

ANDREIA WATANABE

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

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
2022

ANDREIA WATANABE

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

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
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Watanabe, Andreia

Patogênese genética-molecular da síndrome nefrótica córtico-resistente, síndrome nefrótica congênita e glomerulosclerose segmentar e focal : realidade e contribuições da análise de uma população pediátrica brasileira / Andreia Watanabe. -- São Paulo, 2022.

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

Descritores: 1.Síndrome nefrótica
2.Glomerulosclerose segmentar e focal
3.Predisposição genética para doença 4.Padrões de herança 5.Fatores raciais 6.Falência renal crônica
7.Criança

USP/FM/DBD-379/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos queridos por sua existência.
Aos pacientes que me ensinam todos os dias.

Agradecimentos

Ao Prof Luiz Fernando Onuchic por acreditar que esse trabalho seria possível. Guardo minha admiração e gratidão pela sua humanidade e iluminação que sempre caminham juntos.

Ao Elieser Watanabe, irmão que me incentivou a entrar nesse universo da pesquisa.

A Prof Magda Sampaio e Prof Vicente Odone que me apoiaram nessa empreitada desde o início.

A família Navajas pelo suporte e por dividirmos tantas perguntas instigantes que nos fazem seguir em frente.

A Amanda Narciso pelo companheirismo imprescindível e incansável nos experimentos realizados no SELA.

Ao Precil Menezes, por dividirmos os experimentos e aprendermos junto.

Ao Antonio Lerário pelos ensinamentos e precioso apoio nas análises dos casos.

Ao Prof Hildebrandt pela oportunidade de estar em seu laboratório e ao Prof Sampson pelas discussões e direcionamento dos *papers*.

A Kelly Nunes pela colaboração essencial nas análises de ancestralidade.

Ao Frederico Ferreira pelo apoio nas análises de mecânica molecular.

A Andreia Rangel e Fernanda Macaferri pelo suporte na extração e cuidado das amostras no LIM36.

A Andressa, Fernanda, Jéssica, Vivian, Gilson, Livia, Eliene, Leandro e Mirtes por todo apoio nos experimentos no passado e no presente. Gratidão a todos os colegas do LIM29.

A Maria Helena, Giovanna e Suzane por compartilharmos os cuidados dos casos no dia a dia do ambulatório de glomerulopatias do Instituto da Criança e do Adolescente.

A todo o time de nefrologia pediátrica, TRS e transplante renal do ICr por podermos caminhar juntos em todos os momentos, e por nos apoiarmos uns aos outros sempre.

Aos colegas médicos de outras cidades que enviaram e fizeram o seguimento dos seus casos Patrícia, Maria Isabel, Andressa, Maristela, Eleonora, Eduardo, Fabiola, Flavio, Jussara, Thais e Vera.

A bibliotecária Mariza por todos os artigos e suporte e ao Pedro Pereira pelas orientações de sempre.

Ao laboratório Mendelics e laboratório Genera pelo suporte na realização dos sequenciamentos.

Aos amigos queridos que estão sempre presentes nas horas mais necessárias.

Muita gratidão!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Doença renal crônica no ambiente pediátrico	1
1.2. DRC pediátrica: a busca pelo entendimento da patogênese	2
1.3. Proteinúria e podócito	4
1.3.1. Diafragma em fenda	4
1.3.2. Citoesqueleto	9
1.3.3. Relação entre a membrana basal glomerular e o diafragma em fenda	13
1.3.4. Proteínas nucleares e relacionadas ao complexo do poro nuclear	14
1.3.5. Genes mitocondriais e de expressão mitocondrial	16
1.3.6. Fator circulante	17
1.4. Síndrome nefrótica na população pediátrica	18
1.5. Identificação de genes mutados e análise mutacionais	19
1.6. Ampliação dos cenários clínico e molecular proporcionada pelo sequenciamento de nova geração	19
1.6.1. Formas mendelianas	20
1.6.2. Nefropatias associadas a <i>APOL1</i>	27
1.7. Importância do estudo	30
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo central	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1. Casuística	33
3.2. Métodos	34
3.2.1. Extração e conservação do DNA genômico	34
3.2.2. Metodologias de sequenciamento	35
3.2.3. Preparo de bibliotecas e sequenciamento dos painéis customizados	34
3.2.4. Preparo de biblioteca e sequenciamento de exoma completo	37
3.2.5. Análise primária dos dados	38
3.2.6. Análise secundária dos dados	38
3.2.7. Análises de mecânica molecular	42
3.2.8. Análise de ancestralidade	42
3.2.9. Correlações genótipo-fenótipo	44
3.2.10. Análise estatística	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Perfil demográfico da população de pacientes estudada	45
4.2. Perfil da terapêutica imunossupressora empregada	46
4.3. Perfil histológico renal	47
4.4. Evolução clínica da população avaliada	48
4.5. Perfil de distribuição do genótipo de alto risco de <i>APOL1</i> e implicações clínicas	49
4.6. Perfil de ancestralidade genética global dos pacientes da coorte	51
4.7. Variantes mendelianas patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto identificadas na população analisada	54
4.8. Análises de segregação dirigidas às famílias com formas mendelianas de SNCR, SNC ou GESF	56
4.9. Análises de mecânica molecular para variantes de significado incerto associadas a herança Autossômica recessiva	57

4.10. Variantes mendelianas causativas identificadas em pacientes da coorte	62
4.11. Perfil clínico dos pacientes com formas mendelianas de síndrome nefrótica	63
4.12. Descrição dos casos com variantes causativas	65
4.13. Ancestralidade local das variantes mendelianas identificadas	75
4.14. Análise comparativa dos perfis demográficos e clínicos entre pacientes com causas mendelianas, com GAR de <i>APOL1</i> e sem achados genéticos identificados relacionados a SN	77
4.15. Efeitos da idade de manifestação da síndrome nefrótica sobre a evolução clínica e associação com o perfil genético dos pacientes	78
4.16. Fatores de risco de progressão para doença renal estágio terminal identificados na coorte analisada	80
5. DISCUSSÃO	82
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS	95
8. ANEXO1: artigo publicado	
9. ANEXO2: artigo submetido	

RESUMO

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* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Síndrome nefrótica (SN) é a segunda causa mais frequente de doença renal estágio terminal (DRET) na faixa etária pediátrica. Atualmente até 30% dos casos de SN congênita (SNC) e SN córtico-resistente (SNCR) nessa faixa etária se associam a causas mendelianas, entretanto as casuísticas até então analisadas apresentam pouca representação de pacientes provenientes do Hemisfério Sul. Nesse cenário, 101 pacientes de 98 famílias com SNC, SNCR e/ou glomeruloesclerose segmentar e focal (FSGS), seguidos prioritariamente no Instituto da Criança e do Adolescente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, foram submetidos a avaliação genético-molecular por meio da análise de um painel de 62 genes associados a SN ou de sequenciamento de exoma completo, bem como por meio de análise genética para avaliação de ancestralidade. Também avaliamos seus dados clínicos e laboratoriais, correlacionando-os com os achados genético-moleculares. Utilizamos os critérios do ACMG para classificar a patogenicidade das variantes, e posteriormente análises de mecânica molecular *in silico* para ampliar e fortalecer a avaliação das variantes de significado incerto. Nessa casuística, a idade de manifestação da SN foi de 2,9 anos, ocorrendo no primeiro ano de vida em 13,8% dos casos, e o tempo de seguimento de 5,7 anos. A taxa de consanguinidade parental autodeclarada foi de 5,9% e de história familiar de doença renal de 13,9%. Pacientes que atingiram remissão completa de SN após uso de corticosteroide ou inibidor de calcineurina, assim como os que apresentaram lesões histológicas mínimas (LHM), não evoluíram para DRET, desfecho atingido por outros 44 pacientes (43,6%). Oito pacientes apresentaram genótipo de alto risco (GAR) de *APOL1*, grupo que manifestou SN mais tardiamente e apresentou mais frequentemente glomerulopatia colapsante. Não observamos, entretanto, associação de GAR de *APOL1* com a raça autodeclarada não branca ou com ancestralidade genética global africana. Causas mendelianas foram encontradas em 13 famílias (13,3%), frequência similar às de populações equivalentes com baixas taxas de consanguinidade, e incluíram variantes nos genes *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *PLCE1*, *COQ2*, *CUBN* e *COL4A5*. Duas das nove variantes causativas novas identificadas se posicionam em regiões genômicas de ancestralidade nativo-americana. Pacientes com causas mendelianas ou com GAR de *APOL1* progrediram mais rapidamente para DRET que aqueles sem achados genéticos identificados, assim como pacientes autodeclarados não brancos. Pacientes com maior porcentagem de ancestralidade não europeia apresentaram a mesma tendência. Análise por regressão logística de Cox revelou que idade de manifestação de SN menor que

1 ano ou maior ou igual a 9 anos, raça autodeclarada não branca e histologia renal que não LHM se associaram a risco aumentado para atingir DRET, independentemente de GAR de *APOL1* ou de causas mendelianas. Recidiva de SN foi observada em 9/29 pacientes (31%) submetidos a transplante renal, mas não em quatro pacientes com causas mendelianas e outros quatro com GAR de *APOL1*. Nossos resultados ampliam a caracterização genética molecular e clínica da SNC, SNCR e GESF em idade pediátrica, bem como o entendimento de sua patogênese.

Descritores: Síndrome nefrótica; Glomerulosclerose segmentar e focal; Predisposição genética para doença; Padrões de herança; Fatores raciais; Falência renal crônica; Criança.

ABSTRACT

Watanabe A. *Molecular genetic pathogenesis of steroid-resistant nephrotic syndrome, congenital nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: reality and contributions from the analysis of a Brazilian pediatric population* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Nephrotic Syndrome (NS) is the second leading cause of end-stage kidney disease (ESKD) in the pediatric age range. Currently, up to 30% of congenital NS (CNS) and steroid-resistant NS (SNCR) cases in this age range are associated with Mendelian causes, however the previously analyzed cohorts display low representation of patients from the Southern Hemisphere. In this scenario, 101 patients from 98 families with CNS, SNCR and/or focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) followed primarily at the Instituto da Criança e do Adolescente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP underwent genetic molecular evaluation through analysis of a panel including 62 genes associated with NS or whole-exome sequencing, as well as genetic analysis to evaluate ancestry. We also analyzed their clinical and laboratorial data and correlated them with the molecular genetic findings. ACMG criteria were used to classify the pathogenicity of the variants, followed by *in silico* molecular mechanics analysis to broaden and strengthen the assessment of variants of uncertain significance. In this cohort, the age of NS onset was 2.9 years, occurring in the first year of life in 13.8% of the cases, and the follow-up time was 5.7 years. The rate of self-reported parental consanguinity was 5.9% and of family history of kidney disease 13.9%. Patients who achieved complete remission of NS after using corticosteroids or calcineurin inhibitor, as well as those who presented minimal change disease (MCD), did not progress to ESKD, outcome reached by another 44 patients (43.6%). Eight patients harbored an *APOL1* high-risk genotype (HRG), a group of patients that displayed later NS onset and presented more often collapsing glomerulopathy. However, we did not observe association of *APOL1* HRG with self-declared non-White race and with African global genetic ancestry. Mendelian causes were found in 13 families (13,3%), a frequency similar to the ones detected in equivalent populations with low inbreeding rates, and included variants in the *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1*, *PLCE1*, *COQ2*, *CUBN* and *COL4A5* genes. Two of the nine novel identified causative variants are located in genomic regions of Native American ancestry. Patients with Mendelian causes or with *APOL1* HRG progressed more rapidly to ESKD than those with no identified genetic findings, as well as self-declared non-White patients. Patients with higher percentage of non-European ancestry showed the same trend. Cox logistic regression analysis revealed that age of NS onset below 1 year or equal or above 9 years of age, self-declared non-White race, and non-MCD renal histology were associated with increased risk of reaching ESKD regardless of *APOL1* HRG or Mendelian causes. NS recurrence was observed in 9/29 patients (31%) who underwent kidney transplantation, but not in four patients with Mendelian causes nor in another four with *APOL1* HRG. Our results extend the molecular and clinical genetic characterization of CNS, SRNS and FSGS in pediatric age, as well as the understanding of its pathogenesis.

Descriptors: Nephrotic syndrome; Focal segmental glomerulosclerosis; Genetic predisposition to disease; Inheritance pattern; Race factors Chronic kidney failure; Child.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença renal crônica no ambiente pediátrico

O conhecimento epidemiológico sobre doença renal crônica (DRC) ampliou-se substancialmente para a população adulta nas últimas décadas, enquanto uma evolução mais tímida foi observada para a população pediátrica. A indisponibilidade de algumas informações importantes, associada às particularidades da criança e do adolescente, dificulta não apenas a padronização de sua definição como também sua identificação e quantificação epidemiológica¹. Vale notar que a taxa de filtração glomerular (TFG) normalizada para a superfície corpórea apresenta aumento progressivo do nascimento até os dois anos de vida em uma criança saudável, quando atinge valores semelhantes aos de adultos². Além disso, as equações empregadas para estimar a função renal não têm se mostrado fidedignas em adolescentes maduros³. Deve-se atentar, também, para o fato de que o perfil de causas de DRC na faixa etária pediátrica é distinto do encontrado na população adulta. Nesse cenário, crianças com importantes malformações congênitas podem ser diagnosticadas com DRC antes mesmo de 3 meses de documentação de alterações fenotípicas renais⁴.

A incidência de DRC em população pediátrica reportada pelo registro da Associação Europeia de Diálise e Transplante (EDTA) é de 11 a 12 por milhão para os estágios 3 a 5 de DRC, traduzindo-se em uma prevalência de 55-60 por milhão⁵. Em 2008, a incidência e a prevalência de doença renal estágio terminal (DRET) foram, respectivamente, de 15 e 85 por milhão nos EUA⁶. No Brasil, a incidência de terapia de substituição renal (TSR) foi de 6,6 casos por milhão de crianças em 2012⁷. Não dispomos, no entanto, de dados epidemiológicos precisos sobre DRC em população pediátrica brasileira.

As anormalidades congênitas do rim e trato urinário (*CAKUT – Congenital Abnormalities of the Kidney and Urinary Tract*) constituem a causa mais frequente de DRC associada à progressão para DRET na faixa etária pediátrica, seguidas pela síndrome nefrótica resistente a corticosteroide (SNCR), condição em que o padrão histológico mais comum é glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF)⁸. Essas duas entidades clínicas associadas à DRET, entretanto, abarcam múltiplas doenças raras que, embora compartilhem expressões clínicas

e vias fisiopatológicas finais comuns, apresentam patogêneses primárias específicas. Vale notar, ainda, que os mecanismos moleculares e celulares envolvidos em grande parte dessas desordens encontram-se amplamente desconhecidos.

1.2. DRC pediátrica: a busca pelo entendimento da patogênese

Enquanto progressos nas últimas décadas foram relativamente proficientes em esclarecer mecanismos comuns de progressão da DRC ao atingir determinados limiares estruturais e/ou funcionais, o mesmo não foi obtido em relação à patogênese específica dentro da diversidade das nefropatias pediátricas. Vale mencionar que estudos de natureza clínica, anatomopatológica e bioquímica não foram capazes de avançar suficientemente na identificação de marcadores específicos de desenvolvimento e progressão dessas doenças e/ou de alvos para intervenção terapêutica⁹. Alguns modelos experimentais animais foram capazes de trazer informações adicionais relevantes, porém, de forma semelhante, não ampliaram a caracterização e o entendimento de vias de sinalização celular envolvidas em sua patogênese, impedindo o desenvolvimento potencial de intervenções específicas sobre o curso dessas doenças. Nesse ambiente, tornou-se essencial centrar os esforços de pesquisa na realidade molecular associada a tais nefropatias. Iniciam-se, então, a partir da década de 90, os estudos de natureza genético-molecular voltados à ampliação do entendimento da patogênese das enfermidades renais genéticas pediátricas.

O esclarecimento dos defeitos primários associados a nefropatias monogênicas, isto é, causadas por mutações em um único gene, consistiu no primeiro passo de relevo¹⁰. Dada a participação significativamente mais pronunciada de nefropatias monogênicas sobre a realidade de DRC na faixa etária pediátrica que na adulta, esses avanços tiveram uma expressão mais intensa na nefrologia pediátrica que na nefrologia geral⁴. Até o momento, mais de 600 genes foram implicados em doenças renais monogênicas, chegando a 50% em coortes pediátricas e a até 30% em coortes de adultos com doenças renais não relacionadas a diabetes melito¹¹. A identificação dos respectivos genes e seus produtos possibilitou a realização de estudos de natureza celular e orgânica,

pautados em modelos bioquímicos, *in vitro* e *in vivo*. Nesse momento, configuraram-se grandes saltos de conhecimento, estendendo sobremaneira a caracterização e compreensão das vias de sinalização alteradas na doença e das anormalidades biológicas subsequentes.

Com a substantiva identificação de mutações em nefropatias pediátricas, a determinação genotípica de tais pacientes passou a fazer parte não apenas da ciência de maior destaque voltada a esta área, como também da definição diagnóstica e de condutas clínicas^{6,8,9}.

Nos anos mais recentes, o desenvolvimento tecnológico e a ampliação conceitual das bases moleculares das nefropatias genéticas vêm permitindo um aprofundamento progressivo de sua patogênese. A disponibilidade do sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*) constituiu-se em um desses grandes avanços, permitindo análises genotípicas amplas e complexas. Foi com base nessa metodologia que foram desenvolvidas as análises de exoma completo e de painéis customizados para avaliações genéticas dirigidas^{11,12,13}. Vale notar que os estudos genômicos dirigidos a tais enfermidades confirmaram uma maior prevalência de causas monogênicas em pacientes que manifestaram DRC antes dos 25 anos de idade¹⁰. Nos últimos anos, avanços substanciais da investigação da patogênese de doenças renais monogênicas também têm sido obtidos por meio de abordagens transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas^{12,13}.

As descobertas e avanços crescentes reportados nessas avaliações genômicas, entretanto, foram obtidos primariamente em populações de países desenvolvidos, evidenciando uma baixa representação de populações associadas a índices de desenvolvimento humano mais baixos¹¹. Esta realidade limita a extensão da investigação das bases genéticas e moleculares dessas doenças, especialmente em populações de elevada miscigenação. Essa limitação se aplica à realidade brasileira, uma vez que o Brasil, assim como a muitos dos países da América Latina, tem sua população constituída por diversas etnias e altamente miscigenada.

1.3. Proteinúria e o podócito

Proteinúria é um marcador prognóstico de doença renal, associado à progressão de doença renal crônica. A proteinúria pode ser de origem tubular ou glomerular; no segundo caso, reflete geralmente alteração de permeabilidade da barreira de filtração glomerular (BFG), decorrente classicamente de anormalidades da membrana basal glomerular (MBG) e/ou de células podocitárias¹⁴.

As células podocitárias, de origem epitelial, são altamente diferenciadas. São compostas por um corpo celular e seus prolongamentos, sendo eles o processo primário e processos podocitários secundários e terciários, estes denominados pedicelos. Em sua localização externa ao capilar glomerular, as células podocitárias são expostas a forças físicas necessárias para promover a filtração glomerular. Repousando sobre a MBG, os pedicelos conectam-se entre si, formando o diafragma em fenda que, associado à carga negativa da membrana, restringe a filtração de proteínas através de sua estrutura de conformação em zíper. Uma complexa estrutura de citoesqueleto, composta por microtúbulos, filamentos intermediários e actina, não só possibilita a acomodação dinâmica dos processos podocitários à MBG de acordo com as demandas da BFG, como também constitui uma rede de transdução de sinais intrapodocitários^{14,15,16}.

