos de pacientes analisados .....	91
<b>DISCUSSÃO</b> .....	98
<b>CONCLUSÃO</b> .....	121
<b>RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS</b> .....	123
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	127
<b>ANEXOS</b> .....	158
TABELAS ANEXAS.....	160
FIGURAS ANEXAS.....	180
ARTIGO SUBMETIDO.....	184

*Listas*



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Alterações histológicas clássicas da glomerulopatia colapsante observadas na biópsia renal.

**Figura 2.** Gene *APOLI*, alelos de risco e domínios proteicos da Apolipoproteína 1

**Figura 3.** Repercussões intracelulares do aumento de expressão de *APOLI* em pacientes com genótipos de alto risco

**Figura 4.** Espectro clínico de apresentação das Nefropatias associadas ao gene *APOLI*.

**Figura 5.** Fluxograma da seleção da casuística de pacientes com GCI.

**Figura 6.** Distribuição genotípica dos pacientes com GCI (em %), incluindo variantes mendelianas relacionadas a GC e variantes de risco de *APOLI*.

**Figura 7.** Distribuição percentual (ordenada) em número absoluto (dentro das barras) dos pacientes com GCI de acordo com a idade e achados genéticos.

**Figura 8.** Análise da evolução da sobrevida renal em pacientes com GCI de acordo com o perfil genotípico, realizada por meio de análise de curvas de Kaplan-Meier.

**Figura 9.** Distribuição etária da manifestação de GCI em pacientes com GAR e GBR de *APOLI*.

**Figura 10.** *Barplot* de inferência de ancestralidade genética para cada paciente de nossa coorte de GCI.

**Figura 11.** *Boxplot* comparativo das proporções de ancestralidade genética entre os grupos autodeclarados “não-branco” e “branco”.

**Figura 12.** *Boxplot* comparativo das proporções de ancestralidade genética entre subgrupos com diferentes genótipos de *APOLI*.

**Figura 13.** Sequência primária e análise estrutural das duas variantes identificadas em *COQ2*.

**Figura 14.** Etapas da Microdissecção glomerular a laser.

**Figura 15.** Análise de componente principal de proteínas identificadas no proteoma glomerular.

**Figura 16.** Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas detectadas na análise proteômica total e as proteínas comuns entre os grupos analisados.

**Figura 17.** Diagrama de Venn contendo o número de proteínas de MEC glomerular identificadas neste estudo, comparado aos de proteínas anotadas no banco de dados do Projeto Matrissoma e matrissoma glomerular já publicados.

**Figura 18.** *Volcano plot* exibindo as proteínas com diferença de abundância entre os grupos.

**Figura 19.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e CTRL

**Figura 20.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GBR e CTRL.

**Figura 21.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e GESF-NOS.

**Figura 22.** Rede de interações de proteínas identificadas no matrissoma da MEC glomerular do estudo

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Causas secundárias associadas a Glomerulopatia Colapsante

**Tabela 2.** Esquemas imunossupressores e respectivas respostas terapêuticas em pacientes com glomerulopatia colapsante não relacionada a HIV.

**Tabela 3.** Critérios de patogenicidade de variantes de acordo com o *American College of Medical Genetics and Genomics*

**Tabela 4.** Diretrizes de combinação dos critérios para classificar as variantes encontradas

**Tabela 5.** Características clínicas, laboratoriais e evolutivas de pacientes com GCI

**Tabela 6.** Perfil clínico, laboratorial e genético de pacientes com GCI que evoluíram ou não para DRC-TRS até 36 meses após a realização de biópsia renal e até o fim do seguimento.

**Tabela 7.** Achados histológicos em pacientes com GCI que evoluíram para DRC-TRS até 36 meses pós-biópsia e até o final do seguimento.

**Tabela 8.** Apresentação clínica, resposta terapêutica e evolução de pacientes com GCI de acordo com os achados genéticos.

**Tabela 9.** Achados histológicos renais em pacientes com GCI de acordo com os genótipos identificados.

**Tabela 10.** Análise por regressão de Cox de fatores de risco potenciais associados à progressão para DRC-TRS até 36 meses pós-biópsia.

**Tabela 11.** Análise por regressão de Cox de fatores de risco potenciais associados à progressão para DRC-TRS até o final do seguimento.

**Tabela 12.** Perfis clínico, laboratorial e evolutivo de pacientes com genótipos de alto e baixo risco de *APOLI*.

**Tabela 13.** Achados histológicos renais em pacientes com GCI de acordo com o genótipo de *APOLI*.

**Tabela 14.** Proporções de ancestralidade genética africana, europeia, latino-americana e leste-asiática em populações de diferentes regiões do Brasil e em nossa coorte de pacientes com GCI.

**Tabela 15.** Comparação das médias de ancestralidade Africana entre os genótipos de *APOLI*.

**Tabela 16.** A) Caracterização clínico-evolutiva dos pacientes com GCI que apresentaram variantes mendelianas causativas. B) Caracterização clínico-evolutiva dos pacientes com GCI com variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas associadas ou não a *GAR-APOLI*

**Tabela 17** A) Caracterização das variantes mendelianas causativas de acordo com os critérios de patogenicidade do ACMG. B) Caracterização das variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas de acordo com os critérios de patogenicidade do ACMG.

**Tabela 18.** Caracterização das amostras de biópsias renais microdissecadas de acordo com o diagnóstico histológico, genótipo de *APOL1*, número e área glomerular total.

**Tabela 19.** Proteínas exclusivas identificadas no proteoma de cada grupo de pacientes

**Tabela 20.** Proteínas exclusivas identificadas no matrissoma glomerular de cada grupo do estudo

**Tabela 21.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença significativa de abundância entre os grupos GAR e CTRL.

**Tabela 22.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença de abundância significativa entre os grupos GBR e CTRL.

**Tabela 23.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença de abundância significativa entre os grupos GAR e GESF-NOS.

## LISTA DE ABREVIACÕES, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>μL</b>	Micro litro
<b>μm</b>	Micrômetro
<b>Å</b>	Ângstrom
<b>ABraOM</b>	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
<b>ACMG</b>	American College of Medical Genetics and Genomics
<b>AGC</b>	Automated Gain Control
<b>ANCA</b>	Anticorpo Anticitoplasma de Neutrófilos
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>APOL1</b>	Apolipoproteína 1
<b>BA</b>	Bahia
<b>BCL</b>	Binary Base Call
<b>BRA</b>	Bloqueador do Receptor de Angiotensina II
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
<b>CCP</b>	Ciclosporina
<b>CE</b>	Corticosteroides
<b>CFF</b>	Ciclofosfamida
<b>CKD-EPI</b>	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
<b>cm</b>	Centímetro
<b>COVAN</b>	COVID-19 associated-nephropathy
<b>DDA</b>	Data Dependent Acquisition
<b>dL</b>	Decilitro
<b>DLM</b>	Doença de Lesões Mínimas
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DRC</b>	Doença Renal Crônica
<b>DRC-TRS</b>	Doença Renal Crônica com necessidade de Terapia Renal Substitutiva
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBI</b>	European Bioinformatics Institute
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>ERR</b>	Receptor de Estrogênio
<b>FAN</b>	Fator Antinuclear
<b>FMUSP</b>	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>g</b>	Grama
<b>GAR</b>	Genótipo de alto risco de <i>APOL1</i>
<b>GBR</b>	Genótipo de baixo risco de <i>APOL1</i>
<b>GC</b>	Glomerulopatia Colapsante
<b>GCI</b>	Glomerulopatia Colapsante idiopática
<b>GESF</b>	Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

<b>GESF-NOS</b>	Glomeruloesclerose Segmentar e Focal – variante Not otherwise specified
<b>gnomAD</b>	Genome Aggregation Database
<b>GO</b>	Goiás
<b>h</b>	Horas
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Água
<b>HBV</b>	Vírus da Hepatite B
<b>HC-FMUSP</b>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>HCMED</b>	Sistema de Exames Complementares
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HDL</b>	Lipoproteína de Alta Densidade
<b>HGDP</b>	Human Genome Diversity Project
<b>HGMD</b>	Human Gene Mutation Database
<b>HIF</b>	Hypoxia inducible fator
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HIVAN</b>	HIV-associated nephropathy – Nefropatia Associada ao HIV
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitário Humano
<b>HR</b>	Harzard Ratio
<b>HTLV</b>	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
<b>IC</b>	Intervalo de Confiança
<b>ICN</b>	Inibidor de Calcineurina
<b>ICr</b>	Instituto da Criança
<b>IECA</b>	Inibidor da Enzima de Conversão da Angiotensina I
<b>IGV</b>	Integrative Genomics Viewer
<b>INR</b>	International Normalized Ratio
<b>IT</b>	Injection time
<b>KDIGO</b>	Kidney Disease Improving Global Outcomes
<b>LC-MS</b>	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
<b>LES</b>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
<b>LIM</b>	Laboratório de Investigação Médica
<b>m/z</b>	Razão massa-carga
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros quadrados
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MBG</b>	Membrana Basal Glomerular
<b>MCL</b>	Microdissecção a Laser por Captura
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>min</b>	Minuto / Minutos
<b>miRNAs</b>	micro-RNA
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>Ms</b>	Milissegundos
<b>MS/MS</b>	Tandem mass spectrometry
<b>MS1</b>	Full scan mass spectral data

<b>Nef</b>	Negative regulatory fator
<b>NEPTUNE</b>	Nephrotic Syndrome Study Network
<b>NH<sub>4</sub>OH</b>	Hidróxido de Amônio
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NRF</b>	Nuclear Respiratory Factor
<b>OMIM</b>	Online Mendelian Inheritance in Man
<b>PBS</b>	Soro Fetal Bovino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$ Coactivator-1 $\alpha$
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide 3-kinase
<b>PPAR<math>\beta</math></b>	Peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta$
<b>Ras</b>	RAt Sarcoma vírus
<b>RC</b>	Remissão Completa
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RP</b>	Remissão Parcial
<b>Rpm</b>	Rotações por Minuto
<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>SAM</b>	Sequence Alignment Map
<b>SELAdb</b>	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo <i>database</i>
<b>SELA-FMUSP</b>	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction
<b>STAT3</b>	Src signal transducer and activator of transcription 3
<b>TAC</b>	Tacrolimus
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TEAB</b>	Brometo de Tetraetilamônio
<b>TFA</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>TFAM</b>	Transcription Factor A, Mitochondrial
<b>TFGe</b>	Taxa de Filtração Glomerular Estimada
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor- $\beta$
<b>TRS</b>	Terapia Renal Substitutiva
<b>TTPA</b>	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
<b>VCF</b>	Variant Call File
<b>VDRL</b>	Venereal Disease Research Laboratory
<b>VM</b>	Variantes Mendelianas
<b>VSI</b>	Variante de Significado Incerto
<b>WGS</b>	Whole Genome Sequencing

# *Introdução*



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Glomerulopatia Colapsante: Aspectos Históricos e Epidemiologia

Doenças glomerulares podem se associar a causas hereditárias ou adquiridas e se expressar clinicamente de diferentes formas, incluindo curso assintomático, evolução para lesão renal aguda ou progressão para doença renal crônica (DRC). Nesta forma, o conjunto das diferentes glomerulopatias de curso crônico constitui a terceira causa mais frequente de necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) no mundo. Grande parte das glomerulopatias manifesta-se na forma de síndrome nefrótica. Esta denominação compreende um quadro sindrômico composto por elementos clínicos e laboratoriais, definido pela presença de proteinúria intensa (superior a 3,5 g/24 h), hipoalbuminemia e edema periférico. Vale mencionar que hiperlipidemia e manifestações trombóticas frequentemente se associam a essa condição clínica. Entre as glomerulopatias que comumente se manifestam com síndrome nefrótica, destaca-se a glomerulosclerose segmentar e focal (GESF). Esta forma de acometimento glomerular, definida pelo padrão de lesão histológica renal, é encontrada tanto em adultos como em crianças.<sup>1</sup> O diagnóstico de GESF é estabelecido pela presença de esclerose em porções de ao menos um glomérulo no todo da biópsia renal. Suas características histológicas, contudo, não são homogêneas entre os pacientes, realidade que a levou a ser subclassificada de acordo com achados morfológicos específicos.<sup>2</sup>

Interessantemente, na década de 70 foram publicados alguns casos de GESF com apresentação atípica, caracterizada por proteinúria maciça e rápida evolução para DRC-TRS. Dado seu comportamento extremamente agressivo, esta forma da doença foi inicialmente denominada GESF maligna. Em 1986, por sua vez, Weiss e cols.<sup>3</sup> descreveram uma série de casos com síndrome nefrótica maciça e rápida progressão para insuficiência renal crônica, sem evidências clínicas que a justificassem. Nesses casos, o padrão histológico das biópsias renais chamava a atenção, evidenciando colapso e perda de patência de alças capilares, assim como hiperplasia e hipertrofia de podócitos. Tais células apresentavam-se edemaciadas, com vacúolos grosseiros e gotículas com depósito hialino. Vale notar que a maioria dos casos não se acompanhava de infiltrado inflamatório celular ou proliferação mesangial significativa, porém alterações tubulointersticiais eram evidentes, incluindo dilatação tubular microcística. Essa caracterização histológica levou, a partir de então, à identificação de tais casos como uma subclasse específica da GESF, denominada colapsante. A apresentação clínica dessa forma de GESF geralmente se traduz por proteinúria maciça e consequente síndrome nefrótica; hematúria e hipertensão são

frequentes. Comparada à GESF típica, a forma colapsante apresentava envolvimento renal mais grave, incluindo níveis mais altos de proteinúria e disfunção renal mais intensa. Além disso, tal glomerulopatia associava-se tipicamente a um mau prognóstico renal, evoluindo para DRC-TRS na maior parte dos casos dentro de um período inferior a um ano a poucos anos.

Logo após a descrição da GESF colapsante como entidade histológica, seguiu-se a descoberta do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Nesse período inicial de ausência de terapia antirretroviral, o comprometimento renal mais comum da infecção por HIV consistia no desenvolvimento de uma nefropatia caracterizada histologicamente por GESF colapsante, denominada nefropatia associada ao HIV (HIV-associated nephropathy, HIVAN). Nesse cenário, no final dos anos 80 e nos anos 90, a maior parte dos casos diagnosticados como GESF colapsante associava-se à infecção pelo vírus HIV. Com o passar dos anos, contudo, a frequência diagnóstica dessa forma de GESF aumentou progressivamente, assim como o reconhecimento de sua associação com outras etiologias. Suas principais causas secundárias encontram-se na **Tabela 1**. Essas causas incluem infecções pelos vírus da Hepatite B (HBV), Hepatite C (HCV), Linfotrófico de Células T Humanas (HTLV), Coxsackie, Parvovírus B19, Citomegalovírus, Epstein-Barr, Arboviroses (Dengue, Chikungunya, Zika Vírus) e COVID-19. Neste último caso, a nefropatia ocorre por efeito direto do vírus, à semelhança da HIVAN para o HIV, ou, em casos raros, secundária a vacinas contra a doença (COVID-associated nephropathy, COVAN). Causas secundárias infecciosas de GESF colapsante incluíam ainda as bactérias *Mycobacterium tuberculosis* e *Campylobacter enteritis* e parasitas como *Plasmodium falciparum*, *Wuchereria bancrofti*, *Schistosoma mansoni* e *Leishmania donovani/chagasi/infantum*.<sup>4-21</sup> Doenças autoimunes também foram identificadas como causas potenciais de GESF colapsante secundária, contexto em que se destaca o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Diversos relatos evidenciam esta associação.<sup>22-25</sup> O maior desses estudos, publicado em 2012, incluiu 19 pacientes, 16 dos quais com diagnóstico de LES e três com doença LES-like.<sup>26</sup> Outras doenças autoimunes associadas a GESF colapsante secundária incluem doença de Still, doença mista do tecido conjuntivo, arterite de células gigantes e síndrome de Guillain-Barré.<sup>27,28</sup> Outras doenças sistêmicas também constituem causas de GESF colapsante secundária, como neoplasias hematológicas, microangiopatia trombótica, síndrome hemofagocítica, diabetes mellitus e anemia falciforme.<sup>29-31</sup> Ao longo dos anos, as drogas interferon alfa, beta e gama, cocaína, anabolizantes, bisfosfonatos e antracíclicos, assim como condições clínicas como pós-transplante renal e hemorragia pós-parto, foram também reconhecidas como capazes de levar a tal manifestação renal.<sup>32-35</sup>

Paralelamente às formas secundárias de GESF colapsante, um número significativo de casos com tal manifestação histológica permaneceu sem associação etiológica, sendo denominada GESF

colapsante idiopática. A evolução de sua caracterização morfológica e celular, por sua vez, permitiu reconhecer aspectos fundamentais distintos das outras subclasses da GESF. Nesse contexto, nos últimos anos a denominação GESF colapsante foi substituída pelo termo Glomerulopatia Colapsante (GC). Vale mencionar que a maior parte dos casos de GC não associada à infecção por HIV é idiopática. Apesar de sua gravidade e do aumento da frequência diagnóstica, a incidência de GC é desconhecida. De fato, estudos sobre sua incidência são escassos. Dados prévios, referindo-se à GC ainda como subclasse da GESF, relataram que respondia por 4,3-8,8% dos casos de GESF em casuísticas indianas,<sup>36,37</sup> 5% em casuística holandesa,<sup>38</sup> e 11-12% em casuísticas americanas.<sup>39,40</sup> No Brasil, a incidência subnotificada de GC impede uma análise segura. Entretanto, um estudo conduzido em nosso serviço no Hospital das Clínicas da FMUSP, compreendendo as biópsias renais de 131 pacientes com diagnóstico histológico de GESF idiopática, revelou que 36,6% dos casos correspondiam à forma colapsante.<sup>41</sup> Outro estudo, de casuística pernambucana e que avaliou as frequências de glomerulopatias em 663 biópsias renais, mostrou que a GC se responsabilizou por 2% do total de biópsias associadas a glomerulopatias primárias, e por 7% das GESFs.<sup>42</sup>

## **1.2 Glomerulopatia Colapsante: Apresentação Clínica, Evolução e Tratamento**

A apresentação clínica mais frequente da GC se dá sob a forma de proteinúria maciça associada a síndrome nefrótica pura, embora hematuria e hipertensão também possam estar presentes. A proteinúria geralmente tende a ser de grande monta (>10 g/24 h); lipidúria e cilindros granulares podem ser detectados. Apresentações com insuficiência renal à admissão e rápida evolução para doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva (DRC-TRS) são também frequentemente observadas.

Uma vez que a maioria dos estudos que avaliam resposta à imunossupressão e evolução clínica da GC são relativamente antigos, as comparações disponíveis foram feitas com outras formas histológicas de GESF. No estudo de descrição da doença, em 1986, Weiss e cols.<sup>3</sup> apresentaram uma casuística de seis pacientes, um deles HIV positivo e dois com função renal residual, tratados com corticosteroide sem sucesso. Todos os pacientes dessa casuística evoluíram para DRC-TRS entre 0,5 e 48 meses a partir do diagnóstico. Tomados em conjunto, os estudos disponíveis mostram que a resposta terapêutica a drogas imunossupressoras é ruim na grande maioria dos pacientes com GC. As maiores casuísticas terapêuticas e as respostas clínicas correspondentes dirigidas a GC não relacionada a HIV encontram-se sintetizadas na **Tabela 2**. Vale ressaltar que

há um relato de caso de GC idiopática com boa resposta terapêutica a Rituximab, acompanhada de remissão.<sup>43</sup>

**Tabela 1.** Causas secundárias associadas a Glomerulopatia Colapsante.

<b>INFECCIOSAS</b>	<b>DOENÇAS SISTÊMICAS</b>
<i>Virais</i>	Lúpus Eritematoso Sistêmico
HIV	Doença de Still
HBV	Doença Mista do Tecido Conjuntivo
HCV	Arterite de Células Gigantes
HTLV	Síndrome de Guillain-Barré
Coxsackie	Neoplasias hematológicas
Parvovírus B19	Microangiopatia trombótica
Citomegalovírus	Síndrome Hemofagocítica
Epstein-Barr	Diabetes Mellitus
COVID-19	Anemia Falciforme
Dengue	Mieloma Múltiplo
Chikungunya	Síndrome STING
Vírus Zika	
<i>Bacterianas</i>	<b>DROGAS</b>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Interferon alfa, beta e gama
<i>Campylobacter enteritis</i>	Cocaína
	Anabolizantes
	Bisfosfonatos
	Antracíclicos
<i>Outros microorganismos</i>	<b>OUTROS</b>
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Pós-transplante renal
<i>Leishmania donovani/chagasi/infantum</i>	Hemorragia pós-parto
<i>Plasmodium falciparum</i>	Gestação
<i>Schistosoma mansoni</i>	Vacinas para COVID-19
<i>Loa Loa</i>	

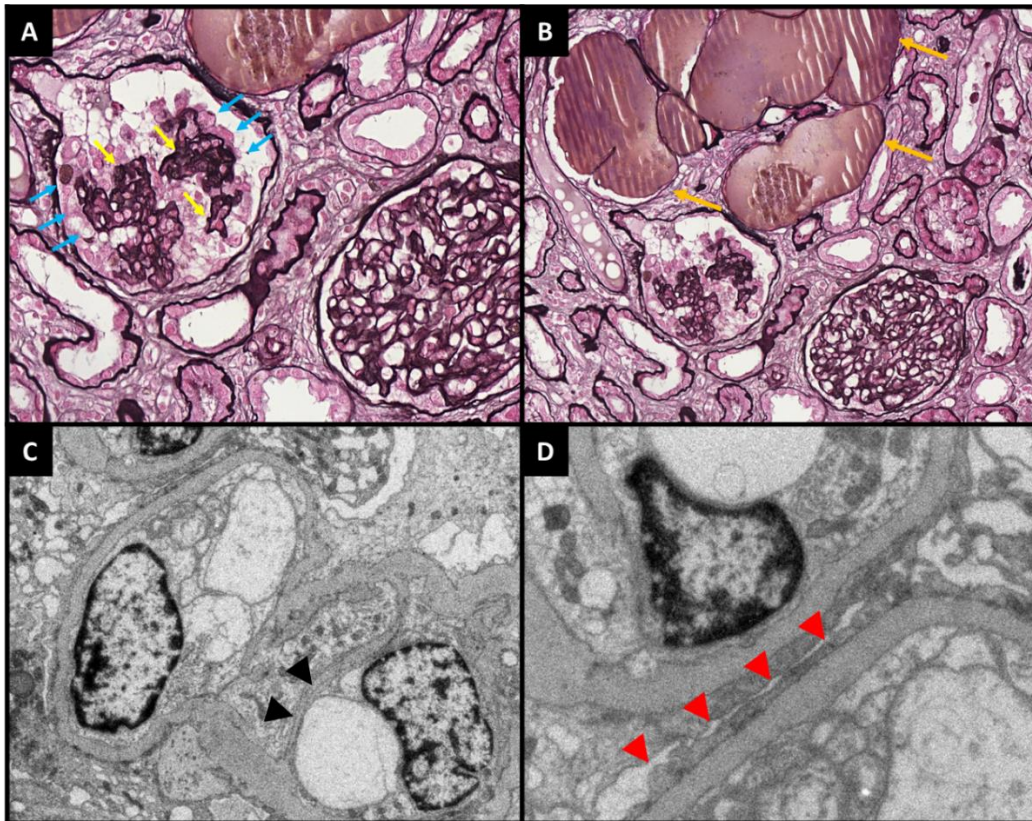
**Tabela 2.** Esquemas imunossupressores e respectivas respostas terapêuticas em pacientes com glomerulopatia colapsante não relacionada a HIV.

Casuística	Coorte Total	Nº de tratados	Tratamento Imunossupressor	Resposta à Imunossupressão
Laurin e cols. <sup>44</sup>	61	56	17 - CE 18 - CCP ± CE	CCP ± CE: 23/30 (65,7%) alcançaram RC ou RP
Valeri e cols. <sup>45</sup>	43	35	26 - CE 6 - CFF 3 - CCP	Nenhuma remissão 1 RP 1 RC, 1 RP
Laurinavicius e cols. <sup>46</sup>	42	37	23 - CE 6 - Terapia citotóxica 3 - CCP	2 RC, 7 RP Nenhuma remissão Nenhuma remissão
Chun e cols. <sup>47</sup>	40	25	25 - CE	6 RC, 10 RP
Ahuja e cols. <sup>48</sup>	30	30	30 - CE 14 - ICN	RC ou RP: não descritos 9/30 - DRC-TRS
Thomas e cols. <sup>40</sup>	22	3	CE: 3	RC ou RP: 4/22
Raja e cols. <sup>37</sup>	22	22	1 - BRA 16 - CE 4 - CE + TAC 1 - CE + CFF	Nenhuma remissão Nenhuma remissão 3RP, 1 RP Nenhuma Remissão
Grcevska e cols. <sup>49</sup>	16	15	7 - CE 8 - CE + CFF	Nenhuma remissão Nenhuma remissão
Detwiler e cols. <sup>50</sup>	16	5	4 - CE 1 - CE + CFF	1 RC Nenhuma remissão
Singh e cols. <sup>51</sup>	6	6	6 - CE 2 - CCP após CE	Nenhuma remissão Todos com RC

BRA: bloqueador de receptor de angiotensina II; CE: corticosteroides; CCP: ciclosporina; CFF: ciclofosfamida; ICN: Inibidor de calcineurina; RC: remissão completa; RP: remissão parcial; TAC: tacrolimus.

### 1.3 Caracterização Histológica da Glomerulopatia Colapsante

O diagnóstico de GC baseia-se na análise da biópsia renal (**Figura 1**). Seu perfil histológico particular compreende lesões que podem acometer todos os compartimentos estruturais renais, incluindo glomérulos, túbulos, interstício e vasos. As alterações à microscopia de luz são exuberantes, podendo ser divididas por compartimentos:



**Figura 1. Alterações histológicas clássicas da glomerulopatia colapsante observadas na biópsia renal.** Microscopia de luz evidenciando A) Glomérulo com colapso de alça capilar (setas amarelas) e hiperplasia de podócitos, com aspecto de “coroa podocitária” (setas azuis), ao lado de glomérulo com aspecto normal. (Prata Metenamina, 400X); B) Dilatação tubular microcística (setas laranja) com presença de material proteináceo no interior dos túbulos, associada a perda de células tubulares (Prata Metenamina, 200X); Microscopia eletrônica mostrando C) colapso de alças capilares (cabeça de seta preta) e vacuolização citoplasmática de podócito (6000x). D) Em maior aumento, desabamento difuso dos pedicelos (cabeça de seta vermelha) (15000x).

- Glomérulos: Observa-se colapso segmentar ou global do tufo glomerular, com enrugamento da membrana basal e áreas de oclusão/suboclusão de capilares. Também são observadas formações com aspecto de pseudo-crescente, denominadas “coroas podocitárias”, resultantes da hiperplasia de podócitos, os quais também se encontram hipertróficos. Tais células podem adquirir formato cuboidal e apresentar aumento do núcleo e vacúolos no citoplasma.

- Túbulo/Interstício: Pode-se observar dilatação tubular microcística, caracterizada por túbulos dilatados, muitas vezes em formato tortuoso e com epitélio plano, com cilindros proteináceos eosinofílicos e descamação celular. O interstício pode inicialmente apresentar edema e infiltrado inflamatório, enquanto a lesão crônica pode se acompanhar de fibrose intersticial / atrofia tubular.

- Vasos: Geralmente não apresentam alterações específicas da doença, à exceção de casos associados a microangiopatia trombótica.

A análise por microscopia de imunofluorescência/imunoistoquímica pode revelar depósitos inespecíficos de IgM e C3 nos segmentos colapsados, possivelmente relacionados a

“*entrapping*”. A análise por microscopia eletrônica evidencia membrana basal glomerular enrugada e colapsada, podócitos de aspecto cuboidal e citoplasma de aspecto pálido e com vacúolos e gotículas de proteínas. Observa-se intenso desabamento dos pedicelos dos podócitos, com perda do citoesqueleto de actina e dos processos primários. Em casos associados a HIV, interferon e lúpus eritematoso sistêmico, inclusões tubuloreticulares podem ser detectadas.<sup>2,52,53</sup> O diagnóstico de GC é estabelecido pela presença de pelo menos um glomérulo com colapso de alça na biópsia renal, associado a hiperplasia/hipertrofia de podócitos.

#### **1.4 Patogênese da Glomerulopatia Colapsante Idiopática: Aspectos Genético-Moleculares**

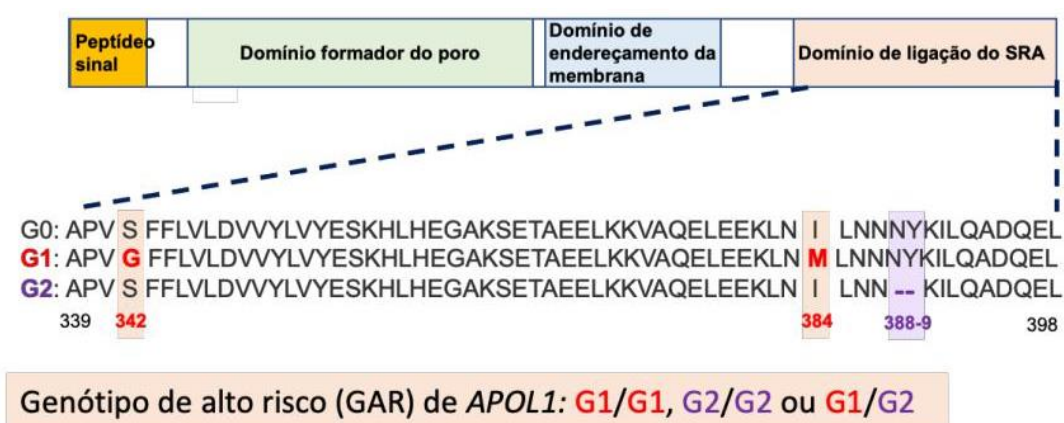
A patogênese da GC idiopática (GCI), contudo, é ainda incerta. Uma grave agressão à integridade e biologia do podócito e da célula epitelial parietal parece constituir o evento patogênico subjacente. Essa lesão conduz a uma desregulação do fenótipo podocitário, culminando com a desdiferenciação e proliferação dessas células e consequente perda significativa da função de barreira de filtração glomerular.<sup>54</sup> O mecanismo primário que induz tal resposta celular, no entanto, permanece desconhecido. Evidências sugerem que células epiteliais viscerais e parietais possam se tornar mediadores celulares similares a macrófagos, promovendo proliferação epitelial no glomérulo.<sup>54,55</sup> Tal mudança de comportamento poderia se manifestar na forma de GC. Esta glomerulopatia, portanto, é uma doença primariamente do podócito.

O podócito caracteriza-se por uma arquitetura arborizada, associada a processos maiores espessos e processos podais finos. Estes processos, denominados pedicelos, compõem a barreira de filtração glomerular cooperativamente com a membrana basal glomerular (MBG). A manutenção dessa morfologia especial do podócito é essencial para sua função normal, incluindo filtração, metabolismo, movimento celular e transmissão de informação. Sua arquitetura celular refinada, entretanto, é frequentemente alterada nas podocitopatias. O aumento na proliferação e apoptose de células epiteliais tubulares ocorrida na GC, por sua vez, está provavelmente envolvido no desenvolvimento das lesões tubulointersticiais severas observadas nessa desordem.<sup>56,57</sup>

É importante destacar o predomínio de indivíduos da raça negra na maior parte dos relatos de GC,<sup>54,55</sup> à exceção de sua associação com bisfosfonatos em que quase todos os pacientes são caucasianos.<sup>32,58</sup> Vale destacar que já em 2007 se observava uma prevalência significativa maior em indivíduos com descendência africana. Tal observação sugeria que componentes genéticos ligados à raça pudessem predispor indivíduos afro-descendentes a determinadas doenças renais (como mencionado acima) além de conferir uma pior evolução da doença. Essa realidade levou à realização de estudos de associação genômica ampla (*Genome-Wide Association Studies*,

GWAS), no intuito de explicar tal fenômeno. Dois estudos iniciais identificaram regiões de desequilíbrio de ligação na região dos genes *MYH9* (*Myosin Heavy Chain 9*) e *APOL1* (*Apolipoprotein 1*) em pacientes de descendência africana comparados aos de descendência europeia.<sup>59,60</sup> Genovese e cols.<sup>61</sup> publicaram em 2010 um estudo que identificou, através de GWAS, a associação entre duas variantes no gene *APOL1* e um maior risco de desenvolvimento de GESF e DRC-TRS atribuída a hipertensão arterial em pacientes afro-americanos quando comparados com europeus-americanos. A variante G1 é composta pela associação de duas mutações *missense* [rs73885319 p.(Ser342Gli) e rs60910145 p.(Ile384Met)] no gene *APOL1* e a variante G2 consiste na deleção de 6 pares de base no mesmo gene. Tais variantes se apresentava, em alta prevalência nos genomas de ancestralidade africana (principalmente da costa ocidental da África) e eram ausentes nos genomas de ancestralidade.

Dessa forma, o gene *APOL1* apresenta dois alelos de risco, G1 e G2, enquanto o alelo normal é denominado G0 (**Figura 2**). Desse modo, os genótipos de alto risco de *APOL1* (GAR) pode ser composto por três combinações: G1/G1, G1/G2 ou G2/G2. Tais alelos de risco foram selecionados ao longo do tempo em populações africanas de áreas endêmicas para a doença do sono, uma vez que *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense* são resistentes à tripanólise mediada por APOL1 e a presença de G1 e/ou G2 supera tal resistência, mesmo em heterozigose.<sup>62-65</sup> Entretanto, como consequência negativa dessa vantagem adaptativa, a presença de duas cópias dos alelos de risco (GAR) aumenta substancialmente o risco de desenvolver várias doenças renais/doença renal crônica ao longo da vida.<sup>62,64,66,67</sup>



**Figura 2.** Gene *APOL1*, seus alelos de risco e domínios proteicos da APOL1. Os alelos de risco de *APOL1* são mapeiam na região que codifica o domínio de ligação da proteína SRA (serum resistance-associated). O alelo G1 inclui duas variantes *missense*, p.(Ser342Gli) e p.(Ile384Met) e o alelo G2 constitui-se da deleção de 6 pares de base p.(Asn388\_Tir389del). (Adaptado de Friedman e cols, Clin J Am Soc Nephrol, 2021)<sup>68</sup>

Nesse contexto, *APOL1* é atualmente considerado como o locus gênico de suscetibilidade mais prevalente para o desenvolvimento de doenças renais, entre elas a GC, em pessoas da raça negra



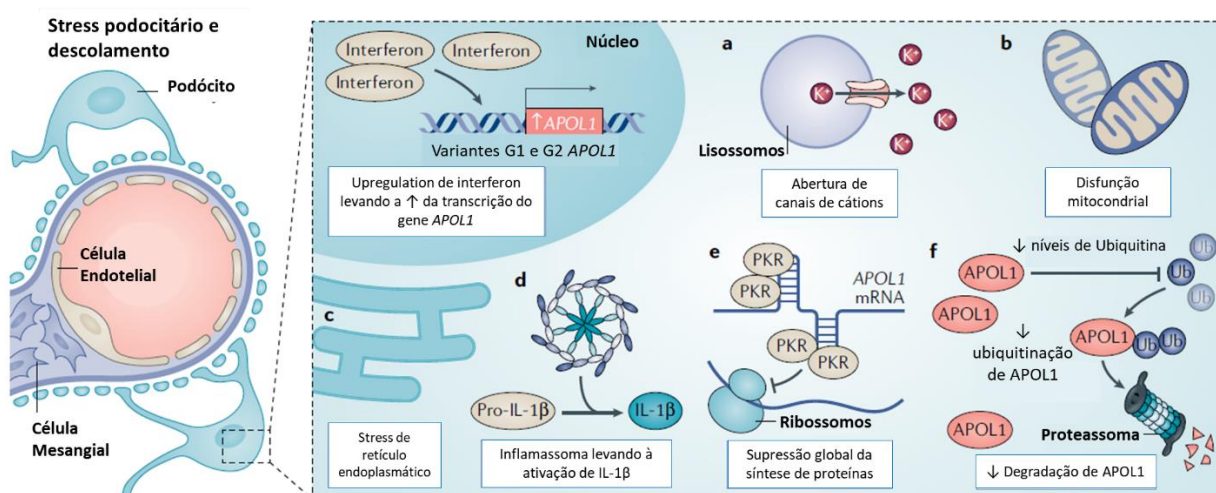
ou com ancestralidade africana, condição associada à expressão de seus alelos mutantes.<sup>59,65,69,70</sup> Além disso, várias evidências sustentam a hipótese de que o desenvolvimento de GESF e GC em pacientes com GAR de *APOLI* segue um mecanismo de “dois eventos”.<sup>18,19,71–74</sup>

De acordo com esse modelo de “dois eventos”, o primeiro evento constitui-se no estado de suscetibilidade à GC decorrente da presença do GAR de *APOLI*, enquanto o segundo golpe, deflagrador da doença, é representado por alterações do sistema imunológico de natureza infecciosa e/ou inflamatória.<sup>4,71,75</sup> Tal teoria é ratificada pelo fato de que, em certas regiões da África, mais de 30% da população alberga genótipos de alto risco e apenas cerca de 20% desenvolvem algum tipo de nefropatia associada a *APOLI*.<sup>76–78</sup> Outras evidências também apoiam tal hipótese na patogênese da GC associada a GAR, como o desenvolvimento desta doença após infecção por parvovírus B19<sup>79</sup>, associada a esquistossomose mansônica (reportada por nosso grupo)<sup>21</sup> e associada a LES.<sup>22–25,80–83</sup> Tal associação também pode ser observada em casos de GC *de novo* pós-transplante renal. Chang e cols.<sup>72</sup> descreveram uma série de cinco pacientes que desenvolveram GC *de novo* após transplante renal de doador falecido. Nenhum dos receptores apresentava GAR de *APOLI*, porém receberam rins de doadores com tal genótipo. Interessantemente, o desenvolvimento de GC *de novo* ocorreu nesses pacientes em associação com exposição a agentes infecciosos ou rejeição. Santoriello e cols.<sup>84</sup> confirmaram tais achados em uma casuística de 38 pacientes com GC *de novo* pós-transplante renal: o genótipo de *APOLI* foi analisado nos enxertos de 34 desses pacientes, tendo sido encontrados GARs em 9 (26%) dos mesmos. Quinze dos doadores eram afro-americanos, entre os quais 8 (53%) apresentavam GAR. O fato de receber um órgão com GAR de *APOLI* conferiu, portanto, um maior risco de desenvolver GC *de novo*, naturalmente associado a pior desfecho renal.

A Apolipoproteína 1 é o principal fator tripanolítico humano, conferindo proteção contra tripanossomas africanos.<sup>85–88</sup> Tal proteína circula no sangue complexada à Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) ou IgM, sendo captada por tripanossomas presentes na corrente sanguínea de pacientes infectados. No ambiente intracelular do parasita, APOL1 se insere na membrana lisossomal, causando edema e posterior ruptura de tal organela, desencadeando a morte do microorganismo.<sup>87,88</sup> APOL1 é expressa no rim humano principalmente nos podócitos, porém também em células tubulares proximais e endotélio de arteríolas extraglomerulares e pequenas artérias; entretanto, o papel exato dessa proteína no rim ainda não foi completamente elucidado.<sup>85,89</sup> Estudos experimentais com células embrionárias renais HEK293 transfectadas com os alelos de risco para *APOLI* e estimuladas para transcrição de tal gene evidenciaram que as apolipoproteínas associadas às variantes de risco G1 e G2 localizam-se em lisossomos e mitocôndria,<sup>90</sup> induzindo disfunção mitocondrial. Além disso, a maior parte da APOL1 normal encontra-se em gotículas de lipídeos intracelulares. Entretanto, a APOL1 associada às variantes

de risco permanece retida no retículo endoplasmático e quando são deslocadas para as gotículas de lipídeos de células HEK T-Rex por meio de tratamento com ácido oleico, segue-se redução do fluxo de autofagia e de citotoxicidade<sup>91</sup>. Além disso, a expressão de APOL1 normal reduziu morte celular induzida pelo alelo mutante<sup>91</sup>.

Em situações em que há estímulo à resposta imunológica como nas doenças autoimunes (lupus eritematoso sistêmico, doença de Still, doença mista do tecido conjuntivo) e exposição a microrganismos (como bactérias, parasitas e, principalmente, vírus) há um estímulo à expressão de *APOL1* mediada pelo aumento dos níveis de interferon.<sup>71,92,93</sup> A APOL1 traduzida a partir de um GAR associa-se a um aumento da expressão de canal de cátions na membrana celular<sup>94</sup>, causando disfunção celular e lisossomal<sup>95</sup>, promove disfunção mitocondrial por meio da ativação dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial<sup>90</sup>, induz estresse de retículo endoplasmático<sup>96</sup> e induz, por meio da ativação do complexo de inflamassoma NLRP3, a produção de IL-1 $\beta$ <sup>97</sup>. Além disso, pode suprimir a síntese proteica e reduzir o nível intracelular de ubiquitina<sup>98</sup>, promovendo retenção de proteínas, inclusive de APOL1 defeituosa.<sup>89</sup> Um resumo das alterações intracelulares associadas aos GARs pode ser visualizado na **Figura 3**.

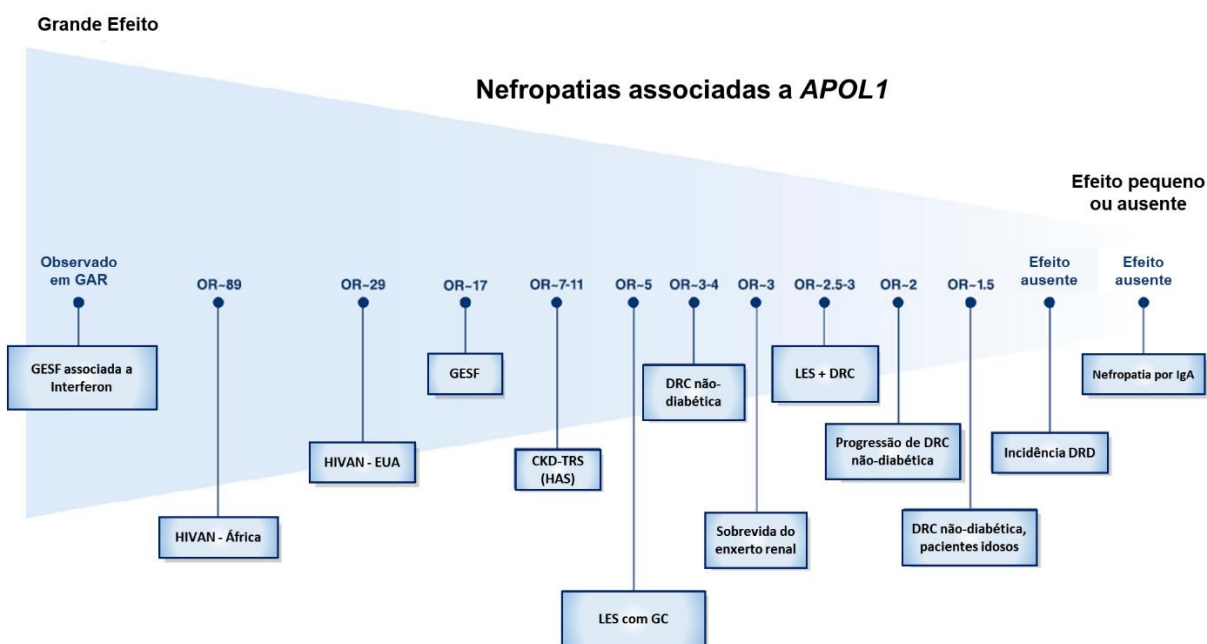


**Figura 3.** As repercussões intracelulares do aumento da expressão da APOL1 em pacientes com GAR incluem A) aumento de permeabilidade lisossomal de cátions; B) Disfunção mitocondrial; C) Stress do retículo endoplasmático; D) Produção de IL-1 $\beta$  através da ativação da cascata do inflamassoma; E) Supressão global da síntese proteica e F) Redução dos níveis intracelulares de ubiquitina, com acúmulo de proteínas, inclusive de APOL1 disfuncional (Adaptado de Daneshpajouhnejad e cols, Nat Rev Nephrol, 2022)<sup>89</sup>.

Quando se analisa o espectro de apresentação das nefropatias associadas a *APOL1* (**Figura 4**), o maior efeito de GAR é associado a condições de aumento dos níveis de interferon (seja pelo uso como droga, interferonopatias monogênicas, nefropatia por HIV e outras infecções virais)<sup>71,99</sup>, GESF e GC. Associação significativa também foi observada entre GAR e DRC-TRS atribuída a hipertensão arterial e entre GAR e lupus eritematoso sistêmico associado a GC. Um menor efeito,

ainda que considerável, também foi observado para a progressão de nefropatia não diabética e para a sobrevida do enxerto renal<sup>68</sup>.

Apesar da estreita relação entre a presença de GAR com progressão de doença renal crônica, GESF e GC em pacientes afro-americanos ou regiões com alta prevalência de ancestralidade genômica africana, a miscigenação ocorrida no Brasil não permite a avaliação de risco associada a *APOL1* apenas através da raça autodeclarada.<sup>100,101</sup> De fato, no Brasil indivíduos autodeclarados brancos podem apresentar uma porcentagem considerável de ancestralidade genética africana<sup>102</sup>, podendo albergar os alelos de risco G1 e/ou G2 de *APOL1*<sup>100</sup>.



**Figura 4.** Espectro clínico de apresentação das Nefropatias associadas ao gene *APOL1*. (Adaptado de Friedman e cols, Clin J Am Soc Nephrol, 2021)<sup>68</sup>.

Estudos específicos envolvendo análise genética e correlações genético-moleculares apenas em pacientes com GC ainda são escassos e com casuísticas pequenas. Dados recentes incluem populações com GESF utilizando sua antiga classificação histológica, com avaliação de alguns poucos casos de GC. Kopp e cols.<sup>67</sup> avaliaram a prevalência de alelos de risco de *APOL1* em pacientes com GESF. GAR esteve presente em 28,7% dos pacientes, com maioria expressiva de afro-americanos. Do total de casos avaliados, 11 apresentavam GC. Destes, 8 (72,7%) apresentavam GAR de *APOL1*. Gribouval e cols.,<sup>103</sup> em outro estudo, avaliaram a presença de GAR de *APOL1* em 152 pacientes de 139 famílias europeias com diferentes ancestralidades africanas e diagnóstico de síndrome nefrótica corticorresistente e/ou GESF. Nessa casuística, GARs de *APOL1* foram identificados em 43,1% dos casos, grupo que incluía pacientes mais velhos, com pior função renal e com evolução mais rápida para DRC-TRS. Essa casuística incluía 10 casos de GC, porém nenhum deles se associava a GAR de *APOL1*.

Poucos estudos avaliaram a distribuição de GARs de *APOLI* em populações brasileiras. As prevalências de traço falciforme e GAR de *APOLI* foram investigadas em 306 pacientes dialíticos na cidade de Salvador, BA.<sup>104</sup> A frequência de traço falciforme nesta população foi maior que na população normal. Dessa casuística, 45 pacientes foram selecionados aleatoriamente para genotipagem de *APOLI*, tendo-se detectado GAR em apenas um deles. Vajgel e cols.<sup>105</sup> por sua vez, avaliaram a presença de GAR de *APOLI* em 201 pacientes não-negros com diagnóstico de nefrite lúpica e os compararam entre si e com uma população controle saudável. Em tal casuística, GARs de *APOLI* foram detectados em 4 (2%) dos pacientes com nefrite lúpica e apenas 1 (0,4%) dos indivíduos controle. A presença de GAR associou-se a maior risco de evolução para DRC-TRS nessa casuística e, possivelmente, a maior dano do compartimento tubulointersticial. Esse estudo sugeriu, também, que a presença de apenas um alelo de risco de *APOLI* possa potencialmente se associar a um pior prognóstico renal nesses pacientes. Em um estudo caso-controle recente,<sup>66</sup> a frequência de GAR de *APOLI* foi analisada em 106 pacientes em hemodiálise com ancestralidade africana e em 106 de seus familiares saudáveis de primeiro grau. GAR foi cerca de 10 vezes mais frequente no grupo de pacientes em hemodiálise (9,4% vs 0,9%, p= 0,001). Um estudo multicêntrico ainda mais recente da Rede Brasileira de Síndrome Nefrótica na Infância,<sup>100</sup> por fim, investigou o impacto de GAR em uma população brasileira de 318 pacientes pediátricos com síndrome nefrótica. GARs de *APOLI* foram detectados em 19 (6%) desses pacientes. Interessantemente, uma prevalência substancial de GAR foi observada em pacientes autodeclarados brancos e crianças com GAR tiveram desfechos renais piores que as com GBR (presença de zero ou 1 alelo de risco de *APOLI*) no subgrupo com GESF. Este estudo revelou, ainda, que o efeito do GAR é independente da presença de GESF e sugeriu que a presença de apenas um alelo de risco de *APOLI* possa ter um impacto negativo sobre o prognóstico renal de crianças com SNCR.

A patogênese da GC também se associa a variantes monogênicas patogênicas em genes cujos produtos estão diretamente envolvidos na função mitocondrial. Dentro desse conceito, variantes em *COQ2* (*p-hydroxybenzoate:polyprenyl transferase*), *COQ6* (*Monoxygenase*), *PDSS2* (*decaprenyl diphosphate synthase subunit 2*) ou *ADCK4/COQ8B* (*AarF domain-containing protein kinase 4/ Coenzyme Q8B or Actinin Alpha 4*), genes que codificam proteínas pertencentes à via de biogênese da coenzima Q10, constituem causas de GC por levarem à deficiência desta coenzima.<sup>106,107</sup> Esses achados são fundamentais, uma vez que sugerem que o mecanismo pelo qual algumas doenças induzem a GC possa se basear no comprometimento da atividade mitocondrial. Esta hipótese é amparada pelo fato de a disfunção mitocondrial consistir em uma via importante de indução de morte celular no parênquima renal. Há descrição também de GC associada a variantes em *MSH6* (*MutS Homolog 6*)<sup>108</sup>, gene que codifica uma proteína que

participa de processos de reparação de DNA durante sua replicação no processo de divisão celular; *RNASEH2B* (*Ribonuclease H2 Subunit B*)<sup>109</sup> e *STING1* (*Stimulator Of Interferon Response CGAMP Interactor 1*)<sup>110</sup>, gene cujas variantes se associam a interferonopatias; e *SCARB2* (*Scavenger Receptor Class B Member 2*)<sup>111</sup>, gene que codifica uma glicoproteína presente na membrana de lisossomos e endossomos e participa da organização e do tráfego de substâncias pelas membranas dessas organelas.

Além da ocorrência de GC em famílias com variantes em *COQ8B*<sup>112</sup>, outras poucas formas familiares de GC também foram descritas até o momento. Tais formas incluem variantes patogênicas no gene *TRPC6* (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*)<sup>113</sup>, que codifica o canal iônico correspondente; em *INF2* (*Inverted Formin 2*)<sup>114,115</sup>, que codifica a proteína correspondente, membro da família das forminas; e em *NUP93* (*Nucleoporin 93*)<sup>116</sup> e *NUP107* (*Nucleoporin 107*)<sup>117</sup>, genes que codificam proteínas componentes do complexo Y do poro nuclear, as quais atuam no tráfego núcleo-citoplasmático de proteínas, RNA e outras moléculas.<sup>118</sup> É fundamental atentar para os fatos de que o canal TRPC6 se expressa no podócito e de que seu respectivo gene foi associado previamente a GESF genética<sup>119,120</sup>, bem como de que as forminas atuam na regulação do citoesqueleto de actina.<sup>115,121</sup> Variantes patogênicas em *COQ8B*, *NUP93* e *NUP107* se associam a doença renal/GC de herança autossômica recessiva<sup>116,117,122</sup>, enquanto variantes patogênicas em *TRPC6* e *INF2* se associam a nefropatia/GC de herança autossômica dominante.<sup>121,123</sup> Variantes em *ACTN4*, gene que codifica  $\alpha$ -actinina-4, causam GESF autossômica dominante, mas também podem se associar a GC.<sup>124,125</sup> Um estudo que revela o desenvolvimento de GC em camundongos deficientes em *Actn4* apoia o conceito de que alterações do citoesqueleto de podócitos decorrentes de variantes em *ACTN4* possam contribuir para o desenvolvimento de GC.<sup>126</sup> Outra família com GC foi ainda reportada, sem apresentar defeitos genéticos podocitários conhecidos até o momento.<sup>127</sup> A síndrome de Galloway-Mowat-1, causada por variantes no gene *WDR73* (*WD Repeat Domain 73*), também foi ligada à possível desenvolvimento de GC.<sup>128</sup>

GC também parece se relacionar com o perfil de Antígeno Leucocitário Humano (HLA). Quatro de cinco irmãos pertencentes a uma mesma família desenvolveram GC, sendo que dois apresentavam manifestações sugestivas, mas não diagnósticas, de LES.<sup>129</sup> Os cinco irmãos apresentavam o mesmo perfil de HLA da mãe (DQA10101, DQB10501), que não desenvolveu glomerulopatia. O único irmão não afetado tinha sete anos, mas poderia ainda ser jovem demais para desenvolver a doença. O perfil de HLA mencionado em membros afetados, mas não em todos, sugere a contribuição de outros fatores para o desenvolvimento do fenótipo. Um estudo prévio mostrou, por fim, que fatores circulantes séricos de pacientes com GC determinam lesão podocitária em ratos, ao passo que tais fatores não são encontrados em pacientes com GESF.<sup>130</sup>

Estudos prévios mostraram, ainda, que deleções específicas de Dicer e Drosha induzem o desenvolvimento de GC.<sup>131,132</sup> Esses achados revelam que a geração de miRNAs é necessária para a função de podócitos maduros e que sua falta leva à GC, porém não revela os miRNAs cuja falta favorece o curso para GC.

### **1.5 Patogênese da Glomerulopatia Colapsante: Vias de sinalização e Perfis de Expressão Proteica Glomerular**

A importância da disfunção mitocondrial na gênese da GC é apoiada também por estudos experimentais envolvendo moléculas de atuação mitocondrial, notadamente PGC1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$* ). PGC1 $\alpha$  é um coativador transcricional que interage com fatores transcricionais associados à regulação da biogênese mitocondrial. Tais fatores de transcrição relacionam-se a fatores de crescimento angiogênicos associados a receptores de estrógeno (ERRs), enzimas antioxidantes (PPAR $\beta$ , *Peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta$* ), enzimas de transporte e oxidação de ácidos graxos (PPAR $\alpha/\delta$ ), e produção de DNA mitocondrial e fissão/fusão de mitocôndrias (TFAM, *Transcription Factor A, Mitochondrial*; e NRF1/2, *Nuclear Respiratory Factor 1/2*).<sup>133,134</sup> Um estudo experimental<sup>134</sup> com camundongos Nefta-PGC1 $\alpha$ , que após estímulo com doxiciclina apresenta aumento da expressão de PGC1 $\alpha$ , revelou correlação do aumento da expressão deste coativador transcricional com aumento da proteinúria, creatinina e ureia, além de aumento da biogênese mitocondrial e da capacidade respiratória máxima, aumento da expressão de proteínas de fusão/fissão mitocondrial, aumento do metabolismo de ácidos graxos, indução de proteínas relacionadas ao retorno ao ciclo celular e aumento do estresse oxidativo. Essas alterações se manifestaram por um padrão podocitático de desdiferenciação celular, com perda da expressão de marcadores de maturidade como nefrina, podocina e sinaptopodina, e expressão histológica de GC.

Admite-se atualmente que a ativação de ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) induzida por TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor- $\beta$* ) possa desempenhar um papel relevante na proliferação podocitária observada em podocitopatias proliferativas, como a GC, possivelmente devido à indução de transição epitélio-mesenquimal em podócitos.<sup>135</sup> De fato, a ativação de ERK foi documentada em podócitos hiperplásicos na Nefropatia pelo HIV (HIVAN).<sup>136</sup> Ciclina D1 constitui-se em um alvo a jusante de ERK e, em suporte a tal mecanismo, ciclina D1 encontra-se aumentada e seu aumento coincide com a entrada no ciclo celular de podócitos de camundongos transgênicos HIV.<sup>137</sup> Superexpressão de HIF-2 (*Hypoxia inducible fator-2*) também foi mostrada em podócitos hiperplásicos de pacientes com HIVAN e em camundongos transgênicos HIV.<sup>138</sup> A ativação de HIF-1, por sua vez, ocorre por meio das vias de sinalização PI3K

(*Phosphoinositide 3-kinase*) e MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*).<sup>139</sup> Juntas, a ativação de Ras/ERK e PI3K em podócitos poderia estimular a expressão de ciclina D1, resultando em proliferação podocitária em podocitopatias proliferativas, como a GC. Dados atuais ampliam esta visão, sugerindo que a ativação das vias dependentes de STAT3 (*Src signal transducer and activator of transcription 3*) e Ras (*RAt Sarcoma vírus*)-MAPK1,2, induzida por Nef (*Negative regulatory factor*), seja também responsável pela proliferação e desdiferenciação de podócitos característica da GC associada à HIVAN.<sup>136</sup> Vale mencionar que a ativação de ERK também foi demonstrada em podócitos hiperplásicos na GCI.<sup>136</sup>

Um estudo recente de Merchant e cols.<sup>140</sup> avaliou o padrão qualitativo de proteinúria, o perfil de constituição proteica da matriz extracelular (MEC) e o perfil transcricional glomerular de pacientes com GC e GESF-NOS (*GESF-not otherwise specified*). A marcação para catepsina B, catepsina C e anexina 3 em capilar glomerular, avaliada por imunistoquímica, mostrou-se mais intensa em pacientes com GC comparados aos com GESF-NOS. Catepsinas B e C se colocalizaram em células epiteliais parietais com expressão de CD44 e em células constituintes da coroa podocitária. Essas proteínas também foram detectadas com maior intensidade na urina e este perfil foi confirmado por meio de análise transcriptômica glomerular. Na mesma linha, pacientes com GC apresentaram excreção urinária aumentada de peptídeos derivados da MEC. As diferenças encontradas na constituição da MEC glomerular entre GC e outras variantes de GESF reforçam, portanto, o conceito de que a GC se constitui em uma entidade glomerular própria, e não num subtipo de GESF.

*Objetivos*



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Central**

Ampliar a caracterização de expressão clínica e o entendimento da patogênese da glomerulopatia colapsante idiopática por meio da caracterização e elucidação de aspectos genético-moleculares e do estabelecimento de correlações e associações potenciais entre achados genético-moleculares com perfis fenotípicos clínicos, laboratoriais e anatomopatológicos.