1.3.1. Diafragma em fenda

O diafragma em fenda é composto por um conjunto de proteínas essenciais às junções intercelulares e a vias de sinalização intracelular. P-caderina, β -catenina, caderina atípica (FAT), *zonula occludens 1* (ZO-1), molécula de adesão juncional A (JAM-A), ocludina e cingulina são proteínas encontradas em junções intercelulares de caráter geral (*adherens junctions e tight junctions*), também presentes no podócito. Nefrina, Neph1 e podocina, por sua vez, expressam-se quase que exclusivamente em podócitos¹⁷.

Nefrina, Neph 1, P-caderina, FAT, neurexina e efrina β 1 compõem o diafragma em fenda com suas porções extracelulares. ZO-1, podocina, proteína associada a CD2 (CD2AP) e guanilato quinase associada a membrana 1 contendo domínios WW e PDZ (MAGI1), por sua vez, se localizam na porção citoplasmática e interagem com proteínas componentes do citoesqueleto, bem

Gene (conclusão)	Produto proteico
<i>ARHGAP24</i>	Proteína 24 ativadora da Rho GTPase
<i>ANLN</i>	Anilina
<i>WT1</i>	Wilms tumor tipo 1
<i>LMX1B</i>	Fator de transcrição LIM homeobox
<i>SMARCAL1</i>	Proteína SMARCA-like 1
<i>NXF5</i>	Fator 5 do RNA exportador nuclear
<i>PAX2</i>	Caixa pareada 2
<i>E2F3</i>	Fator de transcrição e2f3
<i>LMNA</i>	Laminina
<i>ZMPSTE24</i>	Zinco metaloprotease STE24
<i>NUP107</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 107
<i>NUP205</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 205
<i>NUP37</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 37
<i>NUP160</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 160
<i>NUP85</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 85
<i>NUP133</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 133
<i>NUP93</i>	Nucleoporina do complexo proteico do poro nuclear 93
<i>XPO5</i>	Exportina 5
<i>LAMB2</i>	Laminina β 2
<i>COL4A3</i>	Colágeno tipo 4 cadeia α 3
<i>COL4A4</i>	Colágeno tipo 4 cadeia α 4
<i>COL4A5</i>	Colágeno tipo 4 cadeia α 5
<i>ITGA3</i>	Integrina α 3
<i>ITGB4</i>	Integrina β 4
<i>COQ2</i>	Coenzima Q2 4-hidroxi benzoato polifenil transferase
<i>COQ6</i>	Coenzima Q6 monooxigenase
<i>PDSS2</i>	Fenil difosfatase sintase, Subunidade 2
<i>ADCK4</i>	Quinase contendo domínio AARF 4
<i>MTTL1</i>	t-RNA-Leu
<i>SCARB2</i>	Proteína integral de membrana lisossomal tipo 2
<i>CUBN</i>	Cubilina
<i>GLEPP1</i>	Proteína epitelial glomerular 1
<i>PTPRO</i>	Proteína tirosina fosfatase, Tipo receptor, O
<i>CRB2</i>	Componente do complexo de polaridade celular CRUMBS 2
<i>DGKE</i>	Diaglicerol quinase ϵ
<i>FAT1</i>	Protocaderina FAT1
<i>KANK1</i>	Proteína contendo motivo KN e domínio de repetição de anquirina 1
<i>KANK2</i>	Proteína contendo motivo KN e domínio de repetição de anquirina 2
<i>KANK4</i>	Proteína contendo motivo KN e domínio de repetição de anquirina 4
<i>PODXL</i>	Podocalixina
<i>TTC21B</i>	Proteína contendo domínio de repetição tetratricopeptideo 21B
<i>MEFV</i>	Pirina
<i>NEIL1</i>	Endonuclease VIII-like 1
<i>LAMA5</i>	Laminina subunidade α 5
<i>GAPVD1</i>	Proteína ativadora de GTPase
<i>ANKFY1</i>	Proteína contendo repetições anquirina e domínio FYVE 1
<i>MAGI2</i>	Guanilato quinase associada a membrana e contendo domínios WW e PDZ 2
<i>TNS2</i>	Tensina 2
<i>DLC1</i>	Proteína ativadora de Rho GTPase 7
<i>CDK20</i>	Quinase dependente de ciclina 20
<i>ITSN1</i>	Intersectina 1
<i>ITSN2</i>	Intersectina 2
<i>LAGE3</i>	Subunidade LAGE3 do complexo EKC/KEOPS
<i>OSGEP</i>	O-Sialoglicoproteína endopeptidase
<i>TP53RK</i>	Subunidade TP53RK do complexo EKC/KEOPS
<i>TPRKB</i>	Subunidade TPRKB do complexo EKC/KEOPS
<i>WDR73</i>	Proteína contendo repetição WD 73
<i>SGPL1</i>	Liase esfingosina-1-fosfato
<i>TBC1D8B</i>	Membro 8B da família do domínio TBC1
<i>DAAM2</i>	Ativador associado à morfogênese desalinhada 2
<i>AVIL</i>	Adivilina
<i>PRDM15</i>	Proteína contendo domínio PR 15
<i>TRIM8</i>	Proteína contendo motivo tripartido 8
<i>KIRREL1</i>	Nefrina-like 1
<i>NOS1AP</i>	Proteína adaptadora de óxido nítrico sintase 1
<i>GON7</i>	Subunidade GON7 do complexo KEOPS

A nefrina é uma proteína da superfamília das imunoglobulinas. Seu domínio extracelular é composto por oito domínios similares a IgG (*IgG-like domain*) e uma repetição fibronectina tipo 3 (*fibronectin type 3 repeat*)¹⁸. Neph1 também contém cinco domínios similares a IgG em sua porção extracelular¹⁹. As interfaces entre esses domínios, juntamente com outras proteínas como neurexina, FAT e efrina β 1, são responsáveis pela formação de uma superfície em conformação de zíper que recobre a superfície externa do capilar glomerular. Forma-se, assim, uma superfície vazada. Ambas, nefrina e Neph1, apresentam um domínio transmembrânico único e uma cauda citoplasmática curta^{17,20}. A nefrina também desempenha papel importante em vias de sinalização celular, em conjunto com moléculas citoplasmáticas podocitárias envolvidas em polaridade, tráfego à membrana, organização da actina, sinalização mecânica do cálcio e sobrevivência celular^{17,20}.

A nefrina apresenta fosforilação de tirosinas dividida genericamente em dois grupos: A e B. Ambos podem ser fosforilados por membros da família das quinases Src. A ativação de tirosinas do grupo A induz a ligação p85/PI3K, levando à ativação de Akt e Rac1 e conseqüente recrutamento de cofilina. Esses resíduos também recrutam Cas, que uma vez associada à fosforilação de tirosinas do grupo B, permite o acoplamento Crk1/2/L. Esta sequência de ativação molecular, por sua vez, modula o citoesqueleto de actina e, conseqüentemente, a dinâmica de adesão focal do podócito. Além disso, o processo de fosforilação de tirosinas presentes na nefrina parece também modular a formação da lamelipodia, por meio de sua interação com diversas proteínas relacionadas à polimerização da actina^{21,22}. Vale notar que outras alterações associadas a um desarranjo na fosforilação de tirosinas da nefrina também induzem proteinúria, incluindo a doença renal do diabetes e o próprio processo de DRC^{23,24,25}.

Duas vias de endocitose foram identificadas no podócito, uma dependente e outra independente de clatrina. Clatrina é recrutada no estágio inicial da invaginação do endossomo, processo dependente de proteínas como actina, endofilina-1, α -adaptina e sinaptojanina. Dinamina GTPase é então recrutada para a vesícula, onde é envelopada. Forma-se a seguir uma constrição no ápice da vesícula, que culmina em seu desprendimento da membrana de origem e

internalização completa. A ativação das vias de polaridade planar da célula durante o desenvolvimento glomerular parece estimular a endocitose da nefrina via mecanismos dependentes de clatrina/ β -arrestina²⁶. De modo similar, a ativação de Notch parece também induzir a internalização da nefrina, neste caso por meio um processo dependente da via β -arrestina/dinamina²⁶. Interessantemente, muitas das mutações patogênicas em *NPHS1* parecem resultar na perda de função da nefrina, decorrente de sua retenção no retículo endoplasmático. No mesmo sentido, o endereçamento da nefrina à membrana plasmática podocitária encontra-se perturbado em várias doenças humanas relacionadas a proteinúria^{26,27}. Interessantemente, a expressão de *NPHS1* se reduz na GESF. O declínio da expressão da nefrina observado ao longo da evolução de doenças renais pode decorrer da perda de podócitos. De fato, pacientes com LHM apresentam um padrão granular de distribuição da nefrina, correspondente ao grau de fusão dos processos podocitários^{28,29}

A podocina, produto proteico de *NPHS2*, é uma proteína com estrutura semelhante a um grampo de localização citoplasmática, adjacente à porção interna da membrana celular. A podocina interage com nefrina, Neph1 e CD2AP, sendo importante no recrutamento da nefrina para as jangadas lipídicas (*lipid rafts*) presentes na superfície celular. Vale notar que este processo amplifica a sinalização da nefrina. O domínio PHB (*prohibin homology*) parece ter um papel regulatório na atividade do canal TRPC6, agindo como um mecanossensor nos podócitos³⁰. Além disso, sítios de fosforilação na podocina descritos em modelo animal regulam sua multimerização e sua interação com a nefrina e CD2AP³¹. Vale destacar que *LMX1 β* é um dos fatores de transcrição que controlam a expressão de podocina. Variantes patogênicas em *LMX1B* podem levar à síndrome Unha-patela ou GESF isolada³². Modelos de camundongo *knockout* para *Lmx1b* demonstraram que a perda de expressão de nefrina, podocina ou Neph1 é suficiente para perturbar a formação do diafragma em fenda³⁰. Além disso, diversas variantes em *NPHS1* e *NPHS2* foram implicadas causativamente no desenvolvimento de proteinúria e consequente SN¹⁴.

1.3.2. Citoesqueleto:

Os microtúbulos, constituintes do citoesqueleto envolvidos em vários processos celulares, são estruturas dinâmicas formadas pelas subunidades α e β da tubulina. Mutações que levam a alterações de isotipos de tubulina têm sido implicadas na gênese de síndromes associadas a distúrbios do desenvolvimento neurológico, porém não acompanhadas de alterações renais ou específicas ao podócito³³. Os filamentos intermediários, por sua vez, são formados por um grupo heterogêneo de proteínas, pertencentes a seis classes baseadas em sua homologia estrutural. Os podócitos expressam filamentos intermediários de vimentina classe III e nestina classe VI, também encontrados em neurônios e em determinadas células cancerígenas. Assim como os microtúbulos, no podócito os filamentos intermediários também não parecem ter papel predominante na estabilização dos componentes do citoesqueleto. À semelhança do que ocorre em outras espécies celulares, tais filamentos estão envolvidos em funções de sinalização ou de transporte intracelular³⁴.

O citoesqueleto de actina é composto por monômeros de actina globulares. Essa estrutura encontra-se em constante polimerização e se localiza principalmente nos processos podais secundários. O aumento de polímeros que formam cauda de actina na nefrina parece estabilizar a ultraestrutura dos pedicelos e a fenda diafragmática lateralmente²⁵. A polimerização é modulada por uma série de proteínas reguladoras e depende de processos que consomem ATP. Estudos *in vitro* demonstraram que a introdução de novos prolongamentos a filamentos pré-existent é realizada pelo complexo ARP2/3, função essencial à formação da lamelipodia. Vale destacar que os processos secundários apresentam um feixe de actina em seu centro, o qual parece estar envolvido na geração de forças tensionais. A presença de uma malha ramificada ao redor do mesmo, por seu turno, está aparentemente relacionada à manutenção da morfologia complexa dos processos podocitários³⁵.

Genes relacionados às proteínas do citoesqueleto têm sido implicados na patogênese da SN. Mutações em *ACTN4* causam alterações funcionais, como redução da estabilidade proteica, localização subcelular imprópria e aumento da capacidade de ligação à actina F. Tais anormalidades levam a alterações da dinâmica do citoesqueleto, reduzindo o espreado celular e a capacidade de

migração do podócito^{36,37}. *INF2*, por sua vez, codifica a formina, produto chave na polimerização da actina. A maioria das variantes patogênicas localizam-se na porção N-terminal do domínio autoinibitório denominado domínio inibitório diáfano (DID)³⁸. Ao interagir com o domínio autorregulatório diáfano (DAD), DID permite que a formina seja enovelada, mantendo-se em estado inativo. A ligação do domínio G de DID é ativada na presença de determinadas GTPases da família Rho, liberando a interação DID-DAD e promovendo desenovelamento da formina, a qual assume sua forma ativa. Além de catalisar a formação dos filamentos de actina, como o fazem outras forminas, *INF2* é também capaz de cortar e despolimerizar os filamentos de actina. Proteases catépsinas, por sua vez, clivam *INF2* em dois fragmentos, liberando a porção N-terminal de DID para desempenhar sua função de modo independente, bem como a porção C-terminal de DAD. O fragmento N-terminal de DID parece se localizar predominantemente nos processos podocitários, enquanto que a porção C-terminal de DAD localiza-se no corpo celular³⁹. Um estudo realizado com a proteína mutante *INF2* p.(Arg218Gln) não observou alteração na clivagem dos fragmentos, entretanto, tais fragmentos se acumularam tanto no corpo celular quanto nos processos podocitários. Além disso, o fragmento mutado pode dimerizar com o fragmento selvagem, impedindo que este seja recrutado para os prolongamentos celulares e exerça sua função, o que determina o desenvolvimento de proteinúria. Esse mecanismo pode explicar seu efeito dominante negativo e seu modo de herança autossômico dominante⁴⁰. Outros achados mostraram que o fragmento N-terminal de DID encontra-se ausente em regiões de apagamento de pedicelos em pacientes com síndrome de Alport e nefrite lúpica, mas não em regiões de prolongamentos podocitários ainda não afetados. O fragmento C-terminal, por sua vez, permanece presente no corpo de celular, tanto em podócitos preservados quando já afetados³⁸. É importante mencionar que mutações particulares em *INF2* constituem uma das causas da neuropatia de Charcot-Marie-Tooth^{38,41}.

CD2AP participa de várias funções nos podócitos, incluindo sinalização do diafragma em fenda, transporte de glicose e modulação da resposta a fator de crescimento transformador β (TGF β). Suas ações previnem proteólise programada, evitando a redução dos níveis de dinamina e sinaptopodina⁴². As

hidrolases de guanosina trifosfato (GTPases), homólogo A membro da família Ras (RhoA), substrato 1 da toxina botulina C3 relacionado a Ras (Rac1) e o homólogo 42 da proteína do controle de divisão celular (Cdc42) regulam o remodelamento do citoesqueleto de actina, promovendo motilidade celular ou inibindo sua migração. Angiotensina II leva à ativação de vias dependentes de Rho, promovendo contratilidade podocitária a partir da formação de fibras de estresse⁴³. A ativação de Cdc42/Rac1, por sua vez, leva à formação da lamelipodia/filopodia, causando o desaparecimento dos pedicelos. Em modelos animais distintos, tanto a ativação quanto a inibição de RhoA acompanharam-se da inibição de Cdc42/Rac1, traduzida em proteinúria. É possível que o balanço de ativação dessas vias guarde relações específicas com condições fisiopatológicas diferentes⁴³. Mutações em alguns genes cujos produtos interagem com tais GTPases associam-se à SN. De fato, variantes patogênicas em *ARHGDI1* e *ARHGAP24* determinam aumento dos níveis de Rac1 e Cdc42^{45,46}. Mais recentemente, mutações de caráter recessivo em *ITSN1*, *ITSN2*, *MAGI2*, *TNS2*, *DLC1* e *CDK20*, genes que codificam respectivamente intersectina 1, intersectina 2, guanilato quinase associada a membrana 2, tensina 2, proteína ativadora de GTPase 7 e quinase dependente de ciclina 20, foram encontradas em pacientes com SN de resposta parcial a terapia com corticosteroide. Os quatro últimos genes foram relacionados com a modulação da ativação de RhoA e não de Rac1 e Cdc-42, fator central na patogênese da SN. Nesse cenário, o comprometimento da adesão focal dirigida por RhoA foi mais relevante para a patogênese do que anormalidades na formação de lamelipodia dirigida por Rac1⁴⁶.

Sinaptopodina é uma proteína que interage com a α -actina 4, uma proteína importante para a ligação entre filamentos de actina. A ausência da sinaptopodina leva à formação retardada de fibras de estresse, assim como ao desenvolvimento de filopodia aberrante não polarizada em situações de estresse. Sinaptopodina bloqueia a ubiquitinação de RhoA mediada por Smurf1, de modo a preservar a formação de fibras de estresse⁴⁷. Sinaptopodina também inibe a ligação de Cdc42 a proteína habilitada para mamíferos (Mena) e ao substrato 53 do receptor de insulina isoforma B (IRSp53), evitando a formação de filopodia aberrante. Sua degradação é estimulada pela fosforilação mediada

por calcineurina quando na presença de influxo de cálcio, promovendo sinalização aberrante via Rac1 e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Sua redução parece também alterar a localização e função do canal de cálcio não seletivo TRPC6, sugerindo que o influxo de cálcio mediado por TRPC6 possa aumentar em condições patológicas, levando à apoptose do podócito. Vale dizer que a expressão de sinaptopodina encontra-se diminuída em várias situações clínicas, tais como na nefropatia por IgA ou SN idiopática⁴⁸.

TRPC6, localizado nos processos podocitários, regula o influxo de cálcio, sendo ativado por estiramento, estresse oxidativo ou fatores locais, entre eles angiotensina II por meio do receptor AT1. Sua expressão encontra-se aumentada em diversas condições renais. O influxo de cálcio age como um segundo mensageiro, regulando a montagem de actina e miosina e ativando a transcrição de fatores como o fator nuclear de células T ativadas (NFAT). Também aumenta a ativação da calcineurina, que regula a atividade de ERK1/2 (proteína quinase regulada por sinal extracelular1/2) e de NFATc1⁴⁹.

Miosina 1E (MYO1E) pode atuar nas junções intercelulares por meio de diversas interações, como entre o domínio TH1 e lipídeos da membrana plasmática e entre o domínio TH2 e proteínas associadas à junção. Tais interações direcionam Mio1e para tais junções intercelulares, onde o domínio motor, ao interagir com os filamentos de actina, e o domínio SH3 com ZO-1 promove a montagem coordenada de junções célula-célula e feixes juncionais de actina⁵⁰. Esses achados sugerem que MYO1E contribui para a regulação da integridade dos processos podocitários através de seu papel nas junções intercelulares⁵⁰.

Fosfolipase C ϵ 1 (PLCE1) desempenha vários papéis no podócito. Ao exercer sua ação de fosfolipase, degrada o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3), os quais promovem aumento do cálcio citosólico através da interação com os canais de cálcio TRPC6 da membrana celular e com o receptor de IP3 do retículo endoplasmático, respectivamente. PLCE1 também pode ser ativado por proteína G, traduzindo sinais mitogênicos através de sua atividade RasGEF e estimulando as vias RAS e MAPK. Além disso, regula a atividade de GTPases, importantes na dinâmica da actina e na migração celular. Também interagem com proteína adaptadora 2 de NCK

(NCK2), desempenhando um papel fundamental na estimulação da nucleação da actina induzida por N-WASP-Arp2/3⁵¹.

A perda de FAT1, por sua vez, está associada a redução da adesão e migração de pedicelos. Essa migração é parcialmente revertida por ativadores de Rac1/Cdc42, proteínas importantes na via das GTPases⁵².

1.3.3. Relação entre a membrana basal glomerular e o diafragma em fenda.

A adesão dos podócitos à MBG é necessária para que ocorra o processo de ultrafiltração. Vários receptores transmembrânicos conectam a MBG ao citoesqueleto. A adesão célula-matriz extracelular pode ser modulada pela ativação, clusterização ou pelo nível de integrinas na superfície da célula. Integrinas são proteínas transmembrana que formam α - β -heterodímeros que se ligam às moléculas da matrix extracelular, geralmente quando ligadas a seu ligante. A integrina $\alpha3\beta1$ parece se constituir no principal elemento de ligação entre o podócito e a MBG. Além dela, receptores de domínio discoide (DDR), distroglicanos e sindecanos também participam da adesão da célula à MBG⁵³.

A integrina $\alpha3\beta1$, cujas cadeias $\alpha 3$ e beta 1 são codificadas por *ITGA3* e *ITGB1* respectivamente, interage com a laminina 1,2,5 por meio do domínio C-terminal da cadeia α . A laminina, por sua vez, é formada pelas cadeias de laminina subunidade $\gamma1$ (LAMC1), laminina subunidade $\beta2$ (LAMB2) e laminina subunidade $\alpha5$ (LAMA5), as quais se polimerizam entre si através de suas porções N-terminais, interagindo com os heterodímeros de colágeno. Os heterodímeros de colágeno são compostos pelas cadeias do colágeno tipo 4 $\alpha3$, $\alpha4$ e $\alpha5$, constituindo os principais componentes da MBG⁵⁴.

As cadeias do colágeno 4 $\alpha4$, $\alpha5$ e $\alpha6$, por seu turno, são compostas pelo domínio 7S N-terminal, por uma longa região de cerca de 1400 aminoácidos (aa) que constitui o domínio colagenoso, e pelo domínio não colagenoso (NC) na porção C-terminal. O domínio colagenoso é estruturalmente marcado pela composição de uma sequência em trincas contendo uma glicina a cada 3 aa, o que permite a formação de tripla hélice. As terminações NC podem estar presentes no meio das cadeias de colágeno; acredita-se que sua função seja a

de permitir maior flexibilidade da matriz. As redes de colágeno podem interagir entre si através de ligações covalentes entre dois domínios NC C-terminais ou entre quatro domínios 7S N-terminais⁵⁴.

Proteoglicanos de heparan sulfato, perlecan, agrina e colágeno 8 depositam-se sobre a rede formada por laminina e cadeias de colágeno tipo 4, conferindo carga negativa à MBG. Esta estrutura também contém glicoproteínas monoméricas sulfatadas em formato de haltere, os nidogênios 1 e 2, que se ligam ao colágeno tipo 4 (é 4 ou IV, favor definir), aos proteoglicanos de heparan sulfato e à laminina γ 1, formando pontes entre os polímeros^{54,55}.

As proteínas α -actinina-4, integrina α 3, cadeias de colágeno tipo 4 e lamininas participam da sinalização nos adesomas dos podócitos. Vale mencionar que variantes patogênicas nos genes codificadores de tais proteínas podem se traduzir em proteinúria⁵⁵.

1.3.4. Proteínas nucleares e relacionadas ao complexo do poro nuclear

O complexo do poro nuclear é composto por uma maquinaria macromolecular constituída de cópias de aproximadamente 30 nucleoporinas (Nups). Além de favorecer um transporte seletivo de macromoléculas através do invólucro nuclear, as Nups também constituem sítios de ligação para receptores de transporte nuclear importantes na sinalização intracelular. Por meio de sua influência na organização estrutural interna do núcleo e de seu aparente envolvimento na coordenação de liberação de transcritos para a maquinaria de síntese proteína citoplasmática, tais proteínas participam ativamente do processo de regulação da expressão gênica⁵⁶.

Variantes patogênicas em Nups constituintes dos anéis interno e externo, assim como do complexo Y das nucleoproteínas, têm sido relacionadas a SNCR. Uma variante patogênica em *XPO5*, gene que codifica exportina-5, também foi associada à SNCR⁵⁷. A exportina-5 possibilita a saída de proteínas com domínio de ligação a RNA dupla fita e do próprio RNA dupla fita do núcleo para o citoplasma através do complexo do poro nuclear, onde desacopla da proteína e retorna para o núcleo por meio de difusão^{57,58}.

Variantes nos genes *OSCEP* (*O-sialoglycoprotein endopeptidase*), *TP53RK* (*TP53 regulating kinase*), *TPRKB* (*TP53RK binding protein*) e *LAGE3* (*L Antigen Family member 3*), que codificam proteínas do complexo de KEOPS (*Kinase, Endopeptidase and other proteins of small size*), já foram associadas a síndrome nefrótica em pacientes com síndrome de Galloway Mowatt⁵⁹. O complexo de KEOPS é um conjunto de proteínas muito conservadas em eucarioto que desempenha um papel importante no desemcapamento do telômero e nas modificações de RNA transportador. Além disso, parece promover a ressecção da porção final do DNA, por facilitar a associação de Exo1 e DNA2 com as quebras de DNA⁶⁰. Mutações em *WDR73* e *WDR4* também estão implicadas na síndrome de Galloway Mowatt associada à síndrome nefrótica. *WDR73* interage com os componentes INTS9 e INTS11 do integrador, um grande complexo multiproteico que desempenha vários papéis no controle transcricional e metabólico do RNA⁶¹. *WDR4*, por sua vez, codifica a subunidade da metiltransferase necessária para a formação de 7-metilguanossina altamente conservada de certos RNAs transportadores⁶².

A proteína 1 semelhante a subfamília A, relacionada a SW1/SNF, associada a matriz e reguladora de cromatina dependente de actina (*SMARCAL1*), juntamente com outras helicases de anelamento, é necessária para estabilizar e remodelar a replicação em forquilha do DNA, a fim de promover a estabilidade genômica⁶³. Mutações em *SMARCAL1* levam à síndrome de Schimke, que também pode se associar à síndrome nefrótica⁶⁴.

Originalmente identificado como gene supressor do tumor de Wilms, *WT1* codifica um fator de transcrição com um domínio transregulatório na sua porção N-terminal e quatro dedos de zinco na sua porção C-terminal. Tal fator é importante no desenvolvimento do sistema genitourinário, além de desempenhar o papel de supressor tumoral. . Variantes patogênicas de *WT1* em células germinativas, geralmente as que levam ao truncamento da proteína estão associadas a tumor de Wilms, enquanto variantes em sítio de *splicing* no íntron 9 levam à síndrome de Frasier, caracterizada por alterações do desenvolvimento sexual e síndrome nefrótica⁶⁵. Além disso, variantes patogênicas nos éxons 8 e 9 estão associadas a histologia esclerose mesangial difusa (EMD) e causam a síndrome de Dennys Drash, a qual pode apresentar manifestações extrarrenais

como hérnia diafragmática, também descrita na síndrome de Merchan. Essas condições podem levar não apenas à síndrome nefrótica, mas também a desenvolvimento tumoral⁶⁶.

LMX1B codifica um fator de transcrição pertencente à família LIM-homeodomínio com papel essencial no desenvolvimento das estruturas da coluna lombodorsal, MBG e seguimento anterior do olho, bem como de alguns tipos de neurônios⁶⁷. *LMX1β* é composto por dois domínios LIM repetidos que se ligam a zinco em sua porção terminal, domínios estes importantes na interação proteína-proteína, por um domínio homeo responsável por se ligar ao DNA e necessário para a ativação transcricional, e por uma porção C-terminal rica em glutamina. Variantes patogênicas em *LMX1B* foram associados a casos isolados de SN e a casos de síndrome unha-patela com SN⁶⁷.

1.3.5. Genes mitocondriais e de expressão mitocondrial

A mitocôndria é fundamental para a geração de energia, por meio do processo de fosforilação oxidativa. Esta organela está também envolvida na modulação de outras funções celulares, como sinalização celular, controle do ciclo e do crescimento celular, diferenciação celular e apoptose. PDSS2, COQ2 e COQ6 participam diretamente da via de biossíntese da coenzima Q10 (CoQ10), molécula essencial para o transporte de elétrons dos complexos I e II para o complexo III da cadeia respiratória. Vale notar que a CoQ10 também é um potente antioxidante lipofílico e um fator para biossíntese de diversas desidrogenases mitocondriais e nucleosídeos pirimidínicos⁶⁸. ADCK4, anteriormente chamado de COQ8, também parece ter um papel na biossíntese de CoQ10⁶⁹.

MTTL1 é um gene mitocondrial que codifica o RNA transportador^{Leu^{UUR}}. A perda de taurinometiluridina resulta em deficiência de tradução específica de um códon, resultando na incapacidade da formação da base de pareamento códon-anticódon de UUG, importante para estabilizar o pareamento U:G no sitio A do ribossomo. Nesse cenário, mutações em *MTTL1* causam a síndrome MELAS, caracterizada por manifestações clínicas variáveis relacionadas, incluindo

miopatia, encefalopatia, acidose láctica, acidente vascular cerebral, epilepsia, diabetes, perda auditiva, cardiomiopatia e nefropatia⁷⁰.

1.3.6. Fator circulante

Uma porcentagem significativa dos pacientes com SN associada a lesões histológicas mínimas (LHM) ou glomeruloesclerose segmentar e focal apresenta resposta positiva a terapia imunossupressora. Tal resposta poderia estar ligada a um fenômeno imunomediado; nesses casos, porém, não são observados depósitos imunes ou biomarcadores que indiquem imunoativação relacionada a proteinúria no tecido glomerular. Além disso, a observação de recidivas frequentes de GESF após transplante renal apoiam a possibilidade de existência de fator(es) de permeabilidade circulante(s) na patogênese da síndrome nefrótica⁷¹. Candidatos a fatores circulantes e/ou marcadores associados a essa entidade têm sido descritos ao longo dos anos, entre os quais suPAR (fator solúvel ativador do receptor de plasminogênio), hemopexina, CLCF1 (fator 1 de citocina do tipo cardiotrofina), ANGPTL-4 (semelhante a angiopoietina 4), IL-13 (interleucina-13), IL-8 (interleucina 18), anti-CD 40 (cluster de diferenciação 40), heparanase e CASK (proteína serina quinase dependente de cálcio/calmodulina)⁷².

SuPAR pareceu ser muito promissor inicialmente. uPAR é uma proteína de membrana celular de três domínios ancorada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), que pode funcionar como receptor de uroquinase ou como orquestrador de sinalização através de outros receptores de membranas, como as integrinas⁷². uPAR encontra-se presente em podócitos, tendo o aumento de sua expressão sido associado ao apagamento de pedicelos. Esta proteína pode ser liberada para o plasma como fator solúvel após a clivagem de seu ancoramento a GPI (suPAR), forma que se apresenta normalmente em baixas concentrações séricas. suPAR participa do tráfego de neutrófilos e da mobilização de células tronco⁷¹. Inicialmente observado em uma porcentagem considerável dos pacientes com GESF, mas não em outras glomerulopatias, suPAR foi considerado um fator circulante potencial nesse cenário⁷³. Sabe-se hoje, contudo, que suPAR pode estar presente em várias condições inflamatórias e

que sua concentração sérica aumenta progressivamente com o declínio da TFG em várias doenças renais, não sendo específico para a GESF⁷⁴.

Mais recentemente, ao avaliar o autoanticorpo anti-nefrina em duas coortes independentes, Watt e cols encontraram correlação entre seus títulos e proteinúria em parte dos pacientes adultos e pediátricos com LHM. Também se observou presença de tais autoanticorpos IgG em podócitos de tecido renal de pacientes, com distribuição puntiforme coincidente com a localização da nefrina. Em um paciente que recebeu transplante renal, observou-se correlação entre aumento dos títulos de autoanticorpo anti-nefrina e recidiva da proteinúria. No momento, entretanto, ainda não é possível estabelecer se a relação é causal ou se expressa como marcador da presença de fator circulante nesse grupo de pacientes com SN e LHM⁷⁵.

1.4. Síndrome nefrótica na população pediátrica

Na faixa etária pediátrica, define-se SN como proteinúria $> 40 \text{ mg/m}^2/\text{h}$ ou como razão entre as concentrações de proteína e creatinina > 2 em amostra isolada de urina, hipoalbuminemia e edema^{76,77}.

A incidência anual de SN em população pediátrica norte-americana e europeia é de aproximadamente 2 a 7 pacientes por 100 mil crianças por ano⁷⁸. Quando a SN se manifesta a partir de 1 ano de vida, a sensibilidade ou resistência a corticosteroides é definida de acordo com a resposta clínica a tais fármacos. Vale notar que a biópsia renal ainda é indicada nos casos sem resposta adequada a corticosteroide e em pacientes com apresentação incomum. Cerca de 15% dos casos não são responsivos a esses medicamentos, ocasiões em que se utilizam outros imunossupressores⁷⁹. Entre os casos com comportamento córtico-resistente, 50% evoluem para DRET dentro dos 5 anos que se seguem à manifestação^{80,81}.

No momento atual, até cerca de 30% dos casos de SNCR se associam a variantes patogênicas em genes que codificam proteínas podocitárias ou da MBG. Em sua ampla maioria, tais casos apresentam comportamento refratário a tratamento imunossupressor⁸². Nesse contexto, atualmente um número apreciável de crianças é exposto aos efeitos colaterais da imunossupressão sem

se acompanhar de benefício terapêutico. A avaliação genético-molecular desses casos, portanto, deverá evitar o uso inapropriado de imunossupressão em muitos deles⁸³.

1.5. Identificação de genes mutados e análises mutacionais

A identificação e a caracterização de genes mutados em doenças monogênicas humanas marcou um profundo avanço médico e científico. Esta nova realidade, iniciada nos anos 80, pautou-se em grande escala no mapeamento gênico amparado por marcadores polimórficos de DNA, também conhecidos como marcadores genéticos⁸⁴. Vale dizer que a identificação de genes medicamente relevantes incluiu não apenas a metodologia de clonagem posicional, iniciada por estudos de ligação, como também as abordagens de candidatura gênica e clonagem por expressão.

A partir da identificação de tais genes, iniciaram-se as análises mutacionais dirigidas, com objetivos científicos e de aplicação médica. Enquanto a identificação de mutações patogênicas permitia o avanço na compreensão da patogênese dessas moléstias, também passou a permitir sua aplicação potencial em vários cenários médicos. No plano científico, permitiu estudos de natureza molecular, bioquímica, *in vitro*, *in vivo* e de correlações genótipo-fenótipo, enquanto no cenário médico passou a amparar em vários casos o reconhecimento diagnóstico, orientação terapêutica, estabelecimento de prognóstico e aconselhamento.

1.6. Ampliação dos cenários clínico e molecular proporcionada pelo sequenciamento de nova geração

As técnicas de sequenciamento de nova geração representaram um novo passo de grande impacto para a ampliação do entendimento da patogênese de doenças monogênicas. Essa nova realidade teve consequências particularmente marcantes sobre casos de SNCR em idade pediátrica ou SN congênita (SNC). Por meio de sequenciamento e análise de exomas completos de pacientes com tais desordens não resolvidas geneticamente, expandiu-se a identificação de genes associados a essas condições. Como consequência,

ampliou-se intensamente a compreensão da patogênese da SN como um todo, da fisiologia do podócito e da MBG, e das possibilidades de aplicação desse conhecimento na avaliação e seguimento clínico. Vale notar que as implicações dessas novas descobertas atingem hoje, potencialmente, tanto casos familiares como esporádicos de SN.

1.6.1. Formas mendelianas

As descobertas de mutações patogênicas nos genes *NPHS1*, *NPHS2*, *LMX1B*, *ACTN4*, *WT1* e *CD2AP*, ocorridas entre os anos de 1997 e 2001, constituíram o grande marco molecular da compreensão da patogênese da SNCR e da SNC (Figura 1, Tabela 1)

Esse processo estendeu-se a outros genes no período de 2002 a 2009, com a identificação de variantes patogênicas em *TRPC6*, *PLCE1*, *SMARCAL1*, *LAMB2* e *SCARB2*⁸⁵ (Figura1). No momento presente, variantes patogênicas associadas a SN, em sua grande maioria SNCR, já foram detectadas em um elevado número de genes, elencados a seguir^{86,87}. É importante notar que os produtos proteicos de *NPHS1*, *NPHS2*, *NEPH1*, *TRPC6*, *DGKE*, *FAT1*, *CRB2*, *CD2AP* e *SYNPO2* são constituintes da do diafragma em fenda; os de *PLCE1*, *ANLN*, *AVIL*, *MYH9*, *MYO1E*, *INF2*, *DAAM2*, *ACTN4* e *PTPRO* são componentes do citoesqueleto; os de *ARGAP24*, *ARHGDI1*, *MAGI2*, *TNS2*, *DLC2*, *CDK20*, *NOS1AP*, *ITSN1*, *ITSN2*, *SEMAG3*, *KANK1*, *KANK2* e *KANK4* são reguladores da actina através de Rho/Rac/cdc42 GTPASES; os de *ITGA3* e *ITGB4* são integrinas; os de *OSGEP*, *TP53RK*, *TP53RB*, *LAGE3*, *GON7*, *WDR4* e *WDR73* são modificadores/reguladores do RNA transportador; os de *ADCK4*, *COQ2*, *COQ6* e *PDSS2* são relacionados à biossíntese de CoQ10; o de *MTTL1* é associado à regulação da cadeia respiratória mitocondrial; os de *NUP85*, *NUP93*, *NUP107*, *NUP133*, *NUP205* e *XPO5* compõem as nucleoporinas; *WT1*, *LMX1B*, *SMARCAL1*, *PAX2* e *PRDM15* são proteínas ligadas à transcrição do DNA; o de *SCARB2* é uma proteína lisossomal; os de *ANKFY1*, *TBC1D8B* e *GAPVD1* são proteínas associadas ao endossomos; e os de *PTPRO* e *EMP2* atuam na interação intercelular. Além disso, os produtos proteicos dos genes *COL4A3*, *COL4A4*, *COL4A5*, *LAMA5* e *LAMB2* são constituintes da MBG (Figura 1, Tabela1). A identificação de variantes patogênicas nesses genes encontra-se

em sintonia com as alterações da BFG e suas consequências funcionais encontradas na SN. A cubilina, por sua vez, codificada pelo gene *CUBN*, tem expressão em células tubulares proximais, e variantes patogênicas nesse gene estão associadas a albuminúria não glomerular⁸⁸.

Variantes patogênicas em genes primariamente associadas a outras patologias renais têm sido encontradas em pacientes com manifestações fenotípicas de SN, também chamadas de fenocópias (Tabela 2).

Tabela 2. Genes relacionados a fenocópias de SNCR, localização cromossômica, produto proteico, tipo de herança e doença renal específica relacionada ao gene mutado (adaptado de Watanabe A e cols, Am J Kidney Dis, 2019)⁸⁶

Gene	Localização	Proteína	Herança	Doença específica
<i>EYA1</i>	8q13.3	Eyes absent 1	AD	Síndrome Branchio-oto-renal
<i>COL4A3</i>	2q36.3	Colágeno tipo 4 cadeia α 3	AR	Síndrome de Alport
<i>COL4A4</i>	2q36.3	Colágeno tipo 4 cadeia α 4	AR	Síndrome de Alport
<i>COL4A5</i>	Xq22.3	Colágeno tipo 4 cadeia α 5	Ligada ao X	Síndrome de Alport
<i>AGXT</i>	2q37.3	Alanina glioxilato aminotransferase	AR	Hiperoxalúria
<i>CLCN5</i>	Xp11.23	Canal de cloro dependente de voltagem 5	Ligada ao X	Doença de Dent
<i>CTNS</i>	17p13.2	Cistinosina	AR	Cistinose
<i>FN1</i>	2q35	Fibronectina	AD	Glomerulopatia com depósito de fibronectina
<i>GLA</i>	Xq22.1	Precursor de α -galactosidase A	Ligada ao X	Doença de Fabry
<i>WDR19</i>	4p14	Proteína 19 contendo repetição WD	AR	Síndrome de Senior-Loken
<i>PAX2</i>	10q24.32	Caixa pareada 2	AD	Síndrome renal-coloboma
<i>UMOD</i>	16p12.13	Uromodulina	AD	Doença renal tubulointersticial autossômica dominante
<i>OCRL</i>	Xq26.1	Inositol polifosfato-5-fosfatase	Ligada ao X	Síndrome óculo-cérebro-renal de Lowe

Nos estudos genético-moleculares de base populacional disponíveis até o momento, mais de 69 genes são associados a SNCR e SNC, com manifestações clínicas extrarrenais em alguns casos (Tabela 3). Os genes com maior frequência de variantes patogênicas associadas são o *WT1*, *NPHS1*, *NPHS2*.