### **2.2. Específicos**

1. Estabelecer correlações e associações entre dados histológicos, clínicos e laboratoriais em pacientes com GCI;
2. Identificar e caracterizar variantes genéticas mendelianas ou de susceptibilidade envolvidas na patogênese da GCI;
3. Estabelecer correlações genótipo-fenótipo a partir de dados genético-moleculares, clínicos, laboratoriais e histológicos;
4. Avaliar interações genéticas potencialmente relevantes em pacientes com GCI;
5. Analisar o perfil de ancestralidade genética de pacientes com GCI e associá-lo às variantes genéticas causativas ou de susceptibilidade encontradas nesta população com a doença.
6. Analisar o perfil de expressão proteica em matriz extracelular glomerular a partir de análise proteômica por espectrometria de massas em amostras de tecido renal normal e biópsias renais de pacientes com GCI com e sem GAR de *APOLI* e GESF-NOS.

## *Materiais e Métodos*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos éticos**

Todos os participantes do estudo foram instruídos acerca do propósito do mesmo, bem como de seus potenciais riscos e benefícios. Os pacientes preencheram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), autorizando a coleta, armazenamento e uso de material genético para análise. Para os pacientes pediátricos, a participação no estudo e coleta de sangue foram realizadas após consentimento informado assinado pelos pais ou responsáveis e assentimento informado para pacientes com idade de 7 a 18 anos incompletos, assinado pelos pacientes. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética da nossa instituição e à Plataforma Brasil, tendo sido aprovado sob o número CAAE 17279219.8.0000.0068 para a casuística adulta e CAAE: 70756317.7.0000.0068 para a casuística pediátrica.

Para as análises proteômicas realizadas em fragmentos de biópsia renal, novo projeto foi submetido ao Comitê de Ética de nossa instituição, com aprovação sob o número CAAE: 45678721.9.0000.0068.3

#### **3.2 Seleção e Caracterização de Pacientes**

A casuística de nosso estudo foi composta por pacientes com o diagnóstico de glomerulopatia colapsante estabelecido por análise histológica de biópsia renal. Tais pacientes foram diagnosticados e mantidos em seguimento no Serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) ou no Serviço de Nefrologia Pediátrica do Instituto da Criança (ICr) do HC-FMUSP. Foram considerados casos de GC idiopática os pacientes em que condições previamente associadas a GC foram excluídas por história clínica ou exames complementares, incluindo hemograma, frações C3 e C4 do complemento, FAN, anti-DNA, fator reumatóide, ANCA, sorologias para hepatites B, C e HIV, VDRL e eletroforese/imunofixação de proteínas séricas/urinárias. Em casos em que comemorativos clínicos e/ou laboratoriais suportassem a investigação de outras causas infecciosas específicas, como vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, parvovírus B19 e *Mycobacterium tuberculosis*, ou de doenças associadas, como anemia falciforme e neoplasias, tal investigação foi ampliada.

A caracterização de nossa casuística incluiu dados clínico-epidemiológicos (sexo, idade, etnia, histórico de comorbidades – como de hipertensão arterial, diabetes mellitus, neoplasia e doenças

autoimunes, uso de medicações, histórico de infecções recentes, consanguinidade e história familiar de doenças renais); dados laboratoriais na ocasião da biópsia renal (creatinina, taxa de filtração glomerular estimada – TFG<sub>e</sub> pela equação Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration – CKD-EPI<sup>141</sup> em adultos ou Schwartz modificada<sup>142</sup> em crianças e adolescentes, urina tipo I, proteinúria de 24 h e/ou relação proteína/creatinina em amostra isolada de urina, e albumina sérica); e dados histológicos.

Os pacientes foram avaliados em consultas mensais ou trimestrais, ocasiões em que analisamos parâmetros clínicos (edema, dispneia, ascite, urina espumosa) e laboratoriais (creatinina, TFG<sub>e</sub> pela equação CKD-EPI, urina tipo I, proteinúria de 24 h e/ou relação proteína/creatinina em amostra de urina isolada), além do uso e respectivas doses de medicações imunossupressoras (corticosteroide, inibidor de calcineurina, micofenolato mofetil, rituximab) e antiproteinúricas (inibidores da enzima conversora de angiotensina I ou bloqueadores de receptores da angiotensina II). Todas as informações referentes aos dados clínico-evolutivos, laboratoriais e exames complementares dos pacientes foram obtidas a partir da análise de prontuário eletrônico e do sistema de exames complementares (HCMED) próprios do HC-FMUSP. Tais dados foram organizados e armazenados em planilha Excel.

### **3.3. Análise de Resposta Terapêutica**

Os pacientes foram classificados quanto à resposta ao uso de corticosteroides de acordo com os critérios do Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) de Glomerulopatias<sup>143</sup> em: a) corticossensíveis, quando apresentaram remissão completa após 4 semanas de uso de prednisona ou prednisolona em dose padrão (crianças de 1–18 anos) ou, em adultos, remissão completa após uso de dose padrão de prednisona ou prednisolona por pelo menos 8 semanas; b) corticorresistentes, quando não atingiram a redução de proteinúria no tempo acima descrito, de acordo com a faixa etária.

Remissão completa foi definida como redução da proteinúria para  $\leq 200$  mg/24 h ou  $\leq 200$  mg/g de creatinina em amostra isolada de urina em três dias consecutivos (crianças de 1-18 anos) ou  $< 300$  mg/24 h ou  $< 300$  mg/g de creatinina em amostra isolada de urina, mantendo creatinina estável e albumina  $> 3,5$  g/dL (adultos). Remissão parcial foi definida, na população pediátrica, como redução  $\geq 50\%$  do valor de proteinúria inicial e manutenção dos valores de relação proteína/creatinina em amostra isolada de urina entre 200-2000 mg/g ou, em adultos, redução da proteinúria para níveis entre 300–3500 mg/24 h ou 300–3500 mg/g de creatinina em amostra isolada de urina, associada a redução  $\geq 50\%$  do valor basal de proteinúria e níveis de creatinina sérica estáveis (variações  $< 25\%$ ).

O desfecho primário analisado foi evolução para doença renal crônica com necessidade de TRS. Os desfechos secundários analisados foram: a) resposta à terapêutica, categorizada em remissão parcial, remissão completa ou ausência de resposta; e b) recidiva da doença de base após transplante renal, categorizada em presença ou ausência.

### **3.4. Protocolo de Realização de Biópsia Renal**

Os pré-requisitos para realização de biópsia renal incluíram ausência de infecção ativa; pressão arterial controlada ( $\leq 140 \times 90$  mmHg); suspensão de heparina não-fractionada nas últimas 6 h ou heparina de baixo peso molecular nas últimas 12 h (quando aplicável); suspensão de antiagregantes plaquetários nos últimos 7 dias (quando aplicável e se possível); suspensão de anticoagulante oral (quando aplicável); última sessão de diálise realizada pelo menos 6 h antes do procedimento e realizada sem anticoagulação (quando aplicável); e hemoglobina  $>10$  g/dL, hematócrito  $>30\%$ , plaquetas  $\geq 100.000/\text{mm}^3$ , ureia sérica  $\leq 140$  mg/dL e INR/TTPA  $\leq 1,2$ . Consideramos contraindicações absolutas à realização do procedimento: hipertensão não controlada com anti-hipertensivos, distúrbios de coagulação, rim único, paciente não cooperativo ou que se recusou à realização do procedimento. Consideramos contraindicações relativas: rins hiperecogênicos e menores que 9 cm em seu diâmetro maior, cistos renais múltiplos ou bilaterais, tumores renais, hidronefrose, infecção renal ou perirrenal ativa e infecção de pele sobre o local da biópsia. O paciente foi posicionado em maca em decúbito ventral, com colocação de coxim abdominal em casos de obesidade, e o procedimento foi realizado com apoio de ultrassonografia em tempo real para avaliação do aspecto dos rins e guiar a anestesia e disparos. O polo inferior do rim esquerdo foi o sítio preferencial de punção, em virtude de um acesso anatômico favorável.

O objetivo inicial foi a coleta de pelo menos três fragmentos, a serem enviados para análise por microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica. Os disparos foram interrompidos frente a qualquer sinal de complicação no decorrer do procedimento. Uma nova avaliação ultrassonográfica foi realizada ao final do mesmo, para descartar possíveis complicações. O fragmento selecionado para microscopia de luz foi fixado em Bouin, o para imunofluorescência em soro fisiológico ou meio de Michel e o para microscopia eletrônica em glutaraldeído, sendo então encaminhados ao Serviço de Anatomia Patológica para a confecção de lâminas.

Ao término da biópsia, o paciente foi encaminhado para leito de enfermaria, onde permaneceu durante seis horas em repouso absoluto em decúbito dorsal e monitorizado continuamente, tendo seus parâmetros vitais (pressão arterial, frequência cardíaca, saturação de oxigênio) aferidos a cada 15 min nas primeiras 2 h e a cada 30 min nas 4 h subsequentes. Foram colhidas amostras

de urina para monitoramento do aspecto da mesma, além de exames de hemoglobina/hematócrito 6h, 12h e 24h após o procedimento, para avaliação de potencial sangramento assintomático/sintomático. Quando aplicável, o retorno de antiagregação plaquetária ou anticoagulação, mesmo durante as sessões de hemodiálise, foi liberado apenas 15 dias após a realização do procedimento.

### **3.5. Análise Histopatológica**

A análise dos fragmentos de biópsia renal por microscopia de luz foi realizada através das seguintes colorações histológicas: hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson, prata metenamina e ácido periódico de Schiff. As alterações histológicas foram obtidas a partir do laudo anatomopatológico das biópsias renais, incluindo a análise dos 4 compartimentos renais: glomérulos (presença de hiper celularidade mesangial, expansão da matriz mesangial, presença de sinéquias e/ou esclerose global), túbulos/interstício (fibrose intersticial, atrofia tubular, infiltrado inflamatório, dilatação tubular microcística) e vascular (hialinose arteriolar, proliferação de camada íntima, e esclerose arteriolar).

A análise por microscopia de imunofluorescência incluiu a utilização de anticorpos anti-IgM, IgG, IgA, C3, C1q, cadeias leves kappa e lambda e fibrinogênio. As variáveis analisadas na imunofluorescência foram positividade de deposição, local de deposição (mesangial, alças capilares), padrão de deposição (granular, linear) e intensidade (+1 a +3). Para a microscopia eletrônica, os fragmentos foram fixados em glutaraldeído 2,5%, pós-fixados em tetróxido de ósmio e, posteriormente, incluídos em resina. Os cortes ultrafinos (60 nm) foram então contrastados com citrato de chumbo. Foram avaliadas presença de depósitos (organizados ou não), morfologia da membrana basal glomerular, pedicélios e membrana SLIT, citoplasma dos podócitos e estrutura do capilar glomerular.

As análises histopatológicas das biópsias renais foram realizadas por patologistas com formação específica e expertise em patologia renal. O diagnóstico de GC foi estabelecido pela identificação de colapso de alça capilar em pelo menos um glomérulo, associado a hipertrofia/hiperplasia de podócitos.<sup>52,53</sup>

### **3.6. Coleta de Sangue, Extração de DNA genômico e Armazenamento das Amostras**

A coleta das amostras de sangue e a extração de DNA foram precedidas pela instrução do paciente e/ou responsável a respeito do projeto de pesquisa e após assinatura do termo de consentimento e/ou assentimento. Tal formulário também contemplou a autorização para a utilização dos dados clínicos e laboratoriais contidos no prontuário do paciente.

Para a extração de DNA, foram coletados 9 mL (adultos) e 2 mL (crianças) de sangue total em tubo com EDTA, armazenados a 4°C. A extração de DNA genômico foi realizada com o kit QIAamp DNA BloodMidi no Laboratório de Investigação Médica 29 (LIM 29) da FMUSP (adultos) e no Instituto da Criança do HC-FMUSP (casos pediátricos), seguindo a metodologia descrita a seguir. Em um tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL previamente identificado, adicionou-se 200 µL de sangue total do paciente a ser testado, 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL (tampão de lise). Procedeu-se, então, à inversão do tubo Eppendorf por 15 vezes e agitação em vórtex por 15 s. A seguir, a solução foi incubada por 10 min a uma temperatura de 56°C. Após esse passo, acrescentou-se 200 µL de etanol absoluto, com posterior agitação vigorosa em vórtex por 15 s para promover a precipitação do DNA. Em seguida transferiu-se todo o volume para um tubo contendo uma coluna de retenção de DNA. Centrifugou-se, então, o tubo coletor com a coluna a 2450 g por 5 min a 4°C. Desprezou-se o líquido do tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lavagem 1 (AW1), centrifugando-o por 5 min a 2450 g e 4°C. Desprezou-se novamente o líquido do tubo coletor e acrescentou-se 500 µL de solução de lavagem 2 (AW2), centrifugando-o por 5 min a 2450 g e 4°C. Transferiu-se a coluna para um tubo Eppendorf de 1,5 mL vazio, deixando-o então secar em local protegido por 30 min. Após esta etapa, acrescentou-se 600 µL de tampão de eluição, aguardou-se 5 min para que todo o material fosse eluído e, a seguir, o tubo foi centrifugado por 5 min a 2450 g a 4°C. O DNA eluído foi fracionado em 3 alíquotas de 200 µL, então armazenadas em 3 criotubos a -20°C até o momento do uso. As amostras foram armazenadas no biorepositório do LIM 29 da FMUSP ou no ICr do HC-FMUSP. Uma ficha específica controlou a identificação dos pacientes e as datas de coleta, extração do DNA e armazenamento.

### **3.7. Protocolos de sequenciamento**

O DNA extraído foi submetido a análise por dois painéis customizados compreendendo genes relacionados a glomerulopatias em 43 pacientes e a um dos dois protocolos para sequenciamento de exoma completo descritos a seguir em 27 pacientes. Os sequenciamentos associados a ambos os painéis customizados e ao exoma completo pelo protocolo *Nextera Exome Rapid Capture Enrichment* foram realizados no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da Faculdade

de Medicina da Universidade de São Paulo (SELA-FMUSP). Os sequenciamentos associados ao segundo protocolo de exoma completo foram realizados em parceria com o laboratório externo Mendelics.

### ***3.7.1. Preparo de bibliotecas e sequenciamento dos painéis customizados***

O primeiro painel customizado foi construído utilizando a ferramenta de bioinformática Design Studio (Illumina, San Diego, CA), com o objetivo de realizar a captura de 845 regiões alvo pré-determinadas em 42 genes relacionados a síndrome nefrótica, com cobertura média superior a 99%. A biblioteca de DNA foi preparada usando o protocolo *Nextera Rapid Capture enrichment* (Illumina,), incluindo os seguintes genes:

*ACTN4; COQ8B ARHGDI1; NPHS2; CD2AP; COQ2; CRB2; CUBN; DGKE; EMP2; EYA1; COQ6; FAT1; INF2; ITGA3; ITGB4; KANK1; KANK2; KANK4; LAMB2; LMX1B; MYO1E; NPHS1; PAX2; PDSS2; PLCE1; PODXL; PTPRO; SCARB2; SMARCA1; TRPC6; TTC21B; WDR73; WT1; XPO5; APOL1; ARHGAP24; MEFV; NXF5; NUP107; NUP205 e NUP93.*

O protocolo Nextera Rapid Capture customizado (Illumina) utiliza a tagmentação enzimática do DNA genômico para o preparo de biblioteca. Dada a necessidade de quantificação precisa do mesmo, tal procedimento foi realizado pelo método fluorimétrico QuBit 2.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Após a quantificação, iniciamos a tagmentação enzimática marcando os fragmentos de DNA com as sequências do adaptador. Seguiu-se a purificação através da utilização de “beads” magnéticas, a fim de separar o DNA tagmentado. Em seguida, procedemos à inserção de adaptadores de identificação (index), seguida de amplificação (*polimerase chain reaction*). Após nova purificação, realizamos a hibridização dos fragmentos de DNA com as sondas de captura customizadas para as regiões alvo pré-determinadas, por duas vezes, seguida de purificação. Realizamos, então, a última amplificação e posterior purificação. Após finalização do preparo, as bibliotecas foram identificadas e conservadas a -20 °C.

O segundo painel customizado foi construído utilizando a ferramenta de bioinformática Design Studio (Illumina), com o objetivo de identificar e amplificar 579 regiões alvo de 20 outros genes relacionados a glomerulopatias. A cobertura média atingida foi maior que 99%. O preparo de bibliotecas foi realizado no protocolo Ampliseq (Illumina), incluindo os seguintes genes:

*NEIL1; COL4A3; COL4A4; COL4A5; CFH; CFI; CD46; C3; CFHR5; ADAMTS13; FN1; MCP1; ANLN; MYH9; MAGI2, TNS2, DLC1, CDK20, ITSN1 e ITSN2.*



O protocolo AmpliSeq consiste na hibridização através de um pool de pares de *primers* direcionados às regiões específicas desejadas, capazes de detectar e de se ligar às respectivas sequências de DNA alvo em uma única reação de amplificação (PCR). A seguir, os excessos de *primers* remanescentes foram digeridos e posteriormente descartados, procedendo-se a ligação às sequências adaptadoras de identificação (*index*). Um procedimento de purificação foi então realizado através de “*beads*” magnéticas, seguido por uma segunda amplificação (PCR) e uma segunda purificação. Após a finalização do preparo, as bibliotecas foram identificadas e conservadas a -20°C.

O sequenciamento das bibliotecas resultantes de ambos os painéis customizados foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina, San Diego, CA), utilizando o Kit V3. Tal tecnologia de sequenciamento utiliza a geração de cluster e sequenciamento por meio de química de síntese em uma célula de fluxo (*flowcell*). O terminador fluorescente detecta as bases conforme estas são incorporadas à fita complementar de DNA. À medida que cada dNTP é adicionado, são geradas imagens dos corantes do terminador fluorescente, que posteriormente são clivados para permitir a incorporação da próxima base. As identificações de bases são feitas diretamente a partir das medições da intensidade do sinal durante cada ciclo, resultando em sequenciamento base a base. Esse dado individual de cada base é armazenado em arquivos de dados brutos de base binária (BCL, *binary base call*). Após a conclusão do sequenciamento, os arquivos de chamada de base BCL são então convertidos em dados de sequência de bases.

### ***3.7.2. Preparo de biblioteca e sequenciamento de exoma completo***

No primeiro protocolo de sequenciamento de exoma completo, as bibliotecas de DNA foram preparadas através do Kit Nextera Exome Rapid Capture enrichment (Illumina, San Diego, CA), diferindo em relação ao primeiro painel customizado pelo fato de utilizar um protocolo de Nextera Rapid Capture enrichment com as sondas direcionadas à quase totalidade das regiões exônicas, junções éxon-intron e íntron-éxon e regiões regulatórias adjacentes. O sequenciamento foi realizado com o equipamento NextSeq 500 utilizando o kit High Output kit v2 (Illumina, San Diego, CA), objetivando cobertura horizontal maior que 95% e cobertura vertical média de 100x.

No segundo protocolo de sequenciamento de exoma completo, as bibliotecas de DNA foram construídas utilizando um kit de sondas para a captura customizado Illumina (Illumina, San Diego, CA) gerado para o Laboratório Mendelics (Mendelics, São Paulo, Brasil). O sequenciamento foi realizado no equipamento NovaSeq6000, visando cobertura horizontal mínima de 95% de bases-alvo com 10 ou mais leituras e cobertura vertical média de 100 vezes.

### 3.8. Análise Primária dos Dados

Os dados gerados pelo sequenciamento foram alinhados à referência de genoma humano GRCh37/hg19 com o Burrows-Wheeler Aligner (BWA-MEM aligner, GNU General Public License version XX), MIT License, Cambridge, MA, USA). Os dados duplicados foram marcados com o programa biobambam2. A chamada de variantes foi realizada com freebayes [<https://wiki.gacrc.uga.edu/wiki/Freebayes>]; [<https://github.com/ekg/freebayes>] e os arquivos VCF (variant call format) resultantes anotados por meio do software ANNOVAR [<http://annovar.openbioinformatics.org/em/latest>].

A conversão do formato BCL para o formato FASTQ foi realizado através do software Bcl2fastq Conversion, uma opção automática no sistema MiSeq, NextSeq500 e NovaSeq 6000. O formato FASTQ consiste em um formato texto que armazena os dados brutos da sequência, assim como seu escore de qualidade. O formato SAM (*Sequence Alignment/Map*) é um formato de texto delimitado por TAB, que compreende uma seção de cabeçalho e uma seção de alinhamento, também gerado a partir de arquivo BCL. BAM, por sua vez, constitui uma versão binária comprimida do arquivo SAM, usado para representar sequências alinhadas de até 128 Mb. O arquivo VCF apresenta formato de texto contendo linhas com metainformações, linhas de referência (*header line*) e linhas de dados com informação sobre a posição no genoma. Este formato também pode conter informações do genótipo das amostras para cada posição.

### 3.9. Análise secundária dos dados

Para a análise secundária dos dados de sequenciamento voltada à interpretação das variantes encontradas, foram utilizados filtros que incluíram as variantes com frequência populacional < 0,1% no gnomAD, ABraOM e SELAdb. O gnomAD<sup>144</sup> é uma plataforma desenvolvida por uma coalizão internacional de investigadores, com o objetivo de agregar e harmonizar dados de sequenciamento de exoma e genoma de uma ampla variedade de projetos de sequenciamento em larga escala e disponibilizar dados resumidos para a comunidade científica de uma forma mais ampla. Atualmente, na sua 3ª versão (GRCh38) reúne dados de 71.702 genomas de pacientes não-relacionados de todos os continentes. O ABraOM (Arquivo Brasileiro Online de Mutações)<sup>145</sup> é um repositório que alberga variantes genômicas obtidas através de sequenciamento de exoma e genoma completos de indivíduos participantes do SABE (Inquérito sobre Saúde, Bem-estar e Envelhecimento), que se caracteriza por uma amostra censitária de idosos da cidade de São Paulo. A última versão (SABE-WGS-1171) compreende variantes genômicas de 1.171 indivíduos não-relacionados inscritos no SABE de 2010-2012. O SELAdb, (Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de

São Paulo)<sup>146</sup> é um banco de dados de variantes obtidas a partir de sequenciamento de exoma completo de 523 indivíduos não-relacionados acompanhados por diversas especialidades médicas no HC-FMUSP (Nefrologia, Endocrinologia, Neurologia, Psiquiatria, Gastroenterologia e Reumatologia).

Em um segundo passo, foram filtradas variantes anteriormente referidas como causativas na literatura, assim como aquelas com potencial patogênico, ou seja, aquelas que geram códon de parada ou alteração de sítios de splicing ou, ainda, aquelas que alteram o quadro de leitura. As análises de patogenicidade das variantes *missense*, também chamadas variantes de ponto, foram realizadas através de programas preditores *in silico* de patogenicidade, incluindo Polyphen2, Mutation Assessor, SIFT e PROVEN. Para reduzir as chamadas falsamente positivas, foram conferidas as leituras e alinhamentos das respectivas sequências de bases utilizando o programa Integrative Genomics Viewer (IGV, <https://software.broadinstitute.org/software/igv/>).

Para a avaliação dos dados relacionados às variantes resultantes potencialmente causativas, também foram consultados bancos de dados de domínio público, incluindo OMIM<sup>R</sup> e o banco de dados PubMed, assim como HGMD, EBI, Ensembl e Uniprot. Também foram incluídas as variantes de susceptibilidade em *APOLI* (G1 e G2), assim como a variante p.R229Q em *NPHS2*, esta última presente em mais de 0,1% da população.

As variantes potencialmente patogênicas encontradas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger, tendo os genitores sido estudados quando disponíveis para estudo de segregação. Para o sequenciamento de Sanger, as amostras de DNA foram submetidas à amplificação por PCR a partir de *primers* específicos flanqueadores de cada uma das variantes identificadas. Os produtos de PCR foram então purificados e submetidos a sequenciamento por Sanger usando o BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e o equipamento ABI Prism 3500xl Genetic Analyzer sequencer (Thermo Fisher Scientific). Tais sequências foram posteriormente comparadas às sequências de DNA de referência.

As variantes confirmadas foram classificadas quanto à patogenicidade segundo os critérios estabelecidos pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), (**Tabelas 3 e 4**).<sup>147</sup>

**Tabela 3.** Critérios de patogenicidade de variantes de acordo com o *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*.<sup>147</sup>

Evidência de patogenicidade	Categoria
<b>Muito forte</b>	<b>PVS1.</b> Variante nula (nonsense, que promovem mudança do quadro de leitura, variantes canônicas ± 1 ou 2 em sitio de <i>splicing</i> , em códon de iniciação, deleção de um ou múltiplos exons) em um gene onde a perda de função é um mecanismo de doença
<b>Forte</b>	<b>PS1.</b> A mesma mudança de aa previamente estabelecida como variante patogênica, independentemente da mudança do nucleotídeo <b>PS2.</b> Variante <i>de novo</i> (com maternidade e paternidade confirmadas) em paciente com a doença e sem história familiar da mesma <b>PS3.</b> Estudos funcionais bem estabelecidos <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> dando suporte ao efeito deletério no gene ou no produto do gene <b>PS4.</b> A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente aumentada comparando com a prevalência em controles
<b>Moderada</b>	<b>PM1.</b> Localizada em um sítio com alta frequência mutacional ( <i>hot spot</i> ) e/ou crítico em domínio funcional bem estabelecido, onde não há variante benigna <b>PM2.</b> Ausente em controles populacionais (ou frequência extremamente rara se recessivo) em <i>Exome Sequencing Project, 1000 genomes</i> , ou <i>Exome Agregation Consortium</i> <b>PM3.</b> Para doenças de herança recessiva, detectada em <i>trans</i> com variante patogênica <b>PM4.</b> Mudança do tamanho da proteína como resultado de deleção ou inserção sem mudança no quadro de leitura em regiões não repetidas ou com variantes <i>stop loss</i> (perda de códon de parada) <b>PM5.</b> Nova mudança <i>missense</i> de um resíduo de aa onde uma mudança <i>missense</i> patogênica diferente tenha sido observada previamente no mesmo sítio <b>PM6.</b> Variante considerada <i>de novo</i> , mas sem confirmação de maternidade ou paternidade
<b>Suporte</b>	<b>PP1.</b> Cossegregação com a doença em múltiplos membros afetados da família em um gene que definitivamente é conhecido como causativo <b>PP2.</b> Variante <i>missense</i> em um gene com baixa frequência de variantes benignas <i>missense</i> , onde variantes <i>missense</i> patogênicas tenham sido descritas anteriormente <b>PP3.</b> Múltiplas linhas de evidência computacional suportam efeito deletério do gene mutado ou de seu produto (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i> ) <b>PP4.</b> Paciente com fenótipo ou história familiar muito específica de uma doença com etiologia genética única <b>PP5.</b> Fonte respeitável que recentemente reportou a variante como patogênica, mas a evidência não é disponível para o laboratório fazer uma avaliação independente
Evidência de impacto benigno	Categoria
<b>Stand-alone</b>	<b>BA1.</b> A frequência do alelo é ≥5% nas bases de dados <i>Exome Sequencing Project, 1000 genomes</i> , ou <i>Exome Agregation Consortium</i>
<b>Forte</b>	<b>BS1.</b> A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença <b>BS2.</b> Observada em indivíduo saudável adulto para uma doença de caráter recessivo (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligada ao X (hemizigoto), com penetrância completa esperada em idade precoce <b>BS3.</b> Estudos funcionais bem estabelecidos <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> mostram ausência de efeito deletério sem prejuízo da função da proteína ou de sítio de <i>splicing</i> <b>BS4.</b> Ausência de segregação em membros afetados da família

<b>Suporte</b>	<p><b>BP1.</b> Variante <i>missense</i> em um gene onde variantes primariamente truncadas são conhecidas como causa de doença</p> <p><b>BP2.</b> Observada <i>in trans</i> com uma variante patogênica de penetrância completa do gene dominante/doença ou observada <i>in cis</i> com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança</p> <p><b>BP3.</b> Deleções ou inserções no quadro de leitura em região de repetição sem função conhecida</p> <p><b>BP4.</b> Múltiplas linhas de evidência computacionais sugerem ausência de impacto no gene ou em seu produto (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i>, etc)</p> <p><b>BP5.</b> Variante encontrada em um caso com outra base molecular para a doença</p> <p><b>BP6.</b> Fonte respeitável recentemente reportou a variante como benigna, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente</p> <p><b>BP7.</b> Variante sinônimo (silenciosa) para a qual os algoritmos predizem ausência de impacto na sequência de consenso de <i>splicing</i> assim como na criação de um novo sítio de <i>splice</i> E o nucleotídeo não é altamente conservado.</p>
----------------	--

**Tabela 4.** Diretrizes de combinação dos critérios para classificar as variantes encontradas

Classificação	Critérios
<b>Patogênica</b>	(1) Muito forte (PVS1) E (a) $\geq 1$ Forte (PS1-PS4) OU (b) $\geq 2$ Moderadas (PM1-PM6) OU (c) 1 Moderada (PM1-PM6) e 1 de Suporte (PP1-PP5) OU (d) $\geq 2$ de Suporte (PP1-PP5) (2) $\geq 2$ Fortes (PS1-PS4) OU (3) 1 Forte (PS1-PS4) E (a) $> 3$ Moderadas (PM1-PM6) OU (b) 2 Moderadas (PM1-PM6) e $\geq 2$ de Suporte (PP1-PP5) OU (c) 1 Moderada (PM1-PM6) E $\geq 4$ de Suporte (PP1-PP5)
<b>Provavelmente patogênica</b>	(1) Muito forte (PVS1) E 1 Moderada (PM1-PM6) OU (2) 1 Forte (PS1-PS4) E 1-2 Moderada (PM1-PM6) OU (3) 1 Forte (PS1-PS4) E $\geq 2$ de Suporte (PP1-PP5) OU (4) $\geq 3$ Moderadas (PM1-PM6) OU (5) 2 Moderadas (PM1-PM6) E $\geq 2$ de Suporte (PP1-PP5) (6) 1 Moderada (PM1-PM6) E $\geq 4$ de Suporte (PP1-PP5)
<b>Benigna</b>	(1) 1 Stand-alone (BA1) OU (2) $\geq 2$ Forte (BS1-BS4)
<b>Provavelmente benigna</b>	(1) 1 Forte (BS1-BS4) e 1 de suporte (BP1-BP7) OU (2) $\geq 2$ de suporte (BP1-BP7)
<b>Significado incerto</b>	(1) Critérios descritos acima não são atingidos OU (2) Critérios de classificação de benignidade ou patogenicidade são contraditórios

### 3.10. Análise de Ancestralidade

A avaliação da ancestralidade foi realizada por meio de genotipagem e análise do arranjo de alta densidade de SNPs Infinium HTS Global Screening Array-24 BeadChip v3.0 (Illumina, San Diego, CA), que é capaz de identificar até 750.000 SNPs por amostra de DNA. Essa técnica inicia-se com a quantificação fluorimétrica do DNA, seguida de sua amplificação e fragmentação enzimática. Segue-se a hibridização do DNA fragmentado no BeadChip, que consiste em uma câmara de hibridização que ocorre através da captura das sequências específicas, onde cada canal tem um código de barras de identificação. Após a hibridização, realiza-se a purificação retirando os fragmentos de DNA não hibridizados e acrescentam-se os nucleotídeos marcados para estender os produtos hibridizados. Após este passo, são realizadas as leituras dos sinais de fluorescência utilizando o sistema iScan (Illumina, San Diego, CA)

A ancestralidade global dos pacientes (ancestralidade média do genoma) foi inferida com o programa ADMIXTURE v.1.3.0.<sup>148</sup> Amostras de indivíduos de origem africana (n=104); europeia (n=155), nativo-americana (n=61) e leste-asiática (n=223) não miscigenadas do Human Genome Diversity Project<sup>149</sup> foram usadas como populações parentais. Como as amostras dos pacientes foram genotipadas com o array de alta densidade de SNPs e as do HGDP foram genotipadas por WGS (Whole Genome Sequence), foram utilizados filtros para haver sobreposição entre os marcadores genéticos e possibilitar a harmonização dos dois *datasets*. As análises foram realizadas apenas com marcadores independentes (desequilíbrio de ligação  $r^2=0,1$ ), através de análise supervisionada (K=4) e 2000 réplicas de *bootstrap*.

### 3.11. Preparo de Fragmentos Renais Parafinizados para Microdissecção

As análises proteômicas foram realizadas a partir de material de biópsia renal de pacientes com GCI e GESF-NOS não utilizado para o exame diagnóstico e armazenado como tecido embebido em parafina e fixado em formalina. Porções normais de tecidos renais derivados de nefrectomias renais totais por neoplasias renais foram utilizados como controles de tecido renal normal. Para tanto, nestes casos as coletas respeitaram uma distância superior a 5 cm entre o tumor e o tecido coletado. Após fixação e confecção dos blocos de parafina, foram realizadas secções com espessura de 10 $\mu$ m, sob assepsia do micrótomo com álcool 70% e troca de navalha a cada amostra. Procedeu-se então à distensão do corte de fragmento histológico em banho-maria com água destilada, exposição do mesmo à temperatura ambiente para secagem e adesão à lâmina específica para microdissecção a laser MembraneSlide 1.0 PEN com membrana PEN tensada (Carl Zeiss, Munique, Alemanha). O fragmento foi então submetido a coloração com hematoxilina e eosina para posterior análise de qualidade e identificação das áreas de interesse.

Para a realização da microdissecção a laser, as lâminas não são finalizadas com colocação de lamínulas.

A partir da análise por microscopia de luz, os glomérulos viáveis, ou seja, que não apresentavam esclerose global, foram identificados e microdissecados a laser, sendo coletado apenas o tufo glomerular (exclusão da cápsula de Bowman). A microdissecção a laser (MCL) foi realizada através de um sistema computadorizado (Leica LMD6500 Laser Microdissection System, Wetzlar, Alemanha), que consiste em um emissor de feixes de raio laser acoplado a um microscópio óptico que corta a amostra e a coleta por meio de um sistema gravitacional. Foi estabelecida uma área glomerular de pelo menos  $250.000\mu\text{m}^2$  para que a amostra fosse considerada representativa para a identificação e quantificação de proteínas de MEC glomerular.<sup>150,151</sup> O material capturado foi armazenado em tubos Eppendorf com 35 $\mu\text{L}$  de água destilada a  $-80^\circ\text{C}$ .

### **3.12. Protocolo de Descelularização**

Após aquisição dos fragmentos microdissecados a laser, os cortes armazenados em água destilada foram sedimentados através de centrifugação a  $15300 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 15 min. Após a remoção da água, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de tampão de descelularização (PBS com 0,5% de Triton X-100 e 20 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$ ), seguido por incubação no equipamento Thermomixer C (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) por 10 min a  $37^\circ\text{C}$  e agitação a 750 rpm. A seguir o sobrenadante foi transferido para o Eppendorf Protein lowbind de 0,5 mL (fração celular) e adicionados 10  $\mu\text{L}$  do tampão de neutralização da fração celular (DTT 0,5 M, TEAB 1 M). O pellet contendo os cortes foi então ressuscitado em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de lise da matriz (RapiGest 0,1%, TEAB 0,5 M e DTT 0,25 M). Ambas as frações foram incubadas por 10 min a  $95^\circ\text{C}$  sob agitação de 1400 rpm. Em seguida, as frações contendo os cortes foram sonicadas no equipamento Bioruptor (Diagenode, Seraing, Bélgica) à potência média em 3 ciclos de 15 s com 30 s de intervalo. Um novo ciclo de incubação foi conduzido no equipamento Thermomixer (10 min,  $95^\circ\text{C}$  e agitação de 1400 rpm). Seguiu-se a adição do tampão de desnaturação e alquilação (30  $\mu\text{L}$  para a fração celular e 50  $\mu\text{L}$  para a fração de matriz; ureia 8 M, iodoacetamida 25 mM em TEAB 50 mM). Uma nova incubação foi realizada no equipamento Thermomixer a  $21^\circ\text{C}$ , sob agitação de 1400 rpm e com proteção da luz por 30 min. Foram então adicionados 20  $\mu\text{L}$  da suspensão de Seramag (20 mg/mL) em tubos *LowBind* de 1,5 mL. Os conteúdos dos tubos de 0,5 mL foram transferidos para tubos de 1,5 mL e homogeneizados por inversão. Adicionamos a seguir 400  $\mu\text{L}$  de acetona, seguido de homogeneização. Os tubos foram mantidos em freezer a  $-30^\circ\text{C}$  *overnight*.

Na segunda etapa, conduzida no dia posterior, foi realizada uma nova centrifugação a 20800 ×g, a 4°C por 10 min. Os tubos foram colocados em uma *rack* magnética e o sobrenadante removido. Os tubos foram submetidos a dois ciclos de lavagem com 500 µL de etanol 80%, sem ressuspensão dos pellets magnéticos. Após a última lavagem, foram adicionados 80 µL de tampão de digestão (bicarbonato de amônio 50 mM com 0,025% de dodecilmaltosídeo. Foram então adicionados 2 µL de rLysC 0,2 µg/mL e seguiu-se a incubação por 2 h a 37°C, sob agitação de 700 rpm. Após adição de 5 µL de tripsina 0,2 µg/mL, foi realizada uma nova incubação por 16 h, a 37°C e sob agitação de 700 rpm.

Na terceira etapa, realizada no dia seguinte, os tubos foram acidificados com 5 µL de TFA 10% e os sobrenadantes diretamente transferidos para placas Oasis µElution pré-condicionadas com 200 µL de acetonitrila e 200 µL de TFA 0,1%. Os poços de SPE (*solid phase extraction*) foram lavados com 800 µL de TFA 0,1%, seguidos de 200 µL de H<sub>2</sub>O milliQ, e eluídos em uma placa Protein LowBind com 30 µL de acetonitrila 70%. Os eluatos foram secos em *speed-vac* e ressuspensos em 15 µL de acetonitrila 15% e TFA 0,5% por meio de incubação no Thermomixer por 10 min com agitação a 600 rpm, e diluídos com a adição de 35µL de água. A determinação das concentrações dos peptídeos foi realizada através do equipamento NanoDrop (Sigma-Aldrich, San Louis, MO) a 280 nm, usando a curva de albumina sérica bovina (BSA) e normalizando os volumes de injeção pela amostra de menor concentração.<sup>140,152–155</sup>

### 3.13. Análise Proteômica

Os extratos obtidos foram injetados (volumes ajustados pela normalização por quantificação por NanoDrop) no sistema de microcromatografia NanoUltimate acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo híbrido quadrupolo-orbitrap Exploris 240 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). O sistema de microcromatografia conta com uma coluna de captura Acclaim PepMap100 C18 5µm, 100Å 300 µm x 3mm (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) e uma coluna analítica de fase reversa EasySpray PepMap RSLC C18 2vµm, 100Å, 75vµm x 50vcm (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). A captura e dessalinização dos peptídeos foi realizada em 2 min com um fluxo de 100vµL/min de TFA 0,1%. A separação na coluna analítica foi obtida com um gradiente binário de acetonitrila contendo 1% de DMSO e 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B) em água contendo 1% de DMSO e 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 1,5vµL/min e a concentração de B foi mantida inicialmente em 5% por 4 min e a seguir elevada para 25% em 60 min, de 25 a 49% em 20 min, e finalmente elevada para 95% em 5 min. A aquisição dos dados foi feita no modo Data Dependent Aquisition (top20). A



resolução em MS1 foi 120.000 a 200vm/z e o intervalo de m/z adquirido foi de 370 a 1500 (Max IT 60ms, ACG target  $3 \times 10^6$ ). Os espectros de dissociação foram obtidos a partir da seleção de íons com 2 a 6 cargas, com uma seleção de 2vm/z no quadrupolo e a uma resolução ajustada para 15.000 a 200vm/z (Max IT 40 ms, AGC target:  $1 \times 10^5$ ). Os dados brutos foram preliminarmente avaliados pelo software MaxQuant (versão 4.2.1), comparando os dados através do processo de *peptide spectrum match* em relação ao banco de dados curados do Uniprot Swissprot (proteoma humano: 9606). Os dados contendo os grupos de proteínas foram consolidados em uma planilha e anotados por meio de uma função de busca a partir dos nomes dos genes da base de dados Matrisome Project [<http://matrisomeproject.mit.edu/other-resources/human-matrisome/>] e dos bancos de dados de MEC glomerular previamente publicados.<sup>140,152-155</sup>

### **3.14 Processamento dos Dados e Análise In Silico**

Os dados de proteômica obtidos foram analisados usando o software MaxQuant,<sup>156</sup> em que os espectros de massas são processados de forma integrada com a ferramenta de busca Andromeda<sup>157</sup> contra o banco de dados proteômico humano SwissProt Uniprot.<sup>158</sup> As normalizações e anotações categóricas, como processo biológico e função molecular, foram feitas na plataforma Perseus (v2.0.7.0) (<http://perseusframework.org>).<sup>159</sup> Análises de enriquecimento funcional foram realizadas utilizando as bases de dados Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes (STRING v10)<sup>160</sup> (escore de confiança mais alto, 0,7), análise de enriquecimento pela técnica Gene Ontology realizada pelo sistema de classificação Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (Panther v. 17.0)<sup>161</sup> e construção dos diagramas de Venn através da ferramenta Venny (v.2.1.0).<sup>162</sup>

### **3.15. Análise Estatística**

Empregamos os testes de D'Agostino-Pearson Omnibus e Shapiro-Wilk para avaliação do perfil de distribuição das variáveis. As variáveis com distribuição paramétrica foram expressas como média  $\pm$  desvio padrão e comparadas entre si; quando em dois grupos, por meio do teste *t* de Student e, quando em três ou mais grupos, por análise de variância (ANOVA). Nos casos em que as variâncias, analisadas pelo teste de Levene, foram significativamente diferentes entre os grupos, aplicamos a correção de Welch. Análises pós-teste foram realizadas por meio do teste de TukeyHSD. As variáveis de distribuição não-normal foram expressas em mediana e intervalos interquartis, e comparadas entre si pelo teste U de Mann-Withney, quando em dois grupos, e pelo teste de Kruskal-Wallis quando em três ou mais grupos. As análises pós-teste foram realizadas

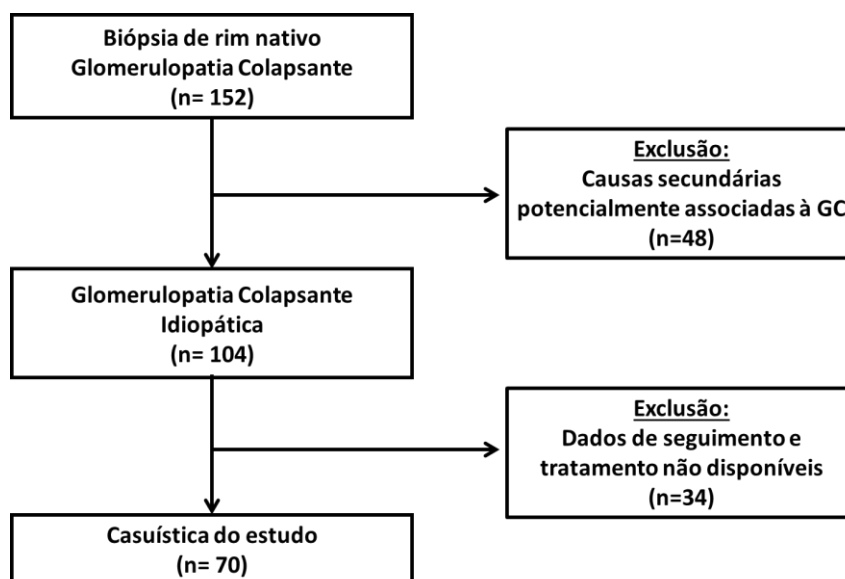
com o teste de Dunn. As variáveis nominais foram expressas em contagem absoluta e percentual e comparações entre grupos para tais variáveis foram realizadas utilizando o teste exato de Fisher, para comparações de variáveis com duas categorias, ou Qui-quadrado, quando uma ou mais das variáveis apresentava mais de duas categorias. Para esses casos, foram calculados os resíduos padronizados e ajustados para cada célula e o p foi obtido, sendo então corrigido com o método de Benjamini-Hochberg. Para análises de correlação, foram utilizados o teste de Pearson para variáveis de distribuição paramétrica e o teste de Spearman para variáveis de distribuição não-paramétrica. As análises comparativas de sobrevida renal ao longo do tempo entre grupos foram realizadas por meio de curvas de Kaplan-Meyer ou pela regressão de Cox. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes e, no caso de múltiplas comparações,  $q < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas pelos softwares GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## *Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização clínica, laboratorial e histológica de pacientes com GCI

Um total de 152 pacientes com diagnóstico histológico de GC foram inicialmente avaliados. Após a aplicação dos critérios de exclusão, 70 deles tornaram-se elegíveis para participar do estudo (**Figura 5**).



**Figura 5.** Fluxograma da seleção da casuística de pacientes com GCI.

Analisando a casuística em sua totalidade, observamos uma distribuição aproximadamente equivalente entre os sexos (52,9% para o sexo masculino), mediana de idade de 23 (17-3) anos, maioria com raça autodeclarada branca (64,3%), história familiar de doença renal em 22,9% dos pacientes e consanguinidade em 5,7% dos mesmos. Os dados sobre a apresentação clínica e exames laboratoriais encontram-se na **Tabela 5**. Chama atenção a observação de que os pacientes apresentavam disfunção renal significativa já à admissão, caracterizada por uma TFGe de 56,1 (31,2-108,4) mL/min/1,73 m<sup>2</sup> e proteinúria de grande monta [6,8 (4,2-10,7) g/24 h], além de um nível sérico baixo de albumina (3,0 ± 0,9 g/dL). A maior parte dos pacientes foi tratada com corticosteroide (90%) e mais da metade necessitou de terapêutica com inibidores de calcineurina (ICN) (62,9%). IECA/BRA não foram utilizados em casos de disfunção renal pronunciada à admissão e/ou hipercalemia, o que totalizou 18,6% dos pacientes.

Em relação à resposta terapêutica, a maioria dos pacientes apresentou corticorresistência (85,7%) e ausência de remissão de proteinúria com o uso de imunossupressão (57%). Tais achados se

associaram a um declínio da TFG<sub>e</sub> de 28,4 (7,3-56,8) mL/min/1,73 m<sup>2</sup>/ano e à evolução de 5% dos pacientes para DRC-TRS após 36 meses do diagnóstico. Cerca de 40% dos pacientes receberam transplante renal, sendo que 15,4% deles desenvolveram recidiva da doença de base no enxerto.

**Tabela 5.** Características clínicas, laboratoriais e evolutivas de pacientes com GCI.

	<b>Total (n = 70)</b>
Idade (anos)	23 (17-3)
Sexo masculino (n/%)	37 / 52,9
Raça autodeclarada (n/%)	
Branca	45 / 64,3
Não-branca	25 / 35,7
História familiar de doença renal (n/%)	16 / 22,9
Consanguinidade (n/%)	4 / 5,7
Exames laboratoriais à biópsia renal	
Creatinina (mg/dL)	1,4 (0,8–2,6)
TFG <sub>e</sub> -CKD-EPI (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	56,1 (31,2–108,4)
Albumina sérica (g/dL)	2,3 ± 0,9
Proteinúria (g/dia)	6,8 (4,2-10,7)
Hematúria (n/%)	31 / 44,3
Hipertensão arterial (n/%)	49 / 70
Tratamento (n/%)	
IECA / BRA	57 / 81,4
Corticosteroide	63 / 90
Inibidor de calcineurina	44 / 62,9
Ciclofosfamida	7 / 10
Micofenolato mofetil	13 / 18,6
Rituximabe	5 / 7,1
Corticorresistência (n/%)	54 / 63 (85,7)
Remissão (n/%)	
Completa	8 / 11,4
Parcial	23 / 32,9
Ausente	39 / 55,7
Tempo para DRC-TRS (meses)	27 (11,5–56,5)
ΔTFG <sub>e</sub> -CKD-EPI/ano (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	-28,4 (-56,8; -7,3)
Desfecho (n/%)	
DRC-TRS 36 meses pós-biópsia renal	35 / 50
DRC-TRS ao fim do seguimento	50 / 71,4
Transplante Renal (n/%)	28 / 40
Recidiva da doença de base (n/%)	4 / 15,4

TFG<sub>e</sub>-CKD-EPI: taxa de filtração glomerular estimada pela equação CKD-EPI; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina I; BRA: bloqueador de receptor da angiotensina II; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva.

Os pacientes que evoluíram para DRC-TRS até 36 meses após a realização da biópsia renal manifestaram a doença em uma idade menor que aqueles que não atingiram tal desfecho para o mesmo tempo de seguimento pós-biópsia [21,0 (16,2-26,0) vs 27,0 (18,8-37,8) anos,  $p=0,021$ ], além de uma pior função renal ao diagnóstico, traduzida por um nível mais elevado de creatinina sérica [2,31 (1,2-4,2) vs 1,23 (0,8-1,6) mg/dL,  $p=0,006$ ] e, conseqüentemente, TFGe mais baixa [43,3 (17,9-77,5) vs 71,7 (51,5-120,7) mL/min/1,73 m<sup>2</sup>,  $p=0,005$ ] (**Tabela 6**). Os pacientes que necessitaram TRS também manifestaram uma maior gravidade histológica, apresentando maior porcentagem de glomérulos com sinéquias [25% (11-50) vs 10 (0-25),  $p=0,045$ ] e de glomérulos esclerosados [17,6% (0,0-42,2) vs 0,0 (0,0-11,5),  $p=0,023$ ] (**Tabela 7**). Além disso, o grupo DRC-TRS fez uso menos frequente de ICN (44,0% vs 82,4%,  $p=0,001$ ) e apresentou menor frequência de remissão parcial (13,9% vs 52,9%,  $p=0,001$ ), apesar de não ter sido observada diferença significativa na frequência de remissão completa entre pacientes DRC-TRS e não DRC-TRS.

Considerada a evolução para DRC-TRS até o final do seguimento, pacientes que atingiram este desfecho também apresentaram nível mais alto de creatinina sérica ao diagnóstico que o grupo não DRC-TRS [1,6 (1,2-3,0) vs 1,10 (0,8-1,4) mg/dL,  $p=0,018$ ] e, conseqüentemente, menor TFGe [47,4 (25,4-83,9) vs 85,4 (52,6-112,1) mL/min/1,73 m<sup>2</sup>,  $p=0,022$ ] (**Tabela 6**). A análise das biópsias renais, por sua vez, revelou que pacientes que evoluíram para TRS apresentaram tendência a fibrose tubulointersticial/atrofia tubular mais extensa que o grupo não DRC-TRS (**Tabela 7**). Por fim, pacientes que necessitaram TRS fizeram uso menos frequente de IECA/BRA (74% vs 100% anos,  $p=0,014$ ) e remissão clínica completa ou parcial associou-se a um menor risco de evolução para DRC-TRS (28% vs 85%,  $p<0,001$ ).

**Tabela 6.** Perfil clínico, laboratorial e genético de pacientes com GCI que evoluíram ou não para DRC-TRS até 36 meses após a realização de biópsia renal e até o fim do seguimento.

	36 meses pós-biópsia			Final do seguimento		
	DRC-TRS (n = 36)	Sem DRC-TRS (n = 34)	P	DRC-TRS (n = 50)	Sem DRC-TRS (n = 20)	P
Idade (anos)	21 (16,2-26,0)	27 (18,8-37,8)	<b>0,021</b>	23 (17-31)	27 (19-34)	0,214
Sexo Masculino (n / %)	22 / 61,1	15 / 44,1	0,231	28 / 56	9 / 45	0,438
Raça autodeclarada (n / %)			0,326			1,000
Branca	21 / 58,3	24 / 70,6		32 / 64	13 / 65	
Não-Branca	15 / 41,7	10 / 29,4		18 / 36	7 / 35	
História familiar de doença renal (n / %)	9 / 25,0	7 / 20,6	0,778	13 / 26	3 / 15	0,529
Consanguinidade (n/%)	1 / 2,8	3 / 8,8	0,350	4 / 8	0 / 0	0,319
Exames laboratoriais à biópsia renal						
Creatinina (mg/dL)	2,31 (1,2-4,2)	1,22 (0,8-1,6)	<b>0,006</b>	1,6 (1,2-3,0)	1,10 (0,8-1,4)	<b>0,018</b>
TFGe (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	43,3 (17,9-77,5)	71,7 (51,5-120,7)	<b>0,005</b>	47,4 (25,4-83,9)	85,4 (52,6-112,1)	<b>0,022</b>
Albumina sérica (g/dL)	2,3 ± 0,94	2,3 ± 0,93	0,931	2,2 ± 0,9	2,4 ± 0,9	0,518
Proteinúria (g/dia)	7,2 (4,6-11,5)	6,6 (4,2-10,7)	0,621	6,5 (4,4-16,4)	7,13 (4,1-10,7)	0,904
Hematúria (n/%)	19 / 54,3	12 / 37,5	0,222	24 / 48	7 / 35	0,289
Hipertensão arterial (n/%)	26 / 74,3	23 / 71,9	1,000	35 / 70	14 / 70	1,000
Tratamento (n/%)						
IECA / BRA	26 / 72,2	31 / 91,2	0,064	37 / 74	20 / 100	<b>0,014</b>
Corticosteroide	30 / 85,7	33 / 97,1	0,198	44 / 88	19 / 95	0,664
Inibidor de calcineurina	16 / 44,4	28 / 82,4	<b>0,001</b>	29 / 58	15 / 75	0,274
Ciclofosfamida	2 / 5,9	5 / 13,9	0,430	5 / 10	2 / 10	1,000
Micofenolato mofetil	7 / 19,4	6 / 17,6	1,000	10 / 20	3 / 15	0,744
Rituximabe	2 / 5,6	3 / 8,8	0,669	3 / 6	2 / 10	0,619
Corticorresistência (n/%)	28 / 30 (93,3)	26 / 33 (78,8)	0,152	40 / 44 (90,9)	14 / 19 (73,7)	0,114
Remissão (n/%)						
Qualquer remissão	7 / 20	24 / 70,5	<b>&lt;0,001</b>	14 / 28	17 / 85	<b>&lt;0,001</b>
Completa	2 / 5,6	6 / 17,6	0,145	2 / 4	6 / 30	<b>0,005</b>
Parcial	5 / 13,9	18 / 52,9	<b>0,001</b>	12 / 24	11 / 55	<b>0,023</b>
ΔTFGe-CKD-EPI/ano (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	-28,44 (-56,81 ; -7,30)	-20,8 (-55,1 ; -7,1)	0,145	-22,6 (-76,7 ; -7,3)	-34,7 (-56,9 ; 13,5)	0,681

TFGe-CKD-EPI: taxa de filtração glomerular estimada pela equação do CKD-EPI; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina I; BRA: bloqueador de receptor da angiotensina II; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva.

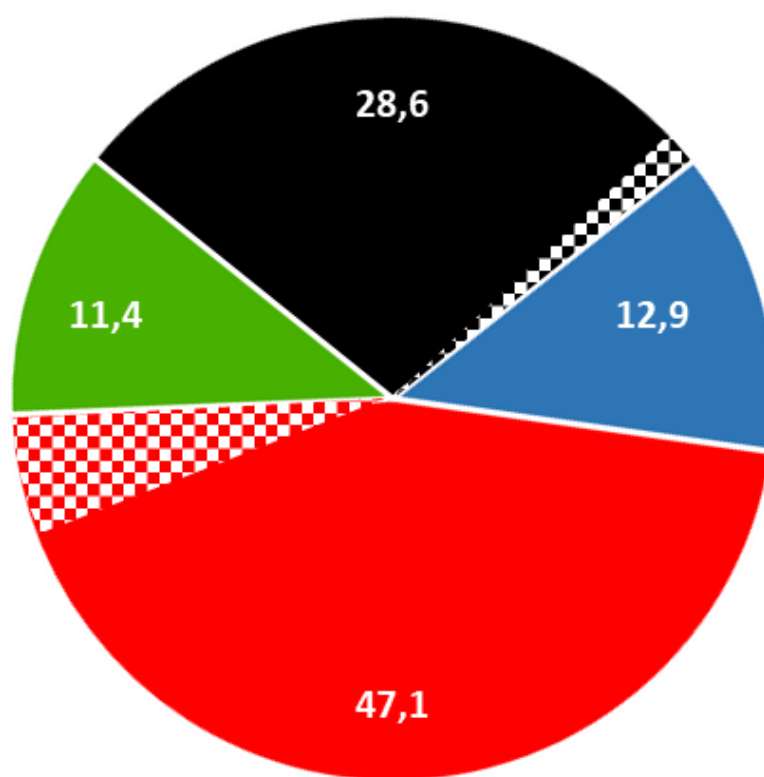
**Tabela 7.** Achados histológicos em pacientes com GCI que evoluíram para DRC-TRS até 36 meses pós-biópsia e até o final do seguimento.