Na SNCS, por outro lado, são poucos os casos monogênicos descritos. Em uma coorte reportada previamente, 19 genes foram analisados em 31 casos esporádicos de SNCR e 38 casos de SN córtico-sensível (SNCS)⁸⁹. Pacientes com manifestações extrarrenais ou com história familiar ou de consanguinidade foram excluídos. Variantes potencialmente patogênicas nos genes avaliados foram encontradas em 32,3% dos pacientes com SNCR, enquanto nenhuma das

Tabela 3: Genes relacionados a síndrome nefrótica córtico-resistente ou parcialmente sensível a corticosteroide, sua localização cromossômica, seu modo de herança, fenótipo relacionado e achados específicos (adaptado de Watanabe A e cols, Am J Kidney Dis, 2019, e atualizado)⁸⁶.

Envolvimento extrarrenal	Gene	Localização	Herança	Fenótipo, incluindo achados específicos
Neurológico	<i>ADCK4</i>	19q13.2	AR	Convulsões, alterações comportamentais. Início da SN na adolescência. *
	<i>COQ2</i>	4q21.23	AR	Alterações das mitocôndrias em biópsia renal, convulsões, encefalopatia*
	<i>COQ6</i>	14q24.3	AR	Alterações das mitocôndrias em biópsia renal, perda de audição neurossensorial *
	<i>PDSS2</i>	6q21	AR	Síndrome de Leigh, deficiência de coenzima Q10
	<i>SCARB2</i>	4q21.1	AR	Epilepsia mioclônica progressiva
	<i>LIGE3</i>	Xq28	Ligada ao X	Complexo KEOPS (<i>Kinase, Endopeptidase and other proteins of small size</i>).
	<i>OSGEP</i>	14q11.2	AR	Síndrome de Galloway-Mowat
	<i>TP53RK</i>	20q13.12	AR	Início precoce de NS
	<i>TPRKB</i>	2p13.1	AR	
	<i>WDR73</i>	15q25.2	AR	
	<i>GON7</i>	14q.32.12	AR	
	<i>PRDM15</i>	21q.22.3	AR	Alterações cardíacas e esqueléticas
	<i>KANK1</i>	9p24.3	AR	Deficiência intelectual
	<i>KANK4</i>	1p31.3	AR	Deficiência intelectual, dirmorfismo facial
	<i>NUP107</i>	12q15	AR	Microcefalia, deficiência intelectual, baixa estatura
	<i>NUP37</i>	12q23.2	AR	Microcefalia, deficiência intelectual, baixa estatura
	<i>FAT1</i>	4q35.2	AR	Ectasia tubular, paquigiria, estenose de artéria pulmonar, hidrocefalia, deficiência intelectual, Sarcoma de Ewing, Linfoma de Hodgkin
	<i>XPO5</i>	6p21.1	AR	Atraso do desenvolvimento da fala. Resposta a ciclosporina ***
	<i>E2F3</i>	6p22.3	?	Retardo mental (quando na deleção do gene)
	<i>LAMB2</i>	3p21.31	AR	Hematúria, surdez neurossensorial, Doença de Pearson
<i>SGPL1</i>	10q22.1	AR	Insuficiência adrenal primária e hipotireoidismo, ictiose, criptorquidismo e atraso de desenvolvimento neuromotor	
<i>AVIL</i>	12q14.1	AR	Surdez, catarata, microcefalia, deficiência intelectual	
<i>TRIM8</i>	10q.24.32	AD	Epilepsia, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor precoce	
<i>ITGA3</i>	17q21	AR	Doença pulmonar intersticial, epidermólise bolhosa	
<i>ITGB4</i>	17q25.1	AR	Epidermólise bolhosa	
<i>LMX1B</i>	9q33.3	AR	Síndrome unha-patela	
<i>SMARCAL1</i>	2q35	AR	Displasia imuno-óssea de Schimke, baixa estatura	
<i>LMNA</i>	1q22	AD	Lipodistrofia familiar parcial	
<i>ZMPSTE24</i>	1p34.2	AR	Displasia mandíbulo-acral	
<i>INF2</i>	14q32.33	AD	Início na adolescência ou após. Doença de Charcot-Marie-Tooth	
<i>WT1</i>	11p13	AD	Síndrome de Denys Drash, Síndrome de Frasier, SNC ***	
<i>TT21B</i>	2q24.3	AR	Lesão tubular, nefronofitose	
<i>MYH9</i>	22q12.3	AD	Macrotrombocitopenia com surdez neurossensorial, Síndrome de Epstein, Sebastian e Fechtner	
<i>CUBN</i>	10p13	AR	Anemia megaloblástica	
<i>NXF5</i>	Xq22.1	Ligada ao X	Bloqueio de condução cardíaca progressivo	
<i>NUP205</i>	7q33	AR	Doença valvar cardíaca pTNSNS **	
<i>DGKE</i>	17q22	AR	Síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa)	
<i>NPHS1</i>	19q13.12	AR	SN tipo finlandês, SNC	
<i>NPHS2</i>	1q25.2	AR	Gene mais frequentemente implicado em SNCR ***	
<i>PLCE1</i>	10q23.33	AR	Frequentemente associado com esclerose mesangial difusa ***	
<i>TRPC6</i>	11q.22.1	AD	Início mais tardio da síndrome nefrótica em muitos pacientes	
<i>CDZAP</i>	6p12.3	AR/AD	Resposta parcial a corticosteroide e ciclosporina ***	
<i>NUP93</i>	16q13	AR	Síndrome de Marcus-Gunn, dilatação de túbulo proximal	
<i>NUP160</i>	12q15	AR	Resposta parcial ao tratamento com drogas imunossupressoras	
<i>NUP85</i>	17q25.1	AR	Hematúria microscópica	
<i>NUP133</i>	1q42.13	AR	GESF	
<i>ACTN4</i>	19q13.2	AD	Geralmente manifestação de GESF na idade adulta	
<i>SYNPO</i>	5q33.1	AD	GESF esporádica	
<i>ARHGAP24</i>	4q20	AD	GESF	
<i>ANLN</i>	7p14.2	AD	Manifestação da GESF principalmente na idade adulta	
<i>MYO1E</i>	15q22.22	AR	SNCR familiar	
<i>PTPRO</i>	12p12.3	AR	Redução parcial de proteinúria com corticosteroide e ciclosporina ***	
<i>KANK2</i>	19p13.2	AR	Hematúria, resposta variável a esteroide **	
<i>NEIL1</i>	15q24.3	AR	SNCR familiar	
<i>LAMA5</i>	20q13.33	AR	Respostas variáveis a corticosteroide **	
<i>GAPVD1</i>	9q33.3	AR	Hiperplasia mesangial, Remissão espontânea (1 caso)	
<i>ANKFY1</i>	17p13.2	AR	GESF	
<i>ARGHDIA</i>	17q25.3	AR	SNC	
<i>MAGI2</i>	7q21.11	AR	SNPSC**	
<i>TNS2</i>	12q13.13	AR	Genes relacionados a cluster regulatório de pequenas GTPases similares a Rho	
<i>DLC1</i>	8p22	AR		
<i>CDK20</i>	9q22.1	AR		
<i>ITSN1</i>	21q22.11	AR		
<i>ITSN2</i>	2p23.3	AR		
<i>DAAM2</i>	6p.21.2	AR	DAAM2 interage com a formina.	
<i>TBC1D8B</i>	Xq.22.3	Ligada ao X	Proteína envolvida no tráfego da nefrina	
<i>NOS1AP</i>	1q.23.3	AR	Hematúria microscópica	

GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; CAKUT: anormalidades congênitas do rim e do trato urinário; SNPSC: síndrome nefrótica parcialmente sensível a tratamento com corticosteroide

* Redução da proteinúria com reposição de coenzima Q10.

** Remissão parcial a remissão completa em alguns casos

*** Descrição de casos raros com remissão parcial ou total com ciclosporina associada ou não a corticosteroide

crianças com SNCS as apresentou. Interessantemente, nenhum dos pacientes em que tais variantes foram encontradas respondeu a imunossupressão, ao passo que 57,9% daqueles em que essas variantes não foram encontradas responderam a tal abordagem terapêutica.

Ao avaliar 231 pacientes com SNCR/SNC, foram encontradas causas monogênicas em 57%, sendo 97% dos pacientes com SNC e 41% daquelas com SNCR⁹⁰. Daqueles com causas monogênicas, apenas 3% apresentaram remissão após utilização de ciclosporina. Dentre os pacientes nos quais causas monogênicas não foram encontradas, 78% apresentaram remissão completa após 2,5 meses de uso de ciclosporina, chegando a 82% após 6 meses de uso do inibidor de calcineurina.

O consórcio Podonet avaliou 1655 pacientes que manifestaram SN até a idade de 20 anos no contexto de SNCR ou SNC, ou que apresentaram persistência de proteinúria não nefrótica⁹¹. Em 56% desses pacientes, provenientes de 67 centros de 21 países predominantemente europeus, encontrou-se GESF como padrão histológico. Embora a avaliação genética molecular tenha sido heterogênea nesse estudo, 1174 pacientes foram submetidos a análise de até 14 dos genes descritos acima. Notavelmente, 23,6% dos indivíduos analisados apresentaram mutações nesses *loci*. Nesse grupo, a chance de recorrência de GESF após transplante renal foi de 4,5%, enquanto nos pacientes sem mutações identificadas foi de 25,8%. Tal resultado é consistente com patogênese pautada em perda de função gênica em pacientes em que foram encontradas variantes patogênicas nos genes estudados (Tabela 4).

Em um estudo multicêntrico mais recente, incluindo pacientes de várias partes do mundo, mas com representatividade sul-americana muito baixa, 1783 famílias com SNCR não relacionadas foram avaliadas geneticamente⁹². Nestas famílias, provenientes predominantemente da América do Norte e Europa, a análise genético-molecular foi realizada por meio de um painel contendo 27 genes associados a SN. Causas monogênicas para SN foram detectadas em 29,5% dessas famílias (Tabela 4). Vale notar que 1% dos pacientes com SNCR apresentaram mutações em genes associados à biossíntese da coenzima Q10. Esta descoberta abriu o cenário de possibilidades de tratamento para alguns pacientes com SNCR. Tal cenário iniciou-se pela descoberta de mutações no

gene *COQ6* (*coenzyme Q10 biosynthesis monooxygenase 6*), identificadas em 13 indivíduos de seis famílias através da metodologia de mapeamento por homozigose. Esses pacientes apresentaram início precoce de SNCR e progressão rápida para DRET, além de surdez neurossensorial. Este gene é altamente conservado ao longo da evolução e, no rim do camundongo, se expressa em mesênquima metanéfrico e néfrons em formação. Interessantemente, *COQ6* também se expressa em células da estria vascular e gânglio espiral da orelha interna. Vale notar que *knockdown* de *Coq6* em células podocitárias em cultura induziu apoptose, um fenótipo atenuado com a adição de CoQ10 ao meio⁹³. *Knockdown* de *Coq6* em zebrafish, por sua vez, determinou apoptose preferencial em cabeça e tronco dos embriões. Interessantemente, a reposição de CoQ10 em pacientes com SNCR com deficiência secundária de CoQ10 também se mostrou benéfica em alguns casos, reduzindo a proteinúria a níveis não nefróticos⁹⁴.

O estudo recente NEPTUNE (*Nephrotic Syndrome Study Network*) incluiu 312 pacientes e analisou 21 genes associados a SNCR, tendo identificado variantes consideradas causativas em 5,8% dos casos. Com a utilização de um filtro de maior estringência para patogenicidade, contudo, a prevalência de SN monogênica diminuiu para 2,9%. Computadas apenas crianças com GESF ou LHM, a prevalência foi de 5,5%⁹⁵.

Um estudo de coorte nacional do Reino Unido avaliou 53 genes em 187 pacientes que receberam o diagnóstico de SNCR até 18 anos de idade. Variantes causais da doença foram encontradas em 26,2% dos casos. Tais pacientes apresentaram progressão mais rápida para DRET, porém não se observou recidiva da doença após transplante renal nos submetidos a esse procedimento. Interessantemente, 47,8% dos pacientes submetidos a transplante renal, nos quais mutações não foram encontradas, apresentaram recidiva da doença após o transplante⁹⁶.

Em 77 crianças com SNCR de 72 famílias atendidas consecutivamente em período de 18 meses em um único centro pediátrico americano, foram encontradas variantes patogênicas em 6 de 24 genes avaliados em 8 famílias, revelando causa monogênica em 11,1% dos casos⁹⁷ (Tabela 4).

Em uma análise nacional envolvendo 95 crianças brasileiras submetidas a transplante renal por causas relacionadas a SN, realizada por meio de um painel de 24 genes, foram encontradas causas monogênicas em 8 casos (8,4%)⁹⁸(Tabela 4). Entretanto nenhum caso de SNC foi incluída no estudo. Outro estudo nacional incluiu 27 crianças com SNCR pertencentes a um único centro⁹⁹. Este estudo encontrou variantes patogênicas em *NPHS2* em 15% dos pacientes. Não foram identificadas variantes potencialmente patogênicas em *NPHS1* e *WT1*, embora apenas os éxons 8 e 9 de *WT1* tenham sido analisados.

A diversidade de prevalência de SN de origem monogênica reportada em diferentes estudos decorre, provavelmente, das diferentes faixas etárias e etnias consideradas, bem como da heterogeneidade na determinação do início das manifestações e o grau de consanguinidade presente nos estudos. De fato, enquanto cerca 45% dos casos de SNCR foram considerados de origem monogênica em população pediátrica da Turquia, Arabia e Egito, esse percentual foi de apenas aproximadamente 14% nos Estados Unidos e 25% na Europa^{92,100}. Em um estudo que avaliou 300 pacientes com SNCR/SNC em faixa etária pediátrica através de sequenciamento de exoma completo (SEC) encontrou que aqueles com história de consanguinidade parental apresentaram taxa de 38% de causas monogênicas, quando comparadas a 13% daqueles sem historia de consanguinidade¹⁰¹.

Um estudo japonês com 230 pacientes pediátricos e adultos, por outro lado, encontrou uma prevalência de 30% de causas monogênicas, nenhuma delas associadas ao gene *NPHS2*¹⁰² (Tabela 4). O mesmo foi observado em um estudo multicêntrico pediátrico na Coreia, onde foram detectadas causas mendelianas em 43,6% dos 291 pacientes estudados com idade menor ou igual a 20 anos, nenhuma associada a *NPHS2*¹⁰³(Tabela 4). Na China, entretanto, mutações em *NPHS2* foram observadas como quarta causa monogênica mais frequente em 28,5% de 120 pacientes com SNCR com manifestação antes de 18 anos de idade, depois das formas associadas a *NPHS1*, *WT1* e *ADCK4*¹⁰⁴ (Tabela 4).

Tabela 4: Causas monogênicas de SNCR em pacientes de coortes pediátricas e suas características relacionadas a taxa de detecção, idade de manifestação da síndrome nefrótica, consanguinidade parental, história familiar de SN ou GESF, método de sequenciamento, critérios de patogenicidade e genes mais frequentemente associados.

	Trautmann, 2015 PodoNET ⁹¹	Sadowski 2015 SRNS Study Group ⁹²	Bierzynska 2017 RaDar ⁹⁶	Wang 2017 ¹⁰⁴	Feltran 2017 ⁹⁸	Warejko 2018 ¹⁰¹	Tan 2018 ⁹⁷	Nagano 2020 ¹⁰²	Park 2020 ¹⁰³
Pais	Internacional Europa	Internacional EUA	Reino Unido	China	Brasil	Internacional EUA	EUA	Japão	Coreia
Taxa de detecção	23,6% (277/1174)	29,5% (526/1783)	26,2% (49/187)	28,3% (34/120)	8,4% (8/95)	25% (74/300)	11,1% (8/72)	30,0% (69/230)	43,6% (127/291)
Idade de manifestação de SN	≤20 anos	< 25 anos	< 19 anos	< 18 anos	< 19 anos	< 25 anos	0.1-18.8 anos	1 dia a 65 anos	≤ 20 anos
Características da coorte	SNCR Amostras enviadas	SNCR Amostras enviadas	SNCR Amostras enviadas de casos sequenciais	SNCR Amostras enviadas	Crianças transplantadas devido a SN, ausência de casos de SNC	SNCR Amostras enviadas	SNCR Casos prevalentes de um centro único	Proteinúria/SNCR Amostras enviadas	Proteinúria/SNCR Amostras enviadas
Consanguinidade parental	28,6%	20,9%	7%	Zero	3,2%	49%	9,7%	1,4% 1/69 detectadas	Zero
História familiar de SN ou GESF	25,6% 300/1174	10,5% 187/1783	11,8% (22/187)	15,8% 19/120	9,5% (9/95)	31% 93/300	?	11,7% (27/230)	16,4% (48/291)
Método de sequenciamento	Painel N=31	Painel N=27	Exoma completo N=53	Painel N=28	Painel N=24	Exoma completo	Painel N=24	Painel N=60	Painel N=57 genes
Critérios de patogenicidade	Não descrita	Descritas na ref 80	Semelhante às descritas na ref 80	ACMG	ACMG	Descritas na ref 80	Descritas na ref 80	Semelhante às descritas na ref 80	ACMG
Genes associados a variantes causativas encontrados mais frequentemente	<i>NPHS2</i> 138 (49,8%) <i>NPHS1</i> 41 (14,8%) <i>WT1</i> 48 (17,3%) <i>SMARCAL1</i> 12 (4,3%) <i>PLCE1</i> 10 (3,6%)	<i>NPHS2</i> 177 (33,7%) <i>NPHS1</i> 131 (24,9%) <i>WT1</i> 85 (16,2%) <i>PLCE1</i> 37 (7%) <i>LAMB2</i> 20 (3,8%)	<i>NPHS2</i> 14 (28,6%) <i>NPHS1</i> 12 (24,5%) <i>WT1</i> 4 (8,2%) <i>TRPC6</i> 3 (6,1%) <i>NUP107</i> 3 (6,1%)	<i>NPHS2</i> 4 (11,8%) <i>NPHS1</i> 7 (20,6%) <i>WT1</i> 7 (20,6%) <i>COQ8B</i> 8 (23,5%) <i>LMX1B</i> 2 (5,9%)	<i>NPHS2</i> 5 (62,5%) <i>MYO1E</i> 2 (25%) <i>COL4A3</i> 1 (12,5%)	<i>NPHS2</i> 8 (9,4%) <i>NPHS1</i> 13 (15,3%) <i>PLCE1</i> 11 (12,9%) <i>SMARCAL1</i> 8 (9,4%) <i>LAMB2</i> 6 (7,1%)	<i>NPHS2</i> 1 (12,5%) <i>NPHS1</i> 2 (25%) <i>WT1</i> 2 (12,5%) <i>MYO1E</i> 1 (6,2%) <i>TRPC6</i> 1 (6,2%) <i>INF2</i> 1 (6,2%)	<i>NPHS2</i> zero <i>NPHS1</i> 8 (11,6%) <i>WT1</i> 17 (25,6%) <i>INF2</i> 8 (11,6%) <i>TRPC6</i> 7 (10,1%) <i>LAMB2</i> 6 (8,7%)	<i>NPHS2</i> zero <i>NPHS1</i> 11 (8,8%) <i>WT1</i> 30 (23,6%) <i>COQ6</i> 12 (9,4%) <i>NUP107</i> 9 (7,1%) <i>COQ8B</i> 8 (6,3%)

ACMG: Critérios de patogenicidade do American College of Medical Genetics¹⁰⁵.

Vale atentar que o fenótipo de SNCR pode também decorrer do mecanismo de transheterozigose, onde o paciente afetado apresenta uma das mutações em um *locus* e outra em outro gene associado a uma forma autossômica recessiva da enfermidade. De fato, há relatos prévios de um paciente com uma mutação em heterozigose em *LAMB2* e outra em *NPHS1*, assim como de outro caso com uma variante em *LAMB2* - presente também em sua mãe sadia - e outra em *INF2* - também encontrada em seu pai sadio¹⁰⁶. Formas de herança não mendelianas envolvendo os genes citados na Tabela 1 e/ou outros também são possíveis, uma vez que mutações *de novo* poderiam definir o comprometimento funcional por: a) ocorrer em transheterozigose com uma variante herdada em outro *locus* associado a formas AR de SNCR; b) ocorrer em heterozigose composta com uma variante herdada no outro alelo de um mesmo gene associado a formas AR do fenótipo; ou c) atingir um dos alelos de um *locus* associado a formas AD de SNCR¹⁰⁶.

Trinta e nove genes relacionados a SNCR foram avaliados em uma coorte anterior de 81 adultos com diagnóstico de GESF¹⁰⁷. Variantes causativas foram encontradas em 12 pacientes, em oito dos quais nos genes *COL4A3-5*. Vale notar que, com exceção de dois, todos os demais casos foram formas familiares.

Algumas variantes hipomórficas em *NPHS2* podem atuar como modificadores genéticos quando herdados concomitantemente com mutações em *COL4A3/A4*¹⁰⁸. Tais associações podem predispor à GESF e à progressão do declínio da função renal. Outra observação prévia relevante foi a identificação de mutações concomitantes nos genes *MYO1E* e *COL4A5* em dois irmãos, um com SNC com rápida evolução para doença renal crônica e outro com DRET aos 8 anos de idade. Vale destacar a presença isolada da mesma mutação em *COL4A5* em outros dois irmãos com proteinúria e hematúria leves¹⁰⁹.

1.6.2. Nefropatias associadas a *APOL1*

A partir da observação de que os afro-americanos apresentavam maior frequência e pior desfecho de doenças renais quando comparados a europeus-americanos, estudos de associação ampla do genoma identificaram uma região que se encontrava em desequilíbrio de ligação entre blocos de haplótipos que

englobavam regiões dos genes *MYH9* e *APOL1*^{110,111}. Em 2010, ao compararem pacientes afro-americanos e seus pares europeus-americanos, Genovese e cols encontraram associação entre as variantes em *APOL1* G1, que compreende duas variações *missense* neste gene [rs73885319 p.(Ser342Gly) e rs60910145 p.(Ile384Met)], e G2, que corresponde a uma deleção de 6 pares de base também em *APOL1* (rs60910145, p.Asn388_Tyr389del), com GESF e DRET atribuída a hipertensão arterial em pacientes afro-americanos (Figura 2)¹¹². Ambas as variantes são ausentes nos genomas de ancestralidade europeia, entretanto se apresentam em prevalência elevada nos genomas de ancestralidade africana, e em maior proporção nos originários da costa ocidental da África. A presença de duas variantes (homozigose para G1 ou G2 e heterozigose G1/G2), denominada genótipo de alto risco (GAR) de *APOL1*, parece ser necessária para que o produto resultante ultrapasse o limiar de lesão podocitária.

Respostas inflamatórias a infecções virais e processos constitutivos de ativação de imunidade inata frente a diferentes estímulos parecem aumentar a expressão de *APOL1* por meio do aumento dos níveis de interferon¹¹³. Em células HEK293, proteínas *APOL1* associadas às variantes de risco G1 e G2 localizam-se em lisossomos e mitocôndria¹¹⁴, induzindo disfunção mitocondrial. Este mecanismo parece ser importante na patogênese da glomerulopatia colapsante (GC). Grande parte de *APOL1* selvagem permanece nas gotículas intracelulares de lipídeos, ao passo que *APOL1* associada às variantes de risco G1 e G2 permanecem retidas no retículo endoplasmático. Interessantemente, quando as proteínas mutantes G1 e G2 são deslocadas do retículo endoplasmático para as gotículas de lipídeos de células HEK T-Rex por meio de tratamento com o ácido oleico, segue-se redução do fluxo de autofagia e de citotoxicidade¹¹⁵. Esses resultados sugerem que, ao menos em determinadas situações, a patogênese da doença se baseie num mecanismo de ganho de função dose-dependente, que difere do mecanismo de perda de função mais consistente com a forma de herança das nefropatias associadas a *APOL1*. Vale observar que a expressão de *APOL1* selvagem reduziu morte celular induzida pelo alelo mutante¹¹⁵.

Dentro do espectro de nefropatias associadas a GAR de *APOL1*, observa-se efeito maior desses genótipos nas relacionadas a aumento de interferon, como

na sua utilização de terapêutica ou em interferonopatias de causas monogênicas, seguidas pelas nefropatias por HIV e outras infecções virais, possivelmente incluindo COVID-19¹¹⁶, GESF e GC. Também se observa significativa associação entre GAR de *APOL1* e hipertensão arterial associada a DRET atribuída e entre GAR de *APOL1* e GC no lúpus eritematoso sistêmico e, e menor efeito, ainda que considerável, na progressão de nefropatia não diabética e na sobrevida do enxerto renal¹¹⁷.

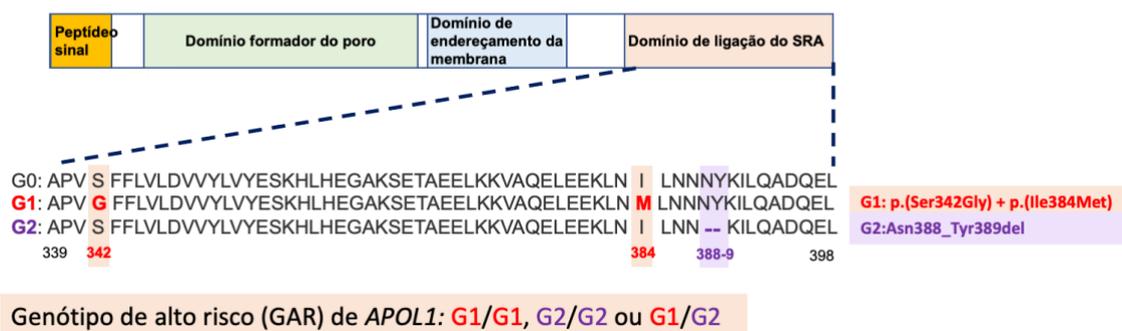


Figura 2. Alelos de alto risco estão relacionados a variantes que afetam o domínio de ligação de SRA (antígeno de resistência ao soro) da proteína *APOL1*. O alelo G1 inclui duas variantes *missense*, p.(Ser342Gly) e p.(Ile384Met); e o alelo G2 corresponde a deleção de 6 pares de base, p.(Asn388_Tyr389del). O fator de virulência SRA do tripanossomo se liga fortemente a variante G0, inibindo a ação tripanolítica da *APOL1*, enquanto essa ligação é mais fraca ou praticamente ausente com as variantes G1 e G2, respectivamente. (Adaptado de Friedman e cols, Clin J Am Soc Nephrol, 2021)¹¹⁷.

Ainda que GARs de *APOL1* estejam associados a progressão de doença renal crônica e a GESF em afro-americanos, e que tais genótipos estejam em região genômica de ancestralidade africana, a miscigenação ocorrida no Brasil não permite a avaliação de risco associada a *APOL1* apenas através da raça autodeclarada. De fato, no Brasil indivíduos autodeclarados brancos podem apresentar uma porcentagem considerável de ancestralidade genética africana¹¹⁸, podendo albergar os alelos de risco G1 e/ou G2 de *APOL1*¹¹⁹.

1.7. Importância do estudo

Com base nos dados disponíveis até o presente, pode-se estimar as prevalências absoluta e relativa de SN monogênica em diferentes populações, porém ainda estamos distantes de valores realmente precisos. Essa realidade é particularmente aplicável a cenários de baixo acesso a diagnóstico molecular, seguimentos clínicos não integrados, populações geneticamente diversificadas e elevada miscigenação. Todos esses componentes estão presentes em nosso país. Uma vez que a identificação e caracterização de variantes patogênicas guarda relação com a conduta a ser empregada nos pacientes, a realização de um estudo voltado ao dimensionamento e caracterização genética molecular de pacientes pediátricos com SNCR fazia-se fundamental em nosso meio. Também se fazia essencial analisar o cenário de *APOL1* nessa população de pacientes. Esperava-se, por fim, que o conjunto de resultados proporcionados pelo estudo em seus diferentes níveis, assim como sua integração, possibilitasse a geração de novos conhecimentos sobre a patogênese da SN, com possíveis implicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Central

Caracterizar e analisar geneticamente uma população brasileira de pacientes pediátricos com SNCR, SNC e GESF através de sequenciamento de painel dirigido ou de exoma completo, de modo a determinar as formas monogênicas, sua frequência e seu padrão de envolvimento gênico, assim como o perfil de distribuição de genótipos de alto risco de *APOL1*. Com base nesses dados, o objetivo deste estudo também incluiu a ampliação do entendimento genético-molecular e clínico dessas condições.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Construir um banco de dados e um biorrepositório para todos os pacientes com SNCR, SNC e GESF prevalentes no ICr-HCFMUSP, incluindo amostras de DNA genômico e informações clínicas, laboratoriais, imagenológicas e anatomopatológicas.

2.2.2. Construir um painel voltado à análise de variantes genéticas em genes associados a glomerulopatias.

2.2.3. Identificar variantes genéticas relevantes mendelianas ou em *APOL1* por meio de sequenciamento de painel genético ou de exoma completo.

2.2.4. Analisar as variantes detectadas e avaliar seu potencial patogênico.

2.2.5. Determinar a frequência de formas mendelianas de SNC, SNCR e GESF na população avaliada, assim como de GAR de *APOL1*, e caracterizar a distribuição de variantes patogênicas entre os genes mutados associados às formas mendelianas.

2.2.6. Estabelecer, se possível, correlações genótipo/fenótipo para as condições clínicas analisadas, utilizando informações genético-moleculares de nosso estudo e de estudos de outros autores.

2.2.7. Analisar em profundidade as informações genéticas geradas por nosso estudo, procurando expandir o entendimento da patogênese da SNCR, SNC e GESF pediátricas.

2.2.8. Nos casos possíveis, empregar as informações obtidas para guiar o seguimento e o tratamento de pacientes incluídos no estudo.

2.2.9. Constituição da REBRASNI- Rede Brasileira da Síndrome Nefrótica na Infância, como um de seus três centros coordenadores.

2.2.10. Analisar a ancestralidade genética global dos pacientes e correlacionar com a raça autodeclarada, susceptibilidade genética relacionada as variantes de risco de *APOL1* e prognóstico.

2.2.11. Analisar a ancestralidade local na região genômica das variantes mendelianas encontradas.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram incluídos pacientes que manifestaram SN até 18 anos incompletos na forma de SNCR ou SNC, com diagnóstico histológico de GESF independente da resposta a imunossupressão, ou com familiares de primeiro grau com GESF ou SN.

SNCR foi definida como não responsiva a tratamento com corticosteroide na dose de 60 mg/m²/dia por quatro semanas, seguido da mesma dose, mas administrada diariamente ou em dias alternados por quatro semanas adicionais; ou dose de 60 mg/m²/dia por quatro semanas, seguida de três pulsos de metilprednisolona na dose de 20-30 mg/kg/dia por três dias consecutivos.

Nos anos de 2017 e 2020 foram atendidos 186 pacientes com SN no Instituto da Criança e do Adolescente (ICr) do Hospital das Clínicas da FMUSP (Figura 3). Destes, 61 apresentaram comportamento inicial de corticorresistência, enquanto outros 10, com diagnóstico de GESF por biópsia renal, mostraram-se sensíveis a corticosteroide, e outros 2 apresentaram SN familiar. Destes 73 pacientes, 65 foram submetidos a análise genética molecular.

Entre os 8 pacientes que não participaram do estudo, 6 declinaram e 2 não foram encontrados no seu momento de transição para a clínica dos adultos, responsável pelo seguimento de pacientes acima de 18 anos de idade.

Além destes, sequenciamos também outros 8 pacientes que já haviam sido seguidos no Ambulatório de Glomerulopatias do ICr-HCFMUSP em período anterior ao descrito. Sete deles apresentavam SNCR, enquanto 1 mostrava corticodependência e diagnóstico histológico de GESF.

Outros 28 pacientes externos foram encaminhados para participar da pesquisa, tendo também sido sequenciados: 25 deles com SNCR e 3 com SNC.

No total, portanto, realizamos o sequenciamento proposto em 101 pacientes, provenientes de 98 famílias. Destes 101, 74 pacientes foram submetidos à análise pelo painel de 42 genes associados à SN e pelo painel de 20 genes associados a glomerulopatias, enquanto 26 foram submetidos a SEC. Um paciente foi submetido a análise por painel em estudo conduzido pela Disciplina

de Endocrinologia da FMUSP voltada à avaliação de distúrbios da diferenciação sexual, tendo sido identificada variante patogênica no gene *WT1*. Esse paciente foi submetido a sequenciamento de Sanger para *APOL1* e então adicionado a casuística.

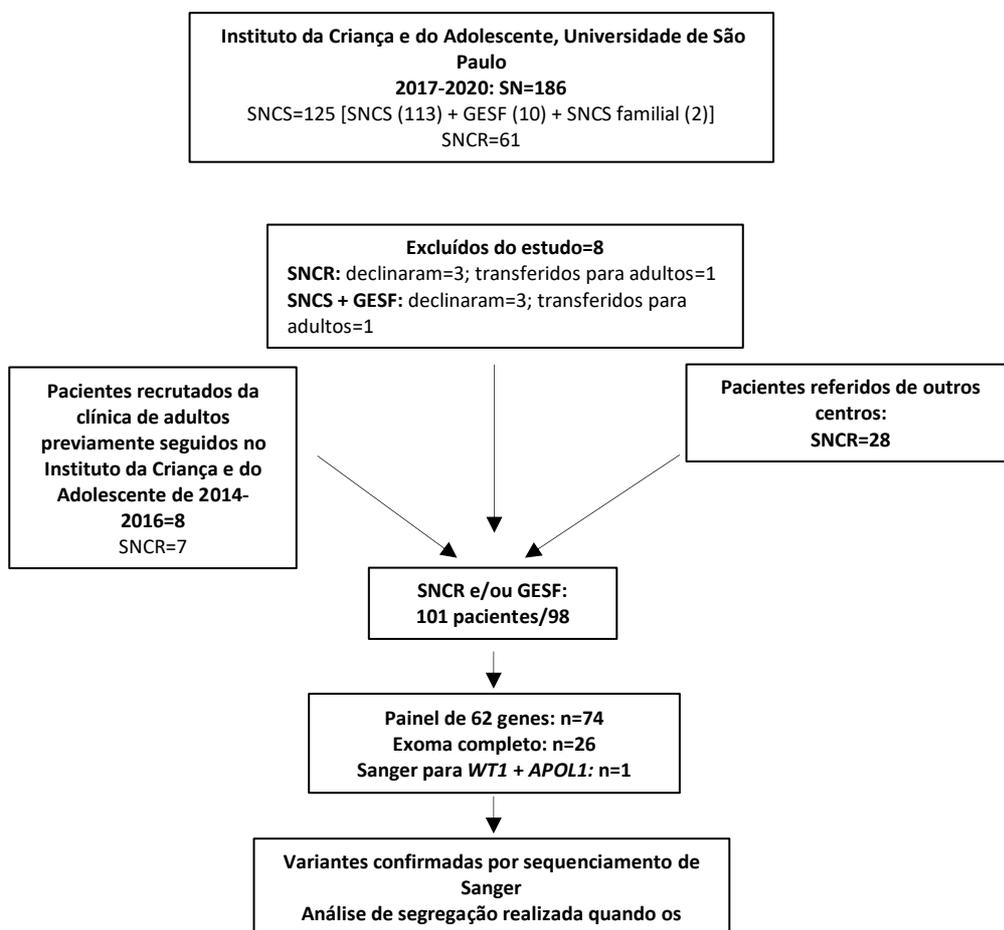


Figura 3. Estabelecimento da coorte e visão geral do estudo

3.2. Métodos:

3.2.1. Extração e conservação do DNA genômico

Após consentimento informado assinado pelos pais ou responsáveis e assentimento informado para pacientes com idade de 7 a 18 anos incompletos assinado pelos pacientes foram coletados 4 mL de sangue total em tubo com EDTA tanto do paciente quanto dos genitores (pai e mãe), quando disponíveis e consentido. Os tubos foram armazenados a 4°C em geladeira. A extração de

DNA genômico foi realizada em até duas semanas da coleta do sangue total com o kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany), no Laboratório de Investigação Médica 36 do Hospital das Clínicas da FMUSP (LIM 36).

O armazenamento das amostras de DNA foi feito no biorrepositório do ICr-HCFMUSP, localizado no LIM 36. As amostras de DNA foram divididas em três alíquotas: uma armazenada a -80°C e duas a -20°C . O biorrepositório, contendo dados clínicos e amostras biológicas pertence ao Departamento de Pediatria da FMUSP e foi aprovado sob o número CAPPesq 1059/2009.

3.2.2. Metodologias de sequenciamento

O DNA extraído foi submetido a sequenciamento por meio de dois painéis customizados compreendendo genes relacionados a glomerulopatias, ou a um dos dois protocolos para SEC.

Os sequenciamentos relacionados a ambos os painéis customizados e a um dos protocolos de SEC foram realizados no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SELA-FMUSP).

Os sequenciamentos relacionados ao segundo protocolo de SEC foram realizados no Laboratório Mendelics (São Paulo, Brasil).

3.2.3. 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 objetivo de realizar a captura de 845 regiões alvo predeterminadas em 42 genes relacionados a glomerulopatias, com cobertura média superior a 99%. A biblioteca de DNA foi preparada no protocolo Nextera Rapid Capture enrichment (Illumina, San Diego, CA), incluindo os seguintes genes: *ACTN4*; *ADCK4*; *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*; *SMARCAL1*; *TRPC6*; *TTC21B*; *WDR73*; *WT1*; *XPO5*; *APOL1*; *ARHGAP24*; *MEFV*; *NXF5*; *NUP107*; *NUP205* e *NUP93*.

O protocolo Nextera Rapid Capture customizado (Illumina, San Diego, CA) utiliza a tagmentação enzimática do DNA genômico para o preparo da biblioteca. Dada a necessidade de quantificação precisa do mesmo, tal procedimento foi realizado pelo método fluorométrico 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 de utilização de “beads” magnéticas, a fim de separar o DNA tagmentado. Em seguida, procedemos à colocação de adaptadores de identificação (index), seguida de amplificação por PCR (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 com posterior purificação. Após a finalização do preparo, as bibliotecas foram identificadas e conservadas à temperatura de -20°C.