	36 meses pós-biópsia		P
	DRC-TRS (n = 36)	Sem DRC-TRS (n = 34)	
<b>Compartimento glomerular</b>			
Hipercelularidade mesangial (n / %)	20 / 55,5	13 / 38,2	0,145
Expansão da matriz mesangial (n / %)	27 / 75	26 / 76,5	1,000
Glomérulos com sinéquias (%)	25 (11-50)	10 (0-25)	<b>0,045</b>
Glomérulos esclerosados (%)	17,6 (0-42,2)	0 (0-11,5)	<b>0,023</b>
<b>Compartimento tubulointersticial</b>			
Fibrose intersticial / Atrofia tubular			0,271
Ausente	3 / 8,3	6 / 17,6	
<25%	14 / 38,8	17 / 50	
25-50%	9 / 25	7 / 20,6	
>50%	10 / 27,9	4 / 11,8	
Dilatação tubular microcística (n / %)	28 / 77,7	23 / 67,6	0,262
<b>Compartimento vascular</b>			
Hialinose arteriolar (n / %)	7 / 19,4	9 / 26,5	0,576
Proliferação de camada íntima (n / %)	14 / 38,9	12 / 35,3	0,803
Arteriolesclerose (n / %)	5 / 13,8	2 / 5,9	0,411
<b>Final do seguimento</b>			
	DRC-TRS (n = 50)	Sem DRC-TRS (n = 20)	P
<b>Compartimento glomerular</b>			
Hipercelularidade mesangial (n / %)	24 / 48	9 / 45	0,793
Expansão da matriz mesangial (n / %)	37 / 74	17 / 85	0,532
Glomérulos com sinéquias (%)	25 (10-35)	10 (0-28,3)	0,242
Glomérulos esclerosados (%)	8,5 (0-37,5)	2,5 (0-15,8)	0,221
<b>Compartimento tubulointersticial</b>			
Fibrose intersticial/Atrofia tubular (n / %)			0,050
Ausente	5 / 10	5 / 25	
<25%	19 / 38	12 / 60	
25-50%	13 / 26	2 / 10	
>50%	13 / 26	1 / 5	
Dilatação tubular microcística (n / %)	36 / 72	15 / 75	0,992
<b>Compartimento vascular</b>			
Hialinose arteriolar (n / %)	10 / 20	6 / 30	0,532
Proliferação de camada íntima (n / %)	16 / 32	10 / 50	0,274
Arteriolesclerose (n / %)	4 / 8	3 / 15	0,411

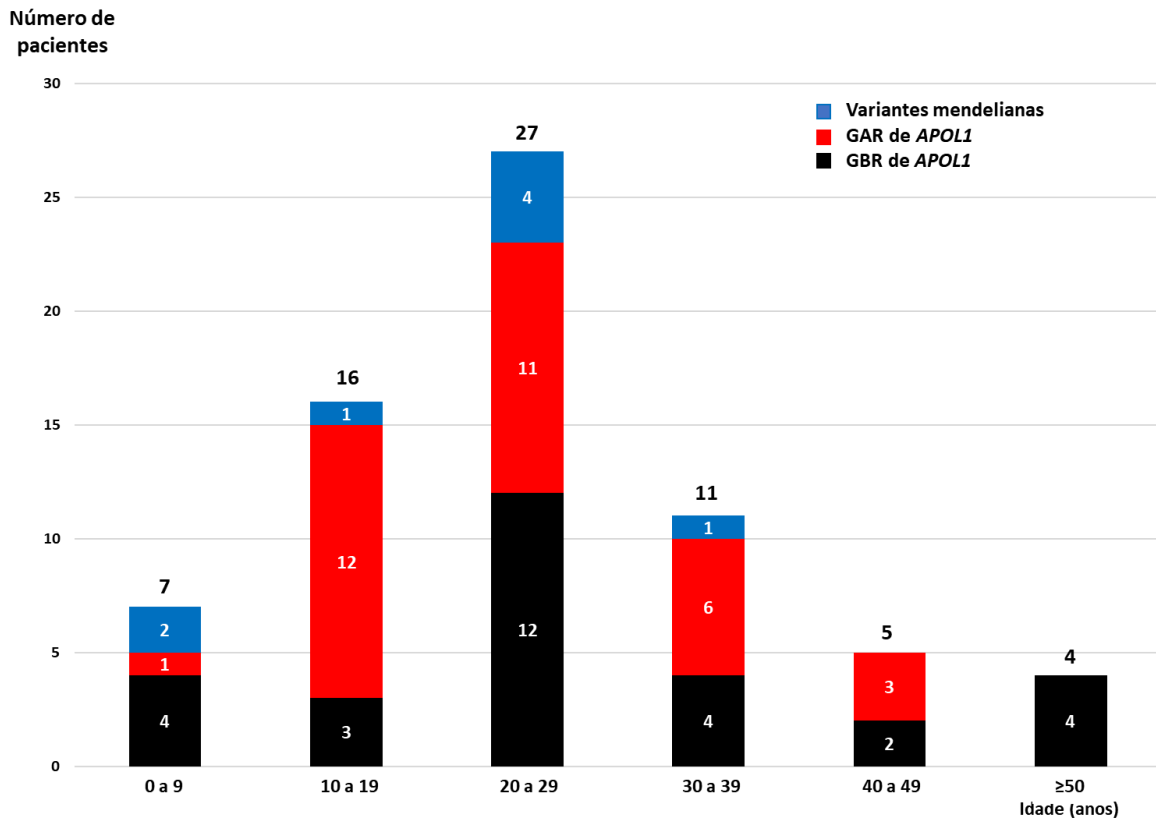


## 4.2. Análise genética e correlações genótipo-fenótipo

Variantes genéticas mendelianas consideradas causativas ou presença de dois alelos de risco de *APOLI* (G1/G1, G2/G2 ou G1/G2), denominada genótipo de alto risco de *APOLI* (GAR), foram identificadas em 41 (58,6%) dos pacientes, 33 (47,1%) dos quais com GAR e 8 (11,5%) com variantes mendelianas causativas (**Figura 6**). Detectamos apenas 1 alelo de risco de *APOLI* em 9 (12,9%) pacientes e nenhum alelo de risco (G0/G0) em 20 (28,5%) dos mesmos. Vale dizer que, em conjunto, esses grupos de 9 e 20 pacientes compõem um grupo de 29 (40%) pacientes, definido como genótipo de baixo risco de *APOLI* (**Figura 6 e Tabela 8**). A **Figura 7** ilustra a distribuição dos achados genéticos de acordo com a idade.



**Figura 6.** Distribuição genotípica dos pacientes com GCI (em %), incluindo variantes mendelianas relacionadas a GC e variantes de risco de *APOLI*. Preto: Genótipo G0/G0 de *APOLI*; Preto quadriculado: Genótipo G0/G0 + variante mendeliana de significado incerto; Azul: Presença de apenas 1 alelo de risco de *APOLI* (genótipo G1/G0 ou G2/G0); Azul + Preto: Genótipo de baixo risco de *APOLI* (0 ou 1 alelo de risco de *APOLI*); Vermelho: Genótipo de alto risco de *APOLI* (G1/G1, G2/G2 ou G1/G2); Vermelho quadriculado: Genótipo de alto risco de *APOLI* + variante mendeliana de significado incerto.



**Figura 7.** Distribuição percentual (ordenada) em número absoluto (dentro das barras) dos pacientes com GCI de acordo com a idade e achados genéticos.

Ao compararmos as características clínicas, laboratoriais e de resposta terapêutica dos indivíduos do estudo de acordo com seu status genético, a maior parte dos pacientes com variantes mendelianas ou GAR foram diagnosticados na terceira década de vida, seguidos pela 2ª e 4ª década respectivamente. Conforme esperado, observamos uma maior prevalência de GAR no grupo de pacientes autodeclarados não-brancos que nos autodeclarados brancos (**Tabela 6**;  $p=0,0009$ ). Interessantemente, também observamos maior frequência de história familiar de doença renal em pacientes com GAR ( $p=0,03$ ), observação não presente no grupo VM. Apenas pacientes do grupo GBR foram tratados com rituximabe (**Tabela 6**;  $p=0,022$ ) e ciclofosfamida foi empregada quase que exclusivamente neste grupo de pacientes (**Tabela 6**;  $p=0,042$ ). Embora esses dados estejam de acordo com a patogênese da GCI nos três grupos, esses resultados apresentam interesse científico limitado, uma vez que tal conduta se constitui em opção do médico.

A porcentagem de glomérulos com sinéquias e/ou esclerosados mostrou-se associada a pior prognóstico aos 36 meses pós-biópsia, enquanto fibrose tubulointersticial e atrofia tubular se associaram a pior prognóstico ao final do seguimento. Esses marcadores histológicos, entretanto, não são específicos, refletindo apenas o grau de cronicidade da lesão renal.

**Tabela 8.** Apresentação clínica, resposta terapêutica e evolução de pacientes com GCI de acordo com os achados genéticos.

	<b>GBR-APOLI</b> (n = 29)	<b>GAR-APOLI</b> (n = 33)	<b>VM</b> (n = 8)	<b>p</b>
Idade (anos)	25,5 (20-35)	23 (17-33)	22 (5-27)	0,362
Sexo masculino (n/%)	11 / 37,9	18 / 54,5	4 / 50,0	0,419
Raça autodeclarada (n/%)				<b>0,001</b>
Branca	24 / 82,8 <sup>a†</sup>	14 / 42,4 <sup>b†</sup>	7 / 87,5 <sup>c</sup>	
Não-Branca	5 / 17,2 <sup>a†</sup>	19 / 57,6 <sup>b†</sup>	1 / 12,5 <sup>c</sup>	
História familiar de doença renal (n / %)	3 / 10,3 <sup>d</sup>	12 / 36,4 <sup>e†</sup>	1 / 12,5 <sup>f</sup>	<b>0,039</b>
Consanguinidade (n/%)	2 / 6,9	1 / 3,0	2 / 12,5	0,549
Exames laboratoriais à biópsia renal				
Creatinina sérica (mg/dL)	1,41 (1,1–2,9)	1,37 (0,8-2,3)	1,71 (0,5–4,0)	0,718
TFGe-CKD-EPI (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	51,9 (23,5-113)	62 (35,3–103,7)	45 (17-119)	0,599
Albumina sérica (g/dL)	2,3 ± 0,92	2,1 ± 0,80	2,96 ± 1,15	0,062
Proteinúria (g/24h)	5,61 (4,2–9,9)	8,0 (4,5-12,6)	5,0 (2,6–8,2)	0,165
Hematúria (n/%)	16 / 55,2	11 / 36,7	4 / 50,0	0,353
Hipertensão arterial (n/%)	22 / 75,9	20 / 66,7	7 / 87,5	0,452
Tratamento (n/%)				
IECA / BRA	23 / 79,3	28 / 84,8	6 / 75,0	0,756
Corticosteroide	25 / 86,2	30 / 90,9	6 / 75,0	0,474
Inibidor de calcineurina	16 / 55,2	23 / 69,7	5 / 62,5	0,498
Ciclofosfamida	6 / 20,7	1 / 3,0	0 / 0	<b>0,042</b>
Mícifenolato mofetil	5 / 17,2	5 / 15,2	3 / 37,5	0,335
Rituximabe	5 / 17,2	0 / 0	0 / 0	<b>0,022</b>
Corticorresistência (n/%)	21 (87,5)	27 (84,4)	6 (85,7)	0,947
Remissão (n/%)				
Presente	14 / 48,3	14 / 42,4	3 / 37,5	0,826
Completa	5 / 17,2	2 / 6,1	1 / 12,5	0,384
Parcial	9 / 31,0	12 / 36,4	2 / 25	0,798
Desfecho (n/%)				
DRC-TRS 36 meses pós-biópsia	14 / 48,3 <sup>g</sup>	14 / 42,4 <sup>h</sup>	8 / 100 <sup>†</sup>	<b>0,012</b>
DRC-TRS ao fim do seguimento	18 / 62,1 <sup>j</sup>	24 / 57,6 <sup>k</sup>	8 / 100 <sup>l</sup>	0,107
Transplante renal (n/%)	8 / 27,6	14 / 42,4	6 / 75,0	<b>0,049</b>
Recidiva da doença de base (n/%)	2 / 25	0 / 0	2 / 33,3	0,088

TFGe-CKD-EPI: taxa de filtração glomerular estimada pela equação do CKD-EPI; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina I; BRA: bloqueador de receptor da angiotensina II; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva. Análises post-hoc de Qui-quadrado: **a: p=0,02; b: p=0,0009; c: p=0,43; d: p=0,10; e: p=0,03; f: p=1,00; g: p=1,00; h: p=0,46; i: p=0,01; j: p=0,49; k: p=1,00; l: p=0,17, †: p<0,05.**

Também conduzimos análise comparativa de marcadores histológicos potenciais entre os grupos GBR, GAR e VM (**Tabela 9**). A única diferença detectada foi uma maior proporção de pacientes com proliferação de camada íntima no grupo GBR que nos grupos GAR e VM (55,2% vs 25,8% vs 25,0%, respectivamente, p=0,046).

**Tabela 9.** Achados histológicos renais em pacientes com GCI de acordo com os genótipos identificados.

	<b>GBR-APOLI</b> (n = 29)	<b>GAR-APOLI</b> (n = 33)	<b>VM</b> (n = 8)	<b>p</b>
<b>Compartimento glomerular</b>				
Hipercelularidade mesangial (n/%)	15 / 51,7	12 / 38,7	6 / 75,0	0,169
Expansão da matriz mesangial (n/%)	25 / 86,2	23 / 74,2	6 / 75,0	0,489
Glomérulos com sinéquias (%)	12 (0–34)	20 (10–30)	10 (0–26)	0,619
Glomérulos esclerosados (%)	0 (0–20,8)	5 (0–22,1)	13 (0–45)	0,669
<b>Compartimento tubulointersticial</b>				
Fibrose intersticial/Atrofia tubular (n/%)				0,145
Ausente	8 / 27,6	2 / 6,5	1 / 12,5	
<25%	19 / 65,6	17 / 54,8	4 / 50,0	
25-50%	1 / 3,4	5 / 16,1	1 / 12,5	
>50%	1 / 3,4	7 / 22,6	2 / 25,0	
Dilatação tubular microcística (n/%)	22 (75,9)	24 (77,4)	5 (62,5)	0,679
<b>Compartimento vascular</b>				
Hialinose arteriolar (n/%)	9 / 31,0	5 / 16,1	2 / 25,0	0,394
Proliferação de camada íntima (n/%)	16 / 55,2	8 / 25,8	2 / 25,0	<b>0,046</b>
Arterioloesclerose (n/%)	4 / 13,8	2 / 6,5	1 / 12,5	0,631

Avaliamos a evolução da doença renal em nossos pacientes com GCI por meio de análise multivariada usando regressão de Cox (**Tabela 10**). Pacientes com variantes mendelianas apresentaram maior risco de progressão para DRC-TRS aos 36 meses após o diagnóstico em relação aos pacientes com GAR e GBR (HR: 2,853, IC 95% 1,151–7,076, p=0,024). Embora em menor grau, este aumento de risco também foi observado quanto à evolução para DRC-TRS ao final do seguimento (HR: 2,35, IC 95% 1,018–5,447, p=0,045) (**Tabela 11**).

**Tabela 10.** Análise por regressão de Cox de fatores de risco potenciais associados à progressão para DRC-TRS até 36 meses pós-biópsia.

<b>Variable</b>	<b>HR</b>	<b>Intervalo de confiança 95%</b>		<b>p</b>
		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>	
<b>GBR-APOLI</b>	1,000			
Maior idade à biópsia renal (anos)	0,961	0,927	0,996	<b>0,029</b>
TFGe à biópsia renal (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	0,992	0,984	1,001	0,094
Inibidor de calcineurina	0,443	0,184	1,069	0,070
Qualquer remissão	0,230	0,085	0,623	<b>0,004</b>
<b>GAR-APOLI</b>	0,529	0,240	1,116	0,114
Variante mendeliana	2,853	1,151	7,076	<b>0,024</b>

GBR: genótipo de baixo risco de *APOLI*; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; GAR: genótipo de alto risco de *APOLI*; VM: variante mendeliana. Caselas depois da vírgula.

Esses dados são consistentes com a patogênese da GC em pacientes com VM, uma vez que estes indivíduos apresentam deficiência funcional de genes que codificam componentes essenciais à estrutura e/ou função dos podócitos. Outro dado interessante foi a observação de que idade mais avançada constituiu-se em fator protetor contra evolução para DRC-TRS aos 36 meses após o diagnóstico (HR: 0,961, IC 95% 0,927–0,996, p=0,029) (**Tabela 10**).

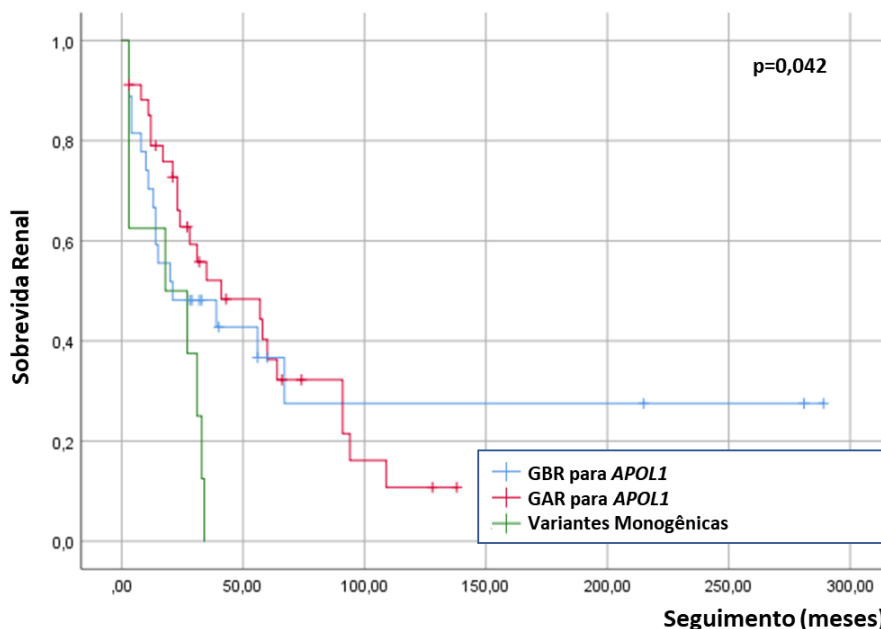
**Tabela 11.** Análise por regressão de Cox de fatores de risco potenciais associados à progressão para DRC-TRS até o final do seguimento.

Variable	HR	Intervalo de Confiança 95%		p
		Inferior	Superior	
GBR- <i>APOLI</i>	1,000			
Maior idade à biópsia renal (anos)	0,982	0,949	1,016	0,303
TFGe à biópsia renal (mL/min/1.73m <sup>2</sup> )	0,996	0,990	1,003	0,261
IECA/BRA	1,288	0,550	3,014	0,560
Qualquer remissão	0,155	0,069	0,351	< <b>0,001</b>
GAR- <i>APOLI</i>	0,591	0,302	1,157	0,125
Variante mendeliana	2,355	1,018	5,447	<b>0,045</b>

GBR: genótipo de baixo risco de *APOLI*; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; GAR: genótipo de alto risco de *APOLI*; VM: variante mendeliana; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina I; BRA: bloqueador de receptor da angiotensina II.

Conforme esperado, apresentar qualquer tipo de remissão da doença se associou a uma redução do risco de progressão para DRC-TRS aos 36 meses pós-diagnóstico (HR: 0,230, IC 95% 0,085-0,623, p=0,0004). (**Tabela 10**). Esta redução de risco também foi detectada para evolução para DRC-TRS ao final do seguimento (HR: 0,155, IC 95% 0,069–0,351, p<0.001) (**Tabela 11**).

Também avaliamos a evolução da doença ao longo do tempo por meio de análise comparativa de sobrevida renal empregando curvas de Kaplan-Meier para os grupos GBR, GAR e VM (**Figura 8**). Esta análise de sobrevida renal de acordo com o perfil genotípico mostrou-se consistente com as avaliações do risco e ampliou o entendimento do curso da função renal nos diferentes grupos. Com base nos dados obtidos até o final do seguimento, observamos diferença significativa entre as curvas de sobrevida renal (p=0,042), com os pacientes com VM apresentando progressão mais rápida para DRC-TRS.



**Figura 8.** Análise da evolução da sobrevida renal em pacientes com GCI de acordo com o perfil genotípico, realizada por meio de análise de curvas de Kaplan-Meier.

#### 4.3. Contribuição do GAR de *APOL1* para o desenvolvimento de GCI

Com o intuito de avaliar exclusivamente o efeito do genótipo de *APOL1* sobre o desenvolvimento de GCI, removendo o efeito potencialmente confundidor de variantes mendelianas sobre os resultados, realizamos uma análise comparativa em separado entre os grupos GAR e GBR. Conforme esperado, pacientes com GAR se declararam não-brancos e apresentaram história familiar de doença renal mais frequentemente que pacientes com GBR (57,6% vs 17,2%,  $p=0,002$ ; e 36,4% vs 10,3%,  $p=0,02$ , respectivamente) (**Tabela 12**). De fato, era esperado que o efeito de suscetibilidade de GAR se traduzisse em uma probabilidade aumentada de história familiar positiva para doença renal.

Pacientes com GBR, por sua vez, foram tratados mais frequentemente com ciclofosfamida e rituximabe que pacientes com GAR (20,7% vs 3,0%,  $p=0,044$ ; e 17,2% vs 0%,  $p=0,018$ ; respectivamente) (**Tabela 12**). É interessante notar que, embora faça sentido o uso mais frequente de tais imunossupressores no grupo GBR que GAR, este resultado não guarda valor interpretativo, uma vez que o uso de tais drogas constitui-se em uma decisão médica e não em um parâmetro observacional independente.

A observação de uma tendência não significativa de menor taxa de recidiva pós-transplante no grupo GAR comparado a GBR (0% vs 25%,  $p=0,121$ ; **Tabela 12**) é também consistente com a base genética da patogênese da GCI do primeiro grupo e com a associação potencial com

fator(es) circulante(s) no segundo. Contudo, não foram detectadas diferenças entre pacientes com GAR e GBR em relação a consanguinidade parental, função renal ao diagnóstico, hipertensão arterial, corticorresistência e progressão para DRC-TRS.

**Tabela 12.** Perfis clínico, laboratorial e evolutivo de pacientes com genótipos de alto e baixo risco de *APOLI*.

	<b>GAR-<i>APOLI</i></b> <b>(n = 33)</b>	<b>GBR-<i>APOLI</i></b> <b>(n = 29)</b>	<b>p</b>
Idade (anos)	23 (17–33)	25.5 (20–35.5)	0.323
Sexo masculino (n/%)	15 / 45.5	18 / 62.1	0.213
Raça autodeclarada (n/%)			<b>0,002</b>
Branca	14 / 42.4	24 / 82.8	
Não-branca	19 / 57.6	5 / 17.2	
História familiar de doença renal (n/%)	12 / 36.4	3 / 10.3	<b>0.02</b>
Consanguinidade (n/%)	2 / 6.9	1 / 3	0.595
Exames laboratoriais à biópsia renal			
Creatinina (mg/dL)	1.37 (0.87–2.31)	1.41 (1.10–2.85)	0.396
TFGe-CKD-EPI (mL/min/1,73m <sup>2</sup> )	62 (35.3–103.7)	51.9 (23.5–113.10)	0.514
Albumina sérica (g/dL)	2.10 ± 0.81	2.33 ± 0.92	0.298
Proteinúria (g/24h)	8.0 (4.51–12.7)	5.61 (4.22–9.87)	0.184
Hematúria (n/%)	11 / 36.7	16 / 55.2	0.195
Hipertensão arterial (n/%)	20 / 66.7	22 / 75.9	0.567
Tratamento (n/%)			
IECA / BRA	28 / 84.8	23 / 79.3	0.741
Corticosteroide	30 / 90.9	25 / 86.2	0.696
Inibidor de calcineurina	23 / 69.7	16 / 55.2	0.296
Ciclofosfamida	1 / 3.0	6 / 20.7	<b>0.044</b>
Micofenolato mofetil	5 / 17.2	5 / 15.2	1.000
Rituximabe	0 / 0	5 / 17.2	<b>0.018</b>
Corticorresistência (n/%)	21 / 87.5	25 / 86.2	1.000
Remissão (n/%)			
Presente	14 / 42.4	14 / 48.3	0.799
Completa	2 / 6.1	5 / 17.2	0.237
Parcial	12 / 36.4	9 / 31.0	0.789
Desfecho (n/%)			
DRC-TRS até 36 meses pós-biópsia renal	13 / 46.4	14 / 42.4	0.800
DRC-TRS até o fim do seguimento	24 / 72.7	18 / 62.1	0.423
Transplante renal (n/%)	14 / 42.4	8 / 27.6	0.290
Recidiva pós-transplante (n/%)	0 / 0	2 / 25	0.121

TFGe-CKD-EPI: taxa de filtração glomerular estimada pela equação CKD-EPI; IECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina I; BRA: bloqueador de receptor da angiotensina II; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva.

À análise histológica, observamos apenas uma tendência de maior área percentual de fibrose intersticial no grupo GAR que GBR ( $p=0,08$ ) e, curiosamente, uma menor proporção de pacientes com GAR com proliferação da camada íntima vascular (25,8% vs 55,2%,  $p=0,034$ ) (**Tabela 13**). No momento ainda não temos uma explicação para tal achado.

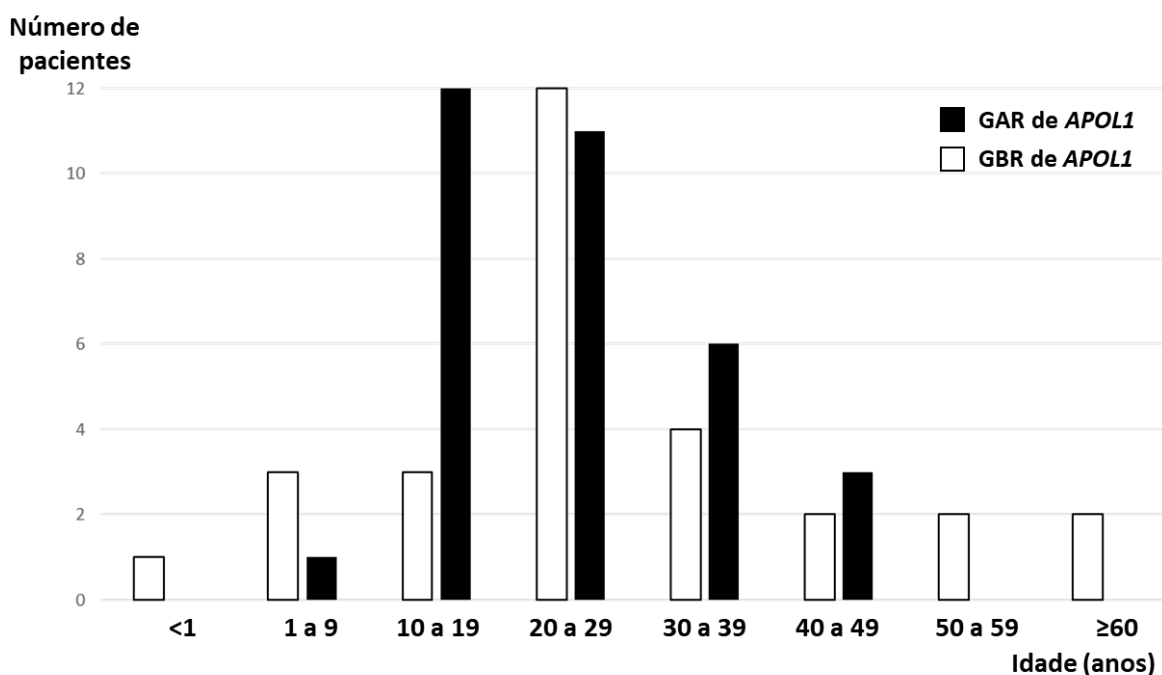
**Tabela 13.** Achados histológicos renais em pacientes com GCI de acordo com o genótipo de *APOLI*.

	<b>GAR-APOLI</b> (n = 33)	<b>GBR-APOLI</b> (n = 29)	<b>P</b>
<b>Compartimento glomerular</b>			
Hipercelularidade mesangial (n / %)	12 / 38.7	15 / 51.7	0.437
Expansão da matriz mesangial (n / %)	23 / 74.2	25 / 86.2	0.337
Glomérulos com sinéquias (%)	20 (10–30)	12 (0–34)	0.562
Glomérulos esclerosados (%)	5 (0 – 22.1)	0 (0 – 20.7)	0.596
<b>Compartimento tubulointersticial</b>			
Fibrose intersticial / Atrofia tubular			0.08
Ausente	2 / 6.5	8 / 27.6	
<25%	17 / 54.8	19 / 65.5	
25-50%	5 / 16.1	1 / 3.4	
>50%	7 / 22.6	1 / 3.4	
Dilatação tubular microcística (n / %)	22 / 66.6	22 / 75.8	0.983
<b>Compartimento vascular</b>			
Hialinose arteriolar (n / %)	5 / 16.1	9 / 31.0	0.227
Proliferação de camada íntima (n / %)	8 / 25.8	16 / 55.2	<b>0.034</b>
Arterioloesclerose (n / %)	2 / 6.5	4 / 13.8	0.417

Um dos resultados mais relevantes de nosso estudo foi a constatação de que os grupos GAR e GBR apresentam diferentes distribuições etárias para a manifestação de GCI (**Figura 9**). De fato, em pacientes com GBR a apresentação da GCI ocorreu em todas as décadas da vida até os 70 anos, embora tenha sido mais frequente até a quarta década e um pico de incidência bem definido tenha sido observado na terceira década. Por outro lado, em pacientes com GAR o diagnóstico foi firmado essencialmente da segunda à quinta década de vida. Mais especificamente, a expressão clínica da doença se deu de 9 a 44 anos, mostrando que o único caso da primeira década ocorreu em seu final e que os três casos da quinta década ocorreram em sua primeira metade. Tal observação é traduzida em uma maior probabilidade da GCI se



manifestar da 2<sup>a</sup> à metade da 5<sup>a</sup> década de vida em pacientes com GAR em comparação a pacientes com GBR [OR: 14,4, CI: 95% (1,69-122,41), p=0,003].

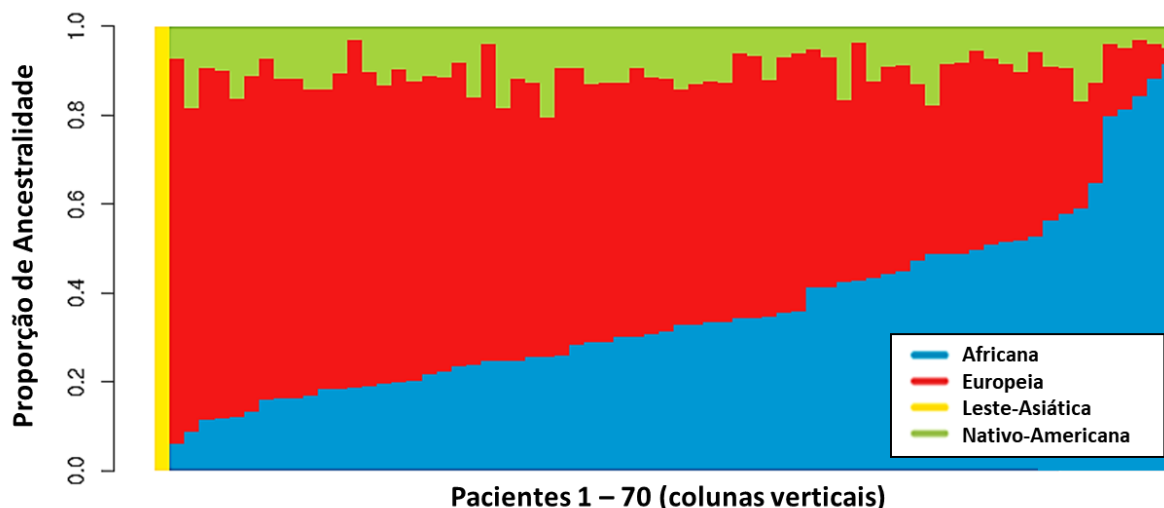


**Figura 9.** Distribuição etária da manifestação de GCI em pacientes com GAR e GBR de APOL1

#### 4.4. Efeito da miscigenação sobre a distribuição de genótipos de alto risco de APOL1 em pacientes brasileiros com GCI

Com o objetivo de compreender os efeitos da ancestralidade sobre a patogênese da GCI associada e não associada a GAR, estendemos nosso estudo à caracterização da ancestralidade de nossos pacientes. A análise realizada em nossa coorte revelou médias inferidas de 35% para ancestralidade africana, 54% europeia, 10% nativo-americana e 1% leste-asiática. Em nossa população de pacientes, contudo, a composição da ancestralidade genética variou amplamente entre os indivíduos, conforme representação expressa na **Figura 10**. Essa observação revela que a grande miscigenação presente na população brasileira também está presente no grupo específico de pacientes com GCI.

A proporção de ancestralidade genética africana na coorte de pacientes com GCI mostrou-se acima das encontradas em regiões brasileiras específicas avaliadas previamente, à exceção das identificadas em grupos remanescentes de quilombos e na cidade de Salvador (**Tabela 14**). Tais dados sugerem que o enriquecimento de ancestralidade genética africana em nossa coorte se deve à frequência elevada de indivíduos com GAR.

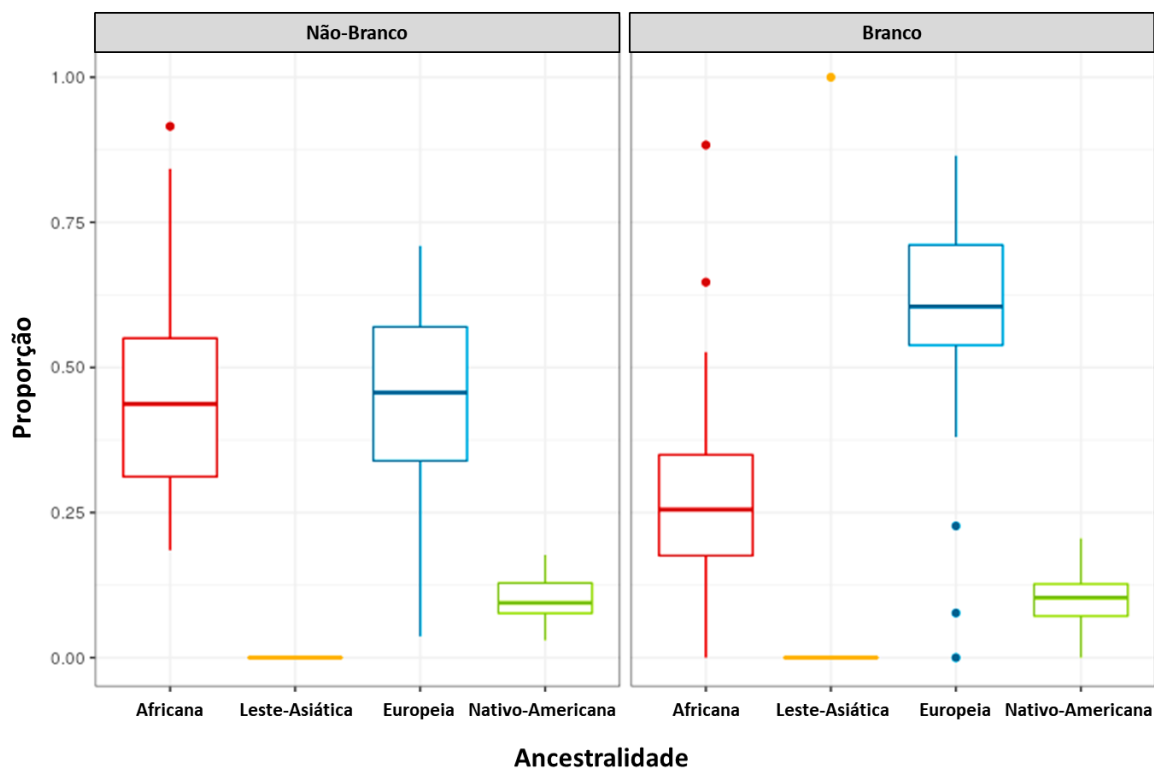


**Figura 10.** Barplot de inferência de ancestralidade genética para cada paciente de nossa coorte de GCI. Cada coluna representa um indivíduo e as cores indicam as proporções de ancestralidade africana, europeia, leste-asiática e nativo-americana, respectivamente.

**Tabela 14.** Proporções de ancestralidade genética africana, europeia, nativo-americana e leste-asiática em populações de diferentes regiões do Brasil e em nossa coorte de pacientes com GCI.

Casuística	Africana	Europeia	Nativo- Americana	Asiática	Referência
Salvador - BA	0.50	0.44	0.06	0.01	Kehdy e cols., 2015 <sup>163</sup>
Quilombos- SP	0.40	0.39	0.21	0.00	Kimura e cols., 2013 <sup>164</sup>
Quilombos- GO	0.67	0.25	0.07	0.00	Gontijo e cols., 2018 <sup>165</sup>
Bambuí - MG	0.14	0.79	0.06	0.00	Kehdy e cols., 2015 <sup>163</sup>
Pelotas - RS	0.15	0.77	0.07	0.00	Kehdy e cols., 2015 <sup>163</sup>
São Paulo -SP	0.18	0.73	0.07	0.03	Naslavsky e cols., 2020 <sup>166</sup>
Brasil	0.19	0.68	0.11	0.06	Souza e cols., 2019 <sup>167</sup>
Pacientes com GCI	0.35	0.54	0.10	0.01	Estudo atual

Nossos dados revelaram que apesar do subgrupo autodeclarado branco apresentar uma maior proporção de ancestralidade europeia que o subgrupo não-branco, a correlação entre eles foi bastante baixa ( $r^2=0,16$ ) (**Figura 11**).

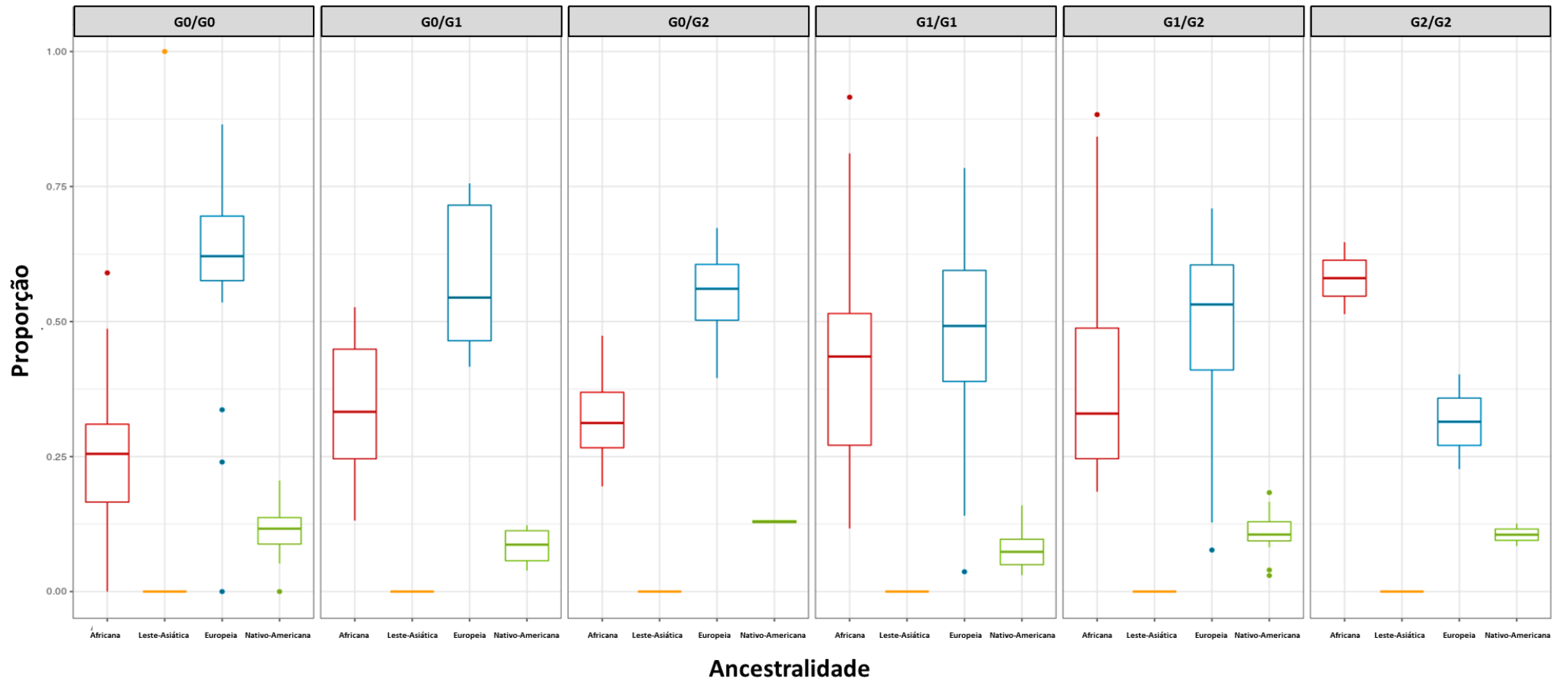


**Figura 11.** *Boxplot* comparativo das proporções de ancestralidade genética entre os grupos autodeclarados “não-branco” e “branco”.

Conforme esperado, nossos resultados mostraram que o subgrupo de pacientes com GAR apresentou maior proporção de ancestralidade africana que o subgrupo sem alelos de risco para *APOL1* (Tabela 15 e Figura 12). Comparações entre os subgrupos G1/G1 vs G0/AR (alelo de risco) e entre os subgrupos G2/G2 vs G0/AR também mostraram proporções distintas.

**Tabela 15.** Comparação das medianas de ancestralidade Africana entre os genótipos de *APOL1*.

Genótipo de <i>APOL1</i>	p
G0/G0 vs G1/G1	<0.001
G0/G0 vs G1/G2	0.018
G0/G0 vs G2/G2	0.028
G0/G1 ou G2 vs G1/G1	0.047
G0/ G1 ou G2 vs G1/G2	0,107
G0/ G1 ou G2 vs G2/G2	0.039



**Figura 12.** Boxplot comparativo das proporções de ancestralidade genética entre subgrupos com diferentes genótipos de *APOL1*.

#### 4.5. Variantes mendelianas patogênicas associam-se a GCI em pacientes adultos e pediátricos

Identificamos variantes mendelianas consideradas causativas em 8 (11,4%) dos pacientes de nossa coorte de GCI (**Tabela 16A**), 6 (75%) dos quais com manifestação da doença após os 18 anos de idade. A maioria das variantes monogênicas foram identificadas em pacientes que se autodeclararam brancos. Destes, todos que receberam tratamento com corticosteroide foram corticorresistentes (7/7) e 5 (71,4%) não apresentaram qualquer tipo de remissão com o uso de imunossupressão. Ao final do seguimento, 6 dos pacientes com variantes mendelianas (75%) haviam evoluído para DRC-TRS.

Variantes identificadas nos genes *MYH9* (*Myosin Heavy Chain 9*), *TRPC6* (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*), *COQ2* (*Parahydroxybenzoate-polyprenyltransferase*) e *PLCE-1* foram previamente associadas à GC.<sup>127,168-170</sup> Quatro das variantes mendelianas causativas identificadas são novas. Duas delas afetam o gene *COL4A5*, enquanto as outras duas foram identificadas em *COQ2* e *PLCE1*, ambas recentemente reportadas por nosso grupo na tese de doutorado de Andreia Watanabe. A análise de patogenicidade das variantes em *COQ2* e *PLCE-1* incluíram simulação de mecânica molecular, enquanto análises de segregação alélica foram realizadas para os pacientes com variantes em *COL4A5* (2 pacientes), *COQ2*, *MYH9* e *PLCE1*. As caracterizações clínico-evolutiva e genética das variantes detectadas, incluindo análises de frequência e patogenicidade, análises de segregação e informações disponíveis na literatura, encontram-se nas **Tabelas 16A e 17A**.

Assim como observado em pacientes com GESF<sup>171-173</sup>, as variantes mais frequentes foram em genes que codificam cadeias do colágeno IV (1 caso em *COL4A3* e 2 casos em *COL4A5*). Estes pacientes manifestaram a doença na 3ª década de vida e evoluíram para DRC-TRS. A paciente 1 possui uma variante em *COL4A5* [NM\_033380.3, c.4377delT:p.(Pro1460fs)], associada à mudança da fase de leitura. Esta variante não é detectada no gnomAD nem foi descrita previamente, e foi classificada como patogênica pelos critérios do ACMG (**Tabelas 16A e 17A**). Na análise de segregação, apenas a paciente e sua mãe (transplantada renal com diagnóstico de GESF) possuem a variante, não presente em suas tias, avó materna, irmãs e filha. O paciente 2 apresenta a variante c.1033-2A>G em hemizigose no gene *COL4A5*, a qual altera o sítio de *splice*. Esta variante é ausente nos bancos de dados do gnomAD, é considerada patogênica pela análise dos programas de predição de patogenicidade (Mutation Taster e Polyphen-2) e tem um ADA-score de 0,9999, que sugere altíssima probabilidade de patogenicidade. Tal variante também é classificada como patogênica de acordo com os critérios do ACMG. Não há descrição prévia desta variante em artigos que envolvam doenças associadas ao colágeno IV. Vale notar que a análise de segregação revelou que tal variante não foi detectada nos pais do paciente e em

seus irmãos, tratando-se, portanto, de uma mutação *de novo*. Sua filha, por outro lado, alberga esta variante em heterozigose. A paciente 3, por fim, apresenta duas variantes *missense* no gene *COL4A3* (NM\_000091.5) c.G1354A:p.(Gly452Arg) e c.T4421C:p.(Leu1474Pro), já reportadas anteriormente.<sup>171,174-177</sup> A primeira é ausente no banco de dados de variantes gnomAD, e classificada como patogênica pelos programas de predição de patogenicidade SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean, e como VSI pelos critérios do ACMG. A segunda apresenta frequência de 2,4% no banco gnomAD, é classificada como patogênica pelos programas de predição de patogenicidade SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean, e classificada como provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG. A análise de segregação não pôde ser realizada nesta paciente pelo fato de ser adotada e desconhecer sua família biológica.

Identificamos variantes em quatro genes previamente associados a GCI em nosso grupo de pacientes. A paciente 4 apresentou a variante c.643C>T:p.(Arg215Trp) em heterozigose em *TRPC6* (NM\_004621.6) (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6*), gene que codifica um canal de cátions não-seletivo permeável a cálcio (**Tabelas 16A e 17A**). Esta variante é descrita com frequência de 0,002% no gnomAD e já foi associada previamente à GESF,<sup>178</sup> estando atualmente classificada como patogênica pelos programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean) e provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG.

No paciente 5, encontramos a variante c.C287T:p.(Ser96Leu) em heterozigose no gene *MYH9* (NM\_002473.6) (*Myosin Heavy Chain 9*), variante ausente no banco de dados gnomAD (**Tabelas 16A e 17A**). Esta variante, já previamente associada a GESF,<sup>179,180</sup> é classificada como provavelmente patogênica pelos programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean) e patogênica pelos critérios do ACMG.

A paciente 6 apresentou a variante c.C626T:p.(Pro209Leu) em homozigose no gene *TTC21B* (NM\_024753.5) (*tetratricopeptide repeat domain 21B*), uma variante com frequência de 0,01% no banco de dados gnomAD. Esta variante é classificada como patogênica tanto pelos programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean) quanto pelos critérios do ACMG (**Tabelas 16A e 17A**) e já foi descrita em um caso de GESF<sup>181,182</sup>, porém ainda não reportada em associação com a GCI.

Identificamos variantes mendelianas em duas crianças com idade inferior a 1 ano. O paciente 7 apresentou as variantes c.424C>G:p.(Pro142Ala) e c.1147T>C:p.(Phe383Leu) no gene *COQ2* (NM\_001358921.2) (*Polyprenyltransferase*), ambas em heterozigose (**Tabelas 16A e 17A**). A primeira variante ainda não foi incluída em bancos de variantes, mas foi previamente descrita em um

paciente de casuística brasileira.<sup>183</sup> A segunda variante, por sua vez, é encontrada na frequência de 0,009% no banco de dados gnomAD e ainda não foi descrita na literatura. A análise de segregação pôde ser realizada apenas com amostras de DNA do paciente e de sua mãe. Constatamos que a mãe era heterozigota para a primeira variante e não apresentava a segunda, achado consistente com a condição de heterozigose composta do paciente. Ambas as variantes são classificadas como patogênicas pelos programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean) e como VSI pelos critérios do ACMG. Análise mecânica molecular *in silico*, realizada na tese de doutorado de Andreia Watanabe,<sup>184</sup> revelou que ambas as variantes se localizam próximas ao sítio ativo da enzima com potencial de reduzir seu volume e, conseqüentemente, sua atividade de transprenilação.

O paciente 8 apresentou a variante c.3698T>C:p.(Leu1233Pro) em homozigose no gene *PLCE1* (NM\_016341.4) (*Phospholipase C Epsilon 1*) (**Tabelas 16A e 17A**). Esta variante não se encontra presente no banco de variantes gnomAD nem é referida em artigos prévios. Sua classificação, de acordo com os programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean), é de patogênica, e de VSI pelos critérios do ACMG. Esta variante localiza-se em região altamente conservada do domínio *EF hand* e a análise de segregação confirmou que os pais carregavam tal variante em heterozigose, sugerindo consanguinidade não conhecida (descobriu-se posteriormente que os mesmos eram primos de terceiro grau). Em conjunto, e associados aos critérios ACMG relativamente robustos, esses dados sugerem que tal variante seja causativa.<sup>184</sup>

Em nossa casuística, identificamos a variante c.686G>A:p.(Arg229Gln) no gene *NPHS2* (NM\_014625.4) em três pacientes (1 e 6 - **Tabelas 14A e 15A**) e 4 (**Tabelas 14B e 15B**), sendo todos adultos.

#### **4.6. Associação de variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas com GAR-*APOLI***

Três pacientes com GAR (G1/G1) também albergavam variantes monogênicas nos genes *ITGB4* (*Integrin Subunit Beta 4*), *LAMA5* (*Laminin Subunit Alpha 5*) ou *PTPRO* (*Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O*) (**Tabelas 16B e 17B**). Dois desses pacientes apresentaram corticorresistência, os 3 apresentaram remissão parcial ou completa com o uso de inibidores de calcineurina e, ao término do seguimento, apenas 1 havia evoluído para DRC-TRS. No paciente 9, identificamos a variante em potencial sítio de *splice* c.469+5G>A no gene *ITGB4* (NM\_000213.5), em homozigose. Tal variante apresenta frequência de 0,08% no gnomAD e não foi previamente descrita.

Apresenta um ADA-score de 0,9984, o que prediz alto potencial de patogenicidade e é classificada como VSI pelos critérios do ACMG. Análise de segregação alélica não pôde ser realizada devido à não autorização do paciente. A paciente 10 apresentou as variantes c.C1421T:p.(Thr474Met) e c.A4007G:p.(His1336Arg) no gene *LAMA5*, em heterozigose composta. Tais variantes apresentam frequências de 0,03% e 0,009% no banco de dados gnomAD, respectivamente, e não foram previamente reportadas. Ambas as variantes His1336Arg e Thr474Met são classificadas como VSI pelos programas de predição de patogenicidade (SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e Provean) e pelos critérios do ACMG. Nossa análise de segregação alélica revelou que o pai da paciente era heterozigoto para a variante Thr474Met, enquanto sua mãe era heterozigota para a variante His1336Arg. Tais achados são consistentes com heterozigose composta da paciente para His1336Arg e Thr474Met. Na paciente 11, detectamos as variantes c.G2473A:p.(Val825Met) e c.A3478G:p.(Ile1160Val) em heterozigose composta no gene *PTPRO* (NM\_030667.3). A apresentação da doença renal se deu aos 17 anos de idade. As duas variantes apresentam frequência de 0,003% no gnomAD e não foram reportadas em estudos prévios. Segundo os programas de predição de patogenicidade, tais variantes são classificadas como patogênicas pelo SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster e como neutras pelo PROVEAN, sendo ambas classificadas como VSI pelos critérios do ACMG. Distintamente dos casos anteriores, apesar da remissão parcial a paciente evoluiu para DRC-TRS 11 meses após o diagnóstico histológico. Uma caracterização abrangente das variantes em *ITGB4*, *LAMA5* e *PTPRO*, incluindo frequências, análises de patogenicidade, análises de segregação e informações adicionais, é apresentada nas **Tabelas 16B e 17B**.

A explicação mais provável para o desenvolvimento de GC nestes três pacientes é que seja decorrente da patogenicidade relacionada a GAR-APOL1, entretanto no momento não podemos excluir completamente a possibilidade de papéis contributivos ou potencialmente patogênicos dessas variantes monogênicas nos fenótipos renais desses pacientes. Para afastar interferência potencial de tais VSIs nas análises realizadas para o grupo GAR, também conduzimos as análises excluindo os três casos de GAR+VSI do grupo GAR (30 pacientes).

A paciente 4 apresentou a variante c.C210G:p.(Asn70Lys) em homozigose no gene *MAGI2* (NM\_012301.4) (*membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 2*), uma variante inédita nos bancos de dados de variantes e não reportada anteriormente (**Tabelas 16B e 17B**). Tal variante é classificada como de significado incerto pelos programas de predição de patogenicidade SIFT, Polyphen-2 e Mutation Taster e neutra pelo Provean, sendo classificada como VSI pelos critérios do ACMG. Esta paciente apresentou corticorresistência, porém atingiu remissão parcial com ICN e não havia evoluído para DRC-TRS até o fim de nosso seguimento. Uma caracterização abrangente da



variante em *MAGI2* também é apresentada nas **Tabelas 16B e 17B**. Embora um possível papel causal para esta VSI não possa ser excluído, a previsão de patogenicidade baseada nos critérios de do ACMG não foi suficientemente forte para sugerir um efeito patogênico. Para também descartar uma possível influência dessa VSI nas análises feitas com o grupo GBR, excluimos esse paciente do grupo GBR (28 pacientes) quando o comparamos com o grupo GAR sem os casos GAR+VSI. Tais análises revelaram resultados semelhantes, confirmando uma maior prevalência de GAR em pacientes autodeclarados não-brancos que em brancos (53,3% vs 17,9%,  $p = 0,007$ ) e uma maior frequência de história familiar relatada de doença renal em pacientes GAR em comparação aos GBR (36,7% vs 10,6%,  $p = 0,031$ ). Ao comparar os três grupos nesse contexto, os pacientes autodeclarados não-brancos permaneceram com maior frequência de GAR (53,3% vs 17,9% em GBR vs 12,5% em VM,  $p=0,007$ ) e relataram mais frequentemente história familiar de doença renal (36,7 % vs 10,7% vs 12,5%, respectivamente;  $p=0,047$ ). Os três grupos permaneceram sem diferenças estatisticamente significantes em relação aos exames laboratoriais no momento do diagnóstico. O impacto negativo das variantes mendelianas na sobrevida renal também continuou sendo observado nas análises multivariadas através de regressão de Cox que avaliou as variáveis independentemente relacionadas à evolução para DRC-TRS em 36 meses (HR: 2,853; IC 95% 1,151–7076,  $p=0,024$ ), ao final do seguimento (HR: 2,535; IC 95% 1,081–5,994,  $p=0,032$ ) e pela análise da sobrevida renal até o fim do seguimento através da curva de Kaplan-Meier ( $p=0,042$ ).

**Tabela 16A.** Caracterização clínico-evolutiva dos pacientes com GCI que apresentaram variantes mendelianas causativas.

Paciente	Gene	Padrão de herança	Variante	Zigosidade	Idade ao diagnóstico	Raça autodeclarada	Resposta a corticosteroide	Remissão	Progressão para DRC-TRS	Tempo para DRC-TRS	Genótipo de <i>APOLI</i>
1*	<i>COL4A5</i> (NM_033380.3)	Ligada ao X	c.4359delT:p.(Pro1453fs)	Hetero	29 anos	Branca	Resistente	Parcial	Sim	34 meses	G0/G0
2	<i>COL4A5</i> (NM_033380.3)	Ligada ao X	c.1033-2A>G	Hemi	21 anos	Não-branca	Resistente	Ausente	Sim	27 meses	G0/G0
3	<i>COL4A3</i> (NM_000091.5)	AD/AR	c.T4421C:p.(Leu1474Pro) c.G1354A:p.(Gly452Arg)	Hetero Hetero	23 anos	Branca	-	-	Sim	3 meses	G0/G0
4	<i>TRPC6</i> (NM_004621.6)	AD	c.643C>T:p.(Arg215Trp)	Hetero	33 anos	Branca	Resistente	Parcial	Sim	31 meses	G0/G0
5	<i>MYH9</i> (NM_002473.6)	AD	c.287T:p.(Ser96Leu)	Hetero	19 anos	Branca	Resistente	Ausente	Sim	33 meses	G0/G0
6*	<i>TTC21B</i> (NM_024753.5)	AR	c.C626T:p.(Pro209Leu)	Homo	24 anos	Branca	Resistente	Ausente	Sim	3 meses	G0/G0
7	<i>COQ2</i> (NM_001358921.2)	AR	c.424C>G:p.(Pro142Ala) c.1147T>C:p.(Phe383Leu)	Hetero Hetero	3 meses	Branca	Resistente	Ausente	Sim	18 meses	G0/G0
8	<i>PLCE1</i> (NM_016341.4)	AR	c.3698 T>C:p.(Leu1233Pro)	Homo	5 meses	Branca	Resistente	Ausente	Sim	3 meses	G0/G0

AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; Hetero: heterozigoto; Hemi: hemizigoto; Homo: homozigoto; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva.

\*Pacientes também apresentavam a variante p.Arg229Gln no gene *NPHS2*.

**Tabela 16B.** Caracterização clínico-evolutiva dos pacientes com GCI com variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas associadas ou não a *GAR-APOLI*

Paciente	Gene	Padrão de herança	Variante	Zigosidade	Idade ao diagnóstico	Raça autodeclarada	Resposta a corticosteroide	Remissão	Progressão para DRC-TRS	Tempo para DRC-TRS	Genótipo de <i>APOLI</i>
9	<i>ITGB4</i> (NM_000213.5)	AR	c.469+5G>A	Homo	34 anos	Não-branca	Resistente	Parcial	Não	-	G1/G1
10	<i>LAMA5</i> (NM_005560.4)	AR	c.A4007G:p.(His1336Arg) c.C1421T:p.(Thr474Met)	Hetero Hetero	17 anos	Não-branca	Sensível	Completa	Não	-	G1/G1
11	<i>PTPRO</i> (NM_030667.3)	AR	c.G2473A:p.(Val825Met) c.A3478G:p.(Ile1160Val)	Hetero Hetero	26 anos	Não-branca	Resistente	Parcial	Sim	11 meses	G1/G1
12*	<i>MAGI2</i> (NM_012301.4)	AR	c.C210G:p.(Asn70Lys)	Homo	23 anos	Branca	Resistente	Parcial	Não	-	G0/G0

AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; Hetero: heterozigoto; Homo: homozigoto; DRC-TRS: doença renal crônica com necessidade de terapia renal substitutiva.

\*Pacientes também apresentavam a variante p.Arg229Gln no gene *NPHS2*.

**Tabela 17A.** Caracterização das variantes mendelianas causativas de acordo com os critérios de patogenicidade do ACMG.

Paciente	Gene	Padrão de herança	Variante	Localização Cromossômica (hg38)	Zigosidade	Análise de Segregação	Frequência no gnomAD	Crítérios de patogenicidade do para classificação de variantes (ACMG)	Classificação da variante de acordo com os critérios ACMG	Ref
1*	<i>COL4A5</i> (NM_033380.3)	Ligada ao X	c.4359delT:p.(Pro1453fs)	X:108687543	Hetero	Mãe Het / Pai neg	-	PVS1, PM2, PP4	Patogênica	Nova
2	<i>COL4A5</i> (NM_033380.3)	Ligada ao X	c.1033-2A>G	X:108586613	Hemi	<i>De novo</i> Mãe neg / Pai neg	-	PSV1, PM2, PM6, PP3	Patogênica	Nova
3	<i>COL4A3</i> (NM_000091.5)	AD/AR	c.T4421C:p.(Leu1474Pro) c.G1354A:p.(Gly452Arg)	2:227307878 2:227266455	Hetero Hetero	Não realizada	- 0,27%	PM1, PM2, PP2, PP3, PP5 PM1, PP2, PP3	Prov. Patog. VSI	174-176 171,177
4	<i>TRPC6</i> (NM_004621.6)	AD	c.643C>T:p.(Arg215Trp)	11:101504326	Hetero	Não realizada	0,002%	PM2, PM5, PP3, PP5	Prov. Patog.	178
5	<i>MYH9</i> (NM_002473.6)	AD	c.287T:p.(Ser96Leu)	22:36348950	Hetero	<i>De novo</i> Mãe neg / Pai neg	-	PM2, PM6, PP3, PP4, PP5	Prov. Patog	179,180
6*	<i>TTC21B</i> (NM_024753.5)	AR	c.C626T:p.(Pro209Leu)	2:165941111	Homo	Não realizada	0,01%	PM2, PP3, PP5	Prov. Patog	185,186
7	<i>COQ2</i> (NM_001358921.2)	AR	c.424C>G:p.(Pro142A) c.1147T>C:p.(Phe383Leu)	4:83279094 4:83264318	Hetero Hetero	Mãe Het / Pai NA Mãe Neg / Pai NA	- 0,009%	PM2, PP3, PP4 PM2, PP3, PP4	VSI VSI	183 Nova
8	<i>PLCE1</i> (NM_016341.4)	AR	c.3698 T>C:p.(Leu1233Pro)	10:94259034	Homo	Mãe Het / Pai Het	-	PM2, PP3, PP4	VSI	Nova

AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; Hetero: heterozigoto; Hemi: hemizigose; Homo: homozigoto; Prov. Patog: provavelmente patogênica, VSI: variante de significado incerto

\*Pacientes também apresentavam a variante p.Arg229Gln no gene *NPHS2*.