O segundo painel customizado também foi construído utilizando a ferramenta de bioinformática Design Studio (Illumina, San Diego, CA), 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 empregando o protocolo Ampliseq (Illumina, San Diego, CA), 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 de um *pool* de pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) direcionados às regiões específicas pré-determinadas, capazes de se ligar às respectivas sequências de DNA alvo e promover amplificação dos respectivos segmentos por PCR. A seguir, os excessos de primers remanescentes são digeridos e posteriormente descartados, procedendo-se a ligação às sequências adaptadoras de identificação (index). A purificação foi realizada através de “beads” magnéticas, seguida pela segunda amplificação (PCR) e 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 em 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.

3.2.4. Preparo de biblioteca e sequenciamento de exoma completo

No primeiro protocolo de SEC, as bibliotecas de DNA também foram preparadas usando o Kit Nextera Exome Rapid Capture enrichment (Illumina, San Diego, CA), porém neste caso as sondas foram direcionadas a todas as porções gênicas exônicas conhecidas e suas regiões regulatórias adjacentes. O sequenciamento foi realizado no equipamento NextSeq 500 utilizando o kit High Output kit v2 (Illumina, San Diego, CA), visando cobertura horizontal maior que 95% e cobertura vertical média de 100 vezes.

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

3.2.5. Análise primária dos dados

Os dados de sequenciamento obtidos foram alinhados à referência de genoma humano GRCh37/hg19 usando 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/ekq/freebayes>) e os arquivos VCFs (*variant call format*) resultantes foram anotados através do software ANNOVAR (<http://annovar.openbioinformatics.org/em/latest>)¹²⁰.

A conversão do formato BCL para o formato FASTQ foi realizado através do programa Bcl2fastq Conversion, uma opção automática nos sistemas 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, por sua vez, 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.

3.2.6. 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% nos bancos de dados gnomAD¹²¹, ABraOM¹²² e SELAdb¹²³. Em um segundo passo, foram filtradas variantes anteriormente referidas como causativas na literatura, assim como aquelas com potencial patogênico, ou seja, que geram códon de parada ou alteração de sítios de *splicing* ou ainda alteração no quadro de leitura. A patogenicidade das variantes *missense*, também chamadas variantes de ponto, foram realizadas através dos

programas preditores *in silico* de patogenicidade, incluindo Polyphen2¹²⁴, Mutation Assessor¹²⁵, SIFT¹²⁶ e PROVEN¹²⁷. 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/>)¹²⁸.

Para avaliação dos dados relacionados às variantes resultantes potencialmente causativas, também foram consultados os bancos de dados de domínio público OMIM^{R, 129} e PubMed^{130,131}, assim como HGMD¹³², EBI¹³³, Ensembl¹³⁴ e Uniprot¹³⁵.

Também foram incluídas em nossas análises as variantes de susceptibilidade *APOL1* G1 (rs73885319, p.Ser342Gly e rs60910145, p.Ile384Met) e G2 (rs71785313, p.Asn388_Tyr389del), assim como a variante em *NPHS2* rs61747728, p.Arg229Gln (R229Q) presentes em mais de 1% da população.

As variantes potencialmente causativas encontradas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger e submetidas a estudo de segregação quando disponíveis os genitores. Para sequenciamento de Sanger, as amostras de DNA foram submetidas a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para a análise de cada variante. Os produtos de PCR foram então purificados e submetidos ao sequenciamento por Sanger usando o BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) e o sequenciador ABI Prism 3500xl Genetic Analyzer sequencer (Thermo Fisher Scientific). Tais sequências foram então comparadas às sequências de referência.

As variantes confirmadas foram classificadas quanto à patogenicidade de acordo com os critérios estabelecidos pelo American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG),(Tabela 5 e 6) ^{105,136}.

Tabela 5. Resumo dos critérios de classificação de variantes conforme diretrizes do ACMG, considerando evidência de patogenicidade e de impacto benigno (Richards e cols, Genet Med 2015)¹⁰⁵.

Evidência de patogenicidade	Categoria
Muito forte	PVS1. 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
Forte	PS1. A mesma mudança de aa previamente estabelecida como variante patogênica, independentemente da mudança do nucleotídeo PS2. Variante <i>de novo</i> (com maternidade e paternidade confirmadas) em paciente com a doença e sem história familiar da mesma PS3. 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 PS4. A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente aumentada comparando com a prevalência em controles
Moderada	PM1. 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 PM2. Ausente em controles populacionais (ou frequência extremamente rara se recessivo) em <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 genomes</i> , ou <i>Exome Agregation Consortium</i> PM3. Para doenças de herança recessiva, detectada em <i>trans</i> com variante patogênica PM4. 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) PM5. 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 PM6. Variante considerada <i>de novo</i> , mas sem confirmação de maternidade ou paternidade
Suporte	PP1. Cossegregação com a doença em múltiplos membros afetados da família em um gene que definitivamente é conhecido como causativo PP2. 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 PP3. Múltiplas linhas de evidência computacional suportam efeito deletério do gene mutado ou de seu produto (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i>) PP4. Paciente com fenótipo ou história familiar muito específica de uma doença com etiologia genética única PP5. Fonte respeitável que recentemente reportou a variante como patogênica, mas a evidência não é disponível para o laboratório fazer uma avaliação independente (Continua)

Evidência de impacto benigno (conclusão)	Categoria
Stand-alone	BA1. A frequência do alelo é $\geq 5\%$ nas bases de dados <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 genomes</i> , ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
Forte	<p>BS1. A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença</p> <p>BS2. 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</p> <p>BS3. 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></p> <p>BS4. Ausência de segregação em membros afetados da família</p>
Suporte	<p>BP1. Variante <i>missense</i> em um gene onde variantes primariamente truncadas são conhecidas como causa de doença</p> <p>BP2. 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>BP3. Deleções ou inserções no quadro de leitura em região de repetição sem função conhecida</p> <p>BP4. 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>BP5. Variante encontrada em um caso com outra base molecular para a doença</p> <p>BP6. Fonte respeitável recentemente reportou a variante como benigna, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente</p> <p>BP7. 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 6. Diretrizes de combinação dos critérios para classificar as variantes encontradas

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

3.2.7. Análises de mecânica molecular

Análises *in silico* de mecânica molecular foram realizadas para ampliar e fortalecer a avaliação de potencial de patogenicidade de variantes de significado incerto (*variant of uncertain significance*, VUS). Nesses casos, a sequência primária de aa foi inicialmente alinhada para avaliar a conservação dos aa localizados nas posições alteradas pela variante genética. Seguiram-se, então, análises de mecânica macromolecular *in silico* e análises estruturais. O alinhamento de sequências homólogas foi realizado com o programa MUSCLE¹³⁷, usando o banco de dados de sequência de referência de proteínas NCBI. Todos os modelos moleculares foram construídos e submetidos a simulações de mecânica molecular em forças explícitas de água com o programa YASARA¹³⁸ suíte ao longo de 10.000 trajetórias com o campo de força YAMBER. Os modelos resultantes de tipo selvagem e mutantes foram comparados visualmente e inspecionados utilizando o programa PyMOL (<https://pymol.org>)¹³⁹. COQ2 foi modelada com base nos modelos de estrutura cristalina 4OD428¹⁴⁰ e 4TQ429¹⁴¹, a fosfolipase C épsilon 1 (PLCE1) em 6PMP3330¹⁴², 1DJH3431¹⁴³, 4QJ33532¹⁴⁴, 3OHM3633¹⁴⁵ e 2BYE3734¹⁴⁶, e nefrina (NPHS2) em 4OFY3935¹⁴⁷.

3.2.8. Análise de ancestralidade

A avaliação da ancestralidade foi realizada com base em genotipagem e análise do arranjo de alta densidade de SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) Infinium HTS Global Screening Array-24 BeadChip v3.0 (Illumina, San Diego, CA), capaz de identificar até 750.000 SNPs por amostra de DNA. Essa técnica inicia-se com a quantificação fluorimétrica do DNA e se segue com amplificação e fragmentação enzimática. A etapa seguinte consiste na hibridização do DNA fragmentado no BeadChip, 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, então, acrescentam-se os nucleotídeos marcados para estender os produtos hibridizados. Após este procedimento, são realizadas as leituras dos sinais de fluorescência utilizando o sistema iScan

(Illumina, San Diego, CA). A genotipagem para a análise da ancestralidade foi realizada no laboratório Genera (São Paulo, Brasil).

Os dados foram limpos e filtrados de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando a *pipeline* GWASTools¹⁴⁸. As análises de parentesco dos dados genéticos resultantes foram realizadas usando a metodologia contida no pacote R SNPRelate¹⁴⁹. As corridas de homozigose (ROH) foram realizadas com o programa PLINK¹⁵⁰, usando uma janela deslizante com 50 SNPs. O máximo permitido por janela foi um genótipo heterozigoto e cinco chamadas ausentes, enquanto a proporção de janelas sobrepostas para formar segmento genômico homozigoto foi de 5%. Foi empregada uma densidade de pelo menos um SNP por 50 kb, com um intervalo máximo de 100 kb entre SNPs consecutivos. O coeficiente de endogamia baseado nas corridas de homozigose (FROH) foi inferido a partir da abordagem de McQuillan e cols¹⁵¹.

As análises de ancestralidade genética foram realizadas utilizando duas abordagens: 1) Ancestralidade global dos pacientes (ancestralidade média do genoma), inferida com o programa ADMIXTURE v.1.3.0¹⁵². 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 (HGDP)¹⁵³ foram usadas como populações parentais. Como as amostras dos pacientes foram genotipadas com o arranjo de alta densidade de SNPs e as do HGDP foram genotipadas por SEC, filtros foram realizados para haver sobreposição entre os marcadores genéticos e possibilitar a harmonização dos dois conjuntos de dados (*datasets*). As análises foram feitas apenas com marcadores independentes (desequilíbrio de ligação $r^2=0.1$), através de análise supervisionada (K=4) e 2000 réplicas de inicialização (*bootstrap*). 2) Ancestralidade observada na região genômica da variante, obtida usando o software RFMIX¹⁵⁴ com um modelo que assume 8 gerações de mistura (*generations of admixture*) em janela com tamanho de 0,2 cM, e com 2 interações expectativa-maximização. Foram utilizadas como populações parentais africanos, europeus, leste asiáticos e nativo-americanos, ancoradas em amostras do *Human Genome Diversity Project-Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*, HGDP-CEPH^{153,154}. É importante notar que apenas

amostras parentais com mais de 95% de ancestralidade de seu grupo populacional foram incluídas como referência nessa análise.

3.2.9. Correlações genótipo-fenótipo

A busca por correlações genótipo-fenótipo incluiu análises de variantes mendelianas associadas a SN e o *status* genotípico de *APOL1*. As características fenotípicas utilizadas foram a idade de início de SN, manifestações extrarrenais, diagnóstico histológico, raça autodeclarada, história familiar de SN e/ou de DRC, consanguinidade parental, progressão para DRET, tempo para atingir DRET e recorrência de SN após transplante renal.

3.2.10. Análise estatística

O teste exato de Fisher ou o teste Qui-quadrado foram usados para comparar as frequências entre os grupos, dependendo do número de variáveis comparáveis. Os dados contínuos foram classificados como paramétricos ou não paramétricos com base no teste de Shapiro Wilk. Os dados paramétricos de dois grupos foram comparados pelo teste t de Student e expressos em média \pm desvio padrão (DP), enquanto os dados não paramétricos foram comparados entre dois grupos pelo teste U de Mann-Whitney e entre mais de dois grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, em ambos os casos expressos como mediana e intervalo interquartil. As análises comparativas de sobrevida renal entre grupos foram conduzidas usando a análise de curva de Kaplan-Meier com o teste log-rank, seguida de regressão de Cox com redução de viés de máxima verossimilhança penalizada de Firth para prever a probabilidade de sobrevida em um modelo multivariável. Significância estatística foi considerada para erro $\alpha \leq 0,05$ e erro $\beta < 0,1$. Todos os testes foram realizados no software SPSS versão 24.0 (IBM, New York, EUA), exceto a regressão de Cox, que foi desenvolvida em R4.1. (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>). Os gráficos das curvas de Kaplan-Meier foram gerados no programa Prism Versão 9.4.1 (GraphPad, San Diego, EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil demográfico da população de pacientes estudada

Dos 101 pacientes avaliados para variantes nos 62 genes mencionados, 73 (72,2%) foram ou são seguidos no IC-HC-FMUSP e 28 (27,7%) foram provenientes de Natal/RN, Campinas/SP, Taubaté/SP ou Vitória/ES. A idade mediana de manifestação da SN foi de 2,9 anos (1,5-6,8). Destes 101 pacientes, 61 (60,4%) são/eram do sexo masculino e 40 (39,6%) do sexo feminino. Entre eles, 61 (60,4%) se autodeclararam brancos, 34 (33,7%) pardos, 4 (4%) negros, 1 (1%) leste asiático e em 1 (1%) não foi possível a autodeclaração. Consanguinidade foi declarada em 6 (5,9%) dos 101 pacientes, e história familiar de doença renal foi referida em 14 pacientes (13,9%) dos casos (Tabela 7).

Tabela 7. Caracterização demográfica dos 101 pacientes, incluindo sua origem, idade de manifestação da SN, sexo, raça, tempo de seguimento e frequência de doença renal estágio terminal.

n=101	
Origem	ICr 73 (72,2%) Externos 28 (27,7%): - Campinas/SP: 4 (14,3%) - Taubaté/SP: 1 (3,6%) - Vitória/ES: 2 (7,1%) - Natal/RN :13 (46,4%) - Hospital Menino Jesus: 1(3,6%) - Belo Horizonte: 3 (10,7%) - Divinópolis: 4 (14,3%)
Idade de manifestação de SN	2,9 anos (1,5-6,8)
Sexo	Masculino: 61 (60,4%) Feminino: 40 (39,6%)
Raça autodeclarada	Branca: 61 (60,3%) Parda: 34 (33,7%) Negra: 4 (1,2%) Leste asiática: 1 (1%) Sem informação: 1 (1%)
História familiar	Sim: 14 (13,9%) Não: 86 (94,1%)
Consanguinidade parental Autodeclarada	Sim: 6 (5,9%) Não: 95 (85,1%) Sem informação: 1 (1%)

(Continua)

(Conclusão)	n=101
Resposta a corticosteroide	Sensível: 9 (8,9%) Córtico-resistente: 82 (81,2%) Córtico-resistente presumido: 10 (9,9%)
Resposta a inibidor de calcineurina n=69	Remissão completa: 36 (52,9%) Remissão parcial: 2 (2,9%) Sem resposta: 31 (44,1%)
Histologia renal	GESF: 54 (53,5%) LHM: 20 (19,8%) GC: 12 (11,9%) EMD: 6 (5,9%) Proliferação mesangial: 2 (2%) Crescêntica pauci imune: 1 (1%) Não realizou biópsia renal: 6 (5,9%)
Tempo de seguimento	5,7 anos (2,4-9,5)
Pacientes com DRET	44 (43,6%)
Tx renal	29 (28,7%)
Recidiva após tx renal	9/29 (31,0%)

ICr: Instituto da Criança e do Adolescente; SN: síndrome nefrótica; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; GC: glomerulopatia colapsante; EMD: esclerose mesangial difusa; DRET: doença renal estágio terminal; Tx renal: transplante renal.

4.2. Perfil da terapêutica imunossupressora empregada

Dez pacientes não receberam corticosteroide. Destes, cinco apresentaram SNC, três manifestaram SN com 4 e 5 meses de idade, e dois outros apresentavam síndrome genética ainda em investigação, um deles por distúrbio da diferenciação sexual. (Tabela 7).

Dos 91 pacientes que receberam corticosteroide, 82 (90,1%) apresentaram comportamento córtico-resistente e 9 córtico-sensível (9,9%). Nenhum dos pacientes que responderam a corticosteroide evoluiu para DRET, enquanto 44/92 (47,8%) com SNCR evoluíram para essa condição ($p=0,005$), dentro de um tempo de seguimento de 8,4 anos (6,3-12,7) e tempo de evolução para DRET de 2,5 anos (1-5,2), respectivamente (Tabela 7).

Dos pacientes com SNCR, 69 receberam inibidores de calcineurina. Um deles apresentou resposta parcial, 36 apresentaram remissão completa com posterior dependência de corticosteroide e 31 não apresentaram resposta (Tabela 6). Nenhum dos pacientes que apresentaram remissão evoluiu para DRET em um tempo de seguimento de 9,5 anos (7,5-13,3) e 26 (83,9%) dos que não

responderam a inibidor de calcineurina evoluíram para DRET ($p=0,001$) em 3,5 anos (1,7-5,5). Dois pacientes apresentaram redução da proteinúria, mas não atingiram remissão.

4.3. Perfil histológico renal

Todos os 73 pacientes originários do ICr-HCFMUSP realizaram biópsia renal. Quarenta tiveram o diagnóstico de GESF, 10 de GC, 17 de LHM, 3 de EMD, 2 da forma proliferativa mesangial, e 1 de glomerulonefrite crescêntica pauci-imune. Dos 28 pacientes provenientes de outros serviços, 6 não realizaram biópsia renal, 14 apresentavam GESF, 2 GC, 3 esclerose EMD e 3 LHM.

A distribuição do diagnóstico histológico conforme apresentação clínica dos 95 pacientes que realizaram biópsia renal encontra-se na Tabela 8.

Tabela 8. Distribuição dos diagnósticos histológicos de 95 pacientes, conforme apresentação clínica de SN.

Apresentação clínica (n)	Padrão histológico	n (%)
SNCR/SNC (86)	GESF	47 (%)
	LHM	19 (22,7%)
	GC	12 (15,2%)
	EMD	6 (6,1%)
	Glomerulopatia proliferativa mesangial	1 (3%)
	Glomerulonefrite crescêntica pauci-imune	1 (1,5%)
SNCD (7)	GESF	7 (100%)
SN familiar (2)	LHM	1 (50%)
	Glomerulopatia proliferativa mesangial	1 (50%)

SNCR: síndrome nefrótica córtico-resistente; SNC: síndrome nefrótica congênita; GESF: glomerulosclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; GC glomerulopatia colapsante; EMD: esclerose mesangial difusa.

4.4. Evolução clínica da população avaliada

Em um período de 5,7 anos de seguimento (2,4-9,5), 44 pacientes (43,6%) atingiram DRET, 29 (65,9%) dos quais receberam transplante renal (Tabela 9). A recidiva de SN após o transplante renal foi observada em 9 pacientes (31%). As recidivas foram imediatas, ou seja, dentro das primeiras 24 horas, em 3 pacientes, na primeira semana em 2 casos, no primeiro mês em dois pacientes, e em 5 e 6 meses em outros dois casos. Dos 9 pacientes que apresentaram recidiva, duas perdas de enxerto ocorreram após 21 e 31 meses do transplante renal, respectivamente.

Quatorze pacientes (13,9%) apresentaram manifestação da SN no primeiro ano de vida. Nove (69,2%) atingiram DRET em 12 meses (2-76). Quatro destes receberam transplante renal e não apresentaram recidiva da SN.

Doze pacientes apresentaram glomerulopatia colapsante, 11 dos quais atingiram DRET em 15 meses (0,1-28) após a manifestação inicial de SN. Três destes pacientes apresentaram SN no primeiro ano de vida. Nove dos 11 que evoluíram para DRET receberam transplante renal. Dois desses pacientes apresentaram recidiva na primeira semana de transplante renal, sendo que um deles perdeu o enxerto 34 meses após o transplante renal por rejeição aguda, um perdeu o enxerto precocemente por trombose venosa do enxerto, e outros 6 não apresentaram recidiva em um tempo de seguimento de 29,5 meses (mínimo de 6 meses e máximo de 48 meses).