**Tabela 17B.** Caracterização das variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas de acordo com os critérios de patogenicidade do ACMG.

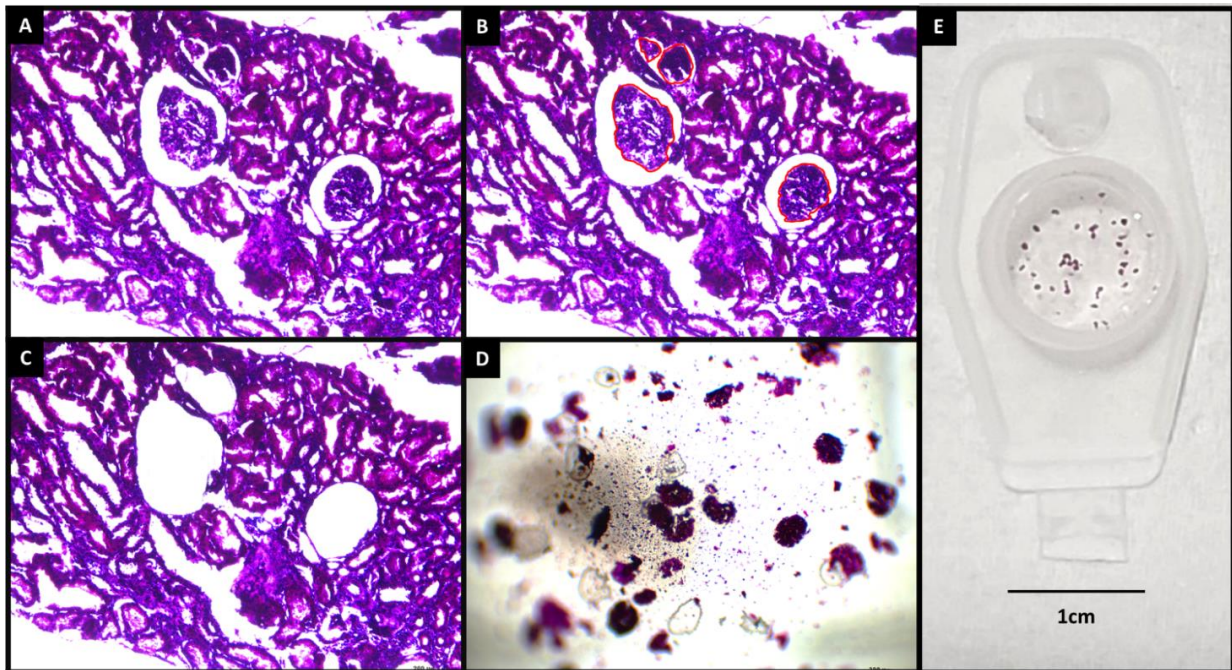
Paciente	Gene	Padrão de herança	Variante	Localização Cromossômica (hg38)	Zigosidade	Análise de Segregação	Frequência no gnomAD	Crítérios de patogenicidade do para classificação de variantes (ACMG)	Classificação da variante de acordo com os critérios ACMG	Ref
9	<i>ITGB4</i> (NM_000213.5)	AR	c.469+5G>A	17:75727860	Homo	Não realizada	0,08%	PM2, PP3	VSI	Nova
10	<i>LAMA5</i> (NM_005560.4)	AR	c.A4007G:p.(His1336Arg) c.C1421T:p.(Thr474Met)	20:62329889 20:62345874	Hetero Hetero	Mãe Neg / Pai Het Mãe Het / Pai neg	0,03% 0,009%	PM2, BP1, BP4 PM2, PP3, BP1	VSI VSI	Nova Nova
11	<i>PTPRO</i> (NM_030667.3)	AR	c.G2473A:p.(Val825Met) c.A3478G:p.(Ile1160Val)	12:15551586 12:15594952	Hetero Hetero	Mãe Het / Pai Neg Mãe Neg / Pai Het	0,003% 0,003%	PM2 PM2, PP3	VSI VSI	Nova Nova
12*	<i>MAGI2</i> (NM_012301.4)	AR	c.C210G:p.(Asn70Lys)	7:79453111	Homo	Mãe Neg / Pai Neg	-	PM2, PP3	VSI	Nova

AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; Hetero: heterozigoto; Homo: homozigoto; VSI: variante de significado incerto.

\*Pacientes também apresentavam a variante p.Arg229Gln no gene *NPHS2*.

#### 4.7 Microdissecção glomerular a laser de biópsias renais

Para conduzir as análises de proteômica, realizamos microdissecção a laser de glomérulos em biópsias renais (**Figura 14**) de três grupos de pacientes e em tecido renal controle. Este procedimento traduziu-se em quatro grupos experimentais: 1) GCI com GAR (9 casos); 2) GCI com GBR-*APOLI* (8 casos); 3) GESF-NOS com GBR-*APOLI* (5 casos); e 4) Fragmentos de áreas de rim normal provenientes de nefrectomia total por tumor (6 casos).



**Figura 14.** Etapas da Microdissecção glomerular a laser. A) Fragmento de biópsia renal com identificação de glomérulos a serem microdissecados (Hematoxilina e eosina, x100); B) Marcação da área glomerular a ser microdissecada (em vermelho, Hematoxilina e eosina, x100); C) Espaço glomerular vazio após microdissecção a laser (Hematoxilina e eosina, x100); D) Glomérulos microdissecados em suspensão no microtubo de coleta (x50); E) Aspecto macroscópico de glomérulos microdissecados a laser em tampa de microtubo.

Estudos previamente publicados com análises proteômicas de pacientes com nefropatia membranosa<sup>150,151</sup> e GESF/GC<sup>140</sup> demonstraram que amostras com área glomerular acima de 250.000  $\mu\text{m}^2$  foram suficientes para a análise proteômica por microdissecção a laser. Este valor mínimo foi atingido para todos os pacientes avaliados nos quatro grupos.

O número de glomérulos microdissecados e a área glomerular total disponível para análise proteômica em cada caso encontram-se descritos na **Tabela 18**.

**Tabela 18.** Caracterização das amostras de biópsias renais microdissecadas de acordo com o diagnóstico histológico, genótipo de *APOLI*, número e área glomerular total.

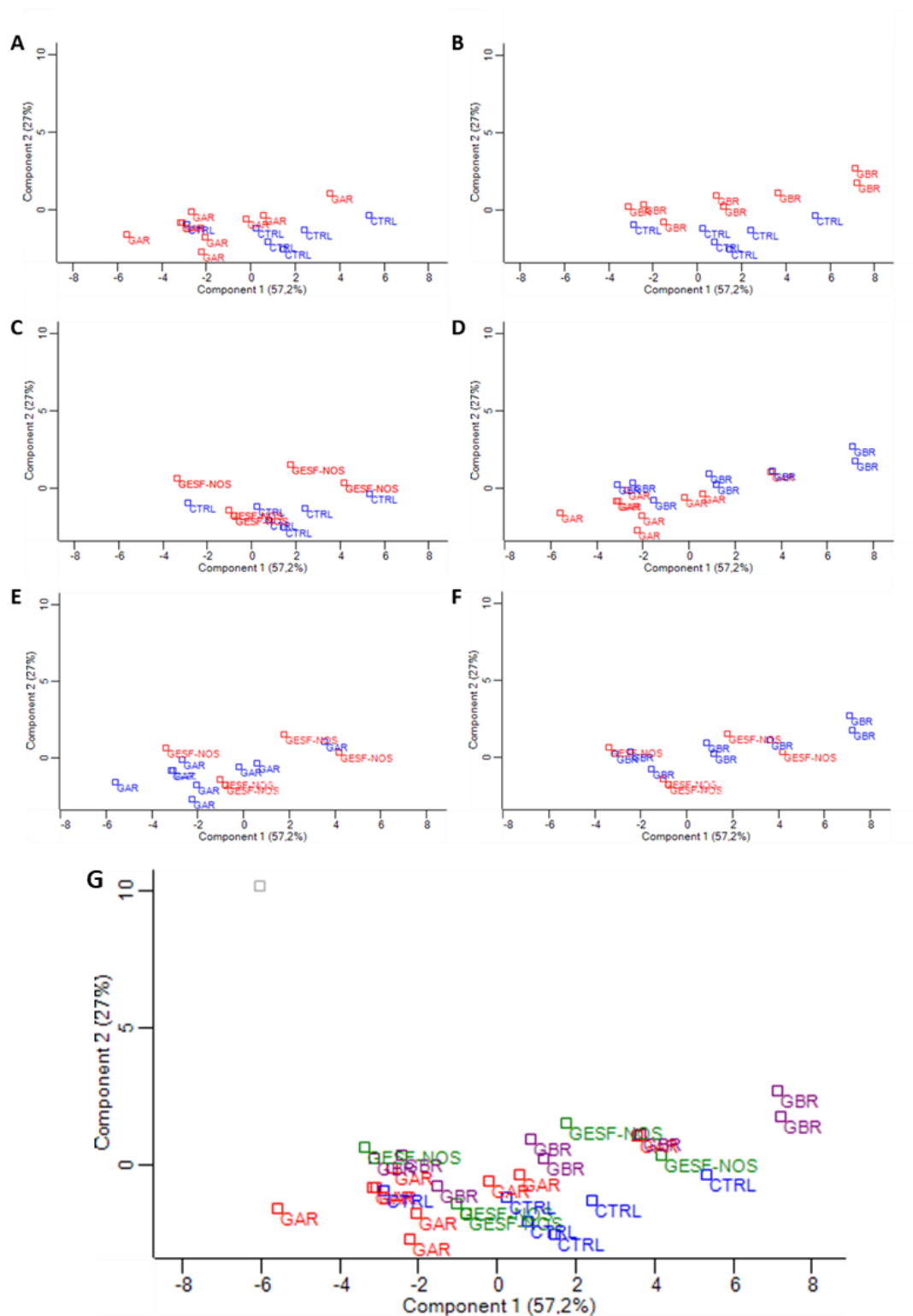
	Diagnóstico histológico	Genótipo de <i>APOLI</i>	Nº de glomérulos microdissecados	Área glomerular total ( $\mu\text{m}^2$ )
1	GCI	G1/G1	92	1.002.355
2	GCI	G1/G2	152	1.882.935
3	GCI	G2/G2	76	1.460.098
4	GCI	G1/G1	154	2.646.042
5	GCI	G1/G1	35	568.662
6	GCI	G1/G2	25	322.569
7	GCI	G1/G2	123	1.348.305
8	GCI	G1/G2	119	1.511.960
9	GCI	G1/G2	30	251.492
1	GCI	G0/G0	79	1.639.830
2	GCI	G0/G0	33	561.893
3	GCI	G0/G0	47	701.508
4	GCI	G0/G0	91	1.626.058
5	GCI	G0/G0	62	1.960.009
6	GCI	G0/G0	129	2.036.719
7	GCI	G0/G0	41	433.179
8	GCI	G0/G0	39	461.204
1	GESF-NOS	G0/G0	39	666.648
2	GESF-NOS	G0/G0	26	323.974
3	GESF-NOS	G0/G0	71	673.707
4	GESF-NOS	G0/G0	107	2.149.896
5	GESF-NOS	G0/G0	34	437.833
1	Rim Normal	N/A	106	2.233.664
2	Rim Normal	N/A	55	1.182.263
3	Rim Normal	N/A	108	2.287.684
4	Rim Normal	N/A	106	2.333.664
5	Rim Normal	N/A	111	2.485.720
6	Rim Normal	N/A	50	815.463

GCI: Glomerulopatia Colapsante Idiopática; N/A: não avaliado

#### 4.8. Caracterização das proteínas do proteoma de matriz extracelular glomerular

A análise e caracterização dos componentes proteicos da MEC glomerular foi realizada a partir de amostras de tecido renal de nove pacientes com genótipo de alto risco de *APOLI* (grupo GAR), oito pacientes com genótipo de baixo risco de *APOLI* (grupo GBR), cinco pacientes com GESF-NOS (grupo GESF-NOS) e seis amostras de tecido renal normal de indivíduos submetidos a nefrectomia total por neoplasia renal, que compuseram o grupo controle (grupo CTRL).

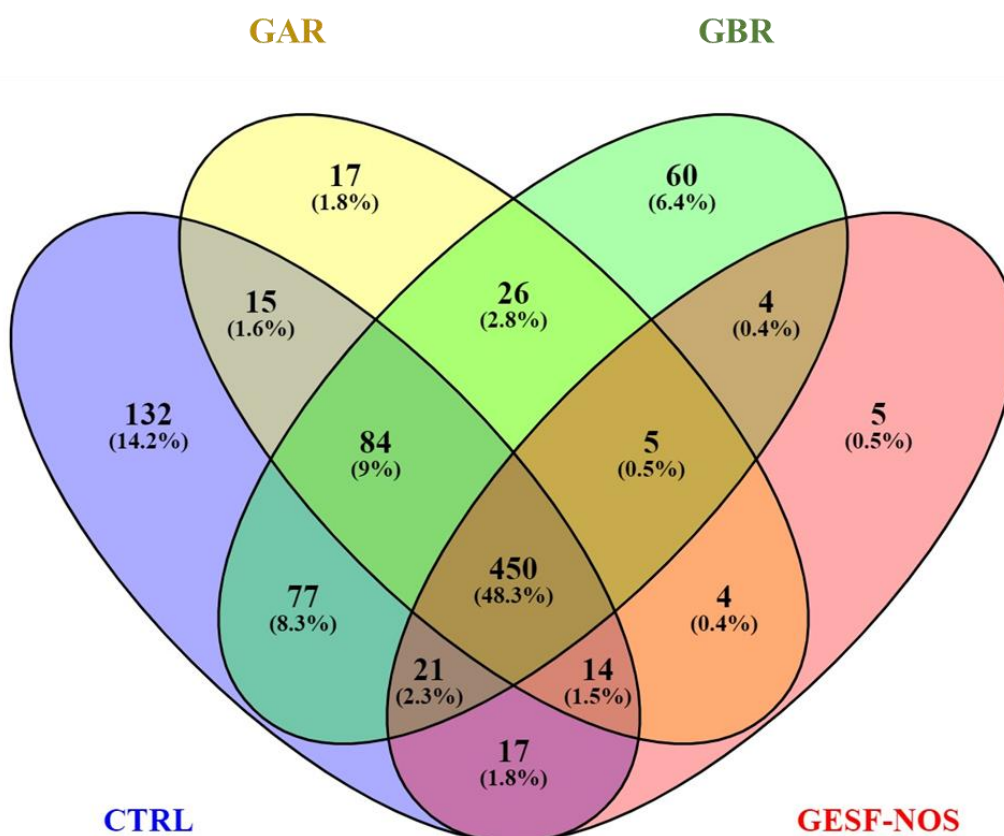
As proteínas identificadas no proteoma total da MEC glomerular em nosso estudo foram classificadas de acordo com o filtro de valores válidos de *LFQ intensity* de 60%, sendo selecionadas as proteínas presentes em no mínimo em 60% das amostras de pelo menos um grupo, ou seja, no mínimo 6 pacientes do grupo GAR, 5 pacientes do grupo GBR, 3 pacientes do grupo GESF-NOS e 4 indivíduos do grupo CTRL.



**Figura 15.** Análise de componente principal de proteínas identificadas no proteoma glomerular. A proporção da variância capturada está apresentada como percentual (PC2 e PC1).

Utilizamos dois critérios para a seleção de proteínas exclusivas: o primeiro com requisitos mais rígidos, com filtros de valores válidos de *LFQ intensity* de 100%, onde as proteínas deveriam apresentar intensidade detectável em todas as amostras de um grupo e ausência em todos os demais; e o segundo com menor rigidez, onde a proteína deveria apresentar intensidade detectável em pelo menos 60% das amostras de um grupo. Também foi realizada a análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA), com a representação dos dados multidimensionais entre os grupos (**Figura 15**).

A avaliação do proteoma de MEC do nosso estudo identificou um total de 931 proteínas presentes em pelo menos 60% das amostras de um grupo, sendo 810 proteínas no grupo CTRL, 615 no grupo GAR, 726 no grupo GBR e 520 no grupo GESF-NOS (**Figura 16**). A relação de todas as proteínas identificadas e quantificadas na avaliação total e em cada grupo de pacientes é descrita nas **Tabelas anexas 1 e 2**.



**Figura 16.** Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas detectadas na análise proteômica total e as proteínas comuns entre os grupos analisados.

Utilizando o filtro rígido de 100% de intensidade detectável, objetivando avaliar proteínas expressas em todas as amostras de determinado grupo e de forma exclusiva, identificamos apenas 2 proteínas no grupo CTRL: KIRREL-1 (*Kin of IRRE-like protein 1*) e DNHP1 (*2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1*). Ao aplicar o filtro intermediário de 60% de intensidade detectável, observamos exclusividade de 33 proteínas no grupo CTRL, 7 proteínas no grupo GAR, 11 proteínas no grupo GBR e 2 proteínas no grupo GESF-NOS (**Tabela 19**).

**Tabela 19.** Proteínas exclusivas identificadas no proteoma de cada grupo de pacientes

Grupo	Gene	Proteína (em inglês)
CTRL	<i>ADH1B</i>	Alcohol dehydrogenase 1B
	<i>AIF1L</i>	Allograft inflammatory factor 1-like
	<i>ALAD</i>	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
	<i>ANK1</i>	Ankyrin-1
	<i>BHMT2</i>	S-methylmethionine--homocysteine S-methyltransferase BHMT2
	<i>CTSG</i>	Cathepsin G
	<i>DDAH1</i>	N(G), N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
	<i>DNPH1</i>	2-deoxynucleoside 5-phosphate N-hydrolase 1
	<i>EPB41</i>	Protein 4.1
	<i>EPB42</i>	Erythrocyte membrane protein band 4.2
	<i>FABP3</i>	Fatty acid-binding protein, heart
	<i>FUS</i>	RNA-binding protein FUS
	<i>GALM</i>	Aldose 1-epimerase
	<i>GBAS</i>	Protein NipSnap homolog 2
	<i>GGACT</i>	Gamma-glutamylaminecyclotransferase
	<i>GSTM2</i>	Glutathione S-transferase Mu 2
	<i>INHBE</i>	Inhibin beta E chain
	<i>KIRREL</i>	Kin of IRRE-like protein 1
	<i>LIN7C</i>	Protein lin-7 homolog C
	<i>MRGPRF</i>	Mas-related G-protein coupled receptor member F
	<i>NAPA</i>	Alpha-soluble NSF attachment protein
	<i>NPC2</i>	Epididymal secretory protein E1
	<i>NSFL1C</i>	NSFL1 cofactor p47
	<i>PBLD</i>	Phenazine biosynthesis-like domain-containing protein
	<i>PDHA1</i>	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial
	<i>PLA2R1</i>	Secretory phospholipase A2 receptor
	<i>PRTN3</i>	Myeloblastin
	<i>QDPR</i>	Dihydropteridine reductase
	<i>S100A4</i>	Protein S100-A4
	<i>SPTA1</i>	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1
	<i>SRSF10</i>	Serine/arginine-rich splicing factor 10
	<i>STX7</i>	Syntaxin-7
	<i>TST</i>	Thiosulfate sulfurtransferase



<b>GAR</b>	<i>CIQC</i>	Complement C1q subcomponent subunit C
	<i>CFHR1</i>	Complement factor H-related protein 1
	<i>DPP4</i>	Dipeptidyl peptidase 4
	<i>GAA</i>	Lysosomal alpha-glucosidase
	<i>HRNR</i>	Hornerin
	<i>MT-CO2</i>	Cytochrome c oxidase subunit 2
	<i>RPL30</i>	60S ribosomal protein L30
<b>GBR</b>	<i>ARL6IP5</i>	PRA1 family protein 3
	<i>ATL3</i>	Atlastin-3
	<i>ENG</i>	Endoglin
	<i>FLOT2</i>	Flotillin-2
	<i>IARS</i>	Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic
	<i>KRT19</i>	Keratin, type I cytoskeletal 19
	<i>LAMA2</i>	Laminin subunit alpha-2
	<i>NDUFV1</i>	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 1, mitochondrial
	<i>PRMT1</i>	Protein arginine N-methyltransferase 1
	<i>SFXN3</i>	Sideroflexin-3
<i>SNRNP200</i>	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	
<b>GESF-NOS</b>	<i>AOC3</i>	Membrane primary amine oxidase
	<i>EHHADH</i>	Peroxisomal bifunctional enzyme

As proteínas exclusivas do grupo CTRL foram agrupadas de acordo com sua função biológica em: 1) proteínas envolvidas na manutenção estrutural podocitária; 2) proteínas de ligação da membrana basal glomerular com o citoesqueleto de actina; 3) proteínas envolvidas no *turnover* da MEC; 4) proteínas de ligação ou interferência em canais de cátions; 5) enzimas que participam do metabolismo mitocondrial e fosforilação oxidativa; 6) proteínas que atuam no tráfego intracelular de substâncias; 7) enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, proteico e glicolítico; 8) inibidores da via inflamatória NFκB; e 9) proteínas envolvidas na regulação de *splicing* de RNA.

As proteínas identificadas como exclusivas no grupo GAR incluem proteínas pertencentes ao sistema complemento (C1QC e CFHR), enzima com atuação no metabolismo lisossomal (GAA), receptores de superfície celular com ação de sinalização intracelular (DPP4), proteína que permite ligação de íons cálcio (HRNR), proteína componente da cadeia respiratória mitocondrial (MT-CO2) e uma proteína ribossomal (RPL30).

As funções atribuídas às proteínas exclusivas ao grupo GBR compreendem participação no transporte intracelular de proteínas pelas organelas (ribossomo, mitocôndria, retículo endoplasmático), adesão e migração de células nos tecidos através de interação da MEC com o citoesqueleto de actina podocitária, além de participação no complexo pré-catalítico e catalítico do spliceossoma.

Observamos exclusividade de apenas 2 proteínas no grupo GESF-NOS: AOC3 (*Membrane primary amine oxidase*), uma proteína de adesão localizada na superfície celular com função de propiciar adesão de células à MEC, principalmente células endoteliais<sup>187,188</sup>, e EHHADH (*Peroxisomal bifunctional enzyme*), uma enzima que catalisa reações de peroxidação de ácidos graxos de cadeia longa.<sup>189,190</sup>

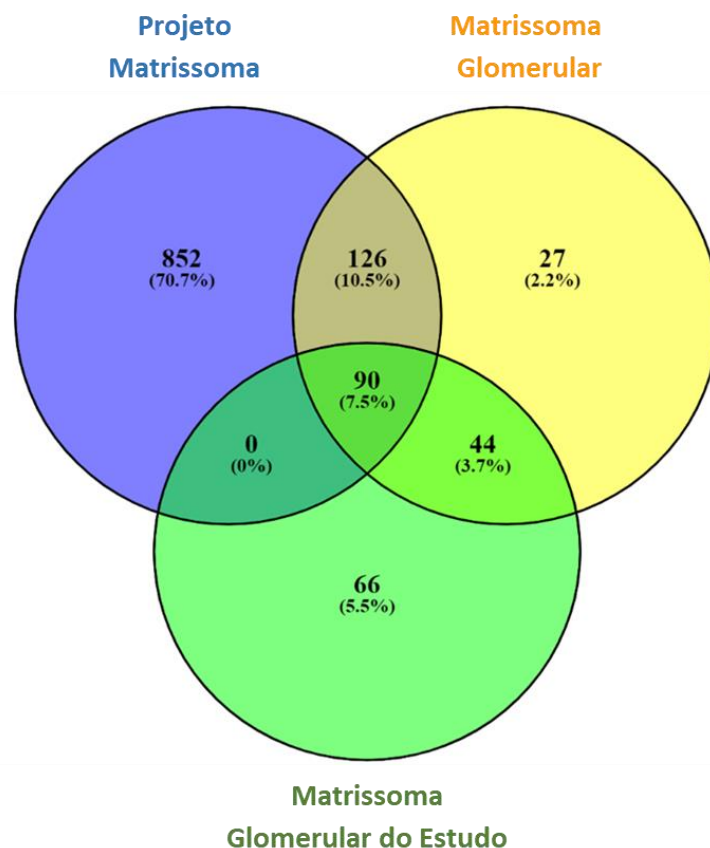
Um total de 123 proteínas apresentam diferença de abundância de deposição entre os grupos GAR e CTRL: 75 com aumento e 48 com redução de abundância no grupo GAR (**Figura anexa 2 e Tabela anexa 3**). Essa diferença foi de 155 proteínas entre o grupo GBR e o grupo CTRL: 112 com aumento e 43 com redução no grupo GBR (**Figura anexa 3 e Tabela anexa 4**); e de 5 proteínas entre os grupos GAR e GESF-NOS, com aumento de abundância no grupo GAR (**Figura anexa 4 e Tabela anexa 5**). Não foram detectadas diferenças significantes para as comparações entre os grupos GAR e GBR, CTRL e GESF-NOS, e GBR e GESF-NOS.

#### **4.9. Identificação de proteínas da MEC glomerular e construção do matrissoma do estudo**

Identificamos um total de 200 proteínas de MEC glomerular em nossa casuística (**Figura 17**). Noventa delas já foram identificadas e incluídas no projeto matrissoma, 134 foram previamente reportadas como componentes da MEC glomerular e 66 constituem proteínas candidatas para composição da MEC glomerular, ainda não reportadas (**Tabela anexa 6**).

A construção do matrissoma glomerular do estudo foi realizada a partir dos dados das classes das proteínas, função biológica e os seguintes termos ontológicos: *Collagen-containing extracellular matrix, Complex of collagen trimers, Collagen type IV trimer, Collagen network, Network-forming collagen trimer, Anchoring collagen complex, Basement membrane collagen trimer, Extracellular matrix, Extracellular space, Extracellular region, Focal adhesion, Protein complex involved in cell adhesion, Igg immunoglobulin complex*.

Muitas das proteínas candidatas identificadas e quantificadas neste estudo são componentes do sistema imune, incluindo proteínas e receptores do sistema complemento, cadeias de imunoglobulinas, proteínas que interferem na migração de macrófagos, citocinas e enzimas de degradação de componentes da MEC.



**Figura 17** - Diagrama de Venn contendo o número de proteínas de MEC glomerular identificadas neste estudo, comparado aos de proteínas anotadas no banco de dados do Projeto Matrissona e matrissona glomerular já publicados.

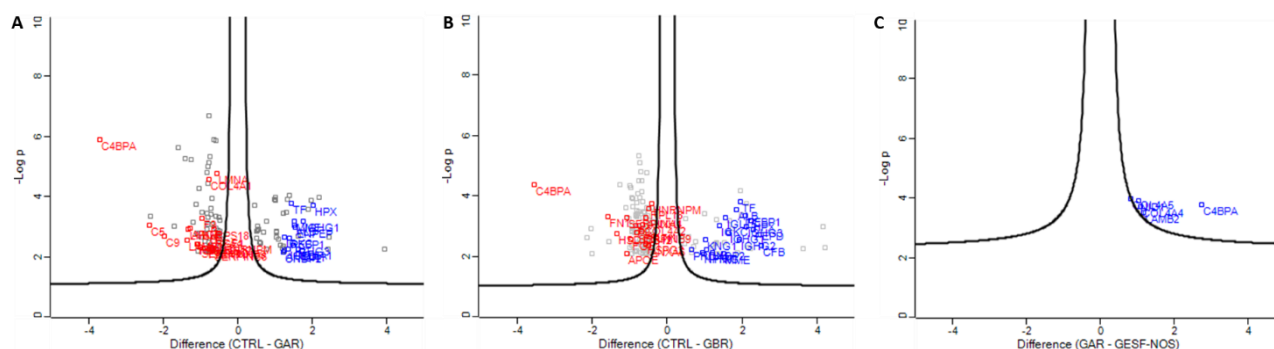
Seguindo o parâmetro intermediário de exclusividade (60%), identificamos quatro proteínas exclusivas para o grupo CTRL, quatro para o grupo GAR, 1 para o grupo GBR e nenhuma para o grupo GESF-NOS (**Tabela 20**).

**Tabela 20.** Proteínas exclusivas identificadas no matrissona glomerular de cada grupo do estudo.

Grupo	Gene	Proteína (em inglês)
CTRL	<i>CTSG</i>	Cathepsin G
	<i>INHBE</i>	Inhibin beta E chain
	<i>PRTN3</i>	Myeloblastin
	<i>S100A4</i>	Protein S100-A4
GAR	<i>CIQC</i>	Complement C1q subcomponent subunit C
	<i>CFHR1</i>	Complement factor H-related protein 1
	<i>GAA</i>	Lysosomal alpha-glucosidase
	<i>HRNR</i>	Hornerin
GBR	<i>LAMA2</i>	Laminin, alpha 2
GESF-NOS	-	-

#### 4.10. O perfil de abundância das proteínas da matriz extracelular glomerular difere entre os grupos de pacientes analisados

Com o intuito de investigar a patogênese molecular da GCI por meio da detecção de ativação ou inibição anormais de vias moleculares, investigamos comparativamente as diferenças de abundância de deposição de proteínas de MAC entre os grupos, como pode ser observado na **Figura 18**.



**Figura 18.** Volcano plot exibindo as proteínas com diferença de abundância entre os grupos. Análises realizadas através do teste t de *student* com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini-Hochberg ( $q < 0,05$ ). Eixo y representa  $-\log_{10}$  do valor de p ajustado e eixo x  $\log_2$  da diferença de abundância entre os grupos. A) Comparação entre os grupos GAR e CTRL, sendo em vermelho proteínas com aumento de abundância no grupo GAR e, em azul, proteínas com redução de abundância; B) Comparação entre os grupos GBR e CTRL, sendo em vermelho proteínas com aumento de abundância no grupo GBR e, em azul, proteínas com redução de abundância; C) Comparação entre os grupos GAR e GESF-NOS, sendo em azul, proteínas com maior abundância no grupo GAR.

Observamos diferença de abundância significativa para 31 proteínas entre os grupos GAR e CTRL: 17 com aumento e 14 com redução de abundância no grupo GAR (**Tabela 21**). Trinta e duas diferiram quanto à abundância entre os grupos GBR e CTRL: 15 com aumento e 17 com redução de abundância de abundância no grupo GBR (**Tabela 22**); e 5 proteínas diferiram entre os grupos GAR e GESF-NOS, com aumento de abundância no grupo GAR (**Tabela 23**). Não observamos diferenças significantes entre os grupos GAR *vs* GBR, CTRL *vs* GESF-NOS e GBR *vs* GESF-NOS.

**Tabela 21.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença significativa de abundância entre os grupos GAR e CTRL.

Gene	Proteína (em inglês)	Log <sub>2</sub> (GAR-CTRL)	q	Abundância relativa no grupo GAR
<i>AHSG</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	-1,576	0,046	Reduzida
<i>ALB</i>	Serum albumin	-1,262	0,016	Reduzida
<i>CNDP2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	-0,963	0,050	Reduzida
<i>CR1</i>	Complement receptor type 1	-1,775	0,047	Reduzida
<i>ENPEP</i>	Glutamyl aminopeptidase	-1,576	0,018	Reduzida
<i>FGF1</i>	Fibroblast growth factor 1	-0,382	0,025	Reduzida
<i>HPX</i>	Hemopexin	-2,089	0,006	Reduzida
<i>IGHA1</i>	Ig alpha-1 chain C region	-1,366	0,046	Reduzida
<i>IGHG1</i>	Ig gamma-1 chain C region	-1,574	0,013	Reduzida
<i>IGHG3</i>	Ig gamma-3 chain C region	-1,893	0,037	Reduzida
<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region	-1,825	0,025	Reduzida
<i>IGLL5</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	-1,702	0,046	Reduzida
<i>MME</i>	Neprilysin	-0,983	0,014	Reduzida
<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	-0,839	0,026	Reduzida
<i>TF</i>	Serotransferrin	-1,282	0,006	Reduzida
<i>ANXA4</i>	Annexin A4	0,841	0,025	Aumentada
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	1,342	0,019	Aumentada
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	3,312	0,000	Aumentada
<i>C5</i>	Complement C5	2,257	0,016	Aumentada
<i>C9</i>	Complement component C9	4,245	0,025	Aumentada
<i>COL4A1</i>	Collagen alpha-1(IV) chain	0,697	0,002	Aumentada
<i>F9</i>	Coagulation factor IX	1,469	0,012	Aumentada
<i>FN1</i>	Fibronectin	0,089	0,035	Aumentada
<i>HNRNPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	1,444	0,035	Aumentada
<i>HSD17B12</i>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	3,161	0,037	Aumentada
<i>LAMB1</i>	Laminin subunit beta-1	2,388	0,028	Aumentada
<i>RPS18</i>	40S ribosomal protein S18	0,257	0,019	Aumentada
<i>SERPINB6</i>	Serpin B6	1,710	0,046	Aumentada
<i>SERPINB9</i>	Serpin B9	0,987	0,043	Aumentada
<i>SERPINC1</i>	Antithrombin-III	0,726	0,042	Aumentada
<i>TTR</i>	Transthyretin	0,482	0,043	Aumentada

A análise da diferença de abundância de proteínas entre os grupos GAR e CTRL (**Figura 19**) revela redução de deposição de 3 proteínas (FGF1, HPX, PEBP1) e aumento de outras 11 (ANXA4, APOE, C5, C9, F9, FN1, HSD17B12, LAMB1, SERPINB6, SERPINC1 e TTR) cujas detecções e intensidades de deposição foram descritas em pacientes com GC no estudo de Merchant e cols.<sup>140</sup> Outras proteínas com perfis de abundância alterados identificadas em nossa casuística, contudo, não foram identificadas nesse estudo (AHSG, SERPINB9, C4BPA, CNDP2, CR1, ENPEP, IGHG1, IGHG3, IGLL5, MME, TF, HNRNPM, RSP18, SERPINB9).

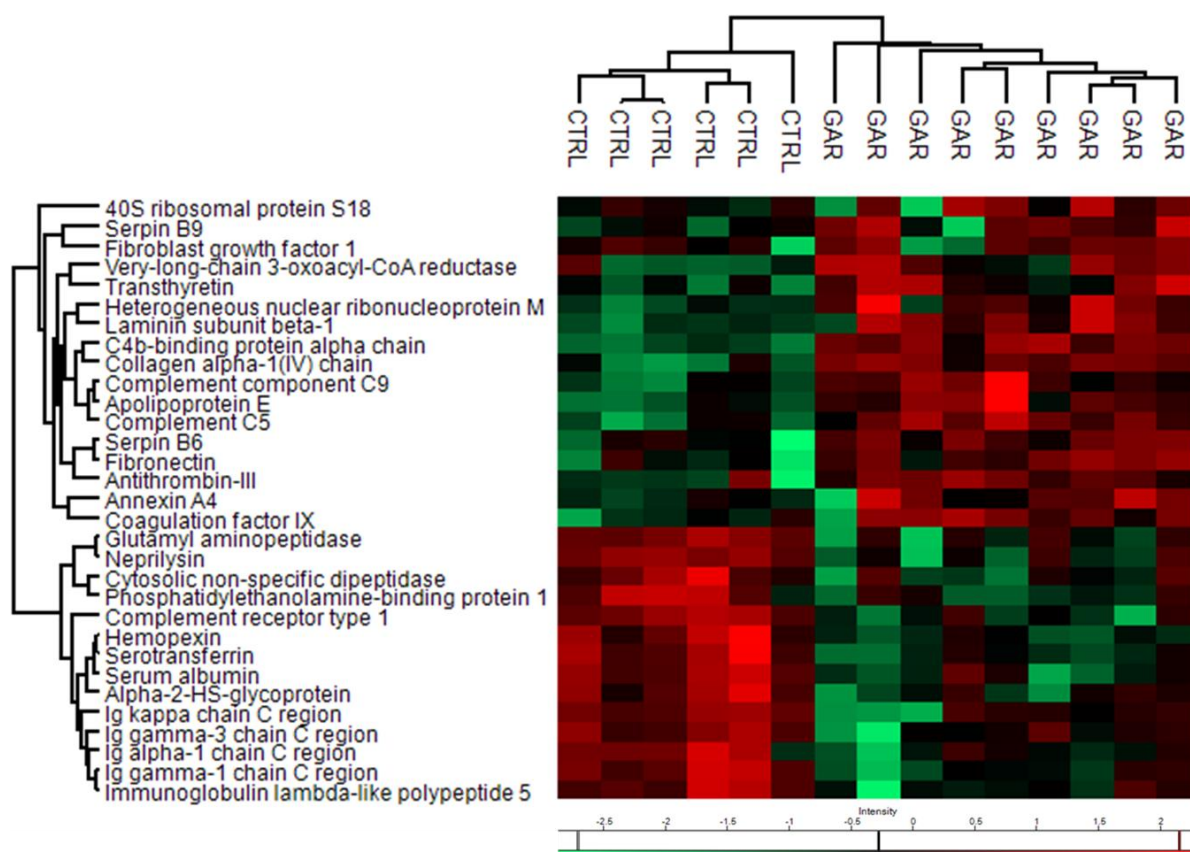
**Tabela 22.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença de abundância significativa entre os grupos GBR e CTRL.

Gene	Proteína (em inglês)	Log <sub>2</sub> (GBR-CTRL)	q	Abundância relativa no grupo GBR
<i>ALB</i>	Serum albumin	-1,593	0,009	Reduzida
<i>CFB</i>	Complement factor B	-3,106	0,036	Reduzida
<i>CNDP2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	-1,104	0,044	Reduzida
<i>FGF1</i>	Fibroblast growth factor 1	-0,073	0,026	Reduzida
<i>HPX</i>	Hemopexin	-2,219	0,012	Reduzida
<i>HRG</i>	Histidine-rich glycoprotein	-1,512	0,048	Reduzida
<i>IGHG1</i>	Ig gamma-1 chain C region	-1,415	0,019	Reduzida
<i>IGHG2</i>	Ig gamma-2 chain C region	-2,540	0,026	Reduzida
<i>IGHG3</i>	Ig gamma-3 chain C region	-2,650	0,016	Reduzida
<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region	-1,317	0,016	Reduzida
<i>IGLL5</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	-1,311	0,011	Reduzida
<i>KNG1</i>	Kininogen-1	-1,345	0,026	Reduzida
<i>MME</i>	Nepilysin	-0,825	0,049	Reduzida
<i>NPNT</i>	Nephronectin	-0,393	0,048	Reduzida
<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	-1,499	0,011	Reduzida
<i>PEPD</i>	Xaa-Pro dipeptidase	-2,537	0,018	Reduzida
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	-0,420	0,044	Reduzida
<i>TF</i>	Serotransferrin	-1,736	0,008	Reduzida
<i>ANXA4</i>	Annexin A4	0,464	0,011	Aumentada
<i>ANXA6</i>	Annexin A6	0,394	0,035	Aumentada
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	1,139	0,050	Aumentada
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	3,309	0,005	Aumentada
<i>COL4A2</i>	Collagen alpha-2(IV) chain	0,622	0,015	Aumentada
<i>F9</i>	Coagulation factor IX	0,603	0,016	Aumentada
<i>FBLN1</i>	Fibulin-1	0,507	0,019	Aumentada
<i>FN1</i>	Fibronectin	0,653	0,011	Aumentada
<i>HNRNPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,111	0,008	Aumentada
<i>HSD17B12</i>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	2,841	0,020	Aumentada
<i>HSPG2</i>	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0,484	0,031	Aumentada
<i>RPS18</i>	40S ribosomal protein S18	0,310	0,017	Aumentada
<i>SERPINB9</i>	Serpin B9	0,850	0,019	Aumentada
<i>SERPINH1</i>	Serpin H1	0,340	0,011	Aumentada

**Tabela 23.** Proteínas do matrissoma do estudo com diferença de abundância significativa entre os grupos GAR e GESF-NOS.

Gene	Proteína (em inglês)	Log <sub>2</sub> (GAR-GESF-NOS)	q	Abundância relativa no grupo GAR
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	3,878	0,032	Aumentada
<i>COL4A4</i>	Collagen alpha-4(IV) chain	1,116	0,032	Aumentada
<i>COL4A5</i>	Collagen alpha-5(IV) chain	0,803	0,032	Aumentada
<i>LAMB2</i>	Laminin subunit beta-2	1,034	0,041	Aumentada
<i>NID1</i>	Nidogen-1	0,901	0,032	Aumentada

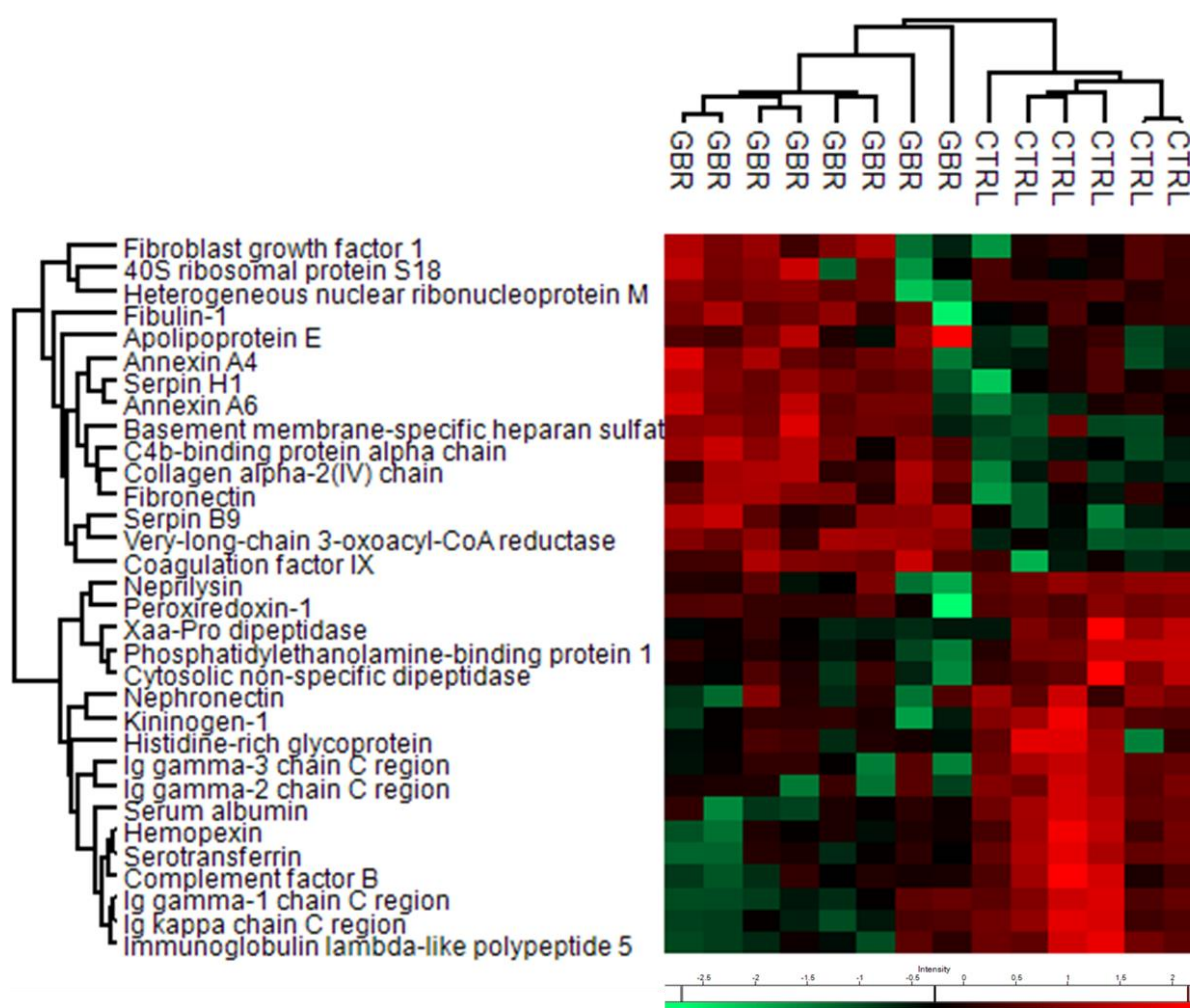
A análise integrada das proteínas com redução de abundância em GAR e suas funções biológicas (**Figura 19**) identificou um perfil que favorece vias de inflamação, ativação de células do sistema imunológico e fibrose, através de uma menor deposição de proteínas que interagem na formação e renovação da MEC (AHSG, MME), estimulam neoformação vascular (ENPEP), inibem fibrose (CNDP2, FGF1), promovem clearance imune (CR1), protegem contra o estresse oxidativo (HPX), se relacionam com processos de apoptose e ferroptose (PEBP1, HPX) e modulam e participam da quimiotaxia de linfócitos (IGHA1, IGHG1, IGHG3, IGKC, IGLL5).



**Figura 19.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e CTRL

As proteínas com abundâncias aumentadas no grupo GAR, por sua vez, compreendem proteínas do sistema complemento (C5 e C9), estimuladoras ou associadas a fibrose (APOE, TTR, HSD17B12, COL4A1), componentes da MEC (FN1, LAMB12), Ver bem estimuladoras de vias inflamatórias intracelulares (ANXA4), indutoras de descolamento de células das membranas basais (F9) e inibidoras de autofagia e apoptose (SERPINB6, SERPINB9, C4BPA, além de proteínas que estimulam a transição epitélio-mesenquimal (HNRNMPM) e que se associam a stress de retículo endoplasmático (RPS18).

O perfil de diferença de abundância de deposição de proteínas no grupo GBR em relação ao grupo CTRL (**Figura 20**) se assemelha ao padrão biológico do grupo GAR, com uma menor deposição de proteínas que interagem na formação e renovação da MEC (MME), inibem fibrose (CNDP2, FGF1), protegem contra estresse oxidativo (HPX), se relacionam com processos de apoptose e ferroptose (HPX, TF), ativam processos de autofagia (PRDX1), modulam e participam da quimiotaxia de linfócitos (IGHA1, IGHG1, IGHG3, IGKC, IGLL5, PEPD), mantêm os níveis intracelulares de cálcio (KNG1) e promovem ligação da MEC com as integrinas (NPNT).



**Figura 20.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GBR e CTRL.

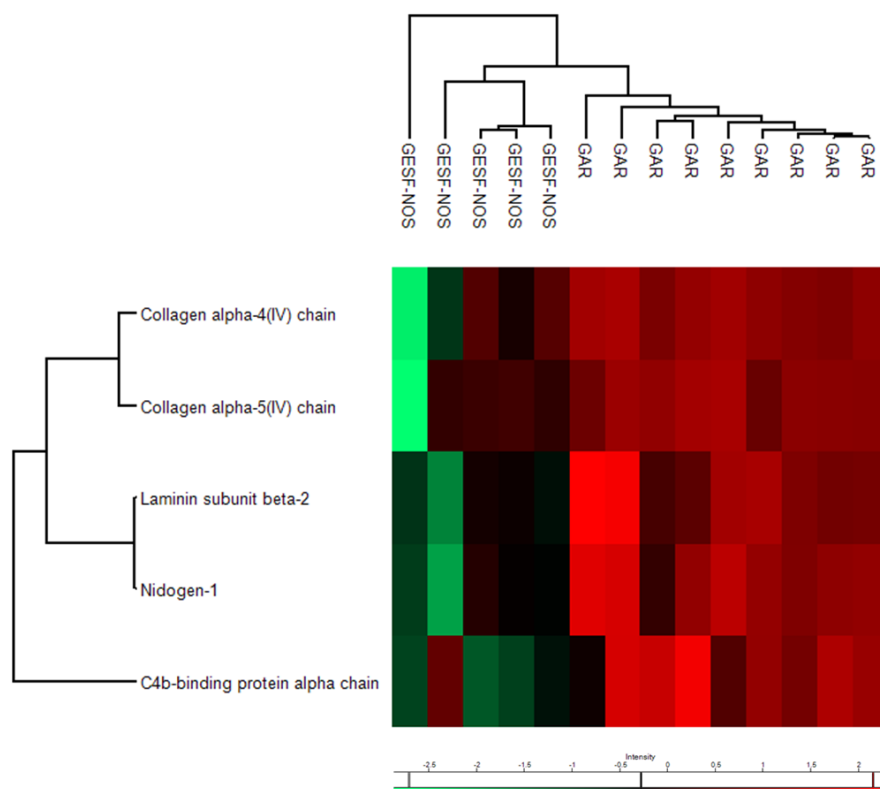
A tendência pró-inflamatória e pró-fibrótica no grupo GBR é ratificada pelo achado de aumento de abundância de deposição de proteínas estimuladoras ou associadas a fibrose (APOE, HSD17B12, COL4A2), que compõem a MEC (FN1, FBLN1), que estimulam vias inflamatórias intracelulares (ANXA4, ANXA6), que induzem descolamento de células das membranas basais



(F9) e que inibem autofagia e apoptose (SERPINB9, SERPINH1, C4BPA), além de proteínas que estimulam a transição epitélio-mesenquimal (HNRNMPM) e estão associadas a stress de retículo endoplasmático (RPS18).

Apesar de não termos identificado proteínas de matriz extracelular com abundâncias significativamente distintas entre GAR e GBR, as análises entre os grupos GAR vs CTRL e GBR vs CTRL mostraram 11 proteínas presentes em GAR e não identificadas no grupo controle, também não identificadas no grupo GBR: AHSG, CR1, ENPEP, IGHA1, C5, C9, COL4A1, LAMB1, SERPINB6, SERPINC1 e TTR. Em sentido oposto, 12 proteínas presentes no grupo GBR não identificadas no grupo CTRL, também não foram detectadas no grupo GAR: CFB, HRG, IGHG2, KNG1, NPNT, PEPD, PRDX1, ANXA6, COL4A2, FBLN1, HSPG2, SERPINH1.

A comparação entre os grupos GAR e GESF-NOS, por sua vez, revelou aumento de proteínas que compõem a MEC glomerular (COL4A4, COL4A5, LAMB2 e NID1) no grupo GAR, além de C4BPA, um receptor do sistema complemento que regula negativamente processos de autofagia, apoptose e migração linfocitária (**Figura 21**).

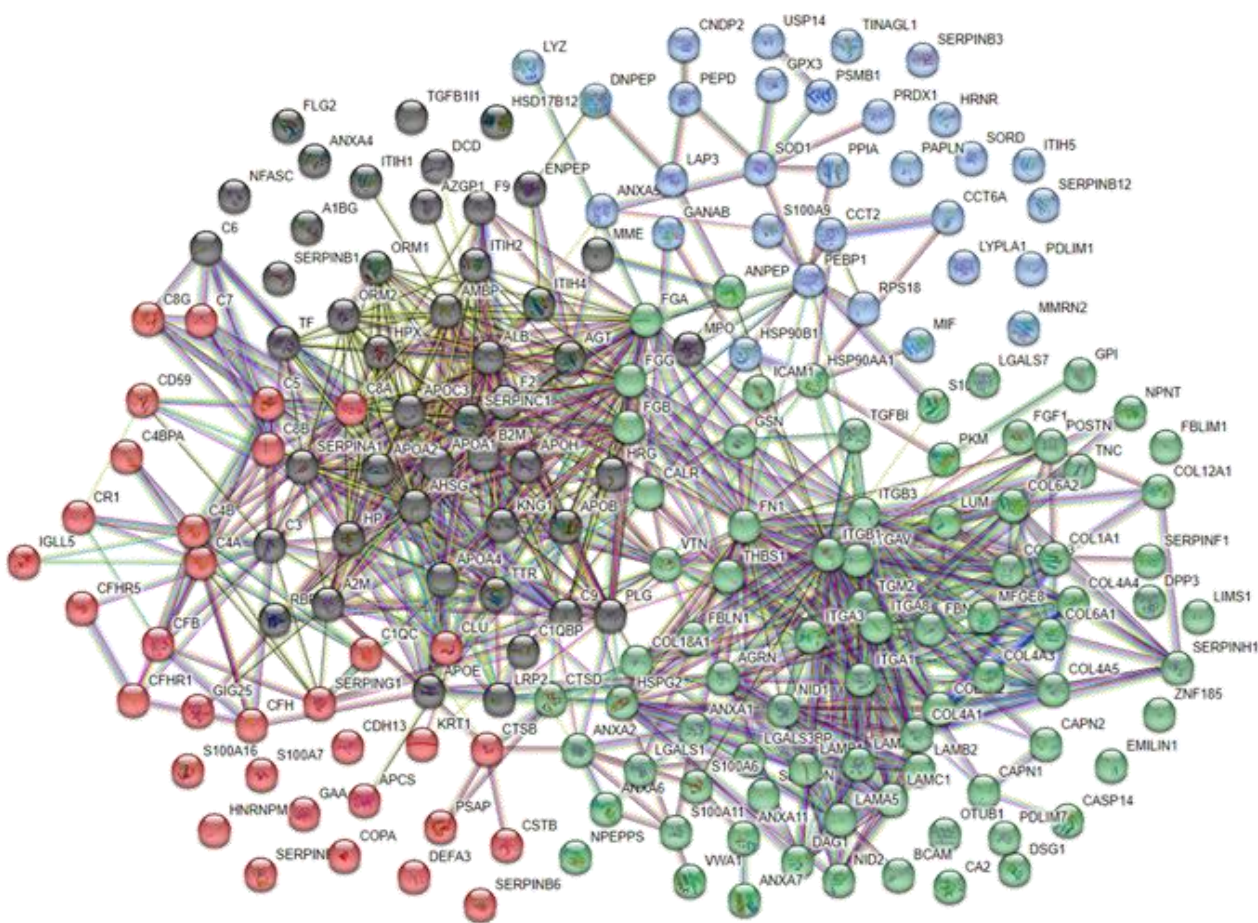


**Figura 21.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e GESF-NOS.

#### 4.10 As proteínas da matriz extracelular glomerular de pacientes com GC associada ou não a GAR e de pacientes com GESF-NOS se organizam em 4 clusters funcionais

Com o intuito de avaliar as interações proteicas conhecidas e previstas na forma de associações funcionais físicas diretas ou indiretas, as 200 proteínas do matrissoma glomerular do estudo foram submetidas a uma análise de enriquecimento através do banco de dados *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (STRING v10).<sup>160</sup>

De acordo com a interação dentro das vias biológicas, observamos a formação de 4 clusters: 1) proteínas relacionadas à ativação e modulação do sistema complemento; 2) componentes estruturais da MEC glomerular ou proteínas que interagem e/ou são envolvidas no remodelamento da MEC; 3) proteínas associadas ao estresse; e 4) proteínas relacionadas à modulação da migração de células inflamatórias, apoptose e fibrose (**Figura 22**).



**Figura 22.** Rede de interações de proteínas identificadas no matrissoma da MEC glomerular do estudo, construída por meio do STRING (v10) database, com escore de confiança alto (0.700). De acordo com a interação dentro das vias biológicas, observamos a formação de 4 clusters: em vermelho, proteínas relacionadas à ativação e modulação do sistema complemento; em verde, componentes estruturais da MEC glomerular ou proteínas que interagem e/ou são envolvidas na remodelação da mesma; em preto, proteínas associadas ao estresse; e em azul, proteínas relacionadas à modulação da migração de células inflamatórias, apoptose e fibrose.

## *Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

Poucos estudos avaliaram aspectos demográficos, laboratoriais, evolutivo e terapêuticos da GCI até o momento, apesar de sua grande relevância clínica decorrente de sua agressividade e de sua evolução para DRC-TRS frequentemente observada. Vários desses estudos avaliam informações associadas a GC a partir de coortes de pacientes com GESF, portanto analisando como um subtipo de GESF. A maior das casuísticas que avaliaram pacientes com GC, publicada pela Glomerular Disease Collaborative Network,<sup>44</sup> incluiu 61 pacientes norte-americanos com mediana de idade de 33 anos, com predomínio de mulheres (65,6%) e de negros (82,8%), e com medianas de creatinina sérica e proteinúria ao diagnóstico de 1,5 mg/dL e 12,2 g/24 h, respectivamente. Num acompanhamento de 61 meses, 47,5% desses pacientes evoluíram para DRC-TRS. Um outro estudo unicêntrico norte-americano avaliou 43 pacientes com idade mediana de 32 anos, sendo a maioria do sexo masculino (58%) e negros (61%).<sup>45</sup> Ao diagnóstico, apresentavam mediana de creatinina sérica de 4,2 mg/dL e proteinúria de grande monta (mediana de 10,2 g/24 h). Em 32 meses, 51% dos pacientes evoluíram para DRC-TRS. Outra casuística unicêntrica avaliou 42 pacientes com GC não relacionada a HIV,<sup>46</sup> com idade média de 37,8 anos, predomínio de negros (57%), mediana de creatinina sérica de 2,9 mg/dL e proteinúria maciça (mediana de 11,8 g/24 h) ao diagnóstico. Nesta casuística, contudo, observou-se predomínio do sexo feminino (55%) e sobrevida renal de 50% em apenas 18 meses de seguimento. Diante da realidade apresentada nesses estudos, concluímos que o estudo atual alberga a maior casuística de pacientes com GCI com caracterização ampla e profunda, ao incluir dados inerentes à apresentação clínica, exames complementares, resposta terapêutica e, particularmente, cuidadosa avaliação genética.

Ao analisarmos as características dos pacientes de nossa coorte, observamos que a distribuição dos gêneros foi relativamente próxima às observadas nos estudos até então disponíveis, associando-se a uma incidência da doença aproximadamente igual entre os sexos. Entretanto, ao contrário do observado nas outras casuísticas, nossa população foi constituída por pacientes majoritariamente autodeclarados brancos (64,3%). A ausência de uma maioria autodeclarada não-branca em nossa população de pacientes, na vigência de uma prevalência elevada de GAR para *APOLI*, é consistente com um elevado nível de miscigenação em nosso grupo de pacientes e, em última instância, em nossa população geral. Outro achado que chama atenção é a mediana de idade de nossos pacientes, de 23 anos. Interessantemente, ela se posiciona abaixo da mediana ou média de idade dos estudos de outros centros internacionais. Embora a alta prevalência de GAR e a prevalência significativa de formas monogênicas de GCI tenha certamente contribuído para tal observação, a mediana de idade de nossos pacientes com GBR também se posicionou abaixo dos valores encontrados nos estudos anteriores. Essa observação é fundamental, uma vez

que coloca à comunidade médico-científica uma questão muito relevante: Por que a GCI se manifesta em idades mais precoces em população brasileira mesmo em pacientes com GBR sem variantes mendelianas?