Pacientes com LHM não evoluíram para DRET dentro de um tempo de seguimento de 8,7 anos (6,2-14,3). Por outro lado, aqueles com GC progrediram mais frequentemente para DRET ($p < 0,001$), (Tabela 9).

A idade da manifestação de SN foi maior entre os pacientes que evoluíram para DRET e aqueles que não evoluíram para essa condição [4,1 (1,5-10,4) *versus* 2,6 (1,5 -4,0), respectivamente, $p = 0,025$]. Não foi detectada diferença de evolução para DRET entre os sexos ($p = 0,197$). Pacientes pardos/negro (não brancos) evoluíram mais frequentemente a DRET que pacientes autodeclarados brancos ($p = 0,003$), (Tabela 9).

Tabela 9. Análise comparativa entre pacientes com evolução ou não para doença renal estágio terminal quanto a idade de manifestação de SN, sexo, raça autodeclarada, padrão histológico renal e resposta a imunossupressão.

	Progressão para DRET		p
	Sim (n=44)	Não (n=67)	
Idade (anos)	4,1 (1,5-10,4)	2,6 (1,5-4,0)	0,025
Sexo			
Masculino	24 (39,3%)	37 (60,7%)	0,197
Feminino	20 (50%)	20 (50%)	
Raça autodeclarada			
Branca	19/61 (31,1%)	42/61 (68,9%)	0,003
Não branca	24/38 (63,2%)	14/38 (36,8%)	
Histologia renal			
GESF	25/54 (46,3%)	29/54 (53,7%)	0,40
LHM	0/20 (0%)	20/20 (100%)	<0,001
GC	11/12 (91,7%)	1/12 (8,3%)	<0,001
GESF (SNCS)	0/9	9/9	<0,001
Remissão após uso de inibidor de calcineurina			
Sim	0/36	36/36	<0,001
Não	25/33 (75,8%)	8/33 (24,2%)	

DRET: doença renal estágio terminal ICr: Instituto da Criança e do Adolescente; SN: síndrome nefrótica; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; GC glomerulopatia colapsante; EMD: esclerose mesangial difusa.

4.5. Perfil de distribuição do genótipo de alto risco de APOL1 e implicações clínicas

Oito pacientes apresentaram genótipo de alto risco (GAR) de *APOL1*, sendo 4 G1/G1 e 4 G1/G2. Destes, sete progrediram para DRET no período estudado. Outros oito pacientes apresentaram um alelo de risco de *APOL1*, sendo 2 com genótipo G1/G0 e 6 com G2/G0.

Pacientes com GAR de *APOL1* apresentaram idade maior à manifestação da SN ($p < 0,001$), GESF ou GC como manifestação histológica renal ($p = 0,001$), e evoluíram mais frequentemente ($p = 0,022$) e mais rapidamente para DRET ($p < 0,001$) quando comparados àqueles com um ou nenhum alelo de risco de *APOL1*. (Tabela 10; Figura 5)

Quatro dos 7 pacientes com GAR de *APOL1* que evoluíram para DRET receberam transplante renal, sendo que um deles apresentou perda do enxerto por trombose venosa nas primeiras 24 horas pós-implante do rim. Os outros três pacientes não apresentaram recidiva dentro de um tempo de seguimento pós-transplante de 24 a 49 meses.

Não foi observada diferença significativa de autodeclaração racial entre pacientes com 0, 1 ou 2 alelos de risco de *APOL1* ($p=0,342$); 3/61 pacientes (4,9%) que se autodeclararam brancos e 5/38 pacientes (13,2%) que se autodeclararam não brancos apresentaram GAR de *APOL1* (Tabela 10).

Pacientes que se autodeclararam não brancos atingiram mais rapidamente DRET que aqueles que se autodeclararam brancos ($p=0,002$, Figura 6).

Tabela 10. Distribuição de genótipo de alto risco (GAR), ausência de alelo de risco e presença de um alelo de risco de *APOL1* em autodeclarados brancos e não brancos e análise comparativa de idade de manifestação, ancestralidade genética global, histologia renal e progressão para doença renal estágio terminal entre os três genótipos de *APOL1* referidos.

	APOL1 0 alelo de risco n=83	APOL1 1 alelo de risco n=8	GAR APOL1 n=8	p
Idade de manifestação de SN (anos)	2,7 (1,3-4,4)	4,4 (1,9-10,1)	10,99 (9,99-14,5)	<0,001
Raça autodeclarada *				
Branca	53/83 (63,9%)	5/8 (62,5%)	3/8 (37,5%)	0,342
Não branca	30/83 (36,1%)	3/8 (37,5%)	5/8 (62,5%)	
Ancestralidade genética:				
Europeia	66,9% (53,4-75,6)	66,2% (54,9-76,4)	58,4% (49,4-73,1)	0,59
Africana	22,7% (11,6-28,8)	16,6% (13,2-30,4)	28,1% (14,2-42,4)	0,44
Nativo-americana	10,1% (6,1-13,1)	11,8% (7,4-16,2)	10,1% (7,6-16,2)	0,60
Histologia renal**				
GESF	47	4	3	0,001
LHM	19	1	0	
GC	5	2	5	
Outra histologia	8	1	0	
ESKD	32 (37,5%)	4 (50%)	7 (87,5%)	0,022

*Número de pacientes analisados = 99: um paciente sem o dado e o único paciente de descendência leste-asiática foram excluídos da análise.

** Seis pacientes não realizaram biópsia renal

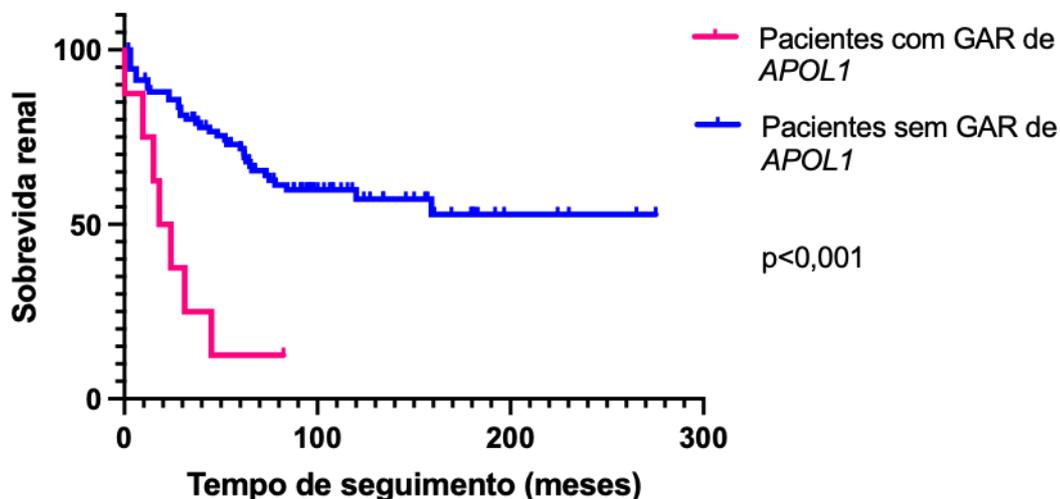


Figura 5. Comparação da sobrevivida renal ao longo do tempo entre pacientes com GAR de *APOL1* e aqueles que não o apresentaram.

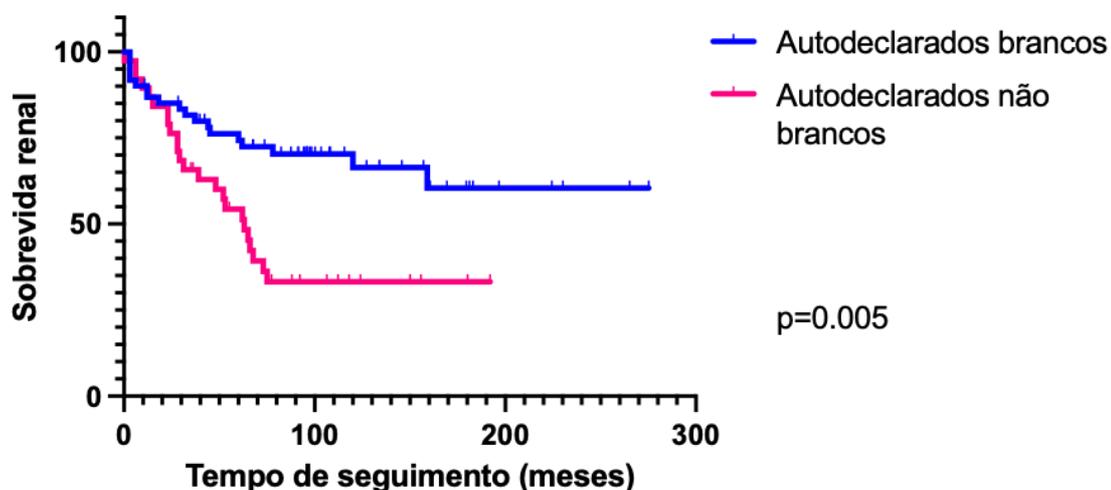


Figura 6. Comparação da sobrevivida renal ao longo do tempo entre pacientes que se autodeclararam brancos e não brancos.

4.6. Perfil de ancestralidade genética global dos pacientes da coorte

Com base nos resultados obtidos relacionados a autodeclaração racial e no contexto multirracial e altamente miscigenado da população brasileira, decidimos analisar a ancestralidade genética global dos pacientes incluídos no

estudo. Tal avaliação detectou 64,9 % de ancestralidade europeia, 22,4% africana, 10,4% nativo-americana e 2,3% leste asiática (figura 7).

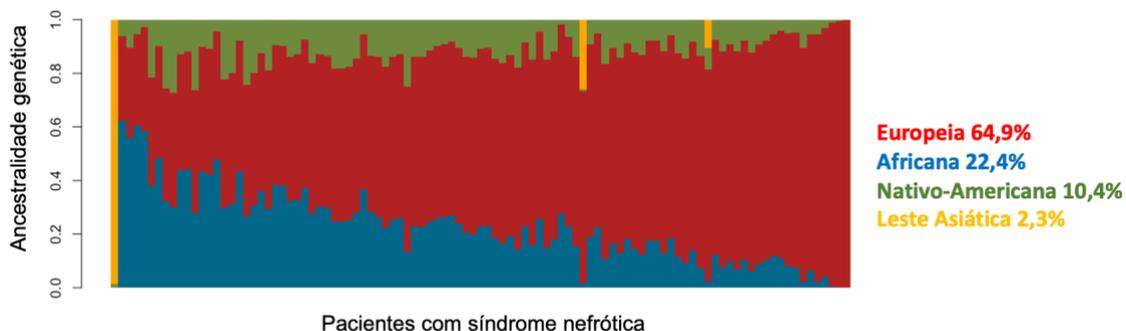


Figura 7. Inferência da ancestralidade global. Cada coluna representa a ancestralidade genética inferida para cada paciente. As cores azul, vermelha, verde e laranja correspondem às ancestralidades africana, europeia, nativo-americana e leste-asiática, respectivamente.

Pacientes autodeclarados não brancos apresentaram maior proporção de ancestralidade genética africana que os autodeclarados brancos (30,9% *versus* 17,4%, $p < 0,001$), não havendo diferença na proporção de ancestralidade nativo-americana entre os grupos (11,7% *versus* 9,6%, $p = 0,059$) (Figura 8)

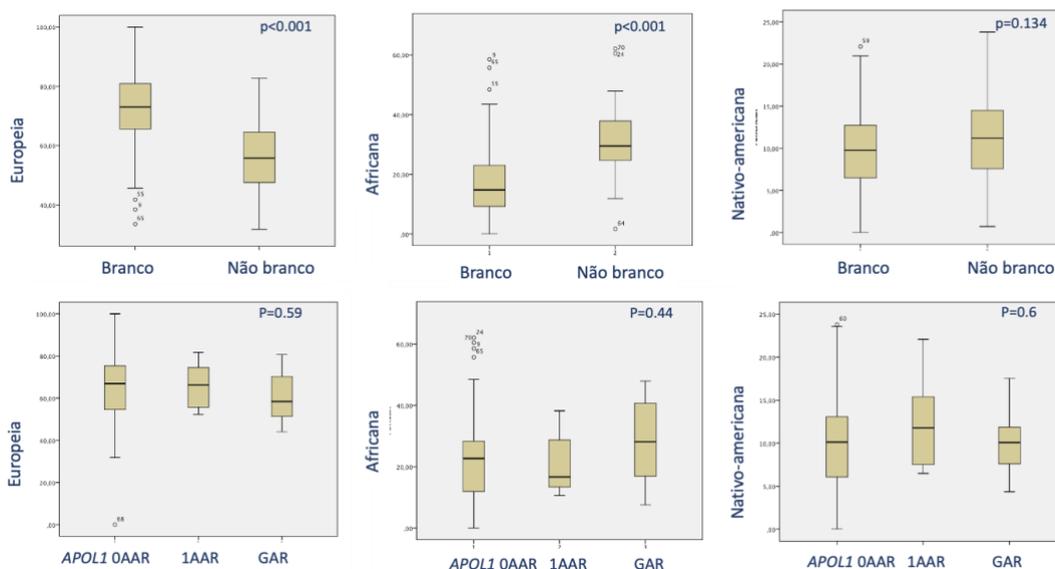


Figura 8. Análise comparativa das ancestralidades globais europeia, africana e nativo americana entre pacientes autodeclarados brancos e não brancos, e entre pacientes sem alelo de risco (0AAR), com um alelo de alto risco (1AAR) e com genótipo de alto risco (GAR) de *APOL1*.

Interessantemente, a proporção de ancestralidade africana não diferiu entre pacientes sem alelo de risco, com um alelo de risco e GAR de *APOL1*, situando-se em 22,7% (11,6-28,8), 16,6% (13,2-40,4) e 28,1% (14,2-43,4%), respectivamente ($p=0,44$) (Tabela 10). A proporção de ancestralidade global nativo-americana também não diferiu entre esses três grupos ($p=0,6$). (Figura 8). Observamos tendência não significativa de progressão mais rápida para DRET em pacientes com maior porcentagem de ancestralidade global não europeia, comparando-se o quarto quartil com o primeiro quartil quantitativo de tal ancestralidade (Figura 9).

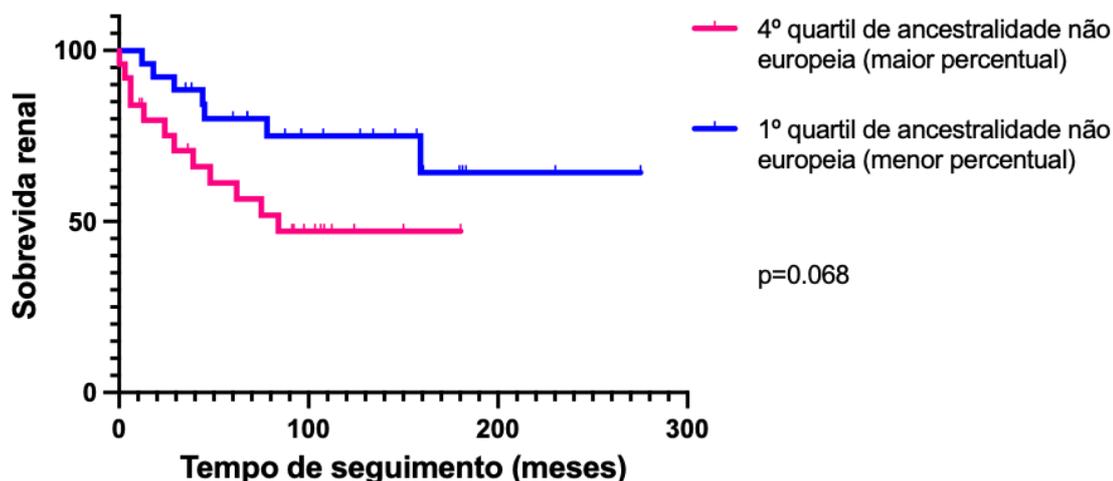


Figura 9. Análise comparativa da sobrevida renal ao longo do tempo entre pacientes com maior e menor percentual de ancestralidade não europeia.

4.7. Variantes mendelianas patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto identificadas na população analisada

Nossa avaliação genética molecular identificou as seguintes variantes causativas previamente descritas em *WT1* (NM_024426.6): c.1447 +5G>A e c.1447 + 4C>T; em *NPHS1* (NM_004646.4): c.2728T>C p.(Ser910Pro), c.2132G>A p.(Arg711His), c.1137T>A p.(Ile446Asn) e c.514_516delCCA p.(Thr172del); em *NPHS2* (NM_014625.4): c.914T>C p.(Leu305Pro), c.928G>A p.(Glu310Lys), c.506T>C p.(Leu169Pro), e o alelo de risco c.686G>A p.(Arg229Gln) (Tabela 11).

Foram também identificadas as seguintes variantes não descritas anteriormente e classificadas como patogênicas em *NPHS1* (NM_004646.4): c.3286+1G>A; em *NPHS2* (NM_014625.4): c.738+1G>A; em *COL4A5* (NM_033380.3): c.2524delC p.482fs; em *CUBN* (NM_001081.4): c.7968_7969insTTATA p.2657fs e c.3672+1G>A; além de uma variante provavelmente patogênica em *FN1* (NM_002026): c.5344G>T p.(Gly1782Cys) (Tabela 11).

Também foram identificadas as seguintes VUSs em *NPHS1* (NM_004646.4): c.1930+5G>A e c.716C>T p.(Pro239Leu); em *PLCE1* (NM_016341.4): c.3582+5G>T, c.6262_6264delGAG p.Glu2088_2088del e c.3698 T>C p.(Leu1233Pro); em *TRPC6* (NM_004621.5): c.227G>C p.(Gly76Ala) e c.1876T>A, p.(Ser626Thr); e em *COQ2* (NM_001358921.2): c.1147T>C p.(Phe383Leu) e c.424C>G p.(Pro142Ala), (Tabela 11).

Tabela 11. Variantes identificadas em pacientes da coorte, previamente descritas e novas, classificadas de acordo com a análise de patogenicidade pautada nos critérios do ACMG.

Gene/Transcrito	Variante
Herança	
Previamente descritas	
Classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas (ACMG)	
<i>WT1</i> (NM_024426.6) AD	c.1447 +5G>A c.1447 + 4C>
<i>NPHS1</i> (NM_004646.4) AR	c.2728T>C p.(Ser910Pro) c.2132G>A p.(Arg711His) c.1137T>A p.(Ile446Asn) c.514_516delCCA p.(Thr172del)
<i>NPHS2</i> (NM_014625.4) AR	c.914T>C p.(Leu305Pro) c.928G>A p.(Glu310Lys) c.506T>C p.(Leu169Pro) homozigose c.686G>A p.(Arg229Gln) – susceptibilidade
Não descritas previamente	
Classificadas como patogênicas (ACMG)	
<i>NPHS1</i> (NM_004646.4) AR	c.3286+1G>A
<i>NPHS2</i> (NM_014625.4) AR	c.738+1G>A
<i>COL4A5</i> (NM_033380.3) Ligado ao X	c.2524delC p.482fs
<i>CUBN</i> (NM_001081.4) AR	c.7968_7969insTTATA p.2657fs c.3672+1G>A
Não descritas previamente	
Classificadas como provavelmente patogênicas (ACMG)	
<i>FN1</i> (NM_212482.4):	c.5344G>T p.(Gly1782Cys)
Não descritas previamente	
Classificadas como variantes de significado incerto (ACMG)	
<i>NPHS1</i> (NM_004646.4) AR	c.1930+5G>A c.716C>T p.(Pro239Leu)
<i>PLCE1</i> (NM_016341.4) AR	c.3582+5G>T c.6262_6264delGAG p.(Glu2088_2088del) c.3698 T>C p.(Leu1233Pro)
<i>TRPC6</i> (NM_004621.5) AD	c.227G>C p.(Gly76Ala) c.1876T>A p.(Ser626Thr)
<i>COQ2</i> (NM_001358921.2) AR	c.1147T>C p.(Phe383Leu) c.424C>G p.(Pro142Ala)
<i>LMX1B</i> (NM_001174147.2) AD	c.349G>A p.(Gly117Ser)

4.8. Análises de segregação dirigidas às famílias com formas mendelianas de SNCR, SNC ou GESF

Todas as variantes causativas e potencialmente causativas detectadas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, realizamos também análise de segregação familiar por meio de amplificação por PCR de segmento específico à variante a partir do DNA parental, seguida de sequenciamento do fragmento por Sanger. Tais análises foram possíveis em todos os genitores, exceto em ambos os pais da paciente que apresentou a variante *NPHS1*: c.3286+1G>A em homozigose, no pai da paciente que apresentou a variante *NPHS2*: c.506T>C p.(Leu169Pro) em homozigose, e também no pai do paciente que apresentou a variante *COQ2*: c.1147T>C p.(Phe383Leu) e c.424C>G p.(Pro142Ala).