Outro aspecto relevante de nossos resultados foi a observação de níveis de creatinina sérica ao diagnóstico geralmente mais baixos que os relatados nas casuísticas internacionais disponíveis. De fato, o valor mediano em nossos pacientes foi próximo ao valor médio descrito no estudo da Glomerular Disease Collaborative Network<sup>44</sup> e substancialmente menor que os valores médio ou mediano dos dois outros estudos publicados. Na mesma linha, a mediana de proteinúria expressa por nossos pacientes mostrou-se menor que a proteinúria mediana/média dos pacientes pertencentes às outras casuísticas reportadas. O fato dos valores de creatinina sérica e proteinúria à biópsia serem próximos entre nossos pacientes com GAR, GBR e VM sugere que o nível mediano desses parâmetros não seja substancialmente afetado pela realidade genética relacionada a cada um dos três grupos de pacientes. Deve-se notar, contudo, que a sobrevida renal de 36 meses foi de 51,4% em nossos pacientes, valor intermediário entre os estudos referidos. De fato, esta taxa de sobrevida renal se aproxima em valor e tempo de seguimento ao estudo de acompanhamento por 32 meses; é próximo ao do seguimento de 18 meses – acompanhamento inferior ao nosso, sugerindo melhor prognóstico em nossos pacientes; e se aproxima do de seguimento de 61 meses – acompanhamento superior a 36 meses, sugerindo pior prognóstico em nossos casos. Tais comparações sugerem, portanto, que o prognóstico renal de nossa população com GCI não difira significativamente do de pacientes de centros estrangeiros. Nossos dados, sugerem, contudo, que o diagnóstico de GCI seja estabelecido em nossa instituição mais precocemente que na maior parte dos pacientes diagnosticados nos centros previamente mencionados.

A maioria de nossos pacientes apresentou corticorresistência e menos da metade deles cursou com algum tipo de remissão - a maior parte parcial - frente à instituição de imunossupressão. Embora a resposta à imunossupressão não seja homogênea entre os grupos de pacientes GBR, GAR e VM, o prognóstico renal mostrou-se majoritariamente ruim, associando-se a uma sobrevida renal menor que 50% em 3-5 anos. O comportamento agressivo da doença ratifica o conceito atual de que imunossupressores apresentam um efeito limitado, sem impedir a progressão da doença renal na GCI. Tal fato é ratificado pelas maiores casuísticas de pacientes com GCI, nas quais também se observa uma resposta ruim à imunossupressão. Na coorte de Valeri e cols.<sup>45</sup> 35/40 pacientes foram tratados com terapia imunossupressora. Nenhum dos pacientes em uso de corticoide isolado (26 pacientes) apresentou remissão e, quando associados outros imunossupressores, 3/9 cursaram com remissão, sendo duas parciais e uma completa. No estudo de Laurinavicius e cols.<sup>46</sup>, 37/42 pacientes foram tratados, 23 dos quais apenas com

corticosteroide. Entre estes pacientes, dois atingiram remissão completa e sete remissão parcial, enquanto os pacientes tratados com outros imunossuppressores não atingiram remissão. Em casuística de Ahuja e cols.<sup>48</sup>, todos os 30 pacientes foram tratados com imunossupressão e nenhum tipo de remissão foi atingida. Os melhores resultados em relação à imunossupressão foram obtidos por Laurin e cols.<sup>44</sup>, estudo em que 56/61 pacientes foram tratados com imunossupressão e 65,7% atingiram algum tipo de remissão. É interessante observar que dois pacientes do grupo VM apresentaram recidiva da doença pós-transplante, entretanto não se observou diferença significativa para esta complicação entre os três grupos.

A porcentagem de glomérulos com sinéquias e/ou esclerosados mostrou-se associada a pior prognóstico aos 36 meses pós-biópsia, enquanto fibrose tubulointersticial e atrofia tubular se associaram a pior prognóstico ao final do seguimento. Esses marcadores histológicos, entretanto, não são específicos, refletindo apenas o grau de cronicidade da lesão renal. Embora não tenhamos detectado associações entre elementos morfológicos específicos à GCI e prognóstico renal em nossa população com esta doença, a realização de tal análise mostrou-se fundamental, uma vez que uma avaliação sistemática ainda não havia sido feita por outros grupos. Vale mencionar, contudo, que um estudo prévio revelou uma maior frequência de dilatação tubular microcística e inclusões tubuloreticulares em pacientes com GC e HIV que em pacientes com GC sem HIV.<sup>191</sup>

Também analisamos comparativamente marcadores histológicos entre os grupos GBR, GAR e VM. A única diferença detectada foi uma maior proporção de pacientes com proliferação de camada íntima no grupo GBR que comparado aos grupos GAR e VM. A hiperplasia de camada íntima, no entanto, se associa à exposição crônica à hipertensão, não se configurando em achado específico.<sup>192-194</sup> Em algumas situações, contudo, a microscopia eletrônica (ME) pode contribuir para a especificação da causa da GC. Um exemplo clássico é a presença de alterações morfológicas mitocondriais, como aberrância de tamanho e morfologia. Tais alterações sugerem a presença de mutações em genes que participam da cadeia enzimática de produção da coenzima Q10, como *COQ2* e *COQ6*.<sup>107,195</sup> Nesse cenário, e com base em evidências provenientes de estudos com pacientes com GESF, recomenda-se avaliação de causas genéticas em GESF com síndrome nefrótica associada a desabamento difuso de pedicelos e corticorresistência; GESF sem síndrome nefrótica porém com desabamento difuso de pedicelos; e GESF com ou sem síndrome nefrótica associada a desabamento segmentar de pedicelos e sem causas secundárias identificadas.<sup>196</sup> Em nossa casuística, entretanto, poucos casos foram submetidos à análise por microscopia eletrônica. Nesse contexto, não incluímos achados de ME em nossas análises envolvendo parâmetros morfológicos. Um estudo que incluiu 90 crianças negras pertencentes à casuística da Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) com diagnóstico histológico de doença de lesões mínimas (DLM) ou GESF investigou marcadores histológicos potenciais que

pudessem distinguir pacientes com GAR de pacientes com GBR.<sup>197</sup> Em pacientes com GESF, a presença de 1 ou 2 alelos de risco de *APOLI* correlacionou-se com redução da hiperplasia mesangial, redução da condensação do citoesqueleto podocitário e aumento de dilatações microcísticas. Não foram observadas diferenças histológicas em pacientes com DLM. Em uma casuística de pacientes afro-americanos com DRC estágio  $\geq 3$ , com diagnóstico histológico de nefrosclerose hipertensiva e sem síndrome nefrótica, a presença de GAR associou-se a uma menor proporção de glomérulos escleróticos, atrofia tubular com aspecto de tireoidização e dilatação tubular microcística.<sup>198</sup> Um estudo prévio em pacientes com nefrite lúpica, por fim, detectou maior frequência de colapso de alças glomerulares em pacientes com GAR.<sup>70</sup>

Um achado interessante da nossa casuística foi que quase metade dos pacientes albergavam GAR de *APOLI*. Kopp e cols. avaliaram uma casuística multicêntrica de 138 pacientes pediátricos e adultos jovens com GESF, entre os quais 94 foram genotipados para *APOLI*.<sup>198</sup> Vinte e sete deles (28,7%) apresentavam GAR e 67 (71,3%) GBR. Em 11 (11,7%) desses pacientes o diagnóstico histológico renal foi de GC, todos com mais de 13 anos de idade. A maior parte deles (8/11 - 72,7%) apresentava GAR. Esses dados apoiam nossa observação de que GCI associada a GAR tende a se manifestar mais tarde que quando associada a GBR, uma vez que nenhum dos casos de GC desse estudo se manifestou na primeira década de vida. Vale notar que nossa observação relativa à distribuição etária da GCI pode ser explicada com base nos perfis de patogênese associados a GAR e GBR. Visto que o mecanismo de dois golpes proposto para a patogênese da lesão renal associada a GAR requer a adição de um segundo evento ao estado de suscetibilidade, é natural que a manifestação da doença aguarde um certo tempo até que esse segundo golpe venha a ocorrer, se vier a ocorrer. Além disso, dada a natureza infecciosa e/ou imunológica potencial do segundo evento, espera-se que o mesmo, se vier a acontecer, não ocorra em uma fase geriátrica, onde a resposta imunológica é sensivelmente reduzida. Por outro lado, a patogênese da GCI em pacientes com GBR pode potencialmente se associar a fator(es) circulante(s). Dada a natureza potencial dessas moléculas e a potencial menor participação do *background* genético na manifestação clínica, sua possibilidade de ocorrência em todas as fases da vida não surpreende.

A elevada prevalência relativa de GAR em pacientes com GCI autodeclarados brancos indica e é consistente com uma alta miscigenação racial na população brasileira. Este cenário nos trouxe uma questão fundamental associada à patogênese das doenças renais associadas a GAR: O efeito lesivo de GAR é modificado com a substituição parcial ou predominante do *background* genético africano pelo europeu? Vale mencionar que esta pergunta carrega várias outras questões científicas e pode ter implicações clínicas de grande monta. Nossa caracterização étnica inicial baseou-se na autodeclaração racial, traduzida na classificação dos pacientes em “brancos” e “não-brancos”. Muitos estudos clínicos se utilizam desse tipo de classificação como proxy de

ancestralidade genética. A autodeclaração racial, contudo, está longe de expressar com segurança a ancestralidade genética do indivíduo.<sup>199,200</sup>

Até o momento não há estudos que tenham avaliado variantes mendelianas especificamente associadas a GCI. Os dados atualmente disponíveis derivam de subpopulações de estudos onde GC foi classificada como um subtipo de GESF. Gribouval e cols.<sup>173</sup> descreveram os resultados de sequenciamento de exoma de 135 pacientes adultos pertencentes a uma casuística multicêntrica europeia com diagnóstico de GESF ou SNCR esporádicas. Variantes monogênicas ou GAR foram identificados em 30 (22,2%) pacientes, sendo 16 (11,8%) com variantes monogênicas e 14 (10,4%) com GAR. Nessa casuística, apenas dois pacientes tinham diagnóstico de GC. Um deles apresentava uma variante em *INF2* em heterozigose e o outro GAR. Um estudo com outra casuística norte-americana avaliou a presença de mutações em cinco genes (*NPHS2*, *TRPC6*, *ACTN4*, *INF2* e *PLCE1*) e o genótipo de *APOL1* em 65 pacientes (28 crianças e 37 adultos) com diagnóstico de GESF esporádica.<sup>201</sup> Entre tais pacientes, 15 (8 crianças e 7 adultos) tinham diagnóstico histológico de GC. Não foram identificadas variantes monogênicas em pacientes com GC e 9 dos 10 pacientes afro-americanos tinham pelo menos um alelo de risco de *APOL1*, não havendo referência sobre quantos destes albergavam GAR.

Identificamos variantes mendelianas causativas em genes que codificam cadeias do colágeno IV em três de nossos pacientes com GCI: *COL4A5* (NM\_033380.3) c.4359delT;p.Pro1453fs em hemizigose (paciente 1); *COL4A5* (NM\_033380.3) c.1033-2A>G em hemizigose (paciente 2); e *COL4A3* (NM\_000091.5) c.T4421C;p.Leu1474Pro e c.G1354A;p.Gly452Arg (paciente 3), cuja segregação familiar não foi possível de ser realizada. Recentemente, análises de exomas de pacientes adultos e pediátricos com diagnóstico de GESF de origem familiar ou corticorresistentes em casuísticas diversas identificaram que mutações em genes do colágeno IV são as mais comuns.<sup>171,172,178,202</sup> A descrição desta fenocópia em tais casuísticas não inclui casos de GCI e há descrição variável de achados de GESF à microscopia de luz e de alterações de membrana basal glomerular (típicas de síndrome de Alport) à microscopia eletrônica. O mecanismo por meio do qual variantes em genes do colágeno IV podem levar à GESF ainda não é completamente conhecido. Entretanto, postula-se que a exemplo do que ocorre com mutações em laminina, tais variantes possam se associar a alterações na seletividade/permeabilidade da membrana basal glomerular, criação de interações anormais entre a membrana basal glomerular e os podócitos, e expressão aberrante ou transporte anormal de componentes da membrana basal glomerular pelos podócitos.<sup>171,203,204</sup> Nossa casuística é pioneira na identificação de variantes em *COL4A3* e *COL4A5* em pacientes com GCI, revelando que o substrato patogênico postulado para os casos de GESF pode também ser aplicado para casos de GCI.



TRPC6 é um canal iônico que está implicado em diversas funções biológicas, entre elas crescimento celular, equilíbrio eletrolítico e transporte intracelular de cálcio. No podócito, constitui-se em um importante componente da membrana SLIT que liga os pedicelos, colocalizando-se com CD2AP, nefrina e podocina e participando de um importante complexo de sinalização celular.<sup>120,205,206</sup> Identificamos em nossa coorte uma paciente com a variante (NM\_004621.6) c.643C>T:p.Arg215Trp no gene *TRPC6*, em heterozigose. Mutações nessa proteína geralmente se associam a ganho de função e levam a aumento das concentrações de cálcio intracelular através da ativação de TRPC6 por diacilglicerol. Sua disfunção pode também potencializar a sinalização celular de cálcio mediada por angiotensina-II e interferir no processo de endocitose mediado por clatrina. A associação desses processos, por sua vez, se traduziria em perda da homeostase podocitária, induzindo apoptose.<sup>119,120,169,206</sup> Mutações em *TRPC6*, portanto, configuram causas de GESF com padrão de herança autossômica dominante, afetando principalmente adolescentes e adultos jovens,<sup>171,172,207,208</sup> além de GCI.<sup>127,209,210</sup> É interessante destacar que nossa paciente desenvolveu síndrome nefrótica com perda rápida de função renal durante a gestação, corticorresistência e resposta parcial a ICN, evoluindo para DRC-TRS.

Um de nossos pacientes apresentou a variante *MYH9* (NM\_002473.6) c.287T:p.Ser96Leu em heterozigose. Tal gene codifica a cadeia pesada IIA da miosina não-muscular (NMMHC-IIA). Mutações nesse gene associam-se a doenças de herança autossômica dominante, como a anomalia de May–Hegglin e as síndromes de Sebastian, Fechtner e Epstein.<sup>211</sup> Tais síndromes caracterizam-se pela presença de macrotrombocitopenia, associada em menor ou maior frequência a inclusões basofílicas intracitoplasmáticas nos leucócitos (corpúsculos Döhle-like), surdez, catarata e glomerulopatias. NMMHC-IIA se expressa em leucócitos, plaquetas, olhos, ouvidos e rim. Esta proteína é composta por um domínio N-terminal globular ou motor que catalisa a hidrólise do ATP e se liga à actina para gerar força e movimento, e por um domínio de cauda longa que facilita a configuração dos filamentos bipolares.<sup>180,212</sup> Essa proteína exerce um efeito importante no citoesqueleto podocitário. De fato, modelos animais *knockout* para *MYH9* específicos para podócitos desenvolveram glomeruloesclerose espontânea, com desabamento dos pedicelos e desaparecimento da membrana SLIT, acompanhados de proteinúria e insuficiência renal.<sup>213</sup> A variante identificada em nosso caso afeta a porção motora da proteína, tendo já sido relacionada a formas familiares de anomalia de Epstein e síndrome de Fechtner, com manifestação renal consistente com GESF. Vale notar que um artigo prévio associou mutação em *MYH9* e GCI.<sup>168</sup>

Um outro achado inédito de nosso estudo foi a identificação da variante *TTC21B* (NM\_024753.5) c.C626T:p.Pro209Leu em homozigose em uma de nossas pacientes. O gene *TTC21B* codifica a proteína ciliar IFT139 (*Intraflagellar transport protein 139*), um componente do complexo de

transporte intraflagelar A, necessário para o transporte retrógrado intraflagelar que ocorre no cílio primário. Até recentemente, mutações nesse gene haviam sido relacionadas a ciliopatias tanto restritas ao rim quanto com acometimento extra-renal; interessante, variantes em *TTC21B* foram mais recentemente associadas a GESF familiar.<sup>185,186,214</sup> Uma dessas variantes associadas a GESF foi a mesma que encontramos em homozigose em nossa paciente 4, p.Pro209Leu. Vale dizer que essa variante foi gerada por um efeito fundador em pacientes de origem portuguesa ou norte-africana, ambas ancestralidades com contribuição importante na formação genética da população brasileira. À semelhança de nossa paciente, os pacientes previamente reportados apresentaram síndrome nefrótica de início tardio, além de alterações tubulares tão graves quanto às descritas em casos de nefronofise. É importante notar que podócitos fetais humanos expressam IFT139 em seu citoplasma, principalmente na região basal do cílio apical primário. Em podócitos adultos, tal proteína tem sua expressão aumentada e localizada nas redes de microtúbulos e citoesqueleto. Portanto, a patogênese da GESF associada a tal variante no gene *TTC21B* se associa a distúrbios no citoesqueleto podocitário.<sup>185,186,215,216</sup> Tal caso é também a primeira descrição de uma fenocópia associada ao gene *TTC21B*, manifestando-se como GCI.

Existem pelo menos 15 genes envolvidos na biossíntese da CoQ10 e estima-se que mutações nesses genes sejam responsáveis por aproximadamente 2% dos casos de síndrome nefrótica com etiologia genética definida.<sup>217</sup> Um deles, *COQ2*, codifica uma enzima que catalisa a condensação do anel precursor na cauda poli-isoprenoide de CoQ10. Células com alta taxa metabólica e baixa atividade mitótica, como neurônios e podócitos, são mais suscetíveis à deficiência de CoQ10. Nesse cenário, a deficiência de CoQ10 secundária a mutações em *COQ2* constitui um distúrbio autossômico recessivo raro com diferentes graus de acometimento de sistema nervoso central e podócito. Variantes no gene *COQ2* já foram associadas tanto a quadros de GESF quanto GCI.<sup>107,218,219</sup> Uma vez que nosso paciente não apresentava acometimento neurológico, os achados de aberrações mitocondriais à análise de microscopia eletrônica renal foram os indicativos iniciais para investigação da causa genética. Sua avaliação genética por meio de painel customizado para doenças glomerulares revelou as variantes em *COQ2* (NM\_001358921.2) c.424C>G:p.Pro142Ala e c.1147T>C:p.Phe383Leu em heterozigose composta. Como se tratavam de duas VSIs, a confirmação de patogenicidade dessas variantes foi estendeu-se a modelagem e análise de mecânica molecular *in silico*, conforme descrição de Watanabe e cols.<sup>184</sup>

Identificamos a variante *PLCE1* (NM\_016341.4) c.3698T>C:p.Leu1233Pro em homozigose em um de nossos casos pediátricos de GCI. A proteína fosfolipase C épsilon 1, ou PLCE1, catalisa a hidrólise de fosfolipídios de membrana para gerar os segundos mensageiros inositol 1,4,5-trifosfato e diacilglicerol. Estas moléculas participam das vias intracelulares de crescimento

celular e diferenciação.<sup>220,221</sup> Apesar do papel de *PLCE1* em podócitos e a patogênese da síndrome nefrótica associada a sua perda funcional não ser completamente conhecido, sabe-se que tal proteína está envolvida na regulação de Rho GTPases e MAPKs nos podócitos, proteínas importantes na modulação da dinâmica estrutural do citoesqueleto de actina e migração celular.<sup>222</sup> Mutações em *PLCE1* já foram associadas a casos familiares e esporádicos sob a apresentação histológica de esclerose mesangial difusa (EMD) e GESF, mas não a GCI até o momento. À semelhança de nosso paciente, os casos de GESF e EMD associados a variantes em *PLCE1* apresentaram manifestação precoce, com acometimento agressivo e rápida evolução para DRC-TRS.<sup>221,223,224</sup> Curiosamente, há também descrição de progressão atípica com boa resposta a corticosteroide e inibidor de calcineurina.<sup>225,226</sup> É importante ressaltar que também nesse caso, a patogenicidade da variante foi confirmada por Watanabe e cols<sup>184</sup> por meio de modelagem e análise de mecânica molecular *in silico*.

O gene *NPHS2* codifica podocina, uma proteína importante para a manutenção da membrana SLIT. Em sua estrutura, a podocina tem o formato “*hairpin-like*” e possui extremidades intracitoplasmáticas amino e carboxi-terminais, além de domínios transmembrana, sendo expressa em rins fetais e adultos. Tal proteína tem a função de ancorar nefrina e CD2AP (proteína associada à CD2) à membrana celular do podócito, além de formar complexos homo-oligoméricos que se ligam ao colesterol em *lipid rafts*, onde pode atuar como proteína esqueleto, de sinalização ou de direcionamento. Mutações em *NPHS2* causam doenças de herança autossômica recessiva e constituem a principal causa genética de síndrome nefrótica corticorresistente e GESF na infância.<sup>227–229</sup> Casos de síndrome nefrótica com manifestação na idade adulta foram associados à presença de uma variante patogênica rara em *NPHS2* associada à variante Arg229Gln, ambas em heterozigose.<sup>230,231</sup> A variante Arg229Gln pode estar presente em até 3,7% da população, conforme relatado previamente em população europeia.<sup>231</sup> Vale notar que as variantes raras associadas a Arg229Gln nos casos mencionados se localizam nos éxons 7 e 8, levando seus produtos a exercer um efeito dominante-negativo sobre a podocina Arg229Gln. Esse efeito ocorre por alteração da oligomerização, devido a sua localização dentro ou na vizinhança dos locais de oligomerização da proteína.<sup>230,232</sup> Identificamos a variante Arg229Gln em 3 indivíduos de nossa casuística (pacientes 1, 6 e 12), entretanto os mesmos não apresentavam outras variantes em *NPHS2*. Essa observação reforça a interpretação de que Arg229Gln não desempenhou efeito patogênico nesses pacientes.

Um achado inesperado de nosso estudo foi a identificação de VSIs em *ITGB4*, *LAMA5* e *PTPRO* em três pacientes com GAR. Dada a associação previamente estabelecida entre GAR de *APOLI* e GC, a alta prevalência de GAR em nossa coorte e os critérios do ACMG insuficientes para predizer robustamente patogenicidade para essas variantes identificadas, a base molecular mais

provável para o desenvolvimento de CG nesses pacientes é o mecanismo induzido pelo GAR. No entanto, como o mecanismo fisiopatogênico mediado por GAR é baseado em susceptibilidade, o status de VSI não exclui a potencial patogenicidade de tais variantes, nos três casos as variantes obedecem a segregação mendeliana esperada e a combinação GAR-VSI foi observada em três casos, não se pode descartar completamente a possibilidade de que tais VSIs possam ter um efeito de contribuição ou um efeito patogênico na determinação do fenótipo de GC. Interessantemente, a associação variante monogênica patogênica-GAR foi previamente descrita em uma criança com síndrome nefrótica congênita com o genótipo G1/G1 e duas variantes em heterozigose composta no gene *NPHS1* (c.106delG:p.Ala36Profs\*6 e c.2728T>C:p.Ser910Pro).<sup>233</sup> Enquanto as variantes em *NPHS1* por si só podem justificar o desenvolvimento da síndrome nefrótica congênita neste caso, o status GAR pode ter contribuído para a gravidade do fenótipo. Em nossos casos, por outro lado, embora com baixa probabilidade, é possível que em um ou mais dos três pacientes as respectivas VSIs tenham desempenhado um papel patogênico direto ou funcionado como um segundo evento para a condição de GAR, desencadeando o fenótipo de GC. É importante mencionar que a exclusão desses três casos do grupo GAR nas análises não impactou as conclusões relacionadas à população de pacientes GAR.

Um desses pacientes albergava, além do GAR, a VSI (NM\_000213.5) c.469+5G>A em homozigose em *ITGB4*, gene que codifica a integrina  $\beta 4$ . A presença de uma variante *missense* em homozigose neste gene foi previamente associada a um caso de epidermólise bolhosa com atresia de piloro, aplasia cútis congênita e síndrome nefrótica congênita.<sup>234-236</sup> Postula-se que mutações em tal gene reduzam as interações célula-matriz glomerular, resultando em aumento da permeabilidade da barreira de filtração glomerular devido a adesão anormal de podócitos à membrana basal glomerular ou alteração na estrutura dos diafragmas em fenda de filtração dos pedicelos.<sup>235</sup> Diferentemente deste único caso publicado até o momento, em nosso caso a variante se localiza provavelmente em região de sítio de *splice*, o paciente manifestou a GC em idade adulta, não foi observado acometimento extra-renal e, apesar de cursar com corticorresistência, apresentou remissão parcial com o uso de ICN e não evoluiu para DRC-TRS. Em outro caso com GAR, identificamos duas variantes em heterozigose composta no gene *LAMA5* (NM\_005560.4): c.A4007G:p.His1336Arg e c.C1421T:p.Thr474Met. As lamininas são proteínas essenciais na formação da membrana basal glomerular, sendo formadas por heterotrímeros das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .<sup>177,237,238</sup> Juntamente com as integrinas, as lamininas participam do *cross-talk* entre podócitos e MBG, contribuindo para a formação e manutenção da mesma. *LAMA5* codifica a laminina  $\alpha$ -5, subtipo predominante de cadeia alfa na forma madura da MBG. Mutações nesse gene já foram associadas a casos de GESF, tanto em população pediátrica quanto em adultos.<sup>177,237,239,240</sup> A exemplo da maioria dos casos previamente descritos,<sup>177,239,240</sup> nossa paciente era corticossensível

e apresentou remissão completa com o uso de ICN, não tendo evoluído até então para DRC-TRS. O terceiro paciente com GAR e VSI possuía as variantes (NM\_030667.3) c.G2473A:p.Val825Met e c.A3478G:p.Ile1160Val, em heterozigose composta em *PTPRO*, gene que codifica o receptor tipo O da proteína tirosina fosfatase, também conhecida como proteína epitelial glomerular 1. Tal proteína se expressa na membrana apical dos pedicelos dos podócitos, participando do controle da permeabilidade paracelular, sinalização celular e remodelamento do citoesqueleto de actina.<sup>241,242</sup> A fosforilação de resíduos de tirosina da nefrina e ZO-1 por tirosina quinases altera sua associação com outras proteínas da membrana SLIT. Vale notar que mutações em *PTPRO* foram associadas a casos de GESF em casuística pediátrica. Nesses pacientes, a maior idade de manifestação do fenótipo renal foi de 14 anos.<sup>241-243</sup>

Identificamos a VSI (NM\_012301.4) c.C210G:p.Asn70Lys no gene *MAGI2* em homozigose em um de nossos pacientes com GBR. O gene *MAGI2* codifica a proteína guanilato sintase associada à membrana-2 (*membrane associated guanylate kinase 2*), a qual funciona como uma proteína *scaffold*. *MAGI2* se expressa nos pedicelos podocitários com IQGAP1 (*IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1*), CASK (*Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase*), espectrinas e alfa-actina. *MAGI2* se liga diretamente à cauda citosólica da nefrina, formando o complexo multiproteico da nefrina e contribuindo para a formação da membrana SLIT. Dessa forma, desempenha um papel importante na adesão e regulação da actina do citoesqueleto, num processo dependente de Rho-A (*Ras homolog family member A*). *MAGI2* também é alvo de WT1 (*Wilms tumor protein*), tendo sido demonstrada como essencial para o desenvolvimento do podócito em modelos de peixe paulistinha e camundongo.<sup>244-247</sup> Nesse cenário, a associação de variantes em *MAGI2* a casos esporádicos e/ou familiares de síndrome nefrótica congênita não se revelou surpreendente.<sup>245</sup> Além disso, em consistência com seu papel também importante no funcionamento neuronal, um estudo prévio associou mutações em *MAGI2* a casos de síndrome nefrótica com acometimento sindrômico neurológico.<sup>247</sup> De forma semelhante aos casos de associação de VSI com GAR, a exclusão desse paciente do grupo GBR não alterou as análises envolvendo este grupo.

Os últimos 20 anos de pesquisas na área médica foram caracterizados pelo grande desenvolvimento de técnicas voltadas à genômica, transcriptômica e proteômica. As implicações e desdobramentos dessa realidade levou ao período em que vivemos, conhecido como a era de “*big data*”.<sup>248-251</sup> A análise de tecidos saudáveis e doentes através de tais técnicas possibilitaram maior entendimento dos processos biológicos associados ao funcionamento normal, envelhecimento e adoecimento.<sup>252-254</sup> Na nefrologia, a consolidação da análise proteômica através do uso da espectrometria de massas permitiu importantes avanços no diagnóstico e terapêutica de várias condições.<sup>254-256</sup> Podemos citar como exemplo a amiloidose renal, doença

em que o uso da proteômica proporcionou a caracterização de vários outros substratos proteicos capazes de formar as fibrilas amiloidoses. Tal metodologia vem possibilitando o diagnóstico diferencial neste conjunto de enfermidades e, assim, manejo e tratamento adequados.<sup>252,257,258</sup> Ainda no campo das glomerulopatias, a associação da técnica de microdissecção glomerular a laser com a espectrometria de massas permitiu a descoberta de novas proteínas-alvo envolvidas na patogênese da nefropatia membranosa (NM),<sup>150,151,259</sup> a descoberta de proteínas-chave envolvidas na gênese da glomerulopatia fibrilar<sup>260</sup> e nefrite lúpica,<sup>261,262</sup> e a descrição de uma nova doença, a Glomerulopatia do C4<sup>263</sup>.

A matriz extracelular constitui-se no componente não-celular que forma os órgãos e tecidos, sendo responsável pela integridade estrutural e por orquestrar o tráfego extracelular de proteínas.<sup>264-267</sup> A MEC é formada por uma rede tridimensional de proteínas fibrilares e estruturais, entre as quais cerca de 300 são proteínas cerne, 200 glicoproteínas complexas, 43 proteínas subunidades de colágeno e 35 proteoglicanas. Essas proteínas fornecem suporte estrutural e participam do controle de processos homeostáticos como adesão, apoptose, proliferação, migração celular, sobrevivência e diferenciação celular.<sup>264,268</sup> Além destas, cerca de outras 700 proteínas associadas a matriz já foram identificadas, entre elas citocinas, fatores de crescimento, proteínas secretadas e proteínas que regulam a organização e remodelamento da MEC.<sup>264,268-270</sup> O matrissoma, conjunto de proteínas que compõem a MEC, consta de mais de 1000 proteínas identificadas, o que reforça a grande complexidade e dinamismo da mesma.<sup>271,272</sup> A composição da MEC pode ser distinta de acordo com o órgão e suas peculiaridades. Poucos estudos avaliaram as proteínas específicas que compõem a MEC glomerular (matrissoma glomerular).<sup>140,273-277</sup> A partir de dados compilados de seis estudos, um total de 288 proteínas já foram identificadas como constituintes do matrissoma glomerular (MG), 51 das quais consensuais entre todos esses estudos.<sup>140,251,272-274,276,277</sup>

Ao analisar as proteínas de MEC glomerular expressas de maneira específica nos grupos de pacientes GAR, GBR, GESF-NOS e CTRL, observamos exclusividade de expressão de duas no grupo CTRL: KIRREL-1 (*Kin of IRRE-like protein 1*) e a DNPH1 (*2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1*). KIRREL-1 é uma molécula de adesão celular da superfamília das imunoglobulinas semelhante à nefrina, que atua como mediadora nos processos de sinalização intracelular envolvidos com a reorganização do citoesqueleto de actina. Vale notar que a mesma também desempenha um papel importante na organização e na integridade da membrana SLIT.<sup>278,279</sup> Em situações de lesão glomerular, KIRREL-1 e nefrina desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular nos podócitos que culmina no apagamento dos pedicelos e, conseqüentemente, proteinúria.<sup>280-282</sup> Duas famílias com SNCR e variantes *missense* em homozigose no gene *KIRRELI* foram previamente reportadas. A patogenicidade dessas variantes

foi confirmada por meio de estudos com cultura de podócitos geneticamente modificados.<sup>282</sup> DNPH1 é uma enzima que atua na hidrólise de monofosfatos de desoxirribonucleosídeos.<sup>283</sup> No rim, se expressa mais intensamente em túbulos e, em intensidade baixa/moderada, no capilar glomerular. Sua localização é nuclear e nas membranas celulares.<sup>284</sup> Variantes no gene *DNPH1* já foram identificadas em casos familiares de doenças inflamatórias intestinais.<sup>285</sup>

As 33 proteínas exclusivas ao grupo CTRL, identificadas aplicando uma taxa de detecção mínima de 60% das amostras, podem ser agrupadas de acordo com sua função biológica em: 1) proteínas envolvidas na manutenção estrutural podocitária; 2) proteínas de ligação da membrana basal glomerular com o citoesqueleto de actina; 3) proteínas envolvidas no *turnover* da MEC; 4) proteínas de ligação ou interferência em canais de cátions; 5) enzimas que participam do metabolismo mitocondrial e fosforilação oxidativa; 6) proteínas que atuam no tráfego intracelular de substâncias; 7) enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, proteico e glicolítico; 8) inibidores da via inflamatória NFκB; e 9) proteínas envolvidas na regulação de *splicing* de RNA. É importante notar que a não-detecção de tais proteínas nos grupos com GCI (GAR ou GBR) e GESF-NOS levantam a possibilidade de distúrbios nessas vias em tais podocitopatias. Alterações em várias dessas vias já foram descritas associadas a tais condições, inclusive associadas a nefropatias associadas a *APOLI*.<sup>94-98,286,287</sup>

Quando comparamos o perfil de proteínas glomerulares exclusivas entre os grupos GBR e GAR, identificamos como principal diferença a presença de proteínas do sistema complemento em GAR, ausentes em GBR. É importante realçar que o papel do sistema complemento na patogênese das glomerulopatias vem ganhando destaque com os estudos baseados em proteômica e transcriptômica, inclusive com evidências da participação do sistema complemento em funções regulatórias de ligação na MEC.<sup>288-292</sup> Além disso, é interessante observar que as outras proteínas identificadas como exclusivas em GAR pertencem a vias que já foram associadas à patogênese da nefropatia associada a GAR de *APOLI*, como atuação no metabolismo mitocondrial, processos de sinalização intracelular, ligação a cátions, atuação em lisossomo e interferência no metabolismo proteico.<sup>94-98,286</sup> Observamos também que as proteínas exclusivas de GBR atuam em vias e organelas intracelulares semelhantes às associadas às proteínas não componentes do sistema complemento exclusivas de GAR.<sup>94-98,286</sup> No grupo GESF-NOS observamos exclusividade de apenas 2 proteínas: AOC3 (*Membrane primary amine oxidase*), uma proteína de adesão localizada na superfície celular que propicia a adesão de células à MEC, principalmente células endoteliais<sup>187,188</sup>, e EHHADH (*Peroxisomal bifunctional enzyme*), uma enzima que catalisa reações de peroxidação de ácidos graxos de cadeia longa.<sup>189,190</sup>

A análise de proteínas componentes do matrissoma glomerular de nosso estudo permitiu identificar catepsina G, cadeia beta da inibina E, mieloblastina e proteína ligadora de cálcio S100A4 como proteínas exclusivas do grupo CRTL. A CTSG (*Cathepsin G*) é uma serinoprotease da família das peptidases S1 encontrada em grânulos azurófilos de neutrófilos e polimorfonucleares. Tal proteína se liga de forma reversível a linfócitos T e linfócitos B, estimulando sua ativação, e às células *natural killer*, aumentando sua citotoxicidade e atividade proteolítica. Catepsina G possui outras atividades associadas ao sistema imunológico, como clivagem de componentes do sistema complemento e modulação de citocinas.<sup>293-296</sup> Tal enzima também participa de processos de remodelação da matriz extracelular em situações de inflamação, podendo inclusive alcançar a matriz subendotelial. Neste contexto, causa lesão endotelial ao separar o inibidor da ativação da plasmina-1 de sua superfície, aumentando o risco de eventos trombotogênicos pela ativação plaquetária. Participa ainda da via de ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, por meio da produção de angiotensina-II em neutrófilos, mediando reações inflamatórias.<sup>297,298</sup> No rim, já foi descrito papel potencial da catepsina G na perpetuação de lesões por isquemia e reperfusão,<sup>299</sup> potencializando a produção de angiotensina-II e, com isso, a disfunção renal em modelo experimental de sepse em camundongos.<sup>297</sup> Em contraste, catepsina G tem um efeito potencial renoprotetor por clivar o Fator de von-Willebrand e, assim, reduzir a produção de microtrombos em capilares glomerulares.<sup>300</sup>

A INHBE (*Inhibin beta E chain*) constitui-se em um membro da superfamília de proteínas TGF-Beta (*transforming growth factor-beta*). As inibinas estão envolvidas em uma série de processos celulares, entre eles resposta imunológica, secreção hormonal e proliferação.<sup>301-303</sup> Frente a situações de estresse de retículo endoplasmático, há aumento dos níveis dessa proteína, que age inibindo a proliferação celular.<sup>303</sup> Postula-se que, apesar de ser uma proteína de produção e secreção predominantemente hepática, tal proteína possa exercer funções à distância. Esse efeito, possivelmente deletério, já foi descrito no pâncreas, uma vez que portadores de variantes associadas a perda de função do gene *INHBE* possuem menor risco de diabetes e menor proporção de obesidade abdominal.<sup>304,305</sup> No nível renal, sua expressão em carcinoma papilar de células renais associou-se a pior prognóstico.<sup>306</sup> Não há descrição sobre seu papel potencial no nível glomerular.

A *PRTN3* (*Myeloblastin or Proteinase 3*), é uma serinoprotease também produzida por neutrófilos, capaz de degradar proteínas de matriz extracelular como colágenos I, III e IV, laminina, vitronectina e fibronectina, além de desempenhar um papel importante na migração transepitelial de neutrófilos.<sup>307-309</sup> Um estudo prévio revelou que a repressão da expressão de *PRTN3* através de clivagem proteolítica de histona H3 facilitou a diferenciação de monócitos em macrófagos.<sup>310</sup> Variantes em *PRTN3* se associam a vasculites ANCA-relacionadas devido a uma



maior expressão de tais proteínas em neutrófilos.<sup>308</sup> Uma maior expressão de PRTN3 também foi associada a pior prognóstico em pacientes com câncer de pâncreas e carcinoma de células renais.<sup>311,312</sup>

A S100A4 (*Protein S100-A4*) é um membro da família de proteínas de ligação ao cálcio que age associando-se a outras proteínas-alvo. Possui papel importante na transformação de células epiteliais em fibroblastos, participa de processos de diferenciação e crescimento celular e media a interação da membrana celular com o citoesqueleto e rearranjos de actina.<sup>313-315</sup> Recentemente, descobriu-se sua íntima relação com processos de fibrose, através da ativação da via TGF-Beta1/Smad3 de fibroblastos em tecidos como coração e rim.<sup>316,317</sup> Estudos com modelos experimentais de nefropatia por adriamicina mostraram que uma maior expressão de S100A4 acompanhava-se de níveis maiores de proteinúria e glomeruloesclerose, sendo este efeito atenuado em modelo *knockout* para essa proteína.<sup>318</sup> Resultados semelhantes foram detectados em pacientes com GESF,<sup>319</sup> levantando a possibilidade de se tornar um alvo terapêutico para a doença, uma vez que a inibição farmacológica de tal proteína associou-se a atenuação da ativação de fibroblastos e redução da fibrose renal em culturas celulares e modelo de nefropatia por ácido fólico.<sup>317</sup>

A análise das proteínas detectadas de forma exclusiva no grupo CTRL sugere que as mesmas apresentem interface com o sistema imunológico, por meio de atividades inflamatórias e/ou pró-fibróticas. As ações dessas proteínas no glomérulo, contudo, ainda não são conhecidas nem dispomos atualmente de informações que nos permitam interpretar sua deposição exclusiva no glomérulo normal. Estudos posteriores serão necessários para elucidar esse achado.

As proteínas exclusivas identificadas no grupo GAR incluíram a subunidade C do subcomponente C1q do complemento, proteína relacionada ao fator H-1, alfa-glicosidase ácida e hornerina. A C1QC (*Complement C1q subcomponent subunit C*) é uma proteína da via clássica do sistema complemento que faz ponte com a imunidade inata através de sua associação a IgM e IgG.<sup>290,320</sup> A deficiência de C1qC por alterações genéticas no gene *C1QC* já foi associada a quadros de lúpus precoce e outras glomerulopatias.<sup>321-323</sup> Um estudo muito interessante observou que em biópsias renais de pacientes com doenças inflamatórias hepáticas (alcoólica, esteatohepatite não-alcoólica e hepatopatias virais) há um maior estímulo de transcrição de moléculas do sistema complemento, entre elas C1qC.<sup>290</sup> Em estudos de avaliação de transcriptoma tumoral já foi identificada a produção de C1qC como proteína componente da MEC tumoral, estimulando o crescimento e metástases, o que configuraria um marcador de pior prognóstico para tais pacientes.<sup>288,289,324</sup>

A CFHR1 (*Complement factor H-related protein 1*) é uma das cinco proteínas relacionadas ao Fator H do complemento.<sup>325,326</sup> Devido à sua similaridade estrutural com o Fator H, tal proteína consegue também se ligar a C3b, um dos componentes da C5 convertase, o que lhe confere um papel modulador da ativação do sistema complemento ao inibir a clivagem do C5. Tal proteína se liga também à forma monomérica da proteína C-reativa ou pentraxina em células necróticas da matriz extracelular, possibilitando a atuação das vias clássica e alternativa do complemento e aumentando a opsonização de células mortas através da ativação do inflamassoma.<sup>292,325-327</sup> Além disso, um estudo recente demonstrou que a CFHR1 pode se ligar a diversos componentes da MEC de forma competitiva com o Fator H, o que perpetuaria a atividade inflamatória do sistema complemento.<sup>291</sup> Mutações no gene *CFHR1* já foram associadas a complementopatias com acometimento renal, como síndrome hemolítico-urêmica atípica, glomerulopatia do C3, nefropatia por IgA e lúpus eritematoso sistêmico.<sup>327,328</sup>

A GAA (*Lysosomal alpha-glucosidase*) é uma enzima responsável pela degradação de glicogênio a glicose nos lisossomos.<sup>329</sup> Variantes patogênicas no gene *GAA* são associadas a Doença de Pompe, uma doença de depósito lisossomal de glicogênio com padrão de herança autossômico recessivo e com amplo espectro de apresentação clínica. Esta doença acomete mais frequentemente coração, fígado e músculo esquelético e o acúmulo lisossomal/citoplasmático de glicogênio induz disfunção celular e tecidual.<sup>329-332</sup>

A HRNR (*Hornerin*) é membro da família das proteínas S100 que têm atividade de ligação a cálcio e a metais de transição.<sup>333,334</sup> Apesar de sua função fisiológica não estar completamente elucidada, evidências revelam que tal proteína pode estar envolvida na regulação da fosforilação de proteínas, regulação de fatores de transcrição, homeostase de cálcio, dinâmica dos constituintes do citoesqueleto e resposta imune e inflamatória, além de processos de proliferação, diferenciação e morte celular.<sup>334-336</sup> Estudos prévios mostraram que a expressão de hornerina na matriz extracelular está associada à progressão de tumores de mama, leucemia, hepatocarcinoma e pâncreas, bem como à metastatização por meio do aumento da vascularização tumoral por mecanismos não-dependentes de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*).<sup>334-337</sup> A hornerina é altamente expressa na pele e variantes patogênicas no gene *HRNR* são associadas a casos de ictiose vulgar e psoríase.<sup>333,338</sup>

A análise do conjunto de proteínas com expressão exclusiva em MEC glomerular no grupo GAR sugere envolvimento importante do sistema complemento, dados os depósitos de proteínas associadas a ativação das vias clássica e alternativa, assim como ativação do inflamassoma (C1QC e CFHR1). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a ativação final do sistema complemento com formação do complexo de ataque à membrana C5b-9 pode induzir 3 tipos de

respostas nos podócitos: lise, apoptose ou ativação. A exposição a concentrações sub-líticas de C5b-9 associa-se à ativação e proliferação podocitária, por levar a lesões ao DNA e consequente ativação e estímulo de proliferação. Este estímulo é evidenciado pelo aumento da expressão de genes associados ao ciclo celular - p53, p21, GADD45 (*Growth-arrest DNA damage-45*) e as quinases de checkpoint 1 e 2, o que é consistente com a patogênese e achados histológicos da GCI, em que se observa marcada hipertrofia e hiperplasia podocitárias.<sup>339-341</sup> Apesar de seu papel no glomérulo não ser completamente elucidado, a identificação da HRNR também se constitui em um achado interessante, uma vez que essa proteína participa de mecanismos já previamente associados à patogênese das nefropatias associadas a GAR, como alterações da homeostase do cálcio, do citoesqueleto e da resposta inflamatória. Além disso, em adição aos efeitos das proteínas do sistema complemento, também atua sobre processos de diferenciação, proliferação e morte celular.<sup>334,335,337</sup> Apesar de ainda não conhecermos o papel da deposição exclusiva de GAA - uma enzima lisossomal - na MEC glomerular associada à GCI mediada por GAR, alterações lisossomais já foram descritas em associação com GAR.<sup>86,89,95</sup>

A única proteína de detecção específica encontrada no grupo GBR foi a LAMA2 (*Laminin, alpha 2*). Essa proteína, um dos principais componentes da membrana basal glomerular, participa de processos de ligação, migração e organização de células com outros componentes da MEC.<sup>342,343</sup> Mutações no gene *LAMA2* já foram associadas a distrofias musculares congênitas e ao rim espongiomedular.<sup>342,344</sup> Redução da expressão de tal proteína foi associada a resistência a quimioterápicos em câncer de ovário, e a maior risco de crescimento e metastatização para adenocarcinoma de pulmão e hepatocarcinoma.<sup>345-347</sup> Um estudo recente descreveu uma família com vários casos de GESF associados a variantes nos genes *LAMA2* e *LOXLA*. Estes genes se tornaram candidatos a causadores de GESF familiar num modelo de herança digênica.<sup>343</sup> É interessante notar, contudo, que não identificamos exclusividade ou aumento de abundância de deposição de proteínas do sistema complemento no grupo GBR, o que pode sugerir mecanismos patogênicos diferentes para a gênese de GCI associada a GAR ou a GBR. Uma hipótese para tal diferença é que a GCI associada a GBR poderia decorrer da ação de fatores circulantes que desencadeariam a lesão glomerular por meio de um mecanismo independente do sistema complemento, enquanto o mecanismo mediado por GAR incluiria a participação de componentes desse sistema.

Há evidências crescentes de que o sistema imunológico participa de forma importante da patogênese de podocitopatias como GC, GESF e DLM, por meio da ativação de proteínas do sistema complemento e da ativação da imunidade inata e/ou humoral.<sup>348-351</sup> Algumas evidências reforçam tais hipóteses: 1) resposta ao uso de imunossupressores como corticosteroides, inibidores de calcineurina, micofenolato e rituximab; 2) deposição de IgM e C3 à biópsia renal

(que em alguns estudos, associou-se a pior prognóstico), com evidências de que tais depósitos são produtos de ativação do sistema do complemento e não apenas entrapping;<sup>348,350</sup> 3) detecção de deposição de C4d em glomérulos não escleróticos, antes da formação de sinequias<sup>352</sup> 4) pior prognóstico em pacientes com GESF e níveis de C3 reduzidos no sangue, o que sugere deposição renal de C3;<sup>353</sup> e 5) alguns estudos detectaram aumentos dos níveis séricos de proteínas do sistema complemento, como Ba, C3a, C4a, C5a, C5b-9 e deposições glomerulares de C3, C4, C1q, MBL.<sup>349,351,354,355</sup> Tais achados reforçam a hipótese de que a deposição de proteínas do complemento e IgM possam não apenas ser derivadas de entrapping glomerular nas áreas de esclerose.<sup>348,350,351,356</sup> No cenário em que IgM é um potente ativador da via clássica do complemento, uma das vias efetoras da imunidade inata, tais deposições são cada vez mais consideradas funcionalmente ativas.<sup>348</sup> Quando focamos na GC, um estudo com 19 pacientes com GC associados a lúpus eritematoso sistêmico ou nefropatia lupus-like em atividade sistêmica detectou deposição renal de IgM e C3 na maioria dos casos, além de deposição de C1q em mais de metade dos mesmos.<sup>26</sup> Outro estudo avaliou a deposição de C4d em pacientes com GESF através de imunoistoquímica e comparou os resultados de acordo com o subtipo histológico pela Classificação de Colombia; todos os casos de GC eram positivos para C4d.<sup>352</sup> Além disso, podócitos de pacientes com GC apresentam perda de CR1 (receptor de C3b e C4b).<sup>357,358</sup> Outra evidência que reforça a importância do sistema complemento na GC é a participação das células epiteliais parietais (PECs) ativadas, que expressam CD44.<sup>140,359</sup> Quando comparados a outras glomerulopatias (como Nefropatia por IgA, Nefropatia Membranosa e Doença de Lesões Mínimas), pacientes com GESF apresentam maior expressão de PECs CD44+ e há correlação direta entre a densidade glomerular de células CD44 com níveis de proteinúria, além da presença de C2, C3, C9, CFB e CFI na urina.<sup>360</sup> PECs CD44+ possuem papel importante nas vias de inflamação e fibrogênese, uma vez que modulam processos de remodelamento da MEC e deposição de colágeno.<sup>361,362</sup> Nossos dados mostram, além de deposição exclusiva de C1QC e CHFR, um aumento da abundância de deposição de algumas proteínas do sistema complemento no grupo GAR (C5, C9) em relação ao grupo controle, não observado no grupo GBR. Uma vez que processos de ativação da imunidade inata possuem relação direta com a patogênese da GC, principalmente em pacientes com GAR de *APOLI*, uma maior participação do sistema complemento na patogênese da GCI nesse grupo de pacientes é, a princípio, bastante coerente.<sup>4,71,92,93,363</sup> Nesse cenário, a realização de estudos adicionais que confirmem essa hipótese e que busquem por potenciais correlações com aspectos histológicos, terapêuticos e prognósticos, é essencial.

Outro cluster importante identificado foi o de proteínas relacionadas à modulação da migração de células inflamatórias, apoptose e fibrose. O envolvimento de células inflamatórias na

patogênese da GESF é investigado há alguns anos. Um estudo recente espanhol<sup>364</sup> avaliou os perfis séricos de citocinas e subpopulações de linfócitos em 79 pacientes pediátricos e adultos com diagnóstico de GESF. Nesse estudo, os autores observaram a formação de três clusters endotípicos de pacientes: o primeiro, que apresentava maior porcentagem de detecção de IL-12, IL-17, IL-23 e linfócitos Th17; o segundo, com maior expressão de IL-4, IL-5, IL-13, IgE e linfócitos Th2; e o terceiro com predomínio das proteínas de fase aguda IL-6, hemopexina, haptoglobina, receptor solúvel de plasminogênio ativador de uroquinase (suPAR) e uCD80. Um achado extremamente relevante foi o fato de que o segundo cluster apresentava menor proporção de pacientes com corticorresistência, evidenciando que uma polarização de resposta imunológica pode prever resposta a corticosteroide.<sup>364</sup> Outros estudos recentes destacam a participação potencial dos linfócitos Th17 e Treg na patogênese da GESF.<sup>365,366</sup> A expressão de citocinas do padrão de resposta Th17 já foi detectada em maior proporção em biópsias renais de pacientes com GESF quando comparadas a outras glomerulopatias, refletindo desbalanço do eixo Th17/Treg a favor do estado pró-inflamatório. Postula-se que a deposição de IL-17 no tecido renal possa levar à apoptose de podócitos através da fosforilação da nefrina.<sup>364-366</sup> Além disso, os níveis séricos de IL-17 são diretamente proporcionais à extensão de glomeruloesclerose em pacientes com GESF.<sup>367,368</sup> Outras evidências da participação de linfócitos T na patogênese da GESF incluem o aumento dos níveis séricos e de transcrição podocitária de TNF- $\alpha$  em pacientes com tal doença, inclusive associado com corticorresistência.<sup>369,370</sup> Interessantemente, dados prévios mostram também a participação de linfócitos Th1 na GC, principalmente quando associada a GAR, juntamente com o aumento dos níveis de INF- $\gamma$ . Esta elevação, associada à ativação de TLR3, induz a transcrição de *APOLI*.<sup>92,93</sup> Além disso, em modelo experimental de GC, o estímulo contínuo do receptor 2 do fator de necrose tumoral (TNFR2) em podócitos se associou a maior ativação da via intracelular de inflamação NF $\kappa$ B.<sup>371</sup> A participação de linfócitos B na patogênese da GESF também já é conhecida, tendo papel importante na ativação de linfócitos T que, conseqüentemente, produzem citocinas pró e anti-inflamatórias que guiam a diferenciação das subpopulações linfocitárias. Além disso, os linfócitos B atuam também na produção de anticorpos e fatores circulantes, os quais podem estar implicados de forma direta na patogênese da GESF.<sup>372,373</sup> A participação de macrófagos como células efetoras do sistema imune também já foi descrita em pacientes com GESF e GC, estando a densidade de tais células no interstício renal associada à proliferação celular glomerular.<sup>374,375</sup>

Os clusters de proteínas associadas ao estresse, de proteínas relacionadas à modulação da migração de células inflamatórias, apoptose e fibrose, e de proteínas componentes estruturais da MEC glomerular ou que interagem e/ou são envolvidas em sua remodelação possuem relação intrínseca e recíproca. Além de sua função estrutural, dando sustentação às estruturas vizinhas, a

MEC glomerular possui outras funções: 1) participa de processos de ativação celular, apresentando *crosstalk* com endotélio, podócito e mesângio; 2) funciona como barreira de cargas predominantemente negativas, contribuindo para a seletividade de filtração; 3) pode ser reservatório de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, influenciando o comportamento de células vizinhas e estimulando a migração de células inflamatórias; e 4) por estar intimamente ligada a vários receptores celulares, pode ativar/inibir vias funcionais intracelulares e modular funções celulares importantes como crescimento, diferenciação, migração e proliferação.<sup>376-381</sup>

A MEC está em constante renovação através de um equilíbrio entre a produção de proteínas estruturais e sua degradação por enzimas. Por suas características moleculares e interações conformacionais, o colágeno é resistente à ação de várias enzimas proteolíticas, sendo sua degradação possível apenas através de enzimas específicas como as metaloproteinases, cisteíno proteinases e enzimas colagenolíticas derivadas de patógenos.<sup>376,380,382</sup> As metaloproteinases são encontradas em células do tecido conjuntivo, como macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e neutrófilos; atualmente já há mais de 20 subtipos identificados. De forma recíproca, inibidores teciduais das metaloproteinases inibem seu efeito colagenolítico, de forma a manter o equilíbrio de *turnover* da MEC.<sup>383-385</sup> Um desbalanço que favoreça um aumento da produção e deposição de proteínas de matriz como colágeno IV, laminina, fibronectina e nidogênio, entre outras, e redução de sua degradação, leva ao espessamento da MBG e posterior glomeruloesclerose.<sup>377-379,381,386-389</sup>

Um achado extremamente interessante e relevante de nosso estudo foi a detecção de aumento de abundância de deposição de proteínas de MEC glomerular (COL4A4, COL4A5, LAMB2 e NID1) e de C4BPA no grupo GAR em relação ao GESF-NOS, o que sugere uma produção mais intensa de proteínas associadas a fibrose. Além disso, a mesma análise comparando os grupos GAR e CTRL revelou um perfil de deposição em GAR que reflete a ativação de vias de inflamação e ativação de células do sistema imunológico e fibrose, associado à redução de deposição de proteínas que interagem na formação e renovação da MEC, estimulam neoformação vascular, inibem de fibrose, promovem clearance imune, protegem contra o estresse oxidativo e se relacionam com processos de apoptose e ferroptose. Além disso, o grupo GAR apresentou aumento de deposição de proteínas do sistema complemento, estimuladoras ou associadas a fibrose, componentes da MEC, estimuladoras de vias inflamatórias intracelulares, indutoras de desacoplamento de células das membranas basais, autofagia e fibrose, associadas a estresse de retículo endoplasmático e estimuladoras de transição epitélio mesenquimal.

A patogênese da fibrose renal e glomeruloesclerose é multifatorial e pode ser dividida em 4 estágios: 1) ativação celular e fase de lesão; 2) sinalização e ativação de vias de fibrose 3) fase

de deposição de fibrose e 4) fase de progressão e destruição tecidual. Na 1ª fase, observamos participação importante de linfócitos (T, B e natural killer), monócitos, macrófagos e neutrófilos, além de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6) e quimiocinas (stromal cell-derived factor-1 - SDF-1, monocyte chemoattractant protein-1 / chemokine (C-C motif) ligand 2 - MCP1/CCL2, fractalquina) e anti-oxidantes (heme-oxigenase e ferritina).<sup>373,378,386,390</sup> Após a ativação de resposta imunológica no contexto de lesão tecidual, segue-se a 2ª fase da cascata de fibrose, que consiste na ativação e recrutamento de células que promoverão a síntese de proteínas de MEC. Nessa fase, há a ativação de vias intracelulares como de TGF- $\beta$ /Smad, Wnt/ $\beta$ -Catenin, Integrin/ILK, NOTCH, Hedgehog e sistema renina-angiotensina aldosterona, além da produção de citocinas (TGF- $\beta$ , IL, -IL-10, IL-13, IL-17), quimiocinas (MCP-1/CCL2, CXCL10) e fatores de crescimento (Connective Tissue Growth Factor – CTGF, Platelet-Derived Growth Factor – PDGF, Epidermal Growth Factor – EGF e Bone Morphogenic Protein-7 - BMP-7), que recrutam e induzem a transição epitélio-mesenquimal através da transdiferenciação de macrófagos, fibrócitos, fibroblastos, células epiteliais parietais, células endoteliais e células tubulares em miofibroblastos.<sup>377–380,384,385,391,392</sup> Na terceira fase, que corresponde ao desenvolvimento da fibrose tecidual nas glomerulopatias progressivas, observa-se um aumento da expressão e deposição de moléculas de colágeno I, III e IV, sendo essa última em maior proporção, o que leva a aumento da MBG e da matriz mesangial, com posterior fibrose e perda de função renal.<sup>381,387–389</sup> O bloqueio de vias que inibam a produção de colágeno IV em nefropatias já se associou a atenuação de processos de fibrose e redução da glomeruloesclerose em modelos experimentais.<sup>393</sup> Além do colágeno, observa-se uma mudança quantitativa e qualitativa dos componentes da MEC, ressaltando-se aumento de deposição também de lamininas, fibrinogênio, nidogênio, entre outros.<sup>376–380</sup> Por fim, na quarta fase, observa-se um desbalanço entre as proteínas produzidas e depositadas, com redução da atividade de proteases e progressão da fibrose, desencadeando doença renal crônica.<sup>379,382,385</sup>

Os resultados obtidos por meio da análise do perfil de proteínas identificadas e quantificadas em pacientes com GC (com GAR ou GBR de *APOLI*), assim como sua diferença de abundância de deposição em relação a amostras de rim normal, sugerem um padrão predominantemente pró-inflamatório, com ativação predominante de resposta imune inata, participação importante do sistema complemento, produção de proteínas associadas ao stress e redução de marcadores de *turnover* de MEC glomerular. Tais achados parecem indicar uma hiper-regulação potencial de marcadores inflamatórios e de fibrose na GC, e poderiam contribuir para o entendimento dos mecanismos associados a seu pior prognóstico comparado ao de pacientes com GESF-NOS.

O único artigo publicado que avaliou a deposição de proteínas de MEC glomerular em pacientes com GC por meio de proteômica por espectrometria de massas foi publicado por Merchant e

cols.<sup>140</sup> Esse estudo avaliou os perfis proteicos de MEC glomerular e urinário através de espectrometria de massas e transcriptoma glomerular em pacientes com GC comparados a GESF-NOS e rins normais. Ao comparar pacientes com GC e GESF-NOS, os autores detectaram diferença de abundância de deposição de 58 proteínas de MEC, sendo 41 mais abundantes no grupo GC e 17 no grupo GESF-NOS. Entre elas, as de maior relevância são a Anexina A3, Catepsina B e Catepsina C, proteínas que participam do remodelamento da MEC e que apresentaram maior abundância de deposição em MEC glomerular de pacientes com GC em relação a pacientes com GESF, com colocalização nas células epiteliais parietais. As catepsinas B e C pertencem à família das cisteíno proteases, enzimas que se localizam principalmente nos lisossomos e que participam de processos de remodelamento da MEC ao serem secretadas e degradar proteínas e regular vias de sinalização de TGF- $\beta$ .<sup>394,395</sup> A anexina A3, por sua vez, é uma proteína de ligação de fosfolipídios de membrana dependentes de cálcio, que participa de vias de ativação intra e extracelular. Essa proteína interage com proteínas do citoesqueleto e participa do transporte de canais iônicos, atuando nos processos de motilidade, divisão celular, diferenciação e apoptose.<sup>396</sup> Tais achados ratificam a importante participação das PECs na patogênese da GC, promovendo um perfil característico de remodelamento de MEC glomerular.

Nosso estudo apresenta algumas diferenças em relação ao estudo de Merchant e cols.<sup>140</sup> 1) As análises de Merchant e cols. derivam de um total de 38-124 fragmentos por paciente, com representatividade de 12-26 glomérulos em cada amostra, sem descrição de exclusão ou de glomérulos completamente fibrosados e da área glomerular total microdissecada, condições que podem alterar a representação proteica. Em nossa casuística, tais critérios de seleção de glomérulos e descrição das áreas glomerulares microdissecadas foram seguidas, o que pode explicar algumas das diferenças no padrão proteico encontrado; 2) Os autores citam como limitação do seu estudo a heterogeneidade das lesões glomerulares nos pacientes com GC e GESF-NOS, o que poderia limitar a detecção de alterações focais. Essa heterogeneidade poderia gerar sub ou super-representação proteica, a depender da predominância do perfil de glomérulos da amostra (normais, com lesões glomerulares ou completamente fibrosados). Em nosso estudo, não incluímos glomérulos completamente fibrosados e selecionamos casos com as maiores proporções de glomérulos acometidos; 3) Detectamos e quantificamos a presença de catepsina B nos pacientes dos grupos GAR, GBR e CTRL, porém sem aumento de abundância de deposição nos pacientes com GC em relação aos CTRL; além disso, não detectamos Catepsina C e Anexina A3 em nossas amostras. Apesar de não termos uma explicação para tal diferença, tal achado ratifica os dados da maioria dos outros estudos de proteômica de MEC glomerular, nos quais tais proteínas também não foram detectadas;<sup>140,272-277</sup> e 4) Em nosso estudo realizamos as análises dos pacientes com GC separando-os de acordo com seu status de portador ou não de GAR de



*APOLI*, enquanto no estudo prévio os pacientes foram agrupados apenas como portadores de GC, sem realização de genotipagem para tal gene. Dessa forma, nosso estudo se mostrou também capaz de avaliar diferenças entre GC na presença ou ausência de GAR para *APOLI*.

Três conclusões advindas de nossas análises proteômicas, por fim, apresentam grande relevância e deverão embasar estudos fundamentais que se seguirão. 1) O padrão de deposição de proteínas na MEC glomerular de pacientes com GCI associada a GAR foi consistente com ativação de vias inflamatórias, imunológicas e pró-fibróticas, um perfil qualitativa e predominantemente reproduzido em pacientes com GCI associada a GBR. 2) Interessantemente, um padrão de deposição proteica em MEC glomerular específico ao tecido renal normal, também associado a efeitos imunológicos, inflamatórios e pró-fibróticos, é excluído de glomérulos de pacientes com GCI. 3) O perfil de deposição de proteínas em MEC glomerular de pacientes com GCI associada a GAR sugere fortemente o envolvimento do sistema complemento na patogênese desta forma de GCI. Deve-se destacar que tal perfil não se aplicou a GCI associada a GBR ou a GESF-NOS.

## *Conclusão*

## 6. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que o status genético desempenha um papel fundamental na patogênese da glomerulopatia colapsante idiopática, responsabilizando-se por mais da metade dos casos em uma população brasileira altamente miscigenada. Nosso estudo mostrou também que genótipo de alto risco de *APOL1* se constituiu na principal base genética para essa doença e que a presença de variantes mendelianas causativas se associa a um pior prognóstico renal. Análises proteômicas, por sua vez, revelaram que rins GAR-*APOL1* apresentam um padrão de proteínas de matriz extracelular glomerular associado a vias de inflamação, ativação imunológica e fibrose, e que inclui componentes do sistema complemento.

## *Resumo dos Resultados obtidos*

## 7. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

A grande maior parte dos pacientes de nossa coorte com glomerulopatia colapsante idiopática (GCI) mostrou-se corticorresistente e a maioria dos pacientes não apresentou remissão com uso de imunossupressão.

- Cerca da metade de nossos pacientes com GCI evoluiu para DRC-TRS 36 meses após o diagnóstico.
- A mediana de idade de nossos pacientes com GCI foi mais baixa que a de outras casuísticas estrangeiras.
- Pacientes com GCI que evoluíram para DRC-TRS 36 meses após o diagnóstico apresentaram menor TFG<sub>e</sub> ao diagnóstico e maior percentual de glomérulos com sinéquias e esclerosados.
- Variantes genéticas mendelianas causativas ou genótipo de alto risco de *APOL1* foram identificadas em 58,6% dos pacientes com GCI; entre estes pacientes, 80,5% albergavam GAR e 19,5% variantes mendelianas.
- A prevalência de GAR foi maior no grupo de pacientes autodeclarados não-brancos que no de autodeclarados brancos.
- Pacientes com GAR apresentaram maior frequência de história familiar de doença renal.
- A ausência de uma maioria autodeclarada não-branca em nossa população de pacientes com GCI, na vigência de uma prevalência elevada de GAR, é consistente com um elevado nível de miscigenação na população brasileira.
- Pacientes mais velhos apresentaram risco menor de evoluir para DRC-TRS aos 36 meses após biópsia renal.
- A presença de variante mendeliana causativa em paciente com GCI foi fator de risco independente para evolução para DRC-TRS aos 36 meses pós-biópsia renal e exerce forte tendência para tal desfecho ao final do seguimento.
- Remissão em paciente com GCI foi fator protetor independente contra evolução para DRC-TRS aos 36 meses pós-biópsia renal e ao final do seguimento.
- Em pacientes com GBR, a apresentação de GCI ocorreu em todas as décadas da vida até os 70 anos, embora tenha sido mais frequente até a quarta década e um pico de incidência tenha sido observado na terceira década. Em pacientes com GAR, a apresentação da doença ocorreu primariamente da segunda à quinta década de vida, mais especificamente de 9 a 44 anos. Nesse cenário, a probabilidade da GCI se manifestar da 2<sup>a</sup> à metade da 5<sup>a</sup> década de vida em pacientes com GAR é substancialmente maior que em pacientes com GBR.
- A distribuição etária da apresentação clínica de GCI pode potencialmente ser explicada com base nos perfis de patogênese associados a GAR e GBR.

- Nossa coorte de pacientes com GCI apresentou uma maior proporção de ancestralidade genética africana que a maioria das encontradas em diferentes populações brasileiras.
- Pacientes com GAR apresentaram maior proporção de ancestralidade africana que os com GBR.
- Apesar do subgrupo autodeclarado branco apresentar maior proporção de ancestralidade europeia que o subgrupo não-branco, a correlação de ancestralidade genética entre eles foi bastante baixa.
- A maior parte dos pacientes com GCI e variantes mendelianas causativas eram adultos. Identificamos variantes novas nos genes *COL4A5*, *COQ2* e *PLCE1* e variantes previamente descritas nos genes *MYH9*, *TRPC6*, *COQ2*, *COL4A3*, *TTC21B* e *TRPC6*.
- Identificamos três casos que albergavam concomitantemente GAR-*APOLI* e variantes monogênicas potencialmente contribuintes ou causativas nos genes *ITGB4*, *LAMA5* e *PTPRO*, classificadas como de significado incerto pelos critérios de patogenicidade do ACMG; Em um paciente com GBR, detectamos também uma variante potencialmente causativa em *MAGI2*, também classificada como de significado incerto pelos critérios de patogenicidade do ACMG.
- Identificamos 33 proteínas glomerulares exclusivas ao tecido renal normal, 7 no grupo GAR de *APOLI*, 11 no grupo GBR de *APOLI* e 2 no grupo GESF-NOS.
- Detectamos 123 proteínas glomerulares com diferença de abundância entre rins GAR-*APOLI* e tecido renal normal, 155 com diferença de abundância entre rins GBR-*APOLI* e tecido renal normal, e 5 com diferença de abundância entre rins GAR-*APOLI* e rins GESF-NOS.
- Consideradas todas as amostras, identificamos 200 proteínas de MEC glomerular, 90 das quais previamente identificadas no projeto matrissoma, 134 já associadas ao matrissoma glomerular e 66 proteínas candidatas para composição do matrissoma glomerular.
- A análise de abundância de deposição de proteínas entre rins GAR-*APOLI* e tecido renal normal revelou um padrão que favorece vias de inflamação, ativação imunológica e fibrose em rins GAR-*APOLI*, caracterizado por uma menor deposição de proteínas associadas ao remodelamento da MEC, estimuladoras de neoformação vascular, inibidoras de fibrose, promotoras de clearance imune, protetoras contra estresse oxidativo, relacionadas a processos de apoptose e ferroptose, e moduladoras de quimiotaxia de linfócitos. No mesmo sentido, observamos aumento de abundância de proteínas do sistema complemento, estimuladoras ou associadas a fibrose, componentes da MEC, estimuladoras de vias inflamatórias intracelulares, indutoras de descolamento de células das membranas basais, inibidoras de autofagia e apoptose, estimuladoras de transição epitélio-mesenquimal, e associadas a stress de retículo endoplasmático.

- A análise de abundância de deposição de proteínas entre rins GBR-*APOLI* e tecido renal normal mostrou um padrão biológico muito semelhante ao da comparação rins GAR-*APOLI* versus tecido renal normal. O perfil de GBR-*APOLI* incluiu ainda redução de abundância de proteínas que se correlacionam com a manutenção da homeostase de cálcio intracelular e que promovem a ligação da MEC às integrinas, mas não proteínas do sistema complemento.
- A análise de abundância de deposição de proteínas entre rins GAR-*APOLI* e GESF-NOS revelou um aumento de proteínas que compõem a MEC glomerular e de um receptor do sistema complemento em rins GAR-*APOLI*; esse receptor regula negativamente processos de autofagia, apoptose e migração linfocitária.
- A análise das interações entre as 200 proteínas do matrissoma glomerular identificadas em nosso estudo mostrou interação de vias biológicas organizadas em 4 clusters: proteínas relacionadas à ativação e modulação do sistema complemento; componentes estruturais da MEC glomerular ou proteínas que interagem e/ou estão envolvidas no seu remodelamento; proteínas associadas ao estresse e proteínas relacionadas à modulação da migração de células inflamatórias, apoptose e fibrose.

## *Referências*



## 8. REFERÊNCIAS

1. Filler G, Young E, Geier P, et al. Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children? *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 1107–1113.
2. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, et al. Pathologic Classification of Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Working Proposal. *American Journal of Kidney Diseases* 2004; 43: 368–382.
3. Weiss MA, Daquiaoag E, Margolin EG, et al. Nephrotic Syndrome, Progressive Irreversible Renal Failure, and Glomerular “Collapse”: A New Clinicopathologic Entity? *American Journal of Kidney Diseases* 1986; 7: 20–28.
4. Chandra P, Kopp JB. Viruses and collapsing glomerulopathy: A brief critical review. *Clinical Kidney Journal* 2013; 6: 1–5.
5. Freitas GRR de, Praxedes MRG, Malheiros D, et al. Collapsing variant of focal segmental glomerulosclerosis by parvovirus B19: case report. *J Bras Nefrol* 2015; 37: 121–126.
6. Rodrigues CE, Sette LHBC, Torritani J, et al. Tuberculosis-associated collapsing glomerulopathy: Remission after treatment. *Ren Fail* 2010; 32: 143–146.
7. Larsen CP, Bourne TD, Wilson JD, et al. Collapsing Glomerulopathy in a Patient With COVID-19. *Kidney Int Rep* 2020; 5: 935–939.
8. Shetty AA, Tawhari I, Safar-Boueri L, et al. COVID-19-Associated Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32: 33–40.
9. Gaillard F, Ismael S, Sannier A, et al. Tubuloreticular inclusions in COVID-19-related collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2020; 98: 241.
10. Nasr SH, Kopp JB. COVID-19-Associated Collapsing Glomerulopathy: An Emerging Entity. *Kidney Int Rep* 2020; 5: 759–761.
11. Kissling S, Rotman S, Gerber C, et al. Collapsing glomerulopathy in a COVID-19 patient. *Kidney Int* 2020; 98: 228–231.
12. Larsen CP, Bourne TD, Wilson JD, et al. Collapsing Glomerulopathy in a Patient With COVID-19. *Kidney Int Rep* 2020; 5: 935–939.
13. Kudose S, Santoriello D, Bomback AS, et al. Longitudinal Outcomes of COVID-19-Associated Collapsing Glomerulopathy and Other Podocytopathies. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32: 2958–2969.
14. Sharma Y, Nasr SH, Larsen CP, et al. COVID-19-Associated Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Report of 2 Cases. *Kidney Med* 2020; 2: 493–497.

15. Magoon S, Bichu P, Malhotra V, et al. COVID-19-Related Glomerulopathy: A Report of 2 Cases of Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Med* 2020; 2: 488–492.
16. Peleg Y, Kudose S, D'Agati V, et al. Acute Kidney Injury Due to Collapsing Glomerulopathy Following COVID-19 Infection. *Kidney Int Rep* 2020; 5: 940–945.
17. Laboux T, Gibier JB, Pottier N, et al. COVID-19-related collapsing glomerulopathy revealing a rare risk variant of APOL1: lessons for the clinical nephrologist. *J Nephrol* 2021; 34: 373–378.
18. Wu H, Larsen CP, Hernandez-Arroyo CF, et al. AKI and Collapsing Glomerulopathy Associated with COVID-19 and APOL 1 High-Risk Genotype. *J Am Soc Nephrol* 2020; 31: 1688–1695.
19. Velez JCQ, Caza T, Larsen CP. COVAN is the new HIVAN: the re-emergence of collapsing glomerulopathy with COVID-19. *Nat Rev Nephrol* 2020; 16: 565–567.
20. Akilesh S, Nast CC, Yamashita M, et al. Multicenter Clinicopathologic Correlation of Kidney Biopsies Performed in COVID-19 Patients Presenting With Acute Kidney Injury or Proteinuria. *Am J Kidney Dis* 2021; 77: 82-93.e1.
21. Neves PD, Bridi RA, Ramalho JA, et al. Schistosoma mansoni infection as a trigger to collapsing glomerulopathy in a patient with high-risk APOL1 genotype. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0008582.
22. Salvatore SP, Barisoni LMC, Herzenberg AM, et al. Collapsing glomerulopathy in 19 patients with systemic lupus erythematosus or Lupus-like disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 7: 914–925.
23. Haas M. Collapsing glomerulopathy in systemic lupus erythematosus: An extreme form of lupus podocytopathy? *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 7: 878–880.
24. Mallavarapu RK, Nandigam SC, Peskoe ST. Collapsing glomerulopathy presenting as the initial manifestation of systemic lupus erythematosus. *NDT Plus* 2008; 1: 452–453.
25. Nasr R, Johns C, Gertner E. Collapsing glomerulopathy in collagen vascular-like disease. *Lupus* 2014; 23: 75–80.
26. Salvatore SP, Barisoni LMC, Herzenberg AM, et al. Collapsing Glomerulopathy in 19 Patients with Systemic Lupus Erythematosus or Lupus-Like Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2012; 7: 914–925.
27. Kumar S, Sheaff M, Yaqoob M. Collapsing glomerulopathy in adult still's disease. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: e4-10.

28. Lim A, Lydia A, Rim H, et al. Focal segmental glomerulosclerosis and Guillain-Barre syndrome associated with Campylobacter enteritis. *Intern Med J* 2007; 37: 724–728.
29. Nasr SH, Markowitz GS, Sentman RL, et al. Sickle cell disease, nephrotic syndrome, and renal failure. *Kidney Int* 2006; 69: 1276–1280.
30. Salvatore SP, Reddi AS, Chandran CB, et al. Collapsing glomerulopathy superimposed on diabetic nephropathy: insights into etiology of an under-recognized, severe pattern of glomerular injury. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 392–399.
31. Niang A, Niang SE, Ka EHF, et al. Collapsing glomerulopathy and haemophagocytic syndrome related to malaria: a case report. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 3359–3361.
32. Barri YM, Munshi NC, Sukumalchantra S, et al. Podocyte injury associated glomerulopathies induced by pamidronate. *Kidney Int* 2004; 65: 634–641.
33. Markowitz GS, Appel GB, Fine PL, et al. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1164–1172.
34. Herlitz LC, Markowitz GS, Farris AB, et al. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 163–172.
35. Markowitz GS, Nasr SH, Stokes MB, et al. Treatment with IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  is associated with collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010; 5: 607–615.
36. Swarnalatha G, Ram R, Ismal KM ai, et al. Focal and segmental glomerulosclerosis: does prognosis vary with the variants? *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2015; 26: 173–181.
37. Raja R, Nada R, Yadav AK, et al. A prospective study of collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Ren Fail* 2016; 38: 894–898.
38. Deegens JKJ, Steenbergen EJ, Borm GF, et al. Pathological variants of focal segmental glomerulosclerosis in an adult Dutch population--epidemiology and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 186–192.
39. D'Agati VD, Alster JM, Charles Jennette J, et al. Association of histologic variants in FSGS clinical trial with presenting features and outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2013; 8: 399–406.
40. Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int* 2006; 69: 920–926.

41. Testagrossa L, Azevedo Neto R, Resende A, et al. Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 91–98.
42. Costa DM do N, Valente LM, Gouveia PA da C, et al. Comparative analysis of primary and secondary glomerulopathies in the northeast of Brazil: data from the Pernambuco Registry of Glomerulopathies - REPEG. *J Bras Nefrol* 2017; 39: 29–35.
43. Ramachandran R, Rajakumar V, Duseja R, et al. Successful treatment of adult-onset collapsing focal segmental glomerulosclerosis with rituximab. *Clin Kidney J* 2013; 6: 500–502.
44. Laurin LP, Gasim AM, Derebail VK, et al. Renal Survival in Patients with Collapsing Compared with Not Otherwise Specified FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; 11: 1752–1759.
45. Valeri A, Barisoni L, Appel GB, et al. Idiopathic collapsing focal segmental glomerulosclerosis: a clinicopathologic study. *Kidney Int* 1996; 50: 1734–1746.
46. Laurinavicius A, Hurwitz S, Rennke HG. Collapsing glomerulopathy in HIV and non-HIV patients: a clinicopathological and follow-up study. *Kidney Int* 1999; 56: 2203–2213.
47. Chun MJ, Korbet SM, Schwartz MM, et al. Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2169–2177.
48. Ahuja A, Gupta R, Sharma A, et al. Idiopathic collapsing glomerulopathy: A clinicopathologic analysis of 30 cases. *Indian J Nephrol* 2014; 24: 239–242.
49. Grcevska L, Polenakovik M. Collapsing glomerulopathy: clinical characteristics and follow-up. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 652–657.
50. Detwiler RK, Falk RJ, Hogan SL, et al. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1994; 45: 1416–1424.
51. Singh HK, Baldree LA, McKenney DW, et al. Idiopathic collapsing glomerulopathy in children. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 132–137.
52. Albaqumi M, Barisoni L. Current views on collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 1276–1281.
53. Fogo AB, Lusco MA, Najafian B, et al. AJKD Atlas of Renal Pathology: Collapsing Glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 2015; 66: e3–e4.
54. Albaqumi M, Soos TJ, Barisoni L, et al. Collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2854–2863.

55. Schwimmer JA, Markowitz GS, Valeri A, et al. Collapsing glomerulopathy. *Semin Nephrol* 2003; 23: 209–218.
56. Bódi I, Abraham AA, Kimmel PL. Apoptosis in human immunodeficiency virus-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 286–291.
57. Yang Y, Gubler MC, Beauvils H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 2002; 91: 416–423.
58. Perazella MA, Markowitz GS. Bisphosphonate nephrotoxicity. *Kidney Int* 2008; 74: 1385–1393.
59. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, et al. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 1175–1184.
60. Freedman BI, Hicks PJ, Bostrom MA, et al. Polymorphisms in the non-muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end-stage renal disease historically attributed to hypertension in African Americans. *Kidney Int* 2009; 75: 736–745.
61. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, et al. Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans. *Science (1979)* 2010; 329: 841–845.
62. Freedman BI, Limou S, Ma L, et al. APOL1-Associated Nephropathy: A Key Contributor to Racial Disparities in CKD. *American Journal of Kidney Diseases* 2018; 72: S8–S16.
63. Larsen CP, Freedman BI. Apolipoprotein L1-associated nephropathy and the future of renal diagnostics. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 26: 1232–1235.
64. Friedman DJ, Pollak MR. APOL1 and Kidney Disease: From Genetics to Biology. *Annu Rev Physiol* 2020; 82: 323–342.
65. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science* 2010; 329: 841–845.
66. Riella C, Siemens TA, Wang M, et al. APOL1-Associated Kidney Disease in Brazil. *Kidney Int Rep* 2019; 4: 923–929.
67. Kopp JB, Winkler CA, Zhao X, et al. Clinical Features and Histology of Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy in the FSGS Clinical Trial. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26: 1443–1448.
68. Friedman DJ, Pollak MR. APOL1 Nephropathy: From Genetics to Clinical Applications. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2021; 16: 294–303.

69. Divers J, Freedman BI. Susceptibility genes in common complex kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2010; 19: 79–84.
70. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, et al. Apolipoprotein L1 risk variants associate with systemic lupus erythematosus-associated collapsing glomerulopathy. 2013; 24: 722–725.
71. Cutrim ÉMM, Neves PDM de M, Campos MAG, et al. Collapsing Glomerulopathy: A Review by the Collapsing Brazilian Consortium. *Front Med (Lausanne)* 2022; 9: 846173.
72. Chang JH, Husain SA, Santoriello D, et al. Donor’s APOL1 Risk Genotype and ‘Second Hits’ Associated With De Novo Collapsing Glomerulopathy in Deceased Donor Kidney Transplant Recipients: A Report of 5 Cases. *Am J Kidney Dis* 2019; 73: 134–139.
73. Neves PD, Bridi RA, Ramalho JA, et al. Schistosoma mansoni infection as a trigger to collapsing glomerulopathy in a patient with high-risk APOL1 genotype. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0008582.
74. Araújo SDA, Macedo E Cordeiro T, Belisário AR, et al. First report of collapsing variant of focal segmental glomerulosclerosis triggered by arbovirus: Dengue and Zika virus infection. *Clin Kidney J* 2019; 12: 355–361.
75. Muehlig AK, Gies S, Huber TB, et al. Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis in Viral Infections. *Front Immunol* 2021; 12: 800074.
76. Nadkarni GN, Gignoux CR, Sorokin EP, et al. Worldwide Frequencies of APOL1 Renal Risk Variants. *New England Journal of Medicine* 2018; 379: 2571–2572.
77. Limou S, Nelson GW, Kopp JB, et al. APOL1 Kidney Risk Alleles: Population Genetics and Disease Associations. *Adv Chronic Kidney Dis* 2014; 21: 426–433.
78. Friedman DJ, Kozlitina J, Genovese G, et al. Population-Based Risk Assessment of APOL1 on Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 2098–2105.
79. Besse W, Mansour S, Jatwani K, et al. Collapsing glomerulopathy in a young woman with APOL1 risk alleles following acute parvovirus B19 infection: a case report investigation. *BMC Nephrol* 2016; 17: 125.
80. Marques LPJ, Pacheco GGLC, Rioja LS, et al. Can systemic lupus erythematosus be the cause of collapsing glomerulopathy? *Lupus* 2005; 14: 853–855.
81. Melo NCV, Malheiros DMAC, Barros RT, et al. Collapsing glomerulopathy associated with proliferative lupus nephritis: Reversible acute kidney injury. *Lupus* 2011; 20: 98–101.

82. Chokshi B, D'Agati V, Bizzocchi L, et al. Haemophagocytic lymphohistiocytosis with collapsing lupus podocytopathy as an unusual manifestation of systemic lupus erythematosus with APOL1 double-risk alleles. *BMJ Case Rep* 2019; 12: bcr-2018-227860.
83. Kofman T, Narjoz C, Raimbourg Q, et al. Collapsing glomerulopathy associated lupus in a black female with homozygous APOL1 mutation. *Lupus* 2012; 21: 1459–1462.
84. Santoriello D, Husain SA, de Serres SA, et al. Donor APOL1 high-risk genotypes are associated with increased risk and inferior prognosis of de novo collapsing glomerulopathy in renal allografts. *Kidney Int* 2018; 94: 1189–1198.
85. O'Toole JF, Bruggeman LA, Madhavan S, et al. The Cell Biology of APOL1. *Semin Nephrol* 2017; 37: 538–545.
86. Ma L, Divers J, Freedman BI. Mechanisms of Injury in APOL1-associated Kidney Disease. *Transplantation* 2019; 103: 487–492.
87. Bruggeman LA, O'Toole JF, Sedor JR. Identifying the Intracellular Function of APOL1. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017; 28: 1008–1011.
88. Friedman DJ, Pollak MR. APOL1 and Kidney Disease: From Genetics to Biology. *Annu Rev Physiol* 2020; 82: 323–342.
89. Daneshpajouhnejad P, Kopp JB, Winkler CA, et al. The evolving story of apolipoprotein L1 nephropathy: the end of the beginning. *Nat Rev Nephrol* 2022; 18: 307–320.
90. Ma L, Chou JW, Snipes JA, et al. APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017; 28: 1093–1105.
91. Chun J, Zhang J-Y, Wilkins MS, et al. Recruitment of APOL1 kidney disease risk variants to lipid droplets attenuates cell toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019; 116: 3712–3721.
92. McNicholas BA, Nelson PJ. Immunity unmasking APOL1 in collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2015; 87: 270–2.
93. Nichols B, Jog P, Lee JH, et al. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. 2015; 87: 332–342.
94. Bruno J, Pozzi N, Oliva J, et al. Apolipoprotein L1 confers pH-switchable ion permeability to phospholipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 2017; 292: 18344–18353.

95. Lan X, Jhaveri A, Cheng K, et al. APOL1 risk variants enhance podocyte necrosis through compromising lysosomal membrane permeability. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2014; 307: F326–F336.
96. Gupta N, Wang X, Wen X, et al. Domain-Specific Antibodies Reveal Differences in the Membrane Topologies of Apolipoprotein L1 in Serum and Podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 31: 2065–2082.
97. Jha A, Kumar V, Haque S, et al. Alterations in plasma membrane ion channel structures stimulate NLRP3 inflammasome activation in APOL1 risk milieu. *FEBS J* 2020; 287: 2000–2022.
98. Zhang J-Y, Wang M, Tian L, et al. UBD modifies APOL1 -induced kidney disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018; 115: 3446–3451.
99. Larsen CP, Bourne TD, Wilson JD, et al. Collapsing Glomerulopathy in a Patient With COVID-19. 2020; 5: 935–939.
100. Watanabe A, Guaragna MS, Belangero VMS, et al. APOL1 in an ethnically diverse pediatric population with nephrotic syndrome: implications in focal segmental glomerulosclerosis and other diagnoses. *Pediatr Nephrol* 2021; 36: 2327–2336.
101. Giudicelli GC, De Souza CMB, Veronese FV, et al. Precision medicine implementation challenges for APOL1 testing in chronic kidney disease in admixed populations. *Front Genet* 2022; 13: 1016341.
102. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* 2015; 5: 9812.
103. Gribouval O, Boyer O, Knebelmann B, et al. APOL1 risk genotype in European steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis patients of different African ancestries. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34: 1885–1893.
104. Alladagbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. *PLoS One* 2018; 13: e0209036.
105. Vajgel G, Lima SC, Santana DJS, et al. Effect of a single apolipoprotein I1 gene nephropathy variant on the risk of advanced lupus nephritis in Brazilians. *Journal of Rheumatology* 2020; 47: 1209–1217.
106. Ashraf S, Gee HY, Woerner S, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest* 2013; 123: 5179–5189.



107. Diomedi-Camassei F, di Giandomenico S, Santorelli FM, et al. *COQ2* Nephropathy: A Newly Described Inherited Mitochondriopathy with Primary Renal Involvement. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18: 2773–2780.
108. Jain NG, Ahram DF, Marasa M, et al. Clinical Real-Time Genome Sequencing to Solve the Complex and Confounded Presentation of a Child With Focal Segmental Glomerulosclerosis and Multiple Malignancies. *Kidney Int Rep* 2022; 7: 2312–2316.
109. Fenaroli P, Rossi GM, Angelotti ML, et al. Collapsing Glomerulopathy as a Complication of Type I Interferon-Mediated Glomerulopathy in a Patient With RNASEH2B-Related Aicardi-Goutières Syndrome. *American Journal of Kidney Diseases* 2021; 78: 750–754.
110. Abid Q, Best Rocha A, Larsen CP, et al. APOL1-Associated Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis in a Patient With Stimulator of Interferon Genes (STING)-Associated Vasculopathy With Onset in Infancy (SAVI). *American Journal of Kidney Diseases* 2020; 75: 287–290.
111. Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, et al. Array-Based Gene Discovery with Three Unrelated Subjects Shows SCARB2/LIMP-2 Deficiency Causes Myoclonus Epilepsy and Glomerulosclerosis. *The American Journal of Human Genetics* 2008; 82: 673–684.
112. Drovandi S, Lipska-Ziętkiewicz BS, Ozaltin F, et al. Variation of the clinical spectrum and genotype-phenotype associations in Coenzyme Q10 deficiency associated glomerulopathy. *Kidney Int* 2022; 102: 592–603.
113. Liakopoulos V, Huerta A, Cohen S, et al. Familial collapsing focal segmental glomerulosclerosis. 2011; 75: 362–368.
114. Barua M, Brown EJ, Charoonratana VT, et al. Mutations in the INF2 gene account for a significant proportion of familial but not sporadic focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2013; 83: 316–322.
115. Gbadegesin RA, Lavin PJ, Hall G, et al. Inverted formin 2 mutations with variable expression in patients with sporadic and hereditary focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2012; 81: 94–99.
116. Cason RK, Williams A, Chryst-Stangl M, et al. Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis in Siblings With Compound Heterozygous Variants in NUP93 Expand the Spectrum of Kidney Phenotypes Associated With Nucleoporin Gene Mutations. *Front Pediatr* 2022; 10: 915174.
117. Nagano C, Hara S, Yoshikawa N, et al. Clinical, Pathological, and Genetic Characteristics in Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney360* 2022; 3: 1384–1393.

118. Braun DA, Lovric S, Schapiro D, et al. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 2018; 128: 4313–4328.
119. Walz G. Slit or pore? A mutation of the ion channel TRPC6 causes FSGS. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1777–1779.
120. Reiser J, Polu KR, Möller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005; 37: 739–744.
121. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, et al. Mutations in INF2 Are a Major Cause of Autosomal Dominant Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 239–245.
122. Song X, Fang X, Tang X, et al. COQ8B nephropathy: Early detection and optimal treatment. *Mol Genet Genomic Med* 2020; 8: e1360.
123. Santin S, Ars E, Rossetti S, et al. TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2009; 24: 3089–3096.
124. Choi HJ, Lee BH, Cho HY, et al. Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. *Am J Kidney Dis* 2008; 51: 834–838.
125. Kakajiwala AK, Meyers KE, Bhatti T, et al. Rapid progression to end-stage renal disease in a child with a sporadic ACTN4 mutation. *Clin Nephrol Case Stud* 2015; 3: 1–5.
126. Henderson JM, Al-Waheeb S, Weins A, et al. Mice with altered alpha-actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. *Kidney Int* 2008; 73: 741–750.
127. Liakopoulos V, Huerta A, Cohen S, et al. Familial collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 2011; 75: 362–368.
128. Colin E, Huynh Cong E, Mollet G, et al. Loss-of-function mutations in WDR73 are responsible for microcephaly and steroid-resistant nephrotic syndrome: Galloway-Mowat syndrome. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 637–648.
129. Avila-Casado MC, Vargas-Alarcon G, Soto ME, et al. Familial collapsing glomerulopathy: clinical, pathological and immunogenetic features. *Kidney Int* 2003; 63: 233–239.
130. Avila-Casado MDC, Perez-Torres I, Auron A, et al. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2004; 66: 133–143.
131. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, et al. Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2150–2158.

132. Zhdanova O, Srivastava S, Di L, et al. The inducible deletion of Droscha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 2011; 80: 719–730.
133. Lynch MR, Tran MT, Parikh SM. PGC1 $\alpha$  in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 314: F1–F8.
134. Li S-Y, Park J, Qiu C, et al. Increasing the level of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  in podocytes results in collapsing glomerulopathy. *JCI Insight* 2017; 2: e92930.
135. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 129–140.
136. He JC, Husain M, Sunamoto M, et al. Nef stimulates proliferation of glomerular podocytes through activation of Src-dependent Stat3 and MAPK1,2 pathways. *J Clin Invest* 2004; 114: 643–651.
137. Nelson PJ, Sunamoto M, Husain M, et al. HIV-1 expression induces cyclin D1 expression and pRb phosphorylation in infected podocytes: cell-cycle mechanisms contributing to the proliferative phenotype in HIV-associated nephropathy. *BMC Microbiol* 2002; 2: 26.
138. Korgaonkar SN, Feng X, Ross MD, et al. HIV-1 upregulates VEGF in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 877–883.
139. Hellwig-Bürigel T, Stiehl DP, Wagner AE, et al. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 2005; 25: 297–310.
140. Merchant ML, Barati MT, Caster DJ, et al. Proteomic Analysis Identifies Distinct Glomerular Extracellular Matrix in Collapsing Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 31: 1883–1904.
141. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604–612.
142. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1832–1843.
143. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int* 2021; 100: S1–S276.
144. Collins RL, Brand H, Karczewski KJ, et al. A structural variation reference for medical and population genetics. *Nature* 2020; 581: 444–451.
145. Naslavsky MS, Yamamoto GL, Almeida TF, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 2017; 38: 751–763.

146. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics* 2020; 75: e1913.
147. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015; 17: 405–424.
148. Alexander DH, Novembre J, Lange K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* 2009; 19: 1655–1664.
149. Almarri MA, Bergström A, Prado-Martinez J, et al. Population Structure, Stratification, and Introgression of Human Structural Variation. *Cell* 2020; 182: 189–199.e15.
150. Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy. *Kidney Int* 2020; 97: 163–174.
151. Sethi S, Madden B, Debiec H, et al. Protocadherin 7–Associated Membranous Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2021; 32: 1249–1261.
152. Lennon R, Byron A, Humphries JD, et al. Global Analysis Reveals the Complexity of the Human Glomerular Extracellular Matrix. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 25: 939–951.
153. Lausecker F, Lennon R, Randles MJ. The kidney matrisome in health, aging, and disease. *Kidney Int* 2022; 102: 1000–1012.
154. Randles MJ, Woolf AS, Huang JL, et al. Genetic Background is a Key Determinant of Glomerular Extracellular Matrix Composition and Organization. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 26: 3021–3034.
155. Hobeika L, Barati MT, Caster DJ, et al. Characterization of glomerular extracellular matrix by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *Kidney Int* 2017; 91: 501–511.
156. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1367–1372.
157. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, et al. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res* 2011; 10: 1794–1805.
158. Pundir S, Martin MJ, O’Donovan C, et al. UniProt Tools. *Curr Protoc Bioinformatics* 2016; 53: 1.29.1–1.29.15.
159. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016; 13: 731–740.

160. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* 2021; 49: D605–D612.
161. Thomas PD, Ebert D, Muruganujan A, et al. <scp>PANTHER</scp>: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. *Protein Science* 2022; 31: 8–22.
162. Oliveros JC (2007-2015). Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn’s diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
163. Kehdy FSG, Gouveia MH, Machado M, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 8696–8701.
164. Kimura L, Ribeiro-Rodrigues EM, de Mello Auricchio MTB, et al. Genomic ancestry of rural African-derived populations from Southeastern Brazil. *Am J Hum Biol* 2013; 25: 35–41.
165. Gontijo CC, Mendes FM, Santos CA, et al. Ancestry analysis in rural Brazilian populations of African descent. *Forensic Sci Int Genet* 2018; 36: 160–166.
166. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). *bioRxiv* 2020; 10: 2020.09.15.298026.
167. de Souza AM, Resende SS, de Sousa TN, et al. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol* 2019; 42: 495–508.
168. Reeves-Daniel AM, Iskandar SS, Bowden DW, et al. Is Collapsing C1q Nephropathy Another MYH9-Associated Kidney Disease? A Case Report. *American Journal of Kidney Diseases* 2010; 55: e21–e24.
169. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308: 1801–1804.
170. Starr MC, Chang IJ, Finn LS, et al. COQ2 nephropathy: a treatable cause of nephrotic syndrome in children. *Pediatr Nephrol* 2018; 33: 1257–1261.
171. Malone AF, Phelan PJ, Hall G, et al. Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2014; 86: 1253–1259.
172. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 961–970.
173. Gribouval O, Boyer O, Hummel A, et al. Identification of genetic causes for sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in adults. *Kidney Int* 2018; 94: 1013–1022.

174. Oka M, Nozu K, Kaito H, et al. Natural history of genetically proven autosomal recessive Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2014; 29: 1535–1544.
175. Morinière V, Dahan K, Hilbert P, et al. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2740–2751.
176. Fallerini C, Dosa L, Tita R, et al. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. *Clin Genet* 2013; 86: 252–257.
177. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 961–970.
178. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *New England Journal of Medicine* 2019; 380: 142–151.
179. Murayama S, Akiyama M, Namba H, et al. Familial cases with MYH9 disorders caused by MYH9 S96L mutation. *Pediatr Int* 2013; 55: 102–104.
180. Han KH, Lee H, Kang HG, et al. Renal manifestations of patients with MYH9-related disorders. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 549–555.
181. Cong EH, Bizet AA, Boyer O, et al. A homozygous missense mutation in the ciliary gene TTC21B causes familial FSGS. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2435–2443.
182. Bullich G, Vargas I, Trujillano D, et al. Contribution of the TTC21B gene to glomerular and cystic kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32: 151–156.
183. Feltran LS, Varela P, Silva ED, et al. Targeted Next-Generation Sequencing in Brazilian Children With Nephrotic Syndrome Submitted to Renal Transplant. *Transplantation* 2017; 101: 2905–2912.
184. Watanabe A. *Patogênese genética-molecular da síndrome nefrótica córtico-resistente, síndrome nefrótica congênita e glomeruloesclerose segmentar e focal: realidade e contribuições da análise de uma população pediátrica brasileira*. Dissertação de Doutorado, University of São Paulo, 2023.
185. Bullich G, Vargas I, Trujillano D, et al. Contribution of the TTC21B gene to glomerular and cystic kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32: 151–156.
186. Cong EH, Bizet AA, Boyer O, et al. A homozygous missense mutation in the ciliary gene TTC21B causes familial FSGS. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2435–2443.
187. Tanaka S, Tanaka T, Kawakami T, et al. Vascular adhesion protein-1 enhances neutrophil infiltration by generation of hydrogen peroxide in renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2017; 92: 154–164.

188. Salmi M, Jalkanen S. Developmental regulation of the adhesive and enzymatic activity of vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in humans. *Blood* 2006; 108: 1555–1561.
189. Ranea-Robles P, Portman K, Bender A, et al. Peroxisomal L-bifunctional Protein Deficiency Causes Male-specific Kidney Hypertrophy and Proximal Tubular Injury in Mice. *Kidney360* 2021; 2: 1441–1454.
190. Makkar RS, Contreras MA, Paintlia AS, et al. Molecular organization of peroxisomal enzymes: Protein–protein interactions in the membrane and in the matrix. *Arch Biochem Biophys* 2006; 451: 128–140.
191. Atta MG, Estrella MM, Kuperman M, et al. HIV-associated nephropathy patients with and without apolipoprotein L1 gene variants have similar clinical and pathological characteristics. *Kidney Int* 2012; 82: 338–343.
192. Caetano ERSP, Zatz R, Saldanha LB, et al. Hypertensive Nephrosclerosis as a Relevant Cause of Chronic Renal Failure. *Hypertension* 2001; 38: 171–176.
193. Liang S, Le W, Liang D, et al. Clinico-pathological characteristics and outcomes of patients with biopsy-proven hypertensive nephrosclerosis: a retrospective cohort study. *BMC Nephrol* 2016; 17: 42.
194. Wang XC, Liu CH, Chen YJ, et al. Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy. *Exp Ther Med* 2013; 6: 1243.
195. Park E, Ahn YH, Kang HG, et al. COQ6 Mutations in Children With Steroid-Resistant Focal Segmental Glomerulosclerosis and Sensorineural Hearing Loss. *Am J Kidney Dis* 2017; 70: 139–144.
196. De Vriese AS, Sethi S, Nath KA, et al. Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29: 759–774.
197. Zee J, McNulty MT, Hodgin JB, et al. APOL1 genotype-associated morphologic changes among patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2021; 36: 2747–2757.
198. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. 2011; 22: 2129–2137.
199. de Ramos BRA, D’Elia MPB, Amador MAT, et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica* 2016; 144: 259–265.
200. Leite TKM, Fonseca RMC, de França NM, et al. Genomic ancestry, self-reported ‘color’ and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 2011; 6: e27162.

201. Laurin LP, Lu M, Mottl AK, et al. Podocyte-associated gene mutation screening in a heterogeneous cohort of patients with sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2014; 29: 2062–2069.
202. Yao T, Udwan K, John R, et al. Integration of Genetic Testing and Pathology for the Diagnosis of Adults with FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019; 14: 213–223.
203. Dietrich A, Matejas V, Bitzan M, et al. Analysis of genes encoding laminin beta2 and related proteins in patients with Galloway-Mowat syndrome. *Pediatr Nephrol* 2008; 23: 1779–1786.
204. Matejas V, Hinkes B, Alkandari F, et al. Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2010; 31: 992–1002.
205. Heeringa SF, Möller CC, Du J, et al. A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One* 2009; 4: e7771.
206. S S, E A, S R, et al. TRPC6 mutational analysis in a large cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3089–3096.
207. Dietrich A, Chubanov V, Gudermann T. Renal TRP channels. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 736–744.
208. Zhu B, Chen N, Wang Z hui, et al. Identification and functional analysis of a novel TRPC6 mutation associated with late onset familial focal segmental glomerulosclerosis in Chinese patients. *Mutat Res* 2009; 664: 84–90.
209. Sun LW, Sun L, Wang P, et al. [Four cases of nephrotic syndrome with TRPC6 gene variations and literature review]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2021; 59: 223–227.
210. Gigante M, Caridi G, Montemurno E, et al. TRPC6 mutations in children with steroid-resistant nephrotic syndrome and atypical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 1626–1634.
211. Tabibzadeh N, Fleury D, Labatut D, et al. MYH9-related disorders display heterogeneous kidney involvement and outcome. *Clin Kidney J* 2018; 12: 494–502.
212. Sellers JR. Myosins: a diverse superfamily. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1496: 3–22.
213. Johnstone DB, Zhang J, George B, et al. Podocyte-specific deletion of Myh9 encoding nonmuscle myosin heavy chain 2A predisposes mice to glomerulopathy. *Mol Cell Biol* 2011; 31: 2162–2170.
214. Davis EE, Zhang Q, Liu Q, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet* 2011; 43: 189–196.



215. Hibino S, Morisada N, Takeda A, et al. Medullary Cystic Kidney Disease and Focal Segmental Glomerulosclerosis Caused by a Compound Heterozygous Mutation in TTC21B. *Intern Med* 2020; 59: 1735–1738.
216. Zhang H, Su B, Liu X, et al. Mutations in TTC21B cause different phenotypes in two childhood cases in China. *Nephrology (Carlton)* 2018; 23: 371–376.
217. Yubero D, Montero R, Santos-Ocaña C, et al. Molecular diagnosis of coenzyme Q 10 deficiency: an update. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18: 491–498.
218. Eroglu FK, Ozaltin F, Gönç N, et al. Response to Early Coenzyme Q10 Supplementation Is not Sustained in CoQ10 Deficiency Caused by CoQ2 Mutation. *Pediatr Neurol* 2018; 88: 71–74.
219. Barisoni L, Diomedi-Camassei F, Santorelli FM, et al. Collapsing glomerulopathy associated with inherited mitochondrial injury. *Kidney Int* 2008; 74: 237–243.
220. Wing MR, Snyder JT, Sondek J, et al. Direct activation of phospholipase C-epsilon by Rho. *J Biol Chem* 2003; 278: 41253–41258.
221. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, et al. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *J Med Genet* 2010; 47: 445–452.
222. Yu S, Choi W il, Choi YJ, et al. PLCE1 regulates the migration, proliferation, and differentiation of podocytes. *Exp Mol Med* 2020; 52: 594–603.
223. Kari JA, Montini G, Bockenbauer D, et al. Clinico-pathological correlations of congenital and infantile nephrotic syndrome over twenty years. *Pediatr Nephrol* 2014; 29: 2173–2180.
224. Gbadegesin R, Bartkowiak B, Lavin PJ, et al. Exclusion of homozygous PLCE1 (NPHS3) mutations in 69 families with idiopathic and hereditary FSGS. *Pediatr Nephrol* 2009; 24: 281–285.
225. Eichinger A, Ponsel S, Bergmann C, et al. Cyclosporine A responsive congenital nephrotic syndrome with single heterozygous variants in NPHS1, NPHS2, and PLCE1. *Pediatr Nephrol* 2018; 33: 1269–1272.
226. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006; 38: 1397–1405.
227. Mulukala SKN, Nishad R, Kolligundla LP, et al. In silico Structural characterization of podocin and assessment of nephrotic syndrome-associated podocin mutants. *IUBMB Life* 2016; 68: 578–588.
228. Guaragna MS, Lutaif ACGB, Maciel-Guerra AT, et al. NPHS2 Mutations: A Closer Look to Latin American Countries. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 7518789.

229. Yu SM-W, Nissaisorakarn P, Husain I, et al. Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach. *Front Med (Lausanne)* 2018; 5: 221.
230. Rood IM, Deegens JKJ, Lugtenberg D, et al. Nephrotic Syndrome With Mutations in NPHS2: The Role of R229Q and Implications for Genetic Counseling. *Am J Kidney Dis* 2019; 73: 400–403.
231. Rood IM, Deegens JKJ, Wetzels JFM. Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 882–890.
232. Mikó Á, K. Menyhárd D, Kaposi A, et al. The mutation-dependent pathogenicity of NPHS2 p.R229Q: A guide for clinical assessment. *Hum Mutat* 2018; 39: 1854–1860.
233. Gribouval O, Boyer O, Knebelmann B, et al. APOL1 risk genotype in European steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis patients of different African ancestries. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2019; 34: 1885–1893.
234. Pulkkinen L, Rouan F, Bruckner-Tuderman L, et al. Novel ITGB4 mutations in lethal and nonlethal variants of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: missense versus nonsense. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1376–1387.
235. Kambham N, Tanji N, Seigle RL, et al. Congenital focal segmental glomerulosclerosis associated with  $\beta 4$  integrin mutation and epidermolysis bullosa. *American Journal of Kidney Diseases* 2000; 36: 190–196.
236. Li AS, Ingham JF, Lennon R. Genetic Disorders of the Glomerular Filtration Barrier. *Clin J Am Soc Nephrol* 2020; 15: 1818–1828.
237. Braun DA, Warejko JK, Ashraf S, et al. Genetic variants in the LAMA5 gene in pediatric nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34: 485–493.
238. Falcone S, Nicol T, Bleasdale A, et al. A novel model of nephrotic syndrome results from a point mutation in Lama5 and is modified by genetic background. *Kidney Int* 2022; 101: 527–540.
239. Chatterjee R, Hoffman M, Cliften P, et al. Targeted exome sequencing integrated with clinicopathological information reveals novel and rare mutations in atypical, suspected and unknown cases of Alport syndrome or proteinuria. *PLoS One* 2013; 8: e76360.
240. Voskarides K, Papagregoriou G, Hadjipanagi D, et al. COL4A5 and LAMA5 variants co-inherited in familial hematuria: digenic inheritance or genetic modifier effect? *BMC Nephrol* 2018; 19: 114.
241. Trautmann A, Lipska-Ziętkiewicz BS, Schaefer F. Exploring the Clinical and Genetic Spectrum of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome: The PodoNet Registry. *Front Pediatr* 2018; 6: 200.

242. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet* 2011; 89: 139–147.
243. Thakor JM, Parmar G, Mistry KN, et al. Mutational landscape of TRPC6, WT1, LMX1B, APOL1, PTPRO, PMM2, LAMB2 and WT1 genes associated with Steroid resistant nephrotic syndrome. *Mol Biol Rep* 2021; 48: 7193–7201.
244. Zhu B, Cao A, Li J, et al. Disruption of MAGI2-RapGEF2-Rap1 signaling contributes to podocyte dysfunction in congenital nephrotic syndrome caused by mutations in MAGI2. *Kidney Int* 2019; 96: 642–655.
245. Bierzynska A, Soderquest K, Dean P, et al. MAGI2 mutations cause congenital nephrotic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 2017; 28: 1614–1621.
246. Jobst-Schwan T, Hoogstraten CA, Kolvenbach CM, et al. Corticosteroid treatment exacerbates nephrotic syndrome in a zebrafish model of magi2a knockout. *Kidney Int* 2019; 95: 1079–1090.
247. Ashraf S, Kudo H, Rao J, et al. Mutations in six nephrosis genes delineate a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun* 2018; 9: 1960.
248. Athieniti E, Spyrou GM. A guide to multi-omics data collection and integration for translational medicine. *Comput Struct Biotechnol J* 2023; 21: 134–149.
249. Park DI. Genomics, transcriptomics, proteomics and big data analysis in the discovery of new diagnostic markers and targets for therapy development. pp. 61–90.
250. Sampson MG, Fox CS. Introduction to Genomics of Kidney Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 15: 267–267.
251. Dubin RF, Rhee EP. Proteomics and Metabolomics in Kidney Disease, including Insights into Etiology, Treatment, and Prevention. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 15: 404–411.
252. Winter M, Tholey A, Kristen A, et al. MALDI Mass Spectrometry Imaging: A Novel Tool for the Identification and Classification of Amyloidosis. *Proteomics* 2017; 17: 1700236.
253. Rinschen MM, Benzing T, Limbutara K, et al. Proteomic analysis of the kidney filtration barrier-Problems and perspectives. *Proteomics Clin Appl* 2015; 9: 1053–1068.
254. Rinschen MM, Saez-Rodriguez J. The tissue proteome in the multi-omic landscape of kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17: 205–219.
255. Rovin BH, Klein JB. Proteomics and autoimmune kidney disease. *Clinical Immunology* 2015; 161: 23–30.

256. Mondal S, Singh MP, Kumar A, et al. Rapid Molecular Evaluation of Human Kidney Tissue Sections by In Situ Mass Spectrometry and Machine Learning to Classify the Nephrotic Syndrome. *J Proteome Res* 2023; 22: 967–976.
257. Sethi S, Vrana JA, Theis JD, et al. Laser microdissection and mass spectrometry–based proteomics aids the diagnosis and typing of renal amyloidosis. *Kidney Int* 2012; 82: 226–234.
258. Sethi S, Theis JD, Vrana JA, et al. Laser Microdissection and Proteomic Analysis of Amyloidosis, Cryoglobulinemic GN, Fibrillary GN, and Immunotactoid Glomerulopathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2013; 8: 915–921.
259. Alsharhan L, Beck LH. Membranous Nephropathy: Core Curriculum 2021. *Am J Kidney Dis* 2021; 77: 440–453.
260. Andeen NK, Yang H-Y, Dai D-F, et al. DnaJ Homolog Subfamily B Member 9 Is a Putative Autoantigen in Fibrillary GN. *Journal of the American Society of Nephrology* 2018; 29: 231–239.
261. Breitkopf DM, Jankowski V, Ohl K, et al. The YB-1:Notch-3 axis modulates immune cell responses and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 2020; 97: 289–303.
262. Dias R, Hasparyk UG, Lopes MP, et al. Novel Biomarkers for Lupus Nephritis in the “OMICS” Era. *Curr Med Chem* 2021; 28: 6011–6044.
263. Sethi S, Quint PS, O’Seaghdha CM, et al. C4 Glomerulopathy: A Disease Entity Associated With C4d Deposition. *American Journal of Kidney Diseases* 2016; 67: 949–953.
264. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, et al. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016; 97: 4–27.
265. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 786–801.
266. Cox TR, Ertler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* 2011; 4: 165–178.
267. Fane M, Weeraratna AT. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 89–106.
268. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J* 2021; 288: 6850–6912.
269. Lu P, Takai K, Weaver VM, et al. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3: a005058–a005058.

270. Hynes RO. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science (1979)* 2009; 326: 1216–1219.
271. Apte SS, Naba A. Beyond the matrisome: New frontiers in ECM research. *Matrix Biology* 2023; 115: 133–138.
272. Lausecker F, Lennon R, Randles MJ. The kidney matrisome in health, aging, and disease. *Kidney Int* 2022; 102: 1000–1012.
273. Nakatani S, Wei M, Ishimura E, et al. Proteome analysis of laser microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded kidneys of autopsies of diabetic patients: nephrin is associated with the development of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2012; 27: 1889–1897.
274. Hobeika L, Barati MT, Caster DJ, et al. Characterization of glomerular extracellular matrix by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *Kidney Int* 2017; 91: 501–511.
275. Lennon R, Byron A, Humphries JD, et al. Global Analysis Reveals the Complexity of the Human Glomerular Extracellular Matrix. *Journal of the American Society of Nephrology* 2014; 25: 939–951.
276. Randles MJ, Woolf AS, Huang JL, et al. Genetic Background is a Key Determinant of Glomerular Extracellular Matrix Composition and Organization. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015; 26: 3021–3034.
277. Paunas FTI, Finne K, Leh S, et al. Characterization of glomerular extracellular matrix in IgA nephropathy by proteomic analysis of laser-captured microdissected glomeruli. *BMC Nephrol* 2019; 20: 410.
278. Sellin L, Huber TB, Gerke P, et al. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 2003; 17: 115–7.
279. Harita Y, Kurihara H, Kosako H, et al. Neph1, a component of the kidney slit diaphragm, is tyrosine-phosphorylated by the Src family tyrosine kinase and modulates intracellular signaling by binding to Grb2. *J Biol Chem* 2008; 283: 9177–86.
280. Garg P, Verma R, Nihalani D, et al. Neph1 cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8698–712.
281. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4829–36.
282. Solanki AK, Widmeier E, Arif E, et al. Mutations in KIRREL1, a slit diaphragm component, cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2019; 96: 883–889.
283. Reintamm T, Aas-Valleriani N, Kelve M. Evolutionary distribution of deoxynucleoside 5-monophosphate N-glycosidase, DNPH1. *Gene* 2019; 683: 1–11.

284. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347: 1260419.
285. Park YM, Ha E, Gu K-N, et al. Host Genetic and Gut Microbial Signatures in Familial Inflammatory Bowel Disease. *Clin Transl Gastroenterol* 2020; 11: e00213.
286. Thomson R, Finkelstein A. Human trypanolytic factor APOL1 forms pH-gated cation-selective channels in planar lipid bilayers: Relevance to trypanosome lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 2894–2899.
287. Heneghan JF, Vondorp DH, Shmukler BE, et al. BH3 domain-independent apolipoprotein L1 toxicity rescued by BCL2 prosurvival proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2015; 309: C332–C347.
288. Chen L, Liu J-F, Lu Y-, et al. Complement C1q (C1qA, C1qB, and C1qC) May Be a Potential Prognostic Factor and an Index of Tumor Microenvironment Remodeling in Osteosarcoma. *Front Oncol* 2021; 11: 642144.
289. Bulla R, Tripodo C, Rami D, et al. C1q acts in the tumour microenvironment as a cancer-promoting factor independently of complement activation. *Nat Commun* 2016; 7: 10346.
290. Frost KL, Jilek JL, Thompson AD, et al. Increased Renal Expression of Complement Components in Patients With Liver Diseases: Nonalcoholic Steatohepatitis, Alcohol-Associated, Viral Hepatitis, and Alcohol-Viral Combination. *Toxicological Sciences* 2022; 189: 62–72.
291. Papp A, Papp K, Uzonyi B, et al. Complement Factor H-Related Proteins FHR1 and FHR5 Interact With Extracellular Matrix Ligands, Reduce Factor H Regulatory Activity and Enhance Complement Activation. *Front Immunol* 2022; 13: 845953.
292. Józsi M, Tortajada A, Uzonyi B, et al. Factor H-related proteins determine complement-activating surfaces. *Trends Immunol* 2015; 36: 374–384.
293. McGowan SE. Mechanisms of Extracellular Matrix Proteoglycan Degradation by Human Neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990; 2: 271–279.
294. de Castro Brás LE, Frangogiannis NG. Extracellular matrix-derived peptides in tissue remodeling and fibrosis. *Matrix Biology* 2020; 91–92: 176–187.
295. Jerke U, Hernandez DP, Beaudette P, et al. Neutrophil serine proteases exert proteolytic activity on endothelial cells. *Kidney Int* 2015; 88: 764–775.

296. Iacoviello L, Kolpakov V, Salvatore L, et al. Human Endothelial Cell Damage by Neutrophil-Derived Cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2037–2046.
297. Rosa RM, Colucci JA, Yokota R, et al. Alternative pathways for angiotensin II production as an important determinant of kidney damage in endotoxemia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2016; 311: F496–F504.
298. Rykl J, Thiemann J, Kurzawski S, et al. Renal cathepsin G and angiotensin II generation. *J Hypertens* 2006; 24: 1797–1807.
299. Shimoda N, Fukazawa N, Nonomura K, et al. Cathepsin G Is Required for Sustained Inflammation and Tissue Injury after Reperfusion of Ischemic Kidneys. *Am J Pathol* 2007; 170: 930–940.
300. Tati R, Kristoffersson A-C, Manea Hedström M, et al. Neutrophil Protease Cleavage of Von Willebrand Factor in Glomeruli – An Anti-thrombotic Mechanism in the Kidney. *EBioMedicine* 2017; 16: 302–311.
301. Morita M, Hashimoto O. Identification and expression of the medaka inhibin  $\beta$ E subunit. *Mol Biol Rep* 2019; 46: 1603–1609.
302. Namwanje M, Brown CW. Activins and Inhibins: Roles in Development, Physiology, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8: a021881.
303. Dombroski BA, Nayak RR, Ewens KG, et al. Gene Expression and Genetic Variation in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Human Cells. *The American Journal of Human Genetics* 2010; 86: 719–729.
304. Deaton AM, Dubey A, Ward LD, et al. Rare loss of function variants in the hepatokine gene INHBE protect from abdominal obesity. *Nat Commun* 2022; 13: 4319.
305. Akbari P, Sosina OA, Bovijn J, et al. Multiancestry exome sequencing reveals INHBE mutations associated with favorable fat distribution and protection from diabetes. *Nat Commun* 2022; 13: 4844.
306. Wang L, Gu W, Ni H. Construction of a prognostic value model in papillary renal cell carcinoma by immune-related genes. *Medicine* 2021; 100: e24903.
307. Sethi S, Zand L, de Vriese AS, et al. Complement activation in pauci-immune necrotizing and crescentic glomerulonephritis: results of a proteomic analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2017; 32: i139–i145.
308. Trivioli G, Marquez A, Martorana D, et al. Genetics of ANCA-associated vasculitis: role in pathogenesis, classification and management. *Nat Rev Rheumatol* 2022; 18: 559–574.

309. Everts-Graber J, Martin KR, Thieblemont N, et al. Proteomic analysis of neutrophils in ANCA-associated vasculitis reveals a dysregulation in proteinase 3-associated proteins such as annexin-A1 involved in apoptotic cell clearance. *Kidney Int* 2019; 96: 397–408.
310. Cheung P, Schaffert S, Chang SE, et al. Repression of CTSG, ELANE and PRTN3-mediated histone H3 proteolytic cleavage promotes monocyte-to-macrophage differentiation. *Nat Immunol* 2021; 22: 711–722.
311. Hu D, Ansari D, Zhou Q, et al. Low P4HA2 and high PRTN3 expression predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Scand J Gastroenterol* 2019; 54: 246–251.
312. Wei Z, Wu B, Wang L, et al. A large-scale transcriptome analysis identified ELANE and PRTN3 as novel methylation prognostic signatures for clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Physiol* 2020; 235: 2582–2589.
313. Barraclough R. Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1998; 1448: 190–199.
314. Okada H, Danoff TM, Kalluri R, et al. Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1997; 273: F563–F574.
315. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 540–51.
316. Meng X, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12: 325–338.
317. Wen J, Jiao B, Tran M, et al. Pharmacological Inhibition of S100A4 Attenuates Fibroblast Activation and Renal Fibrosis. *Cells* 2022; 11: 2762.
318. Nakatani K, Asai O, Konishi N, et al. Role of fibroblast specific protein 1 expression in the progression of adriamycin-induced glomerulosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2021; 567: 148–153.
319. Samejima K, Nakatani K, Suzuki D, et al. Clinical Significance of Fibroblast-Specific Protein-1 Expression on Podocytes in Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 2011; 120: c1–c7.
320. Kishore U, Reid KBM. C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 2000; 49: 159–170.
321. Lubbers R, Beart-van de Voorde LJJ, van Leeuwen K, et al. Complex medical history of a patient with a compound heterozygous mutation in C1QC. *Lupus* 2019; 28: 1255–1260.



322. Kelly KJ, Liu Y, Zhang J, et al. Renal C3 Complement Component: Feed Forward to Diabetic Kidney Disease. *Am J Nephrol* 2015; 41: 48–56.
323. Patra PK, Banday AZ, Nisar R, et al. Persistent skin ulceration - First manifestation of lupus in a child with novel homozygous deletion in C1QC gene. *Australas J Dermatol* 2023; 64: e107–e108.
324. Mangogna A, Belmonte B, Agostinis C, et al. Prognostic Implications of the Complement Protein C1q in Gliomas. *Front Immunol* 2019; 10: 2366.
325. Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, et al. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol* 2013; 56: 170–180.
326. Skerka C, Pradel G, Halder LD, et al. Factor H-related protein 1: a complement regulatory protein and guardian of necrotic-type surfaces. *Br J Pharmacol* 2021; 178: 2823–2831.
327. Li X, Zong J, Si S. Complement Factor H related protein 1 and immune inflammatory disorders. *Mol Immunol* 2022; 145: 43–49.
328. Zipfel PF, Wiech T, Stea ED, et al. CFHR Gene Variations Provide Insights in the Pathogenesis of the Kidney Diseases Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2020; 31: 241–256.
329. Kishnani PS, Sun B, Koeberl DD. Gene therapy for glycogen storage diseases. *Hum Mol Genet* 2019; 28: R31–R41.
330. Stepien KM, Hendriksz CJ, Roberts M, et al. Observational clinical study of 22 adult-onset Pompe disease patients undergoing enzyme replacement therapy over 5years. *Mol Genet Metab* 2016; 117: 413–418.
331. Unnisa Z, Yoon JK, Schindler JW, et al. Gene Therapy Developments for Pompe Disease. *Biomedicines* 2022; 10: 302.
332. Halldorson J, Kazi Z, Mekeel K, et al. Successful combined liver/kidney transplantation from a donor with Pompe disease. *Mol Genet Metab* 2015; 115: 141–144.
333. Takaishi M, Makino T, Morohashi M, et al. Identification of Human Hornerin and Its Expression in Regenerating and Psoriatic Skin. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 4696–4703.
334. Fleming JM, Ginsburg E, Oliver SD, et al. Hornerin, an S100 family protein, is functional in breast cells and aberrantly expressed in breast cancer. *BMC Cancer* 2012; 12: 266.
335. Gutknecht MF, Seaman ME, Ning B, et al. Identification of the S100 fused-type protein hornerin as a regulator of tumor vascularity. *Nat Commun* 2017; 8: 552.

336. Fu S-J, Shen S-L, Li S-Q, et al. Hornerin promotes tumor progression and is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2018; 18: 815.
337. Choi J, Kim D-I, Kim J, et al. Hornerin Is Involved in Breast Cancer Progression. *J Breast Cancer* 2016; 19: 142.
338. Henry J, Hsu C-Y, Haftek M, et al. Hornerin is a component of the epidermal cornified cell envelopes. *The FASEB Journal* 2011; 25: 1567–1576.
339. Pippin JW, Durvasula R, Petermann A, et al. DNA damage is a novel response to sublytic complement C5b-9–induced injury in podocytes. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 877–885.
340. Bruno V, Mühlig AK, Oh J, et al. New insights into the immune functions of podocytes: the role of complement. *Mol Cell Pediatr* 2023; 10: 3.
341. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int* 2016; 89: 1221–1230.
342. Oliveira J, Gruber A, Cardoso M, et al. LAMA2 gene mutation update: Toward a more comprehensive picture of the laminin- $\alpha$ 2 variome and its related phenotypes. *Hum Mutat* 2018; 39: 1314–1337.
343. Vijayan P, Hack S, Yao T, et al. LAMA2 and LOXL4 are candidate FSGS genes. *BMC Nephrol* 2021; 22: 320.
344. Fabris A, Bruschi M, Santucci L, et al. Proteomic-based research strategy identified laminin subunit alpha 2 as a potential urinary-specific biomarker for the medullary sponge kidney disease. *Kidney Int* 2017; 91: 459–468.
345. Liang J, Li H, Han J, et al. Mex3a interacts with LAMA2 to promote lung adenocarcinoma metastasis via PI3K/AKT pathway. *Cell Death Dis* 2020; 11: 614.
346. Jhunjhunwala S, Jiang Z, Stawiski EW, et al. Diverse modes of genomic alteration in hepatocellular carcinoma. *Genome Biol* 2014; 15: 436.
347. Januchowski R, Zawierucha P, Ruciński M, et al. Microarray-based detection and expression analysis of extracellular matrix proteins in drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Oncol Rep* 2014; 32: 1981–90.
348. Strassheim D, Renner B, Panzer S, et al. IgM Contributes to Glomerular Injury in FSGS. *Journal of the American Society of Nephrology* 2013; 24: 393–406.
349. Huang J, Cui Z, Gu Q, et al. Complement activation profile of patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One* 2020; 15: e0234934.

350. Zhang Y, Gu Q, Huang J, et al. Clinical Significance of IgM and C3 Glomerular Deposition in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2016; 11: 1582–1589.
351. Khalili M, Bonnefoy A, Genest DS, et al. Clinical Use of Complement, Inflammation, and Fibrosis Biomarkers in Autoimmune Glomerulonephritis. *Kidney Int Rep* 2020; 5: 1690–1699.
352. van de Lest NA, Zandbergen M, Wolterbeek R, et al. Glomerular C4d deposition can precede the development of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2019; 96: 738–749.
353. Liu J, Xie J, Zhang X, et al. Serum C3 and Renal Outcome in Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Sci Rep* 2017; 7: 4095.
354. Zhang M, Huang J, Zhang Y, et al. Complement activation products in the circulation and urine of primary membranous nephropathy. *BMC Nephrol* 2019; 20: 313.
355. Trachtman H, Laskowski J, Lee C, et al. Natural antibody and complement activation characterize patients with idiopathic nephrotic syndrome. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2021; 321: F505–F516.
356. Genest DS, Bonnefoy A, Khalili M, et al. Comparison of Complement Pathway Activation in Autoimmune Glomerulonephritis. *Kidney Int Rep* 2022; 7: 1027–1036.
357. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, et al. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 51–61.
358. Bariéty J, Nochy D, Mandet C, et al. Podocytes undergo phenotypic changes and express macrophagic-associated markers in idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 1998; 53: 918–925.
359. Eymael J, Sharma S, Loeven MA, et al. CD44 is required for the pathogenesis of experimental crescentic glomerulonephritis and collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2018; 93: 626–642.
360. Chebotareva N, Vinogradov A, Tsoy L, et al. CD44 Expression in Renal Tissue Is Associated with an Increase in Urinary Levels of Complement Components in Chronic Glomerulopathies. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 7190.
361. Chan GC, Eng DG, Miner JH, et al. Differential expression of parietal epithelial cell and podocyte extracellular matrix proteins in focal segmental glomerulosclerosis and diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2019; 317: F1680–F1694.

362. Smeets B, Kuppe C, Sicking E-M, et al. Parietal Epithelial Cells Participate in the Formation of Sclerotic Lesions in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2011; 22: 1262–1274.
363. Barisoni L, Nelson PJ. Collapsing glomerulopathy: an inflammatory podocytopathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 192–5.
364. Roca N, Madrid A, Lopez M, et al. Multidimensional inflammatory and immunological endotypes of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and their association with treatment outcomes. *Clin Kidney J* 2021; 14: 1826–1834.
365. Kapojos JJ, Poelstra K, Borghuis T, et al. Regulation of Plasma Hemopexin Activity by Stimulated Endothelial or Mesangial Cells. *Nephron Physiol* 2004; 96: p1–p10.
366. Peng Z, Mao J, Chen X, et al. Serum suPAR levels help differentiate steroid resistance from steroid-sensitive nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology* 2015; 30: 301–307.
367. Zhai S, Sun B, Zhang Y, et al. IL-17 aggravates renal injury by promoting podocyte injury in children with primary nephrotic syndrome. *Exp Ther Med* 2020; 20: 409–417.
368. Wang L, Li Q, Wang L, et al. The Role of Th17/IL-17 in the Pathogenesis of Primary Nephrotic Syndrome in Children. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37: 332–345.
369. Chung C-F, Kitzler T, Kachurina N, et al. Intrinsic tumor necrosis factor- $\alpha$  pathway is activated in a subset of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One* 2019; 14: e0216426.
370. Youssef DM, El-Shal AS, Hussein S, et al. Tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms and haplotypes in Egyptian children with nephrotic syndrome. *Cytokine* 2018; 102: 76–82.
371. Bruggeman LA, Drawz PE, Kahoud N, et al. TNFR2 interposes the proliferative and NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response by podocytes to TNF- $\alpha$ . *Laboratory Investigation* 2011; 91: 413–425.
372. Campbell RE, Thurman JM. The Immune System and Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2022; 17: 1823–1834.
373. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2016; 11: 137–154.
374. Benz K, Büttner M, Dittrich K, et al. Characterisation of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology* 2010; 25: 1291–1298.
375. Hotta O, Yusa N, Kitamura H, et al. Urinary macrophages as activity markers of renal injury. *Clin Chim Acta* 2000; 297: 123–33.

376. François H, Chatziantoniou C. Renal fibrosis: Recent translational aspects. *Matrix Biology* 2018; 68–69: 318–332.
377. Huang A, Guo G, Yu Y, et al. The roles of collagen in chronic kidney disease and vascular calcification. *J Mol Med* 2021; 99: 75–92.
378. Black LM, Lever JM, Agarwal A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2019; 67: 663–681.
379. Eddy AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011)* 2014; 4: 2–8.
380. Jandl K, Mutgan AC, Eller K, et al. The basement membrane in the cross-roads between the lung and kidney. *Matrix Biology* 2022; 105: 31–52.
381. Büyükbabani N, Droz D. Distribution of the extracellular matrix components in human glomerular lesions. *J Pathol* 1994; 172: 199–207.
382. Bülow RD, Boor P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2019; 67: 643–661.
383. Zakiyanov O, Kalousová M, Zima T, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in kidney disease. pp. 141–212.
384. Wang X, Chen J, Xu J, et al. The Role of Macrophages in Kidney Fibrosis. *Front Physiol* 2021; 12: 705838.
385. Nikolic-Paterson DJ, Wang S, Lan HY. Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms. *Kidney Int Suppl (2011)* 2014; 4: 34–38.
386. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol* 2020; 11: 1142.
387. Shiiki H, Nishino T, Uyama H, et al. Alterations in extracellular matrix components and integrins in patients with preeclamptic nephropathy. *Virchows Arch* 1996; 427: 567–73.
388. Cai YI, Sich M, Beziau A, et al. Collagen distribution in focal and segmental glomerulosclerosis: an immunofluorescence and ultrastructural immunogold study. *J Pathol* 1996; 179: 188–96.
389. Floege J, Alpers CE, Burns MW, et al. Glomerular cells, extracellular matrix accumulation, and the development of glomerulosclerosis in the remnant kidney model. *Lab Invest* 1992; 66: 485–97.
390. Campbell RE, Thurman JM. The Immune System and Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2022; 17: 1823–1834.

391. Edeling M, Ragi G, Huang S, et al. Developmental signalling pathways in renal fibrosis: the roles of Notch, Wnt and Hedgehog. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12: 426–439.
392. Sciascia S, Cozzi M, Barinotti A, et al. Renal Fibrosis in Lupus Nephritis. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 14317.
393. Morgado-Pascual JL, Suarez-Alvarez B, Marchant V, et al. Type IV Collagen and SOX9 Are Molecular Targets of BET Inhibition in Experimental Glomerulosclerosis. *Int J Mol Sci* 2022; 24: 486.
394. Zhang X, Zhou Y, Yu X, et al. Differential Roles of Cysteiny Cathepsins in TGF- $\beta$  Signaling and Tissue Fibrosis. *iScience* 2019; 19: 607–622.
395. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, et al. Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells* 2019; 8: 264.
396. Yang L, Lu P, Yang X, et al. Annexin A3, a Calcium-Dependent Phospholipid-Binding Protein: Implication in Cancer. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 716415.

*Anexos*

## 9. ANEXOS

### TABELAS

**Tabela Anexa 1.** Lista dos genes correspondentes às proteínas identificadas no proteoma do estudo atual.

**Tabela Anexa 2.** Lista dos genes correspondentes às proteínas identificadas em cada grupo de pacientes.

**Tabela Anexa 3.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GAR e CTRL.

**Tabela Anexa 4.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GBR e CTRL.

**Tabela Anexa 5.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GAR e GESF-NOS.

**Tabela Anexa 6.** Proteínas do Matrissoma do estudo.

### FIGURAS

**Figura Anexa 1.** Volcano plot mostrando proteínas com diferença de abundância entre os grupos.

**Figura Anexa 2.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos CTRL x GAR.

**Figura Anexa 3.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos CTRL x GBR.

**Figura Anexa 4.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR x GESF-NOS.

### PUBLICAÇÕES

Artigos publicados ou em revisão relacionados à tese



## TABELAS ANEXAS

**Tabela Anexa 1.** Lista dos genes correspondentes às proteínas identificadas no proteoma do estudo atual..

<i>A1BG</i>	<i>A2M</i>	<i>ABHD10</i>	<i>ABHD14B</i>	<i>ACAA2</i>	<i>ACADM</i>	<i>ACADVL</i>	<i>ACAT1</i>
<i>ACO1</i>	<i>ACO2</i>	<i>ACOT1</i>	<i>ACP1</i>	<i>ACSM2A</i>	<i>ACSM2B</i>	<i>ACTC1</i>	<i>ACTG1</i>
<i>ACTN1</i>	<i>ACTN4</i>	<i>ACTR1A</i>	<i>ACTR2</i>	<i>ACTR3</i>	<i>ACY1</i>	<i>ADD1</i>	<i>ADD3</i>
<i>ADH1B</i>	<i>ADH5</i>	<i>AGRN</i>	<i>AGT</i>	<i>AHCY</i>	<i>AHNAK</i>	<i>AHSG</i>	<i>AIF1L</i>
<i>AIFM1</i>	<i>AK1</i>	<i>AK2</i>	<i>AK3</i>	<i>AKAP12</i>	<i>AKR1A1</i>	<i>AKR1C3</i>	<i>AKR7A2</i>
<i>AKR7A3</i>	<i>ALAD</i>	<i>ALB</i>	<i>ALDH1A1</i>	<i>ALDH1A2</i>	<i>ALDH1L1</i>	<i>ALDH2</i>	<i>ALDH4A1</i>
<i>ALDH6A1</i>	<i>ALDH7A1</i>	<i>ALDH9A1</i>	<i>ALDOA</i>	<i>ALDOB</i>	<i>ALDOC</i>	<i>ALYREF</i>	<i>AMBP</i>
<i>ANK1</i>	<i>ANP32A</i>	<i>ANPEP</i>	<i>ANXA1</i>	<i>ANXA11</i>	<i>ANXA2</i>	<i>ANXA4</i>	<i>ANXA5</i>
<i>ANXA6</i>	<i>ANXA7</i>	<i>AOC3</i>	<i>AP1B1</i>	<i>AP2A1</i>	<i>AP2B1</i>	<i>AP2M1</i>	<i>AP2S1</i>
<i>APCS</i>	<i>APEX1</i>	<i>APMAP</i>	<i>APOA1</i>	<i>APOA2</i>	<i>APOA4</i>	<i>APOB</i>	<i>APOC3</i>
<i>APOE</i>	<i>APOH</i>	<i>APPL1</i>	<i>APRT</i>	<i>AQP1</i>	<i>ARCNI</i>	<i>ARF1</i>	<i>ARF4</i>
<i>ARF6</i>	<i>ARG1</i>	<i>ARHGAP1</i>	<i>ARHGDIA</i>	<i>ARHGDIB</i>	<i>ARL6IP5</i>	<i>ARPC1A</i>	<i>ARPC1B</i>
<i>ARPC2</i>	<i>ARPC3</i>	<i>ARPC4</i>	<i>ASS1</i>	<i>ATIC</i>	<i>ATL3</i>	<i>ATP1A1</i>	<i>ATP1B1</i>
<i>ATP2A2</i>	<i>ATP5A1</i>	<i>ATP5B</i>	<i>ATP5C1</i>	<i>ATP5O</i>	<i>ATP6V1A</i>	<i>ATP6V1B2</i>	<i>AZGP1</i>
<i>B2M</i>	<i>BANF1</i>	<i>BCAM</i>	<i>BDH2</i>	<i>BHMT</i>	<i>BHMT2</i>	<i>BLVRA</i>	<i>BLVRB</i>
<i>C11orf54</i>	<i>C14orf166</i>	<i>C1QBP</i>	<i>C1QC</i>	<i>C3</i>	<i>C4A</i>	<i>C4B</i>	<i>C4BPA</i>
<i>C5</i>	<i>C6</i>	<i>C7</i>	<i>C8A</i>	<i>C8B</i>	<i>C8G</i>	<i>C9</i>	<i>CA1</i>
<i>CA2</i>	<i>CALB1</i>	<i>CALD1</i>	<i>CALM3</i>	<i>CALR</i>	<i>CAND1</i>	<i>CANX</i>	<i>CAP1</i>
<i>CAPN1</i>	<i>CAPN2</i>	<i>CAPNS1</i>	<i>CAPZA1</i>	<i>CAPZA2</i>	<i>CAPZB</i>	<i>CASP14</i>	<i>CAST</i>
<i>CAT</i>	<i>CBR1</i>	<i>CCT2</i>	<i>CCT3</i>	<i>CCT4</i>	<i>CCT5</i>	<i>CCT6A</i>	<i>CCT7</i>
<i>CCT8</i>	<i>CD2AP</i>	<i>CD59</i>	<i>CD81</i>	<i>CDC42</i>	<i>CDH13</i>	<i>CFB</i>	<i>CFH</i>
<i>CFHR1</i>	<i>CFHR5</i>	<i>CFL1</i>	<i>CIRBP</i>	<i>CKAP4</i>	<i>CKB</i>	<i>CLIC1</i>	<i>CLIC4</i>
<i>CLIC5</i>	<i>CLTA</i>	<i>CLTC</i>	<i>CLU</i>	<i>CMBL</i>	<i>CMPK1</i>	<i>CNDP2</i>	<i>CNN3</i>
<i>COL12A1</i>	<i>COL18A1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>COL4A1</i>	<i>COL4A2</i>	<i>COL4A3</i>	<i>COL4A4</i>	<i>COL4A5</i>
<i>COL6A1</i>	<i>COL6A2</i>	<i>COL6A3</i>	<i>COMT</i>	<i>COPA</i>	<i>COPB1</i>	<i>COPG1</i>	<i>CORO1B</i>
<i>CORO1C</i>	<i>CORO2B</i>	<i>COTL1</i>	<i>CP</i>	<i>CPNE3</i>	<i>CR1</i>	<i>CRB2</i>	<i>CRIP2</i>
<i>CRK</i>	<i>CRYAB</i>	<i>CRYL1</i>	<i>CRYZ</i>	<i>CS</i>	<i>CSRP1</i>	<i>CSTB</i>	<i>CTNNB1</i>
<i>CTNND1</i>	<i>CTSB</i>	<i>CTSD</i>	<i>CTSG</i>	<i>CTTN</i>	<i>CYB5B</i>	<i>CYB5R3</i>	<i>CYFIP1</i>
<i>DAG1</i>	<i>DAK</i>	<i>DARS</i>	<i>DBN1</i>	<i>DBNL</i>	<i>DCD</i>	<i>DCTN2</i>	<i>DCXR</i>
<i>DDAH1</i>	<i>DDAH2</i>	<i>DDN</i>	<i>DDOST</i>	<i>DDT</i>	<i>DDX1</i>	<i>DDX17</i>	<i>DDX39B</i>
<i>DDX3X</i>	<i>DDX5</i>	<i>DECR1</i>	<i>DEFA3</i>	<i>DHX9</i>	<i>DLD</i>	<i>DLST</i>	<i>DNM2</i>
<i>DNPEP</i>	<i>DNPB1</i>	<i>DPEP1</i>	<i>DPP3</i>	<i>DPP4</i>	<i>DPYSL2</i>	<i>DPYSL3</i>	<i>DSC1</i>
<i>DSG1</i>	<i>DSP</i>	<i>DSTN</i>	<i>DYNC1H1</i>	<i>DYNLL2</i>	<i>DYNLRB1</i>	<i>DYSF</i>	<i>ECH1</i>
<i>ECHS1</i>	<i>EEF1A1</i>	<i>EEF1B2</i>	<i>EEF1D</i>	<i>EEF1G</i>	<i>EEF2</i>	<i>EFHD1</i>	<i>EFNB1</i>
<i>EHD1</i>	<i>EHD3</i>	<i>EHD4</i>	<i>EHHADH</i>	<i>EIF2S3</i>	<i>EIF3A</i>	<i>EIF3F</i>	<i>EIF4A1</i>
<i>EIF4A2</i>	<i>EIF4A3</i>	<i>EIF4H</i>	<i>EIF5A</i>	<i>EMILIN1</i>	<i>EML1</i>	<i>EML2</i>	<i>ENDOD1</i>
<i>ENG</i>	<i>ENO1</i>	<i>ENPEP</i>	<i>EPB41</i>	<i>EPB41L2</i>	<i>EPB42</i>	<i>EPHX2</i>	<i>EPRS</i>
<i>ERP44</i>	<i>ESD</i>	<i>ESYT1</i>	<i>ETFA</i>	<i>ETFB</i>	<i>EVA1B</i>	<i>EZR</i>	<i>F2</i>
<i>F9</i>	<i>FABP1</i>	<i>FABP3</i>	<i>FABP4</i>	<i>FABP5</i>	<i>FAH</i>	<i>FAM129B</i>	<i>FBLIM1</i>
<i>FBLN1</i>	<i>FBN1</i>	<i>FBP1</i>	<i>FERMT2</i>	<i>FERMT3</i>	<i>FGA</i>	<i>FGB</i>	<i>FGF1</i>
<i>FGG</i>	<i>FH</i>	<i>FHL1</i>	<i>FHL2</i>	<i>FKBP1A</i>	<i>FLG2</i>	<i>FLNA</i>	<i>FLNB</i>
<i>FLOT1</i>	<i>FLOT2</i>	<i>FN1</i>	<i>FSCN1</i>	<i>FTH1</i>	<i>FTL</i>	<i>FUBP1</i>	<i>FUS</i>

<i>FXR1</i>	<i>GAA</i>	<i>GALK1</i>	<i>GALM</i>	<i>GANAB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GATM</i>	<i>GBAS</i>
<i>GC</i>	<i>GDI1</i>	<i>GDI2</i>	<i>GGACT</i>	<i>GLO1</i>	<i>GLRX</i>	<i>GLS</i>	<i>GLUD1</i>
<i>GMFB</i>	<i>GNA11</i>	<i>GNAI2</i>	<i>GNB1</i>	<i>GNB2</i>	<i>GNB2L1</i>	<i>GOT1</i>	<i>GOT2</i>
<i>GPD1</i>	<i>GPI</i>	<i>GPX1</i>	<i>GPX3</i>	<i>GRHPR</i>	<i>GSN</i>	<i>GSR</i>	<i>GSS</i>
<i>GSTA1</i>	<i>GSTM2</i>	<i>GSTM3</i>	<i>GSTO1</i>	<i>GSTP1</i>	<i>H1F0</i>	<i>H1FX</i>	<i>H2AFV</i>
<i>H2AFX</i>	<i>H2AFY</i>	<i>H3F3A</i>	<i>HAAO</i>	<i>HADH</i>	<i>HADHA</i>	<i>HADHB</i>	<i>HBA1</i>
<i>HBB</i>	<i>HBD</i>	<i>HDLBP</i>	<i>HINT1</i>	<i>HIST1H1B</i>	<i>HIST1H1C</i>	<i>HIST1H2BL</i>	<i>HIST1H4A</i>
<i>HIST2H2AA3</i>	<i>HIST2H2BE</i>	<i>HIST2H3A</i>	<i>HK1</i>	<i>HLA-A</i>	<i>HLA-B</i>	<i>HLA-C</i>	<i>HLA-DRA</i>
<i>HLA-DRB3</i>	<i>HMGB1</i>	<i>HNRNPA0</i>	<i>HNRNPA1</i>	<i>HNRNPA2B1</i>	<i>HNRNPA3</i>	<i>HNRNPC</i>	<i>HNRNPD</i>
<i>HNRNPH1</i>	<i>HNRNPH3</i>	<i>HNRNPK</i>	<i>HNRNPL</i>	<i>HNRNPM</i>	<i>HNRNPR</i>	<i>HNRNPU</i>	<i>HNRNPUL2</i>
<i>HP</i>	<i>HP1BP3</i>	<i>HPX</i>	<i>HRG</i>	<i>HRNR</i>	<i>HRSP12</i>	<i>HSD17B10</i>	<i>HSD17B12</i>
<i>HSD17B4</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>HSP90B1</i>	<i>HSPA12A</i>	<i>HSPA12B</i>	<i>HSPA1A</i>	<i>HSPA2</i>
<i>HSPA4</i>	<i>HSPA5</i>	<i>HSPA8</i>	<i>HSPA9</i>	<i>HSPB1</i>	<i>HSPD1</i>	<i>HSPE1</i>	<i>HSPG2</i>
<i>HYOU1</i>	<i>IARS</i>	<i>ICAM1</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>IGHA1</i>	<i>IGHG1</i>	<i>IGHG2</i>
<i>IGHG3</i>	<i>IGHM</i>	<i>IGKC</i>	<i>IGKV3-20</i>	<i>IGLL5</i>	<i>ILF2</i>	<i>ILF3</i>	<i>ILK</i>
<i>IMMT</i>	<i>INF2</i>	<i>INHBE</i>	<i>IQGAP1</i>	<i>IQGAP2</i>	<i>ISOC2</i>	<i>ISYNA1</i>	<i>ITGA1</i>
<i>ITGA3</i>	<i>ITGA8</i>	<i>ITGAV</i>	<i>ITGB1</i>	<i>ITGB3</i>	<i>ITIH1</i>	<i>ITIH2</i>	<i>ITIH4</i>
<i>ITIH5</i>	<i>JUP</i>	<i>KANK2</i>	<i>KARS</i>	<i>KCTD12</i>	<i>KHK</i>	<i>KHSRP</i>	<i>KIF5B</i>
<i>KIRREL</i>	<i>KNG1</i>	<i>KPNB1</i>	<i>KPRP</i>	<i>KRT1</i>	<i>KRT10</i>	<i>KRT14</i>	<i>KRT16</i>
<i>KRT17</i>	<i>KRT18</i>	<i>KRT19</i>	<i>KRT2</i>	<i>KRT5</i>	<i>KRT6A</i>	<i>KRT6B</i>	<i>KRT71</i>
<i>KRT77</i>	<i>KRT78</i>	<i>KRT8</i>	<i>KRT9</i>	<i>KTNI</i>	<i>LAMA2</i>	<i>LAMA5</i>	<i>LAMB1</i>
<i>LAMB2</i>	<i>LAMC1</i>	<i>LAMP1</i>	<i>LAMP2</i>	<i>LANCL1</i>	<i>LAP3</i>	<i>LASP1</i>	<i>LCP1</i>
<i>LDHA</i>	<i>LDHB</i>	<i>LEMD2</i>	<i>LGALS1</i>	<i>LGALS3BP</i>	<i>LGALS7</i>	<i>LIMA1</i>	<i>LIMS1</i>
<i>LIN7C</i>	<i>LMNA</i>	<i>LMNB1</i>	<i>LMNB2</i>	<i>LMO7</i>	<i>LPP</i>	<i>LRP2</i>	<i>LRPPRC</i>
<i>LTA4H</i>	<i>LTF</i>	<i>LUM</i>	<i>LYPLA1</i>	<i>LYZ</i>	<i>MACF1</i>	<i>MAGI2</i>	<i>MAL2</i>
<i>MAP1B</i>	<i>MAP4</i>	<i>MAPK1</i>	<i>MAPRE1</i>	<i>MATR3</i>	<i>MDH1</i>	<i>MDH2</i>	<i>MECP2</i>
<i>MFGE8</i>	<i>MGST3</i>	<i>MIF</i>	<i>MME</i>	<i>MMRN2</i>	<i>MPO</i>	<i>MPST</i>	<i>MRGPRF</i>
<i>MSN</i>	<i>MT-CO2</i>	<i>MTHFD1</i>	<i>MVP</i>	<i>MYH10</i>	<i>MYH9</i>	<i>MYL12B</i>	<i>MYL6</i>
<i>MYL9</i>	<i>MYLK</i>	<i>MYO1B</i>	<i>MYO1C</i>	<i>MYO1D</i>	<i>MYO1E</i>	<i>MYOF</i>	<i>NACA</i>
<i>NAP1L1</i>	<i>NAPA</i>	<i>NAPRT</i>	<i>NCL</i>	<i>NDRG1</i>	<i>NDUFS1</i>	<i>NDUFS3</i>	<i>NDUFV1</i>
<i>NEBL</i>	<i>NES</i>	<i>NFASC</i>	<i>NID1</i>	<i>NID2</i>	<i>NIT2</i>	<i>NME2</i>	<i>NONO</i>
<i>NPC2</i>	<i>NPEPPS</i>	<i>NPHS1</i>	<i>NPHS2</i>	<i>NPM1</i>	<i>NPNT</i>	<i>NQO1</i>	<i>NQO2</i>
<i>NSFL1C</i>	<i>NUCB1</i>	<i>OGDH</i>	<i>ORM1</i>	<i>ORM2</i>	<i>OTUB1</i>	<i>P0DOX7</i>	<i>P4HB</i>
<i>PA2G4</i>	<i>PABPC1</i>	<i>PALLD</i>	<i>PAPLN</i>	<i>PARD3B</i>	<i>PARK7</i>	<i>PARVA</i>	<i>PBLD</i>
<i>PCBD1</i>	<i>PCBP1</i>	<i>PCBP2</i>	<i>PCK2</i>	<i>PCMT1</i>	<i>PCYOX1</i>	<i>PDCD6IP</i>	<i>PDGFRB</i>
<i>PDHA1</i>	<i>PDHB</i>	<i>PDIA3</i>	<i>PDIA4</i>	<i>PDIA6</i>	<i>PDLIM1</i>	<i>PDLIM2</i>	<i>PDLIM5</i>
<i>PDLIM7</i>	<i>PDXK</i>	<i>PEA15</i>	<i>PEBP1</i>	<i>PECAM1</i>	<i>PEPD</i>	<i>PFKL</i>	<i>PFN1</i>
<i>PFN2</i>	<i>PGAM1</i>	<i>PGD</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGLS</i>	<i>PGM1</i>	<i>PGM2</i>	<i>PGRMC1</i>
<i>PGRMC2</i>	<i>PHB</i>	<i>PHB2</i>	<i>PICALM</i>	<i>PIP</i>	<i>PKM</i>	<i>PLA2R1</i>	<i>PLEC</i>
<i>PLG</i>	<i>PLIN3</i>	<i>PLS3</i>	<i>PNP</i>	<i>PODXL</i>	<i>POSTN</i>	<i>POTEE</i>	<i>PPA1</i>
<i>PPIA</i>	<i>PPIB</i>	<i>PPM1F</i>	<i>PPP1CB</i>	<i>PPP1R7</i>	<i>PPP2CA</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>PRDX1</i>
<i>PRDX2</i>	<i>PRDX3</i>	<i>PRDX5</i>	<i>PRDX6</i>	<i>PRKACA</i>	<i>PRKAR2A</i>	<i>PRKDC</i>	<i>PRMT1</i>
<i>PROS1</i>	<i>PRPS1</i>	<i>PRTN3</i>	<i>PSAP</i>	<i>PSMA1</i>	<i>PSMA2</i>	<i>PSMA5</i>	<i>PSMA6</i>
<i>PSMA7</i>	<i>PSMB1</i>	<i>PSMB2</i>	<i>PSMB3</i>	<i>PSMB8</i>	<i>PSMC1</i>	<i>PSMC2</i>	<i>PSMC4</i>
<i>PSMC5</i>	<i>PSMD2</i>	<i>PSME1</i>	<i>PSME2</i>	<i>PTBP1</i>	<i>PTGR1</i>	<i>PTPRO</i>	<i>PTRF</i>
<i>PURA</i>	<i>PYGB</i>	<i>PYGL</i>	<i>QARS</i>	<i>QDPR</i>	<i>RAB11B</i>	<i>RAB14</i>	<i>RAB1B</i>

<i>RAB21</i>	<i>RAB2A</i>	<i>RAB5C</i>	<i>RAB6A</i>	<i>RAB7A</i>	<i>RAC1</i>	<i>RAD23B</i>	<i>RAN</i>
<i>RAP1B</i>	<i>RARS</i>	<i>RBM3</i>	<i>RBMX</i>	<i>RBP4</i>	<i>RDX</i>	<i>RHOA</i>	<i>RNH1</i>
<i>RNPEP</i>	<i>RPL10</i>	<i>RPL10A</i>	<i>RPL11</i>	<i>RPL12</i>	<i>RPL13</i>	<i>RPL13A</i>	<i>RPL14</i>
<i>RPL15</i>	<i>RPL18</i>	<i>RPL21</i>	<i>RPL22</i>	<i>RPL23A</i>	<i>RPL24</i>	<i>RPL27</i>	<i>RPL3</i>
<i>RPL30</i>	<i>RPL36</i>	<i>RPL4</i>	<i>RPL6</i>	<i>RPL7</i>	<i>RPL7A</i>	<i>RPL8</i>	<i>RPL9</i>
<i>RPLP0</i>	<i>RPLP1</i>	<i>RPLP2</i>	<i>RPN1</i>	<i>RPN2</i>	<i>RPS12</i>	<i>RPS13</i>	<i>RPS14</i>
<i>RPS15A</i>	<i>RPS16</i>	<i>RPS18</i>	<i>RPS19</i>	<i>RPS2</i>	<i>RPS20</i>	<i>RPS23</i>	<i>RPS24</i>
<i>RPS25</i>	<i>RPS26</i>	<i>RPS3</i>	<i>RPS3A</i>	<i>RPS4X</i>	<i>RPS6</i>	<i>RPS7</i>	<i>RPS8</i>
<i>RPS9</i>	<i>RPSA</i>	<i>RRAS</i>	<i>RRBP1</i>	<i>RSU1</i>	<i>RTN4</i>	<i>RUVBL1</i>	<i>S100A11</i>
<i>S100A16</i>	<i>S100A4</i>	<i>S100A6</i>	<i>S100A7</i>	<i>S100A8</i>	<i>S100A9</i>	<i>SARS</i>	<i>SBSPON</i>
<i>SCARB2</i>	<i>SDHA</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDPR</i>	<i>SEC22B</i>	<i>SELENBP1</i>	<i>SEPT11</i>	<i>SEPT2</i>
<i>SEPT7</i>	<i>SEPT9</i>	<i>SERPINA1</i>	<i>SERPINA3</i>	<i>SERPINB1</i>	<i>SERPINB12</i>	<i>SERPINB3</i>	<i>SERPINB6</i>
<i>SERPINB9</i>	<i>SERPINC1</i>	<i>SERPINF1</i>	<i>SERPING1</i>	<i>SERPINH1</i>	<i>SET</i>	<i>SFPQ</i>	<i>SFXN3</i>
<i>SH3BGRL</i>	<i>SH3BGRL2</i>	<i>SHMT1</i>	<i>SKP1</i>	<i>SLC25A3</i>	<i>SLC25A6</i>	<i>SLC44A2</i>	<i>SLC4A1</i>
<i>SLC9A3R1</i>	<i>SLC9A3R2</i>	<i>SLK</i>	<i>SND1</i>	<i>SNRNP200</i>	<i>SNRPD3</i>	<i>SNX1</i>	<i>SNX6</i>
<i>SOD1</i>	<i>SOD2</i>	<i>SORBS3</i>	<i>SORD</i>	<i>SPR</i>	<i>SPTA1</i>	<i>SPTAN1</i>	<i>SPTB</i>
<i>SPTBN1</i>	<i>SQRDL</i>	<i>SRSF10</i>	<i>SRSF7</i>	<i>SSB</i>	<i>ST13</i>	<i>STAT1</i>	<i>STAT3</i>
<i>STIP1</i>	<i>STOM</i>	<i>STX7</i>	<i>SUCLG2</i>	<i>SULT1A1</i>	<i>SUN2</i>	<i>SYNCRIP</i>	<i>SYNPO</i>
<i>SYNPO2</i>	<i>TAGLN</i>	<i>TAGLN2</i>	<i>TALDO1</i>	<i>TARDBP</i>	<i>TARS</i>	<i>TCP1</i>	<i>TF</i>
<i>TGFB111</i>	<i>TGFBI</i>	<i>TGM2</i>	<i>THBS1</i>	<i>TINAGL1</i>	<i>TJP1</i>	<i>TKT</i>	<i>TLN1</i>
<i>TMED10</i>	<i>TMEM109</i>	<i>TMOD3</i>	<i>TMPO</i>	<i>TNC</i>	<i>TNKS1BP1</i>	<i>TNS1</i>	<i>TNS2</i>
<i>TNS3</i>	<i>TPD52L2</i>	<i>TP11</i>	<i>TPM1</i>	<i>TPM2</i>	<i>TPM3</i>	<i>TPM4</i>	<i>TPP1</i>
<i>TPPP3</i>	<i>TRA2B</i>	<i>TRIM28</i>	<i>TROVE2</i>	<i>TSN</i>	<i>TST</i>	<i>TTR</i>	<i>TUBA1A</i>
<i>TUBA1B</i>	<i>TUBB</i>	<i>TUBB2A</i>	<i>TUBB4B</i>	<i>TUFM</i>	<i>TWF1</i>	<i>TXN</i>	<i>TXNDC17</i>
<i>TXNRD1</i>	<i>TYMP</i>	<i>UBA1</i>	<i>UBA2</i>	<i>UBA52</i>	<i>UBE2L3</i>	<i>UBE2N</i>	<i>UGGT1</i>
<i>UQCRC1</i>	<i>USO1</i>	<i>USP14</i>	<i>USP5</i>	<i>UTRN</i>	<i>VAR5</i>	<i>VAT1</i>	<i>VCL</i>
<i>VCP</i>	<i>VDAC1</i>	<i>VDAC2</i>	<i>VIM</i>	<i>VPS26A</i>	<i>VPS35</i>	<i>VTN</i>	<i>VWA1</i>
<i>WARS</i>	<i>WDR1</i>	<i>XRCC5</i>	<i>XRCC6</i>	<i>YWHAB</i>	<i>YWHAE</i>	<i>YWHAG</i>	<i>YWHAQ</i>
<i>YWHAZ</i>	<i>ZNF185</i>	<i>ZYX</i>					

**Tabela Anexa 2.** Lista dos genes correspondentes às proteínas identificadas em cada grupo de pacientes.

**CTRL**

*A1BG, A2M, ABHD10, ABHD14B, ACADVL, ACAT1, ACO1, ACO2, ACOT1, ACPI, ACSM2A, ACSM2B, ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTR1A, ACTR2, ACTR3, ACY1, ADD1, ADD3, ADH1B, ADH5, AGRN, AGT, AHCY, AHNAK, AHSG, AIF1L, AIFM1, AK1, AK2, AK3, AKAP12, AKR1A1, AKR1C3, AKR7A2, AKR7A3, ALAD, ALB, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1L1, ALDH2, ALDH4A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH9A1, ALDOA, ALDOB, ALDOC, ALYREF, AMBP, ANK1, ANP32A, ANPEP, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, ANXA7, AP1B1, AP2A1, AP2B1, AP2M1, APCS, APMAP, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOE, APOH, APPL1, APRT, AQP1, ARF1, ARF4, ARF6, ARHGAP1, ARHGDIA, ARHGDIB, ARPC1A, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ASS1, ATIC, ATP1A1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5O, ATP6V1A, ATP6V1B2, AZGP1, B2M, BANF1, BCAM, BDH2, BHMT, BHMT2, BLVRA, BLVRB, C11orf54, C14orf166, C3, C4A, C4B, C4BPA, C5, C9, CA1, CA2, CALB1, CALD1, CALM3, CALR, CAND1, CANX, CAP1, CAPN1, CAPN2, CAPNS1, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, CASP14, CAST, CAT, CBR1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8, CD59, CD81, CDC42, CDH13, CFB, CFH, CFL1, CIRBP, CKAP4, CKB, CLIC1, CLIC4, CLIC5, CLTA, CLTC, CLU, CMBL, CMPK1, CNDP2, CNN3, COL18A1, COL1A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COMT, COPA, COPB1, CORO1B, CORO1C, CORO2B, COTL1, CP, CPNE3, CR1, CRB2, CRIP2, CRYAB, CRYL1, CRYZ, CS, CSRP1, CTNND1, CTSB, CTSD, CTSG, CTTN, CYB5B, CYB5R3, CYFIP1, DAG1, DAK, DARS, DBN1, DBNL, DCD, DCTN2, DCXR, DDAH1, DDAH2, DDN, DDOST, DDT, DDX1, DDX17, DDX39B, DDX3X, DECR1, DEFA3, DHX9, DLD, DLST, DNPEP, DNPH1, DPP3, DPYSL2, DPYSL3, DSCI, DSG1, DSP, DSTN, DYNC1H1, DYNLL2, DYNLRB1, DYSF, ECH1, ECHS1, EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G, EEF2, EFHD1, EFNB1, EHD1, EHD3, EHD4, EIF3A, EIF3F, EIF4A1, EIF4A2, EIF4H, EIF5A, EMILIN1, EML1, EML2, ENDOD1, ENO1, ENPEP, EPB41, EPB42, EPHX2, ERP44, ESD, ESYT1, ETFA, EVA1B, EZR, F2, F9, FABP1, FABP3, FABP5, FAH, FAM129B, FBLIM1, FBLN1, FBNI, FBP1, FERMT2, FERMT3, FGA, FGB, FGF1, FGG, FH, FHL1, FHL2, FKBP1A, FLG2, FLNA, FLNB, FLOT1, FN1, FSCN1, FTL, FUBP1, FUS, GALK1, GALM, GANAB, GAPDH, GATM, GBAS, GC, GDII, GDI2, GGACT, GLO1, GLRX, GLUD1, GNA11, GNAI2, GNB1, GNB2, GNB2L1, GOT1, GOT2, GPD1, GPI, GPX1, GPX3, GRHPR, GSN, GSS, GSTA1, GSTM2, GSTM3, GSTO1, GSTP1, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H3F3A, HAAO, HADH, HADHA, HADHB, HBA1, HBB, HBD, HINT1, HIST1H1C, HIST1H2BL, HIST1H4A, HIST2H2AA3, HIST2H2BE, HIST2H3A, HK1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB3, HMGB1, HNRNPA0, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPA3, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPH3, HNRNPK, HNRNPL, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HNRNPUL2, HP, HP1BP3, HPX, HRG, HRSP12, HSD17B10, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA12A, HSPA12B, HSPA1A, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPB1, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, ICAM1, IDH1, IDH2, IGH1, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHM, IGKC, IGKV3-20, IGLL5, ILF2, ILF3, ILK, INF2, INHBE, IQGAP1, IQGAP2, ISOC2, ISYNA1, ITGA1, ITGA3, ITGA8, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITIH1, ITIH2, ITIH4, ITIH5, JUP, KANK2, KCTD12, KHK, KHSRP, KIF5B, KIRREL, KNG1, KPNB1, KPRP, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT17, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT78, KRT8, KRT9, LAMA5, LAMB2, LAMC1, LAMP1, LAMP2, LANCL1, LAP3, LASP1, LCPI, LDHA, LDHB, LGALS1, LGALS3BP, LIMS1, LIN7C, LMNA, LMNB2, LMO7, LPP, LTA4H, LTF, LYPLA1, LYZ, MACF1, MAGI2, MAP1B, MAP4, MAPK1, MATR3, MDH1, MDH2, MIF, MME, MMRN2, MPO, MPST, MRGPRF, MSN, MTHFD1, MVP, MYH10, MYH9, MYL12B, MYL6, MYL9, MYLK, MYO1B, MYO1C, MYO1D, MYO1E, MYOF, NACA, NAPA, NAPRT, NCL, NDRG1, NDUFS1, NDUFS3, NEBL, NES, NFASC, NID1, NID2, NIT2, NME2, NONO, NPC2, NPEPPS, NPHS1, NPHS2, NPM1, NPNT, NQO1, NQO2, NSFL1C, NUCB1, OGDH, ORM1, ORM2, OTUB1, P0DOX7, P4HB, PALLD, PARD3B, PARK7, PARVA, PBLD, PCBD1, PCBP1, PCBP2, PCK2, PCMT1, PCYOX1, PDCD6IP, PDGFRB, PDHA1, PDHB, PDIA3, PDIA6, PDLIM1, PDLIM2, PDLIM5, PDLIM7, PDXK, PEA15, PEBP1, PECAM1, PEPD, PFKL, PFN1, PFN2, PGAM1, PGD, PGK1, PGLS, PGM1, PGM2, PGRMC1, PHB, PHB2, PIP, PKM, PLA2R1, PLEC, PLG, PLS3, PNP, PODXL, POSTN, POTE, PPA1, PPIA, PPIB, PPM1F, PPP1CB, PPP1R7, PPP2CA, PPP2RIA, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKACA, PRKAR2A, PRKDC, PRPS1, PRTN3, PSAP, PSMA1, PSMA2, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB2, PSMB8, PSMC1, PSMC4, PSMC5, PSMD2, PSME1, PSME2, PTBP1, PTGR1, PTPRO, PURA, PYGB, PYGL, QDPR, RAB11B, RAB14, RAB1B, RAB21, RAB2A, RAB5C, RAB6A, RAB7A, RAC1, RAD23B, RAN, RAP1B,*

---

RARS, RBM3, RBMX, RBP4, RDX, RHOA, RNH1, RNPEP, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL14, RPL15, RPL18, RPL22, RPL27, RPL3, RPL4, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPN1, RPN2, RPS12, RPS13, RPS16, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS25, RPS3, RPS3A, RPS4X, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPSA, RRAS, RSU1, RTN4, RUVBL1, S100A11, S100A4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, SARS, SBSPON, SCARB2, SDHA, SDHB, SEC22B, SELENBP1, SEPT11, SEPT2, SEPT7, SEPT9, SERPINA1, SERPINA3, SERPINB1, SERPINB12, SERPINB3, SERPINB6, SERPINB9, SERPINC1, SERPINF1, SERPING1, SERPINH1, SET, SFPQ, SH3BGRL, SH3BGRL2, SHMT1, SKP1, SLC25A3, SLC25A6, SLC44A2, SLC4A1, SLC9A3R1, SLC9A3R2, SND1, SNRPD3, SNX1, SNX6, SOD1, SOD2, SORBS3, SORD, SPR, SPTA1, SPTAN1, SPTB, SPTBN1, SQRD, SRSF10, SRSF7, SSB, ST13, STAT1, STAT3, STIP1, STOM, STX7, SUCLG2, SUN2, SYNCRIP, SYNPO, SYNPO2, TAGLN, TAGLN2, TALDO1, TCP1, TF, TGFB11, TGFB1, TGM2, THBS1, TINAGL1, TJP1, TKT, TLN1, TMED10, TMEM109, TMOD3, TMPO, TNC, TNS1, TNS2, TNS3, TPD52L2, TP11, TPM1, TPM2, TPM3, TPM4, TPP1, TPPP3, TRA2B, TRIM28, TSN, TST, TTR, TUBA1A, TUBA1B, TUBB, TUBB2A, TUBB4B, TUFM, TXN, TXNDC17, TXNRD1, TYMP, UBA1, UBA2, UBA52, UBE2L3, UBE2N, USO1, USP14, USP5, UTRN, VAT1, VCL, VCP, VDAC1, VDAC2, VIM, VPS35, VTN, VWA1, WARS, WDR1, XRCC5, XRCC6, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ, ZNF185, ZYX

---

GAR

A2M, ABHD14B, ACAA2, ACADM, ACADVL, ACATI, ACO1, ACO2, ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTR1A, ACTR2, ACTR3, ADH5, AGRN, AGT, AHNAK, AHSB, AK1, AK2, AKAP12, AKR1A1, ALB, ALDH1A1, ALDH2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH9A1, ALDOA, ALDOC, AMBP, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, ANXA7, AP2A1, AP2B1, AP2S1, APCS, APMAP, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC3, APOE, APOH, APRT, AQP1, ARF1, ARG1, ARHGAP1, ARHGDI, ARPC2, ARPC4, ASS1, ATP1A1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5O, ATP6V1A, ATP6V1B2, AZGP1, B2M, BANF1, BCAM, BHMT, BLVRA, BLVRB, CIQC, C3, C4A, C4B, C4BPA, C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9, CA1, CA2, CALD1, CALM3, CALR, CAND1, CANX, CAP1, CAPN2, CAPNS1, CAPZA2, CAPZB, CASP14, CAT, CBR1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT8, CD81, CDC42, CDH13, CFB, CFH, CFHR1, CFHR5, CFL1, CIRBP, CKAP4, CKB, CLIC1, CLIC4, CLIC5, CLTA, CLTC, CLU, CNDP2, CNN3, COL12A1, COL18A1, COL1A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COMT, COPA, COPG1, CORO1B, CORO1C, CP, CRB2, CRIP2, CRYAB, CRYZ, CS, CSRP1, CSTB, CTSD, CTTN, CYB5R3, CYFIP1, DCD, DCTN2, DDAH2, DDOST, DDX1, DDX17, DDX39B, DDX3X, DHX9, DLST, DNPEP, DPP4, DPYSL2, DPYSL3, DSCI, DSG1, DSP, DSTN, DYNC1H1, DYNLL2, ECHS1, EEF1A1, EEF1D, EEF1G, EEF2, EFHD1, EHD3, EHD4, EIF2S3, EIF3A, EIF4A1, EIF4H, EIF5A, EMILIN1, EML2, ENO1, ENPEP, EPB41L2, ERP44, ESD, ESYT1, ETF, ETFB, EZR, F2, F9, FABP5, FAH, FBLIM1, FBLN1, FBN1, FERMT2, FGA, FGB, FGF1, FGG, FH, FKBP1A, FLG2, FLNA, FLNB, FLOT1, FN1, FSCN1, FUBP1, GAA, GANAB, GAPDH, GC, GDI1, GDI2, GLUD1, GNAI1, GNAI2, GNB1, GNB2L1, GOT2, GPI, GSN, GSTM3, GSTP1, H1F0, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H3F3A, HADHA, HADHB, HBA1, HBB, HBD, HDLBP, HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H2BL, HIST1H4A, HIST2H2AA3, HIST2H2BE, HK1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB3, HMGB1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPA3, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPH3, HNRNPK, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HP, HP1BP3, HPX, HRG, HRNR, HSD17B12, HSD17B4, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA12A, HSPA12B, HSPA1A, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPB1, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, ICAM1, IDH1, IDH2, IGHA1, IGHG1, IGHG3, IGHM, IGKC, IGLL5, ILF2, ILF3, ILK, INF2, IQGAP1, IQGAP2, ISYNA1, ITGA1, ITGA3, ITGAV, ITGB1, , ITIH1, ITIH2, ITIH4, JUP, KARS, KHSRP, KNG1, KPRP, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT17, KRT18, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT71, KRT77, KRT78, KRT8, KRT9, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMC1, LAMP1, LAP3, LASP1, LDHA, LDHB, LEMD2, LGALS1, LGALS3BP, LGALS7, LMNA, LMNB1, LMNB2, LMO7, LPP, LTF, LUM, LYZ, MAP4, MAPK1, MAPRE1, MATR3, MDH1, MDH2, MECP2, MFGE8, MIF, MME, MSN, MT-CO2, MVP, MYH10, MYH9, MYL12B, MYL6, MYL9, MYLK, MYO1B, MYO1C, MYO1D, MYOF, NCL, NEBL, NES, NID1, NID2, NME2, NPEPPS, NPHS2, NPM1, NPNT, NUCB1, OGDH, ORM1, PODOX7, P4HB, PALLD, PARK7, PARVA, PCBP1, PCBP2, PCMT1, PCYOX1, PDGFRB, PDIA3, PDIA6, PDLIM1, PDLIM2, PDLIM5, PDLIM7, PEA15, PEBP1, PECAM1, PFN1, PFN2, PGAM1, PGD, PGK1, PGLS, PGM2, PHB, PHB2, PICALM, PIP, PKM, PLEC, PLG, PLS, PNP, PODXL, POSTN, PPIA, PPIB, PPP1CB, PPP2R1A, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKAR2A, PROS1, PSAP, PSMA2, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB3,

---

---

PSMD2, PSME1, PSME2, PTBP1, PTPRO, PYGB, RAB11B, RAB2A, RAB5C, RAB6A, RAB7A, RAC1, RAN, RAP1B, RARS, RBMX, RBP4, RHOA, RNH1, RNPEP, RPL10, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL18, RPL21, RPL22, RPL24, RPL27, RPL30, RPL4, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL9, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPN1, RPN2, RPS13, RPS15A, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS3, RPS3A, RPS4X, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPSA, RRAS, RSU1, RTN4, S100A11, S100A16, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, SBSPON, SCARB2, SELENBP1, SEPT11, SEPT2, SEPT7, SEPT9, SERPINA1, SERPINA3, SERPINB1, SERPINB12, SERPINB3, SERPINB6, SERPINB9, SERPINC1, SERPINF1, SERPING1, SERPINH1, SET, SFPQ, SH3BGRL, SLC25A6, SLC4A1, SLC9A3R1, SLC9A3R2, SOD2, SPTAN1, SPTBN1, SQRDL, SRSF7, ST13, STAT1, STOM, SUN2, SYNCRIP, SYNPO, TAGLN, TAGLN2, TALDO1, TF, TGFB11I, TGFB1, TGM2, THBS1, TINAGL1, TJP1, TKT, TLN1, TMEM109, TMOD3, TMPO, TNC, TNS1, TNS2, TPD52L2, TPI1, TPM1, TPM2, TPM3, TPM4, TPP1, TPPP3, TRA2B, TSN, TTR, TUBA1A, TUBA1B, TUBB, TUBB2A, TUBB4B, TUFM, TXN, TYMP, UBA1, UBA52, UBE2N, UQCRC1, USP5, VAT1, VCL, VCP, VDAC1, VDAC2, VIM, VPS35, VTN, VWA1, WARS, WDR1, XRCC5, XRCC6, YWHAB, YWHAЕ, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ, ZYX

---

GBR

A2M, ABHD10, ABHD14B, ACAA2, ACADM, ACADVL, ACAT1, ACO2, ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTRIA, ACTR2, ACTR3, ADD1, ADH5, AGRN, AGT, AHCY, AHNAK, AK1, AK2, AK3, AKAP12, AKRIA1, AKR7A2, ALB, ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH2, ALDH4A1, ALDH7A1, ALDH9A1, ALDOA, ALDOC, AMBP, ANP32A, ANPEP, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, ANXA7, AP2A1, AP2B1, AP2S1, APCS, APEX1, APMAP, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOC3, APOE, APRT, AQP1, ARCNI, ARF1, ARHGAP1, ARHGDIА, ARL6IP5, ARPC1A, ARPC1B, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ASS1, ATIC, ATL3, ATP1A1, ATP1B1, ATP2A2, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5O, ATP6V1A, ATP6V1B2, AZGP1, B2M, BCAM, BHMT, BLVRA, BLVRB, C11orf54, C1QBP, C3, C4A, C4B, C4BPA, C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G, C9, CA1, CA2, CALD1, CALM3, CALR, CAND1, CANX, CAPI, CAPN1, CAPN2, CAPNS1, CAPZA1, CAPZA2, CAPZB, CASP14, CAST, CAT, CBR1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT7, CCT8, CD2AP, CD81, CDC42, CFB, CFH, CFHR5, CFL1, CKAP4, CKB, CLIC1, CLIC4, CLIC5, CLTA, CLTC, CLU, CNDP2, CNN3, COL12A1, COL18A1, COL1A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL6A1, COL6A2, COL6A3, COMT, COPA, COPG1, CORO1B, CORO2B, COTL1, CP, CPNE3, CRB2, CRIP2, CRK, CRYAB, CRYZ, CS, CSRP1, CSTB, CTNNA1, CTNND1, CTSD, CTTN, CYB5B, CYB5R3, CYFIP1, DARS, DBN1, DBNL, DCTN2, DDOST, DDX1, DDX17, DDX39B, DDX3X, DDX5, DECR1, DEFA3, DHX9, DLD, DLST, DNM2, DNPEP, DPYSL2, DPYSL3, DSG1, DSP, DSTN, DYNCH1, DYNLL2, DYNLRB1, ECH1, ECHS1, EEF1A1, EEF1D, EEF1G, EEF2, EFHD1, EHD3, EHD4, EIF3A, EIF3F, EIF4A1, EIF4A2, EIF4A3, EIF4H, EIF5A, EMILIN1, EML2, ENG, ENO1, ENPEP, EPRS, ERP44, ESD, ESYT1, ETFA, EZR, F2, F9, FABP4, FAH, FAM129B, FBLIM1, FBLN1, FBN1, FERMT2, FERMT3, FGA, FGB, FGF1, FGG, FH, FHL1, FHL2, FKBP1A, FLNA, FLNB, FLOT1, FLOT2, FN1, FSCN1, FTL, FUBP1, FXR1, GANAB, GAPDH, GC, GDII, GDI2, GLS, GLUD1, GMFB, GNAI2, GNB1, GNB2, GNB2L1, GOT2, GPI, GSN, GSR, GSS, GSTM3, GSTO1, GSTP1, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H3F3A, HADHA, HADHB, HBA1, HBB, HBD, HDLBP, HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H2BL, HIST1H4A, HIST2H2AA3, HIST2H2BE, HIST2H3A, HK1, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB3, HMGB1, HNRNPA0, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPA3, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPH3, HNRNPK, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HP, HP1BP3, HPX, HRG, HSD17B10, HSD17B12, HSD17B4, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA12A, HSPA12B, HSPA1A, HSPA2, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPB1, HSPD1, HSPE1, HSPG2, HYOU1, IARS, ICAM1, IDH2, IGH1, IGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHM, IGKC, IGLL5, ILF2, ILF3, ILK, IMMT, INF2, IQGAP1, IQGAP2, ISYNA1, ITGA1, ITGA3, ITGA8, ITGAV, ITGB1, ITIH1, ITIH2, ITIH4, JUP, KCTD12, KIF5B, KNG1, KPNB1, KPRP, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT71, KRT78, KRT8, KRT9, KTN1, LAMA2, LAMA5, LAMB1, LAMB2, LAMC1, LAMP1, LAMP2, LAP3, LASP1, LCPI, LDHA, LDHB, LEMD2, LGALS1, LIMA1, LMNA, LMNB1, LMNB2, LMO7, LPP, LRPPRC, LTA4H, LTF, LYZ, MAL2, MAP1B, MAP4, MAPK1, MATR3, MDH1, MDH2, MFG8, MGST3, MIF, MME, MPO, MSN, MVP, MYH10, MYH9, MYL12B, MYL6, MYL9, MYLK, MYO1B, MYO1C, MYO1D, MYO1E, MYOF, NACA, NAP1L1, NCL, NDUFS1, NDUFV1, NEBL, NES, NID1, NID2, NME2, NONO, NPEPPS, NPHS2, NPM1, NPNT, OGDH, ORM1, OTUB1, PODOX7, P4HB, PA2G4, PABPC1, PALLD, PAPLN, PARK7, PARVA, PCBP1, PCBP2, PCMT1, PCYOX1, PDCD6IP, PDHB, PDIA3, PDIA4, PDIA6,

---

---

*PDLIM1, PDLIM2, PDLIM5, PDLIM7, PDXK, PEA15, PEBP1, PECAM1, PEPD, PFN1, PFN2, PGAM1, PGD, PGK1, PGLS, PGM2, PGRMC2, PHB, PHB2, PICALM, PKM, PLEC, PLIN3, PLS3, PNP, PODXL, POSTN, PPIA, PPIB, PPM1F, PPP1CB, PPP1R7, PPP2R1A, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKACA, PRKAR2A, PRKDC, PRMT1, PROS1, PSAP, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB1, PSMB2, PSMB8, PSMC2, PSMC4, PSMD2, PSME1, PSME2, PTBP1, PTGR1, PTPRO, PTRF, PURA, PYGB, QARS, RAB11B, RAB14, RAB1B, RAB2A, RAB5C, RAB6A, RAB7A, RAC1, RAD23B, RAN, RAP1B, RARS, RBMX, RDX, RHOA, RNH1, RPL10A, RPL11, RPL12, RPL13, RPL13A, RPL14, RPL15, RPL18, RPL21, RPL23A, RPL24, RPL27, RPL3, RPL36, RPL4, RPL6, RPL7, RPL7A, RPL8, RPL9, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPN1, RPN2, RPS12, RPS13, RPS14, RPS15A, RPS16, RPS18, RPS19, RPS2, RPS20, RPS23, RPS24, RPS26, RPS3, RPS3A, RPS4X, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPSA, RRAS, RRBP1, RSU1, RTN4, RUVBL1, S100A11, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, SCARB2, SDPR, SELENBP1, SEPT11, SEPT2, SEPT7, SEPT9, SERPINA1, SERPINA3, SERPINB1, SERPINB6, SERPINB9, SERPINC1, SERPINF1, SERPING1, SERPINH1, SET, SFPQ, SFXN3, SH3BGR1, SLC25A3, SLC25A6, SLC44A2, SLC4A1, SLC9A3R1, SLC9A3R2, SLK, SND1, SNRNP200, SNX1, SOD1, SOD2, SORBS3, SPR, SPTAN1, SPTBN1, SQDRL, SRSF7, SSB, ST13, STAT1, STAT3, STIP1, STOM, SULT1A1, SUN2, SYNCRIP, SYNPO, SYNPO2, TAGLN, TAGLN2, TALDO1, TARDBP, TARS, TCPI1, TF, TGFB1I1, TGFB1, TGM2, THBS1, TINAGL1, TJP1, TKT, TLN1, TMED10, TMEM109, TMOD3, TMPO, TNC, TNKS1BP1, TNS1, TNS2, TNS3, TPD52L2, TPII, TPM1, TPM3, TPM4, TPP1, TPPP3, TRA2B, TROVE2, TSN, TTR, TUBA1A, TUBA1B, TUBB, TUBB2A, TUBB4B, TUFM, TWF1, TXN, TXNDC17, UBA1, UBA2, UBA52, UBE2N, UGGT1, UQCRC1, USO1, USP5, UTRN, VARS, VAT1, VCL, VCP, VDAC1, VDAC2, VIM, VPS26A, VPS35, VTN, VWA1, WARS, WDR1, XRCC5, XRCC6, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ, ZNF185, ZYX*

---

**GESF-NOS**

*A2M, ABHD14B, ACADM, ACADVL, ACAT1, ACO2, ACP1, ACSM2B, ACTC1, ACTG1, ACTN1, ACTN4, ACTR1A, ACTR2, ACTR3, ACY1, ADH5, AGRN, AGT, AHCY, AHNAK, AHSB, AIFM1, AK1, AK2, AKAP12, AKR1A1, ALB, ALDH1A1, ALDH2, ALDH4A1, ALDH6A1, ALDH7A1, ALDH9A1, ALDOA, ALDOB, AMBP, ANPEP, ANXA1, ANXA11, ANXA2, ANXA4, ANXA5, ANXA6, AOC3, APCS, APMAP, APOA1, APOA2, APOA4, APOB, APOE, APOH, AQP1, ARF1, ARG1, ARHGAP1, ARHGDI1, ARPC2, ARPC3, ARPC4, ASS1, ATIC, ATP1A1, ATP1B1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5O, ATP6V1A, AZGP1, BANF1, BCAM, BDH2, BHMT, BLVRB, C11orf54, C3, C4B, C4BPA, C9, CA1, CA2, CALD1, CALM3, CALR, CAND1, CANX, CAPI, CAPN2, CAPNS1, CAPZA2, CAPZB, CAT, CBR1, CCT2, CCT3, CCT4, CCT5, CCT6A, CCT8, CDC42, CFB, CFH, CFL1, CIRBP, CKAP4, CKB, CLIC1, CLIC4, CLIC5, CLTC, CLU, CNDP2, CNN3, COL18A1, COL1A1, COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL6A1, COL6A2, COL6A3, CP, CPNE3, CRB2, CRIP2, CRYAB, CRYZ, CS, CSRP1, CTNND1, CTSD, CTTN, CYB5R3, CYFIP1, DCTN2, DDAH2, DDX1, DDX17, DDX39B, DDX3X, DHX9, DLST, DNPEP, DPEP1, DPYSL2, DPYSL3, DSC1, DSG1, DSP, DSTN, DYNCH1, DYNLL2, DYNLRB1, ECHS1, EEF1A1, EEF1D, EEF1G, EEF2, EFHD1, EHD3, EHD4, EHHADH, EIF4A1, EIF4A2, EIF4H, EIF5A, EMILIN1, ENO1, ENPEP, EPB41L2, ESD, ESYT1, ETFA, EZR, F9, FABP1, FABP4, FBLIM1, FBLN1, FBN1, FBP1, FERMT2, FGA, FGB, FGF1, FGG, FH, FKBP1A, FLG2, FLNA, FLNB, FNI, FSCN1, FTH1, FTL, GANAB, GAPDH, GATM, GC, GDI2, GLUD1, GNAI1, GNAI2, GNB1, GNB2L1, GOT1, GOT2, GPI, GSN, GSTA1, GSTM3, GSTP1, H1FX, H2AFV, H2AFX, H2AFY, H3F3A, HADH, HADHA, HADHB, HBA1, HBB, HBD, HIST1H1C, HIST1H2BL, HIST1H4A, HIST2H2AA3, HIST2H2BE, HK1, HLA-A, HLA-DRA, HLA-DRB3, HMGB1, HNRNPA1, HNRNPA2B1, HNRNPA3, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPH1, HNRNPK, HNRNPM, HNRNPR, HNRNPU, HP, HPX, HRG, HRSP12, HSD17B10, HSD17B4, HSP90AA1, HSP90AB1, HSP90B1, HSPA12A, HSPA1A, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPA9, HSPB1, HSPD1, HSPG2, IDH2, IGH1, IGHG1, IGHG3, IGHM, IGKC, IGLL5, ILF2, ILK, INF2, IQGAP1, IQGAP2, ISYNA1, ITGA1, ITGA3, ITGAV, ITGB1, ITIH1, ITIH2, ITIH4, JUP, KNG1, KPNB1, KPRP, KRT1, KRT10, KRT14, KRT16, KRT18, KRT2, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT77, KRT78, KRT8, KRT9, LAMA5, LAMB2, LAMC1, LDHA, LDHB, LGALS1, LGALS3BP, LMNA, LMNB1, LMNB2, LMO7, LPP, LRP2, LRPPRC, LTF, LYZ, MAP4, MATR3, MDH1, MDH2, MECP2, MIF, MME, MSN, MVP, MYH10, MYH9, MYL12B, MYL6, MYL9, MYLK, MYO1B, MYO1C, NAPRT, NCL, NEBL, NES, NID1, NPHS2, NPM1, NPNT, ORM1, PODOX7, P4HB, PARK7, PARVA, PCBP1, PCBP2, PCK2, PCYOX1, PDIA3, PDIA6, PDLIM1, PDLIM2, PDLIM5, PDLIM7, PEA15, PEBP1, PECAM1, PEPD, PFN1, PGAM1, PGD, PGK1, PGLS, PGM2, PHB, PHB2, PICALM, PIP, PKM, PLEC, PLG,*

---

---

*PLS3, PODXL, POSTN, PPIA, PPP1CB, PPP2R1A, PRDX1, PRDX2, PRDX3, PRDX5, PRDX6, PRKAR2A, PSAP, PSMA5, PSMA6, PSMA7, PSMB2, PSMB8, PSMD2, PSME1, PTBP1, PTGR1, PURA, PYGB, RAB11B, RAB5C, RAB7A, RAC1, RAN, RAP1B, RBMX, RBP4, RHOA, RNH1, RPL10A, RPL12, RPL14, RPL18, RPL7, RPL9, RPLP0, RPLP2, RPN1, RPS13, RPS2, RPS20, RPS25, RPS26, RPS3, RPS3A, RPS4X, RPS6, RPS7, RPS8, RPS9, RPSA, RRAS, RSU1, RTN4, S100A6, S100A7, S100A8, S100A9, SCARB2, SELENBP1, SEPT2, SEPT7, SEPT9, SERPINA1, SERPINA3, SERPINB1, SERPINB12, SERPINB6, SERPINB9, SERPINC1, SERPING1, SERPINH1, SFPQ, SLC25A6, SLC4A1, SLC9A3R1, SLC9A3R2, SND1, SOD1, SPTAN1, SPTBN1, SQRDL, SRSF7, ST13, STOM, SYNCRIP, SYNPO, TAGLN, TAGLN2, TF, TGFBI, TGM2, TINAGL1, TJP1, TKT, TLN1, TMEM109, TMPO, TNC, TNS1, TPD52L2, TPI1, TPM1, TPM2, TPM3, TPM4, TPP1, TPPP3, TSN, TTR, TUBA1B, TUBB, TUBB2A, TUBB4B, TUFM, TXN, UBA1, UBA52, USO1, USP5, VAT1, VCL, VCP, VDAC1, VDAC2, VIM, VPS35, VTN, VWAI, WARS, WDR1, XRCC5, XRCC6, YWHAB, YWHAE, YWHAG, YWHAQ, YWHAZ, ZNF185, ZYX*

---



**Tabela Anexa 3.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GAR e CTRL.

<b>Gene</b>	<b>Proteína (em inglês)</b>	<b>q</b>	<b>Abundância relativa no GAR</b>
<i>ABHD14B</i>	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B	0,037	Reduzida
<i>ACTN4</i>	Alpha-actinin-4	0,010	Reduzida
<i>ACY1</i>	Aminoacylase-1	0,045	Reduzida
<i>AHSG</i>	Alpha-2-HS-glycoprotein	0,046	Reduzida
<i>AKR1A1</i>	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	0,005	Reduzida
<i>ALAD</i>	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	0,028	Reduzida
<i>ALB</i>	Serum albumin	0,016	Reduzida
<i>ANK1</i>	Ankyrin-1	0,045	Reduzida
<i>CAPZB</i>	F-actin-capping protein subunit beta	0,020	Reduzida
<i>CAT</i>	Catalase	0,041	Reduzida
<i>CIRBP</i>	Cold-inducible RNA-binding protein	0,020	Reduzida
<i>CNDP2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	0,050	Reduzida
<i>CR1</i>	Complement receptor type 1	0,047	Reduzida
<i>CRB2</i>	Protein crumbs homolog 2	0,009	Reduzida
<i>CSRP1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1	0,013	Reduzida
<i>DDT</i>	D-dopachrome decarboxylase	0,047	Reduzida
<i>DYNLL2</i>	Dynein light chain 2, cytoplasmic	0,005	Reduzida
<i>EIF4A2</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-II	0,006	Reduzida
<i>ENPEP</i>	Glutamyl aminopeptidase	0,018	Reduzida
<i>FABP1</i>	Fatty acid-binding protein, liver	0,025	Reduzida
<i>GLRX</i>	Glutaredoxin-1	0,024	Reduzida
<i>GNB1</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	0,035	Reduzida
<i>H3F3A</i>	Histone H3.3	0,045	Reduzida
<i>HPX</i>	Hemopexin	0,006	Reduzida
<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70 kDa protein 1A;Heat shock 70 kDa protein 1B	0,019	Reduzida
<i>IGHA1</i>	Ig alpha-1 chain C region	0,046	Reduzida
<i>IGHG1</i>	Ig gamma-1 chain C region	0,013	Reduzida
<i>IGHG3</i>	Ig gamma-3 chain C region	0,037	Reduzida
<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region	0,025	Reduzida
<i>IGLL5</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0,046	Reduzida
<i>MME</i>	Neprilysin	0,014	Reduzida
<i>MYH9</i>	Myosin-9	0,017	Reduzida
<i>NEBL</i>	Nebulette	0,005	Reduzida
<i>NPHS2</i>	Podocin	0,005	Reduzida
<i>PARD3B</i>	Partitioning defective 3 homolog B	0,025	Reduzida
<i>PARVA</i>	Alpha-parvin	0,033	Reduzida
<i>PDLIM2</i>	PDZ and LIM domain protein 2	0,021	Reduzida
<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	0,026	Reduzida
<i>PRDX2</i>	Peroxiredoxin-2	0,005	Reduzida
<i>RDX</i>	Radixin	0,005	Reduzida

<i>RNH1</i>	Ribonuclease inhibitor	0,021	Reduzida
<i>SLC4A1</i>	Band 3 anion transport protein	0,008	Reduzida
<i>SORBS3</i>	Vinexin	0,035	Reduzida
<i>TF</i>	Serotransferrin	0,006	Reduzida
<i>TJP1</i>	Tight junction protein ZO-1	0,045	Reduzida
<i>TLN1</i>	Talin-1	0,025	Reduzida
<i>YWHAG</i>	14-3-3 protein gamma	0,020	Reduzida
<i>IGK</i>	Immunoglobulin kappa light chain	0,005	Reduzida
<i>ANXA4</i>	Annexin A4	0,025	Aumentada
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	0,019	Aumentada
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	0,000	Aumentada
<i>C5</i>	Complement C5	0,016	Aumentada
<i>C9</i>	Complement component C9	0,025	Aumentada
<i>COL4A1</i>	Collagen alpha-1(IV) chain	0,002	Aumentada
<i>F9</i>	Coagulation factor IX	0,012	Aumentada
<i>FGF1</i>	Fibroblast growth factor 1	0,025	Aumentada
<i>FNI</i>	Fibronectin	0,035	Aumentada
<i>HNRNPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,035	Aumentada
<i>HSD17B12</i>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	0,037	Aumentada
<i>LAMB1</i>	Laminin subunit beta-1	0,028	Aumentada
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	0,001	Aumentada
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	0,019	Aumentada
<i>RPS18</i>	40S ribosomal protein S18	0,019	Aumentada
<i>SERPINB6</i>	Serpin B6	0,046	Aumentada
<i>SERPINB9</i>	Serpin B9	0,043	Aumentada
<i>SERPINC1</i>	Antithrombin-III	0,042	Aumentada
<i>TTR</i>	Transthyretin	0,043	Aumentada
<i>COPG1</i>	Coatomer subunit gamma-1	0,049	Aumentada
<i>CRYAB</i>	Alpha-crystallin B chain	0,047	Aumentada
<i>DDOST</i>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	0,024	Aumentada
<i>DLST</i>	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	0,047	Aumentada
<i>FH</i>	Fumarate hydratase, mitochondrial	0,032	Aumentada
<i>H1FO</i>	Histone H1.0	0,017	Aumentada
<i>H1FX</i>	Histone H1x	0,050	Aumentada
<i>H2AFY</i>	Core histone macro-H2A.1	0,001	Aumentada
<i>HADHB</i>	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,047	Aumentada
<i>HIST1H1B</i>	Histone H1.5	0,001	Aumentada
<i>HIST1H1C</i>	Histone H1.2	0,003	Aumentada
<i>HIST1H2BL</i>	Histone H2B type 1-L	0,000	Aumentada
<i>HIST2H2BE</i>	Histone H2B type 2-E	0,016	Aumentada
<i>HMGB1</i>	High mobility group protein B1	0,019	Aumentada
<i>HNRNPA2B1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	0,012	Aumentada
<i>HNRNPH1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	0,050	Aumentada
<i>HNRNPR</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	0,041	Aumentada

<i>HSD17B4</i>	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	0,046	Aumentada
<i>HSPA12B</i>	Heat shock 70 kDa protein 12B	0,046	Aumentada
<i>KRT8</i>	Keratin, type II cytoskeletal 8	0,011	Aumentada
<i>NACA</i>	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	0,010	Aumentada
<i>PEA15</i>	Astrocytic phosphoprotein PEA-15	0,006	Aumentada
<i>PGRMC1</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 1	0,019	Aumentada
<i>PHB</i>	Prohibitin	0,008	Aumentada
<i>PPM1F</i>	Protein phosphatase 1F	0,045	Aumentada
<i>PSMC5</i>	26S protease regulatory subunit 8	0,023	Aumentada
<i>RARS</i>	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,002	Aumentada
<i>RPL10A</i>	60S ribosomal protein L10a	0,032	Aumentada
<i>RPL13</i>	60S ribosomal protein L13	0,043	Aumentada
<i>RPL14</i>	60S ribosomal protein L14	0,023	Aumentada
<i>RPL15</i>	60S ribosomal protein L15	0,010	Aumentada
<i>RPL18</i>	60S ribosomal protein L18	0,020	Aumentada
<i>RPL22</i>	60S ribosomal protein L22	0,043	Aumentada
<i>RPL24</i>	60S ribosomal protein L24	0,012	Aumentada
<i>RPL27</i>	60S ribosomal protein L27	0,001	Aumentada
<i>RPL3</i>	60S ribosomal protein L3	0,014	Aumentada
<i>RPL6</i>	60S ribosomal protein L6	0,011	Aumentada
<i>RPL7</i>	60S ribosomal protein L7	0,022	Aumentada
<i>RPLP0</i>	60S acidic ribosomal protein P0	0,001	Aumentada
<i>RPS13</i>	40S ribosomal protein S13	0,001	Aumentada
<i>RPS15A</i>	40S ribosomal protein S15a	0,046	Aumentada
<i>RPS20</i>	40S ribosomal protein S20	0,013	Aumentada
<i>RPS25</i>	40S ribosomal protein S25	0,009	Aumentada
<i>RPS3</i>	40S ribosomal protein S3	0,000	Aumentada
<i>RPS4X</i>	40S ribosomal protein S4, X isoform	0,016	Aumentada
<i>RPS6</i>	40S ribosomal protein S6	0,025	Aumentada
<i>RPS7</i>	40S ribosomal protein S7	0,005	Aumentada
<i>RPS8</i>	40S ribosomal protein S8	0,000	Aumentada
<i>RPS9</i>	40S ribosomal protein S9	0,001	Aumentada
<i>RPSA</i>	40S ribosomal protein SA	0,000	Aumentada
<i>SCARB2</i>	Lysosome membrane protein 2	0,018	Aumentada
<i>SLC25A3</i>	Phosphate carrier protein, mitochondrial	0,025	Aumentada
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial	0,043	Aumentada
<i>SQRDL</i>	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0,021	Aumentada
<i>TPD52L2</i>	Tumor protein D54	0,027	Aumentada
<i>TPM1</i>	Tropomyosin alpha-1 chain	0,021	Aumentada

---

**Tabela Anexa 4.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GBR e CTRL.

Gene	Proteína	q-value	Abundância relativa no GBR
<i>ABHD14B</i>	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B	0,030	Reduzida
<i>ACY1</i>	Aminoacylase-1	0,041	Reduzida
<i>AKR1A1</i>	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	0,008	Reduzida
<i>ALB</i>	Serum albumin	0,009	Reduzida
<i>C11orf54</i>	Ester hydrolase C11orf54	0,041	Reduzida
<i>CAT</i>	Catalase	0,042	Reduzida
<i>CBR1</i>	Carbonyl reductase [NADPH] 1	0,050	Reduzida
<i>CFB</i>	Complement factor B	0,036	Reduzida
<i>CNDP2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	0,044	Reduzida
<i>CP</i>	Ceruloplasmin	0,016	Reduzida
<i>CRB2</i>	Protein crumbs homolog 2	0,050	Reduzida
<i>DYNLL2</i>	Dynein light chain 2, cytoplasmic	0,011	Reduzida
<i>EHD1</i>	EH domain-containing protein 1	0,022	Reduzida
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,036	Reduzida
<i>GC</i>	Vitamin D-binding protein	0,011	Reduzida
<i>GLRX</i>	Glutaredoxin-1	0,030	Reduzida
<i>GPD1</i>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	0,041	Reduzida
<i>GSTA1</i>	Glutathione S-transferase A1	0,041	Reduzida
<i>H3F3A</i>	Histone H3.3	0,048	Reduzida
<i>HBA1</i>	Hemoglobin subunit alpha	0,048	Reduzida
<i>HPX</i>	Hemopexin	0,012	Reduzida
<i>HRG</i>	Histidine-rich glycoprotein	0,048	Reduzida
<i>IGHG1</i>	Ig gamma-1 chain C region	0,019	Reduzida
<i>IGHG2</i>	Ig gamma-2 chain C region	0,026	Reduzida
<i>IGHG3</i>	Ig gamma-3 chain C region	0,016	Reduzida
<i>IGK</i>	Immunoglobulin kappa variable 3-20	0,005	Reduzida
<i>IGKC</i>	Ig kappa chain C region	0,016	Reduzida
<i>IGLL5</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	0,011	Reduzida
<i>KNG1</i>	Kininogen-1	0,026	Reduzida
<i>KV320</i>	Ig kappa chain V-III region B6	0,032	Reduzida
<i>MME</i>	Nepilysin	0,049	Reduzida
<i>MYL9</i>	Myosin regulatory light polypeptide 9	0,024	Reduzida
<i>NPNT</i>	Nephronectin	0,048	Reduzida
<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	0,011	Reduzida
<i>PEPD</i>	Xaa-Pro dipeptidase	0,018	Reduzida
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	0,044	Reduzida
<i>PRDX2</i>	Peroxiredoxin-2	0,012	Reduzida
<i>PRKACA</i>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha	0,032	Reduzida
<i>RHOA</i>	Transforming protein RhoA	0,011	Reduzida
<i>SLC4A1</i>	Band 3 anion transport protein	0,017	Reduzida
<i>TF</i>	Serotransferrin	0,008	Reduzida

<i>TPII</i>	Triosephosphate isomerase	0,030	Reduzida
<i>TXN</i>	Thioredoxin	0,012	Reduzida
<i>ANXA4</i>	Annexin A4	0,011	Aumentada
<i>ANXA6</i>	Annexin A6	0,035	Aumentada
<i>AP2S1</i>	AP-2 complex subunit sigma	0,026	Aumentada
<i>APMAP</i>	Adipocyte plasma membrane-associated protein	0,030	Aumentada
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	0,050	Aumentada
<i>ARF4</i>	ADP-ribosylation factor 4	0,017	Aumentada
<i>ATP2A2</i>	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	0,044	Aumentada
<i>ATP5C1</i>	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	0,011	Aumentada
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	0,005	Aumentada
<i>CANX</i>	Calnexin	0,011	Aumentada
<i>COL4A2</i>	Collagen alpha-2(IV) chain	0,015	Aumentada
<i>COPG1</i>	Coatomer subunit gamma-1	0,050	Aumentada
<i>CORO1C</i>	Coronin-1C	0,031	Aumentada
<i>CS</i>	Citrate synthase, mitochondrial	0,011	Aumentada
<i>DDOST</i>	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit	0,048	Aumentada
<i>DDX17</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	0,048	Aumentada
<i>DDX3X</i>	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	0,041	Aumentada
<i>DDX5</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	0,046	Aumentada
<i>DHX9</i>	ATP-dependent RNA helicase A	0,048	Aumentada
<i>DLST</i>	Dihydrolypoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	0,017	Aumentada
<i>DNM2</i>	Dynamin-2	0,024	Aumentada
<i>EEF1B2</i>	Elongation factor 1-beta	0,024	Aumentada
<i>EEF1D</i>	Elongation factor 1-delta	0,013	Aumentada
<i>EEF1G</i>	Elongation factor 1-gamma	0,019	Aumentada
<i>EIF3A</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	0,011	Aumentada
<i>EIF3F</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	0,028	Aumentada
<i>EIF4A1</i>	Eukaryotic initiation factor 4A-I	0,047	Aumentada
<i>F9</i>	Coagulation factor IX	0,016	Aumentada
<i>FBLN1</i>	Fibulin-1	0,019	Aumentada
<i>FERMT3</i>	Fermitin family homolog 3	0,026	Aumentada
<i>FGF1</i>	Fibroblast growth factor 1	0,026	Aumentada
<i>FH</i>	Fumarate hydratase, mitochondrial	0,018	Aumentada
<i>FN1</i>	Fibronectin	0,011	Aumentada
<i>H2AFY</i>	Core histone macro-H2A.1	0,026	Aumentada
<i>HADHB</i>	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial	0,005	Aumentada
<i>HDLBP</i>	Vigilin	0,017	Aumentada
<i>HIST1H2BL</i>	Histone H2B type 1-L	0,009	Aumentada
<i>HK1</i>	Hexokinase-1	0,030	Aumentada
<i>HNRNPH1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	0,012	Aumentada
<i>HNRNPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	0,008	Aumentada
<i>HP1BP3</i>	Heterochromatin protein 1-binding protein 3	0,041	Aumentada
<i>HSD17B12</i>	Very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	0,020	Aumentada
<i>HSD17B4</i>	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	0,011	Aumentada

<i>HSPD1</i>	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	0,019	Aumentada
<i>HSPG2</i>	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	0,031	Aumentada
<i>ILF2</i>	Interleukin enhancer-binding factor 2	0,041	Aumentada
<i>KRT18</i>	Keratin, type I cytoskeletal 18	0,050	Aumentada
<i>KRT8</i>	Keratin, type II cytoskeletal 8	0,017	Aumentada
<i>LAMP1</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1	0,006	Aumentada
<i>LAMP2</i>	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2	0,048	Aumentada
<i>LEMD2</i>	LEM domain-containing protein 2	0,044	Aumentada
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	0,018	Aumentada
<i>LMNA</i>	Prelamin-A/C	0,044	Aumentada
<i>LMNB1</i>	Lamin-B1	0,036	Aumentada
<i>MAP4</i>	Microtubule-associated protein 4	0,009	Aumentada
<i>MATR3</i>	Matrin-3	0,026	Aumentada
<i>MYOF</i>	Myoferlin	0,025	Aumentada
<i>NACA</i>	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	0,008	Aumentada
<i>P4HB</i>	Protein disulfide-isomerase	0,019	Aumentada
<i>PA2G4</i>	Proliferation-associated protein 2G4	0,021	Aumentada
<i>PDIA3</i>	Protein disulfide-isomerase A3	0,048	Aumentada
<i>PGRMC1</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 1	0,021	Aumentada
<i>PGRMC2</i>	Membrane-associated progesterone receptor component 2	0,011	Aumentada
<i>PHB</i>	Prohibitin	0,020	Aumentada
<i>PPM1F</i>	Protein phosphatase 1F	0,010	Aumentada
<i>PRKDC</i>	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	0,047	Aumentada
<i>PYGL</i>	Glycogen phosphorylase, liver form	0,044	Aumentada
<i>RARS</i>	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,007	Aumentada
<i>RPL10A</i>	60S ribosomal protein L10a	0,011	Aumentada
<i>RPL14</i>	60S ribosomal protein L14	0,013	Aumentada
<i>RPL18</i>	60S ribosomal protein L18	0,009	Aumentada
<i>RPL23A</i>	60S ribosomal protein L23a	0,005	Aumentada
<i>RPL24</i>	60S ribosomal protein L24	0,019	Aumentada
<i>RPL27</i>	60S ribosomal protein L27	0,005	Aumentada
<i>RPL3</i>	60S ribosomal protein L3	0,026	Aumentada
<i>RPL6</i>	60S ribosomal protein L6	0,018	Aumentada
<i>RPL8</i>	60S ribosomal protein L8	0,026	Aumentada
<i>RPLP2</i>	60S acidic ribosomal protein P2	0,010	Aumentada
<i>RPS13</i>	40S ribosomal protein S13	0,004	Aumentada
<i>RPS18</i>	40S ribosomal protein S18	0,017	Aumentada
<i>RPS2</i>	40S ribosomal protein S2	0,048	Aumentada
<i>RPS23</i>	40S ribosomal protein S23	0,017	Aumentada
<i>RPS24</i>	40S ribosomal protein S24	0,009	Aumentada
<i>RPS25</i>	40S ribosomal protein S25	0,007	Aumentada
<i>RPS26</i>	40S ribosomal protein S26	0,007	Aumentada
<i>RPS3</i>	40S ribosomal protein S3	0,045	Aumentada
<i>RPS4X</i>	40S ribosomal protein S4, X isoform	0,008	Aumentada
<i>RPS6</i>	40S ribosomal protein S6	0,049	Aumentada
<i>RPS7</i>	40S ribosomal protein S7	0,028	Aumentada

<i>RPS8</i>	40S ribosomal protein S8	0,004	Aumentada
<i>RPS9</i>	40S ribosomal protein S9	0,009	Aumentada
<i>RPSA</i>	40S ribosomal protein SA	0,004	Aumentada
<i>RRBP1</i>	Ribosome-binding protein 1	0,005	Aumentada
<i>RTN4</i>	Reticulon-4	0,010	Aumentada
<i>RUVBL1</i>	RuvB-like 1	0,030	Aumentada
<i>SARS</i>	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	0,019	Aumentada
<i>SCARB2</i>	Lysosome membrane protein 2	0,016	Aumentada
<i>SEPT9</i>	Septin-9	0,034	Aumentada
<i>SERPINB9</i>	Serpin B9	0,019	Aumentada
<i>SERPINH1</i>	Serpin H1	0,011	Aumentada
<i>SLC25A3</i>	Phosphate carrier protein, mitochondrial	0,044	Aumentada
<i>SLC25A6</i>	ADP/ATP translocase 3	0,005	Aumentada
<i>SQRDL</i>	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	0,030	Aumentada
<i>SYNCRIP</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	0,004	Aumentada
<i>TMEM109</i>	Transmembrane protein 109	0,044	Aumentada
<i>TMPO</i>	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	0,041	Aumentada
<i>TPD52L2</i>	Tumor protein D54	0,019	Aumentada
<i>TUFM</i>	Elongation factor Tu, mitochondrial	0,011	Aumentada
<i>VAT1</i>	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	0,026	Aumentada
<i>VDAC1</i>	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	0,015	Aumentada
<i>VPS26A</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	0,048	Aumentada
<i>ZYX</i>	Zyxin	0,005	Aumentada

**Tabela Anexa 5.** Proteínas identificadas no proteoma do estudo com diferença estatisticamente significativa de abundância entre os grupos GAR e GESF-NOS.

Gene	Proteína (em inglês)	q	Abundância relativa no grupo GAR
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	0,032	Aumentada
<i>COL4A4</i>	Collagen alpha-4(IV) chain	0,032	Aumentada
<i>COL4A5</i>	Collagen alpha-5(IV) chain	0,032	Aumentada
<i>LAMB2</i>	Laminin subunit beta-2	0,041	Aumentada
<i>NID1</i>	Nidogen-1	0,032	Aumentada

**Tabela Anexa 6. Proteínas do Matrissoma do estudo**

<b>Gene</b>	<b>Proteína (em inglês)</b>	<b>Categoria</b>
<i>A2M</i>	Alpha-2-macroglobulin	Associada à matriz extracelular
<i>AGRN</i>	Agrin	Membrana Basal
<i>AGT</i>	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade a, member 8)	Associada à matriz extracelular
<i>ALB</i>	Serum albumin	Associada à matriz extracelular
<i>AMBP</i>	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA1</i>	Annexin a1	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA11</i>	Annexin a11	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA2</i>	Annexin a2	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA4</i>	Annexin a4	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA5</i>	Annexin a5	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA6</i>	Annexin a6	Associada à matriz extracelular
<i>ANXA7</i>	Annexin a7	Associada à matriz extracelular
<i>APCS</i>	Serum amyloid p-component	Associada à matriz extracelular
<i>APOA1</i>	Apolipoprotein a-i	Associada à matriz extracelular
<i>APOA4</i>	Apolipoprotein a-iv	Associada à matriz extracelular
<i>APOC3</i>	Apolipoprotein c-iii	Associada à matriz extracelular
<i>APOE</i>	Apolipoprotein e	Associada à matriz extracelular
<i>APOH</i>	Beta-2-glycoprotein 1	Associada à matriz extracelular
<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin	Associada à matriz extracelular
<i>CIQC</i>	Complement component 1, q subcomponent, c chain	Associada à matriz extracelular
<i>C3</i>	Complement c3	Associada à matriz extracelular
<i>C5</i>	Complement c5	Associada à matriz extracelular
<i>C6</i>	Complement component c6	Associada à matriz extracelular
<i>C7</i>	Complement component c7	Associada à matriz extracelular
<i>C8A</i>	Complement component c8 alpha chain	Associada à matriz extracelular
<i>C8B</i>	Complement component c8 beta chain	Associada à matriz extracelular
<i>C8G</i>	Complement component c8 gamma chain	Associada à matriz extracelular
<i>C9</i>	Complement component c9	Associada à matriz extracelular
<i>CA2</i>	Carbonic anhydrase 2	Associada à matriz extracelular
<i>CASP14</i>	Caspase-14	Associada à matriz extracelular
<i>CCT2</i>	T-complex protein 1 subunit beta	Associada à matriz extracelular
<i>CCT6A</i>	T-complex protein 1 subunit zeta	Associada à matriz extracelular
<i>CD59</i>	Cd59 glycoprotein	Associada à matriz extracelular
<i>CFHR5</i>	Complement factor h-related protein 5	Associada à matriz extracelular
<i>CLU</i>	Clusterin	Associada à matriz extracelular
<i>COL12A1</i>	Collagen, type xii, alpha 1	Other structural
<i>COL18A1</i>	Collagen, type xviii, alpha 1	Membrana Basal
<i>COL1A1</i>	Collagen, type i, alpha 1	Other structural
<i>COL4A1</i>	Collagen, type iv, alpha 1	Membrana Basal
<i>COL4A2</i>	Collagen, type iv, alpha 2	Membrana Basal
<i>COL4A3</i>	Collagen, type iv, alpha 3	Membrana Basal
<i>COL4A4</i>	Collagen, type iv, alpha 4	Membrana Basal
<i>COL4A5</i>	Collagen, type iv, alpha 5	Membrana Basal
<i>COL6A1</i>	Collagen, type vi, alpha 1	Other structural
<i>COL6A2</i>	Collagen, type vi, alpha 2	Other structural
<i>COL6A3</i>	Collagen, type vi, alpha 3	Other structural



<i>COPA</i>	Coatomer subunit alpha	Associada à matriz extracelular
<i>CSTB</i>	Cystatin b (stefin b)	Associada à matriz extracelular
<i>CTSB</i>	Cathepsin b	Associada à matriz extracelular
<i>CTSD</i>	Cathepsin d	Associada à matriz extracelular
<i>CTSG</i>	Cathepsin g	Associada à matriz extracelular
<i>DCD</i>	Dermcidin	Associada à matriz extracelular
<i>DSG1</i>	Desmoglein-1	Membrana Basal
<i>EMILIN1</i>	Elastin microfibril interfacer 1	Outras proteínas estruturais
<i>F2</i>	Coagulation factor ii (thrombin)	Associada à matriz extracelular
<i>F9</i>	Coagulation factor ix	Associada à matriz extracelular
<i>FBLN1</i>	Fibulin 1	Membrana Basal
<i>FBN1</i>	Fibrillin 1	Membrana Basal
<i>FGA</i>	Fibrinogen alpha chain	Associada à matriz extracelular
<i>FGB</i>	Fibrinogen beta chain	Associada à matriz extracelular
<i>FGF1</i>	Fibroblast growth factor 1 (acidic)	Associada à matriz extracelular
<i>FGG</i>	Fibrinogen gamma chain	Associada à matriz extracelular
<i>FLG2</i>	Filaggrin family member 2	Outras proteínas estruturais
<i>FNI</i>	Fibronectin 1	Outras proteínas estruturais
<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	Associada à matriz extracelular
<i>GPX3</i>	Glutathione peroxidase 3	Associada à matriz extracelular
<i>GSN</i>	Gelsolin	Associada à matriz extracelular
<i>HP</i>	Haptoglobin	Associada à matriz extracelular
<i>HPX</i>	Hemopexin	Associada à matriz extracelular
<i>HRG</i>	Histidine-rich glycoprotein	Associada à matriz extracelular
<i>HRNR</i>	Hornerin	Outras proteínas estruturais
<i>HSD17B12</i>	Very-long-chain 3-oxoacyl-coa reductase	Associada à matriz extracelular
<i>HSPG2</i>	Heparan sulfate proteoglycan 2	Membrana Basal
<i>INHBE</i>	Inhibin, beta e	Associada à matriz extracelular
<i>ITIH1</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor h1	Associada à matriz extracelular
<i>ITIH2</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor h2	Associada à matriz extracelular
<i>ITIH4</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor h4 (plasma kallikrein-sensitive glycoprotein)	Associada à matriz extracelular
<i>ITIH5</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor h5	Associada à matriz extracelular
<i>KNG1</i>	Kininogen 1	Associada à matriz extracelular
<i>LAMA2</i>	Laminin, alpha 2	Membrana Basal
<i>LAMA5</i>	Laminin, alpha 5	Membrana Basal
<i>LAMB1</i>	Laminin, beta 1	Membrana Basal
<i>LAMB2</i>	Laminin, beta 2 (laminin s)	Membrana Basal
<i>LAMC1</i>	Laminin, gamma 1 (formerly lamb2)	Membrana Basal
<i>LGALS1</i>	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1	Associada à matriz extracelular
<i>LGALS3BP</i>	Galectin-3-binding protein	Associada à matriz extracelular
<i>LGALS7</i>	Lectin, galactoside-binding, soluble, 7	Associada à matriz extracelular
<i>LRP2</i>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	Associada à matriz extracelular
<i>LUM</i>	Lumican	Outras proteínas estruturais

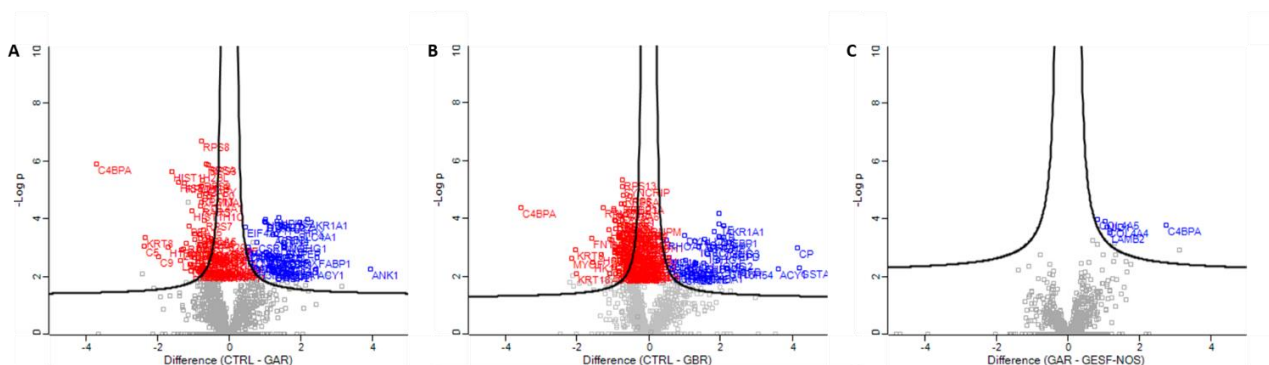
<i>LYZ</i>	Lysozyme c	Associada à matriz extracelular
<i>MFGE8</i>	Milk fat globule-egf factor 8 protein	Associada à matriz extracelular
<i>MMRN2</i>	Multimerin 2	Associada à matriz extracelular
<i>MPO</i>	Myeloperoxidase	Associada à matriz extracelular
<i>NID1</i>	Nidogen 1	Membrana Basal
<i>NID2</i>	Nidogen 2 (osteonidogen)	Membrana Basal
<i>NPNT</i>	Nephronectin	Membrana Basal
<i>PAPLN</i>	Papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein	Membrana Basal
<i>PEBP1</i>	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Associada à matriz extracelular
<i>PLG</i>	Plasminogen	Associada à matriz extracelular
<i>POSTN</i>	Periostin, osteoblast specific factor	Associada à matriz extracelular
<i>PPIA</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase a	Associada à matriz extracelular
<i>PRDX1</i>	Peroxiredoxin-1	Associada à matriz extracelular
<i>PRTN3</i>	Myeloblastin	Associada à matriz extracelular
<i>RBP4</i>	Retinol-binding protein 4	Associada à matriz extracelular
<i>S100A11</i>	S100 calcium binding protein a11	Associada à matriz extracelular
<i>S100A16</i>	S100 calcium binding protein a16	Associada à matriz extracelular
<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein a4	Associada à matriz extracelular
<i>S100A6</i>	S100 calcium binding protein a6	Associada à matriz extracelular
<i>S100A7</i>	S100 calcium binding protein a7	Associada à matriz extracelular
<i>S100A8</i>	S100 calcium binding protein a8	Associada à matriz extracelular
<i>S100A9</i>	S100 calcium binding protein a9	Associada à matriz extracelular
<i>SBSPON</i>	Chromosome 8 open reading frame 84	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINA1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade a (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINA3</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade a (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINB1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 1	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINB12</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 12	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINB3</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 3	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINB6</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 6	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINB9</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade b (ovalbumin), member 9	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINC1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade c (antithrombin), member 1	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINF1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade f (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	Associada à matriz extracelular
<i>SERPING1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade g (c1 inhibitor), member 1	Associada à matriz extracelular
<i>SERPINH1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade h (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	Associada à matriz extracelular
<i>SOD1</i>	Superoxide dismutase [cu-zn]	Associada à matriz extracelular
<i>SORD</i>	Sorbitol dehydrogenase	Associada à matriz extracelular
<i>TF</i>	Serotransferrin	Associada à matriz extracelular
<i>TGFBI</i>	Transforming growth factor, beta-induced, 68kda	Outras proteínas estruturais
<i>TGM2</i>	Transglutaminase 2 (c polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	Associada à matriz extracelular
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	Associada à matriz extracelular
<i>TINAGL1</i>	Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	Membrana Basal
<i>TNC</i>	Tenascin c	Membrana Basal

<i>TTR</i>	Transthyretin	Associada à matriz extracelular
<i>VTN</i>	Vitronectin	Outras proteínas estruturais
<i>VWAI</i>	Von willebrand factor a domain containing 1	Associada à matriz extracelular
<i>AIBG</i>	Alpha-1b-glycoprotein	Proteína Candidata
<i>AHSG</i>	Alpha-2-hs-glycoprotein	Proteína Candidata
<i>ANPEP</i>	Aminopeptidase n	Proteína Candidata
<i>APOA2</i>	Apolipoprotein a-ii	Proteína Candidata
<i>APOB</i>	Apolipoprotein b-100	Proteína Candidata
<i>AZGP1</i>	Zinc-alpha-2-glycoprotein	Proteína Candidata
<i>BCAM</i>	Basal cell adhesion molecule	Proteína Candidata
<i>CIQBP</i>	Complement component 1 q subcomponent-binding protein, mitochondrial	Proteína Candidata
<i>C4A</i>	Complement c4-a	Proteína Candidata
<i>C4B</i>	Complement c4-b	Proteína Candidata
<i>C4BPA</i>	C4b-binding protein alpha chain	Proteína Candidata
<i>CALR</i>	Calreticulin	Proteína Candidata
<i>CAPN1</i>	Calpain-1 catalytic subunit	Proteína Candidata
<i>CAPN2</i>	Calpain-2 catalytic subunit	Proteína Candidata
<i>CDH13</i>	Cadherin-13	Proteína Candidata
<i>CFB</i>	Complement factor b	Proteína Candidata
<i>CFH</i>	Complement factor h	Proteína Candidata
<i>CFHR1</i>	Complement factor h-related protein 1	Proteína Candidata
<i>CNDP2</i>	Cytosolic non-specific dipeptidase	Proteína Candidata
<i>CR1</i>	Complement receptor type 1	Proteína Candidata
<i>DAG1</i>	Dystroglycan	Proteína Candidata
<i>DEFA3</i>	Neutrophil defensin 3	Proteína Candidata
<i>DNPEP</i>	Aspartyl aminopeptidase	Proteína Candidata
<i>DPP3</i>	Dipeptidyl peptidase 3	Proteína Candidata
<i>ENPEP</i>	Glutamyl aminopeptidase	Proteína Candidata
<i>FBLIM1</i>	Filamin-binding lim protein 1	Proteína Candidata
<i>GAA</i>	Lysosomal alpha-glucosidase	Proteína Candidata
<i>GANAB</i>	Neutral alpha-glucosidase ab	Proteína Candidata
<i>HNRNPM</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein m	Proteína Candidata
<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein hsp 90-alpha	Proteína Candidata
<i>HSP90B1</i>	Endoplasmin	Proteína Candidata
<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1	Proteína Candidata
<i>IGHA1</i>	Immunoglobulin heavy constant alpha 1	Proteína Candidata
<i>IGHG1</i>	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	Proteína Candidata
<i>IGHG2</i>	Immunoglobulin heavy constant gamma 2	Proteína Candidata
<i>IGHG3</i>	Immunoglobulin heavy constant gamma 3	Proteína Candidata
<i>IGKC</i>	Immunoglobulin kappa constant	Proteína Candidata
<i>IGKV3-20</i>	Immunoglobulin kappa variable 3-20	Proteína Candidata
<i>IGLL5</i>	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	Proteína Candidata
<i>ITGA1</i>	Integrin alpha-1	Proteína Candidata
<i>ITGA3</i>	Integrin alpha-3	Proteína Candidata
<i>ITGA8</i>	Integrin alpha-8	Proteína Candidata

<i>ITGAV</i>	Integrin alpha-v	Proteína Candidata
<i>ITGB1</i>	Integrin beta-1	Proteína Candidata
<i>ITGB3</i>	Integrin beta-3	Proteína Candidata
<i>KRT1</i>	Keratin, type ii cytoskeletal 1	Proteína Candidata
<i>LAP3</i>	Cytosol aminopeptidase	Proteína Candidata
<i>LIMS1</i>	Lim and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	Proteína Candidata
<i>LYPLA1</i>	Acyl-protein thioesterase 1	Proteína Candidata
<i>MIF</i>	Macrophage migration inhibitory factor	Proteína Candidata
<i>MME</i>	Neprilysin	Proteína Candidata
<i>NFASC</i>	Neurofascin	Proteína Candidata
<i>NPEPPS</i>	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Proteína Candidata
<i>ORM1</i>	Alpha-1-acid glycoprotein 1	Proteína Candidata
<i>ORM2</i>	Alpha-1-acid glycoprotein 2	Proteína Candidata
<i>OTUB1</i>	Ubiquitin thioesterase otub1	Proteína Candidata
<i>PDLIM1</i>	Pdz and lim domain protein 1	Proteína Candidata
<i>PDLIM7</i>	Pdz and lim domain protein 7	Proteína Candidata
<i>PEPD</i>	Xaa-pro dipeptidase	Proteína Candidata
<i>PKM</i>	Pyruvate kinase pkm	Proteína Candidata
<i>PSAP</i>	Prosaposin	Proteína Candidata
<i>PSMB1</i>	Proteasome subunit beta type-1	Proteína Candidata
<i>RPS18</i>	40s ribosomal protein s18	Proteína Candidata
<i>TGFB111</i>	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	Proteína Candidata
<i>USP14</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	Proteína Candidata
<i>ZNF185</i>	Zinc finger protein 185	Proteína Candidata

---

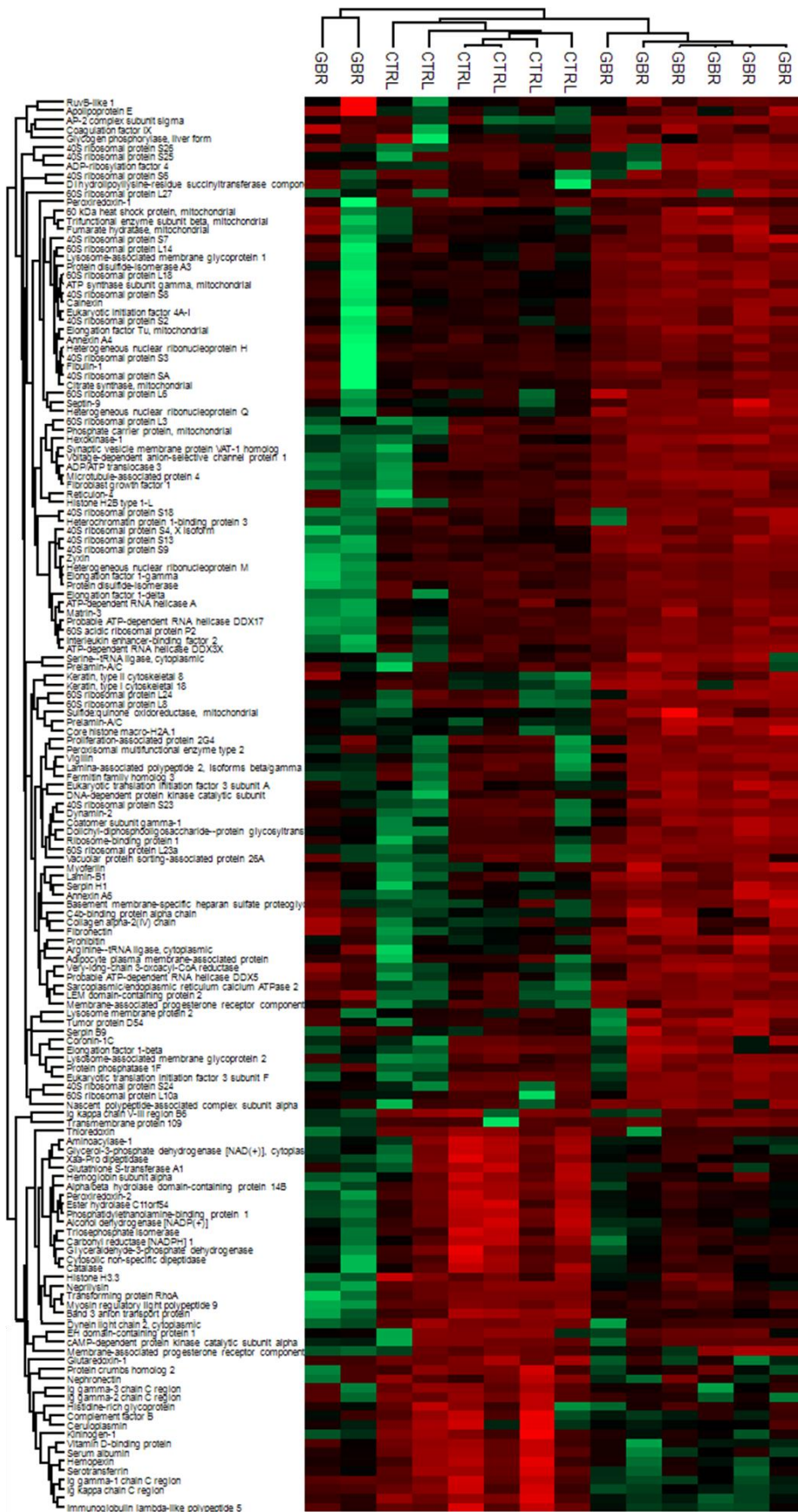
## FIGURAS ANEXAS



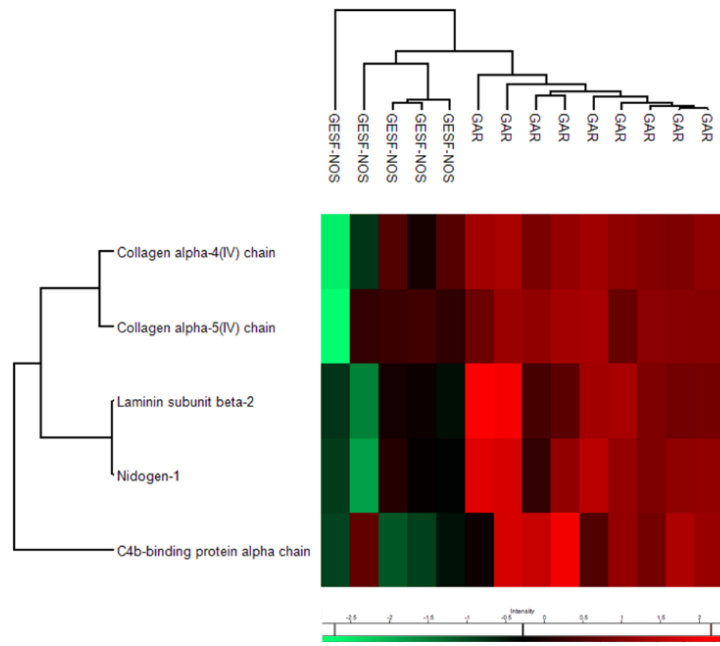
**Figura Anexa 1.** *Volcano plot* mostrando proteínas com diferença de abundância entre os grupos. Análises realizadas pelo teste t de student com correção para múltiplas comparações pelo método de Benjamini-Hochberg ( $q < 0,05$ ). Eixo y representa  $-\log_{10}$  do valor de p ajustado e eixo x  $\log_2$  da diferença de abundância entre os grupos. A) Comparação entre os grupos CTRL e HRG, em azul proteínas com aumento de abundância no grupo CTRL e em vermelho com redução de abundância. B) Comparação entre os grupos CTRL e LRG, em azul proteínas com aumento de abundância no grupo CTRL e em vermelho com redução de abundância. C) Comparação entre os grupos HRG e GESF-NOS, em azul proteínas com aumento de abundância no grupo HRG.



**Figura Anexa 2.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e CTRL.



**Figura Anexa 3.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos CTRL e GBR.



**Figura Anexa 4.** Agrupamento hierárquico de proteínas com diferenças significantes de abundância entre os grupos GAR e GESF-NOS.



*Artigo Submetido*