Nos outros casos, nossa análise de segregação confirmou a presença de heterozigose composta (alelos mutantes *in trans*) nos pacientes com duas variantes causativas e formas Mendelianas de herança autossômico recessiva.

Ao avaliar as formas de doença de padrão autossômico dominante, verificamos que a variante identificada na paciente a variante *WT1*:c.1447 +5G>A também foi encontrada em sua mãe, esta também afetada e com o diagnóstico de GESF. A outra variante em *WT1*, c.1447 +4C>T encontrada em outro paciente, não foi detectada na mãe ou no pai. Nesse contexto, a mesma foi considerada muito provavelmente uma variante *de novo*, uma vez que não foi realizada a análise genética de paternidade para a sua confirmação absoluta. A variante *COL4A5*: c.2524delC p.(Pro842fs), cuja herança apresenta o padrão ligado ao X, foi observada em hemizigose em um paciente e também em heterozigose em sua mãe, a qual apresentava histórico de SN.

A variante nova *FN1*: c.5344G>T p.(Gly1782Cys) foi classificada como provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG. Entretanto, essa variante foi presente no pai do paciente, mas não na mãe, e este, em avaliações realizadas aos 40 anos de idade, apresentava-se normotenso, com função renal normal, não foram observadas hematúria ou proteinúria em exame de urina. Como variantes causativas nesse gene apresentam penetrância variável, procedeu-se também a avaliação de microscopia eletrônica de tecido renal previamente fixado, quando não foi detectada qualquer imagem sugestiva de presença de

fibronectina depositada no tecido renal em questão. Dessa forma, essa variante não foi considerada como causativa.

Foram encontradas duas variantes de significado incerto em *TRPC6*. Uma delas, *TRPC6* (NM_004621.6): c.227G>C p.(Gly76Ala), mostrou-se presente na paciente e em seu pai, que no entanto não apresentava proteinúria e apresentava função renal normal e normotensão já na quinta década de vida. A outra variante, *TRPC6* (NM_004621.6): c.1876T>A p.(Ser626Thr), foi encontrada na mãe do paciente afetado, a qual apresentava função renal normal e ausência de proteinúria na idade de 40 anos. Dessa forma, essas duas variantes não foram consideradas causativas. Ambos os pacientes apresentaram padrão corticoresistente, mas evoluíram para remissão completa após introdução de inibidor de calcineurina e se tornaram dependentes de corticosteroide.

A VUS *LMX1B* c.349G>A p.(Gly117Ser) foi encontrada em um paciente com SN associada a hematúria e hipertensão arterial de difícil controle. Seu pai apresentou a mesma variante, mas não hematúria ou proteinúria, e a função renal era normal aos 41 anos de idade. Assim, essa variante também não pode ser considerada causativa. Este paciente evoluiu rapidamente para DRET, iniciando hemodiálise após apresentar síndrome inflamatória multi-sistêmica pós COVID-19, e apresentou recidiva precoce da SN após o transplante renal.

4.9. Análises de mecânica molecular para variantes de significado incerto associadas a herança autossômica recessiva

Realizamos análise de mecânica molecular *in silico* para as VUSs com maior potencial causativo, identificadas em *COQ2*, *PLCE1* e *NPHS1*.

posição 142 (P142). A substituição da prolina por alanina nessa posição pode reduzir criticamente a flexibilidade conformacional dos resíduos iniciais da hélice TM1. O aa fenilalanina de posição 383 (F383), por sua vez, situa-se dentro da entrada da cavidade catalítica, no início da hélice TM9, posição que permite interagir com a porção alifática do substrato, guiando-o para a reação de transprenilação. Sua substituição por leucina leva a aumento do volume da cavidade, o que pode interferir em sua função. Diante desses resultados, é provável que essas variantes impeçam vários contatos na molécula, uma vez que a energia potencial total dessas moléculas é maior do que em sua versão nativa. Essa instabilidade altera a flexibilidade e aumenta o volume do sítio ativo, alterando sua atividade de transprenilação e apoiando fortemente a patogenicidade das variantes COQ2 c.1147T>C p.(Phe383Leu) e c.424C>G p.(Pro142Ala) (figura 10).

O alinhamento da sequência primária de PLCE1 (fosfolipase C ϵ 1) mostrou que o aa glutamina de posição 2088, localizado no domínio RA1, e a leucina de posição 1233, posicionada no domínio EF hand, são altamente conservadas entre as sequências homólogas de PLCE1 não redundantes. O domínio RA1 interage com várias proteínas *scaffold*, ativa GTPases, promove a estabilidade e a atividade basal de PLCE1¹⁴². Já foi demonstrado também através da fluorimetria de varredura que a deleção do domínio RA1 acarreta diminuição da atividade de PLCE1¹⁴².

O domínio RA1 também faz contatos com os domínios EF hand, C2 e Tim Barril. Esse contato é feito através de um resíduo em alça em uma posição equivalente a do aa glutamina de posição 2088 que se encontra mutado. Além disso, a glutamina na posição 2088 faz parte da interface livre de interação de RA1. A exclusão desse aa, por sua vez, força a glutamina na posição 2089 a assumir a posição excluída, encurtando a alça. É esperado, portanto, que a ausência desse resíduo altamente conservado e carregado negativamente perturbe a atividade de PLCE1. Esses achados são consistentes com a patogenicidade da deleção da glutamina na posição 2088. (Figura 11)

A sequência primária do domínio EF hand, por sua vez, apresenta uma estrutura pouco conservada entre as sequências homólogas observadas, fazendo com que a superposição do domínio mutado no modelo de PLCE1 seja

insatisfatoriamente acompanhado por uma grande distancia entre os C-alfa carbonos (8.5 Å). EF hand é um dos motivos proteicos mais abundantes nos seres vivos, apresentando a propriedade de se ligar ao cálcio com alta afinidade e seletividade, conferindo-lhe propriedade modulatória. A variante PLCE1 p.(Leu1233Pro) localiza-se em região altamente conservada do domínio EF hand e encontra-se ausente nas bases de dados genômicas populacionais. Nesse contexto, apesar de não haver informação estrutural suficiente para previsões robustas, sua presença em homozigose favorece sua patogenicidade. (Figura 11)

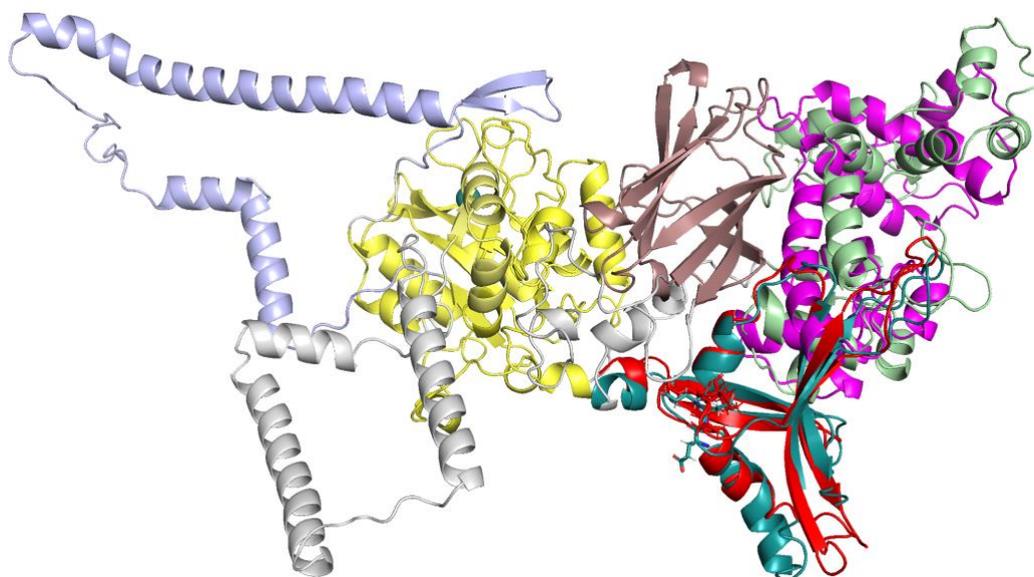


Figura 11. Superposição do modelo de PLCE1 e os dois domínios EF hand (vermelho) e RA1 (maravilha). O modelo selvagem compreende os domínios EF hand (verde claro), domínio Tim barrel (amarelo), ligador X-Y (azul claro), C2 (marron) e RA1 (ciano). O alinhamento estrutural entre os domínios EF hand selvagem e mutante é pobre [*root mean square deviation* (rmsd) =8,5 Å] devido a baixa conservação da sequência primária entre estruturas homólogas. A superposição entre os domínios RA1 selvagem e mutante é boa (rmsd =2.6 Å) devido a alta conservação da sequência de aa entre o domínio RA1 e outras estruturas. A variante com a deleção força a substituição do aa original pelo E20189, encurtando a alça.

A comparação entre os modelos de nefrina selvagem P239 e mutante L239 demonstrou energia total maior nos modelos mutantes, assim como aumento do ângulo entre dois domínios semelhantes a imunoglobulina consecutivos, obtidos pela média de mais de 10.000 modelos simulados de nefrina (Figura 12). Esses achados, contudo, não são suficientes para uma conclusão definitiva sobre a patogenicidade da variante referida.

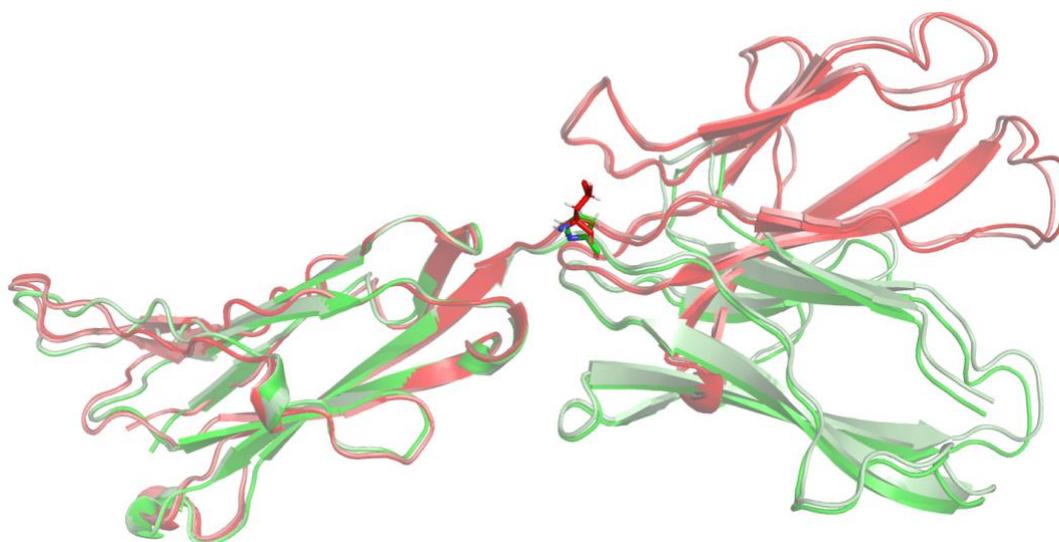


Figura 12. Superposição entre o modelo de NPHS1 selvagem (verde) e o modelo mutado p.(Pro239Leu) (vermelho). O ângulo entre dois domínios semelhantes a imunoglobulina é menor no selvagem que no mutado. A prolina original (verde) e a leucina mutada (vermelho) podem ser observados no centro da imagem. Cada modelo foi obtido a partir da média de 10.000 modelos simulados.

Duas variantes em região de sítio de *splicing*, também consideradas VUSs pelos critérios do ACMG, atingiram alta probabilidade de patogenicidade em predição *in silico*. A variante *PLCE1* c.3582+5G>T atingiu escore ADA de 0,9984 e *Random Forests* (RD) de 0,87, e *NPHS1* c.1930+5G>A escore ADA de 1 e RD

de 0,966. A variante em *PLCE1* foi encontrada em heterozigose composta com a variante *PLCE1* c.6262_6264delGAG p.(Glu2088del), discutida acima.

4.10. Variantes mendelianas causativas identificadas em pacientes da coorte

Com base nas análises recém-descritas, 20 variantes mendelianas foram consideradas causativas, das quais 17 de herança autossômico recessiva (3 em homozigose e 14 em heterozigose composta) duas autossômico dominante, portanto em heterozigose, e uma ligada ao X (hemizigoze). Nos pacientes com variantes mendelianas em homozigose, as mesmas foram encontradas em regiões de ROH, os e coeficientes de cruzamento baseados em ROH revelaram cruzamento de terceiro grau nas regiões genômicas contenedoras de *NPHS1* (NM_004646.4): c.3286+1G>A, e *PLCE1* (NM_016341.4): c.3698 T>C p.(Leu1233Pro), e de primeiro grau na região genômica contenedora de *NPHS2* (NM_014625.4): c.506T>C p.(Leu169Pro) (Tabela 12).

Tabela 12. Inferência de corridas de homozigose (ROH), coeficiente de cruzamento baseado em ROH (FROH), e tamanho de ROH observado nas regiões genômicas específicas observadas para cada gene relacionado a SN.

Paciente	Gene	Herança	Zigose observada	ROH	Tamanho (Mb)	FROH	Grau de parentesco
1	<i>NPHS1</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0161	
2	<i>NPHS1</i>	AR	Homozigose	ROH	14	0,0187	Primos de terceiro grau
3	<i>NPHS1</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0039	
4	<i>NPHS2</i>	AR	Homozigose	ROH	18	0,0703	Primos de primeiro grau
5	<i>NPHS2</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0121	
6	<i>NPHS2</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0132	
7	<i>PLCE1</i>	AR	Homozigose	ROH	8	0,019	Primos de terceiro grau
8	<i>PLCE1</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0118	
9	<i>COQ2</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0052	
10	<i>WT1</i>	AD	Heterozigose	-	0	0,0164	
11	<i>WT1</i>	AD	Heterozigose	ROH	0	0,0724	Primos de primeiro grau
12	<i>CUBN</i>	AR	Heterozigose	-	0	0,0099	
13	<i>COL4A5</i>	Ligada ao X	Hemizigose	-	0	0,0094	

4.11. Perfil clínico dos pacientes com formas mendelianas de síndrome nefrótica

Causas mendelianas foram identificadas em 14 pacientes da coorte (Figura 12), correspondendo a 13,3% das 98 famílias ou 14,6% das com SNCR ou SNCR presumida (Figura 13). Interessantemente, 11% dos pacientes originários de nosso centro apresentaram formas mendelianas da doença, comparando com 21,4% daqueles referidos por outros centros ($p=0,173$). Pacientes com causas mendeliana apresentaram manifestação da SN em idade mais precoce [0,67 (0,3-2,5) versus 2,9 (1,7-5,0), $p=0,001$] e progrediram mais rápido para DRET que pacientes nos quais não foram encontradas causas mendelianas e nem GAR de *APOL1* ($p=0,025$) (Figura 14). Tais pacientes apresentaram também histologia de EMD mais frequentemente, mas não diferiram quanto a raça autodeclarada do grupo sem causas mendelianas em GAR de *APOL1* ($p=0,043$ e $p=0,362$, respectivamente). Não foram observadas recidivas de SN nos 4 pacientes que receberam transplante renal (Tabela 13). Causas mendelianas não foram encontradas em pacientes dependentes de corticosteroides que apresentaram GESF (7/9), ou naqueles que apresentaram SN familiar (2/9), assim como em 36 pacientes que apresentaram remissão completa após introdução de inibidor de calcineurina.

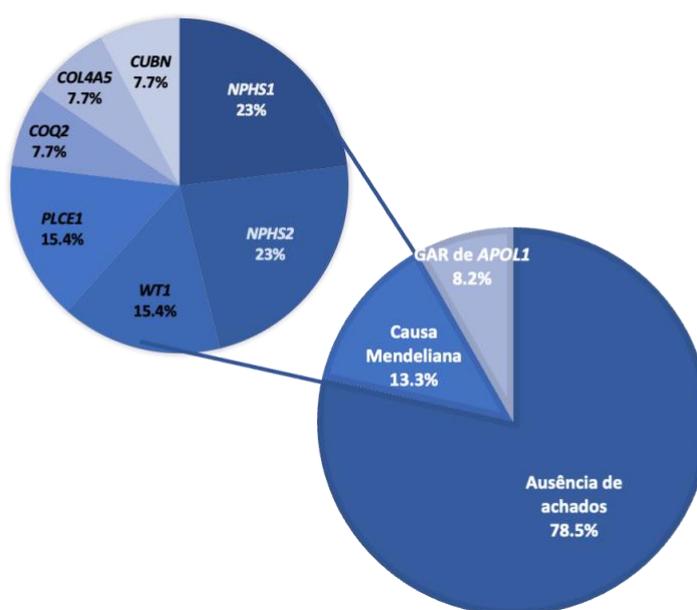


Figura 13. Distribuição das variantes mendelianas e do genótipo de alto risco de *APOL1* entre os pacientes analisados.

Tabela 13. Análise comparativa dos aspectos demográficos, raciais, clínicos, historia familiar e de recidiva da SN após transplante renal entre pacientes com causas mendelianas e aqueles nos quais não foram encontradas causas mendelianas ou GAR de *APOL1*.

	Formas mendelianas n=14/13 (pacientes/famílias)	Formas não-mendeliana/não GAR de <i>APOL1</i> n=79/77 (pacientes/famílias)	p
Idade de manifestação (anos)	0,67 (0,3-2,5)	2,9 (1,7-5,0)	0,001
Historia familiar de SN ou DRET*	5/13 (38,5%)	8/79 (10,1%)	0,017
Raça autodeclarada**			0,362
Branca	10/13 (76,9%)	48 (61,5%)	
Não branca	3/13 (23,1%)	30 (38,5%)	
Histologia renal			
GESF	6/12 (56,2%)	45/75 (60,8%)	
LHM	1/12 (7,7%)	19/75 (25,7%)	
EMD	3/12 (33,3%)	3/75 (8,0%)	0,043
GC	2/12 (16,7%)	5/75 (6,7%)	
Outra	0	3/75 (4,0%)	
DRET	8/14 (46,7%)	29/79 (36,7%)	0,236
Recidiva de SN	0/4	10/21 (47,6%)	0,125

SN: síndrome nefrótica; DRET: doença renal estágio terminal; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; EMD: esclerose mesangial difusa; GC: glomerulopatia colapsante
*1 paciente sem o dado de história familiar

**1 paciente sem o dado de autodeclaração de raça e um paciente de origem Asiática foram excluídos da análise

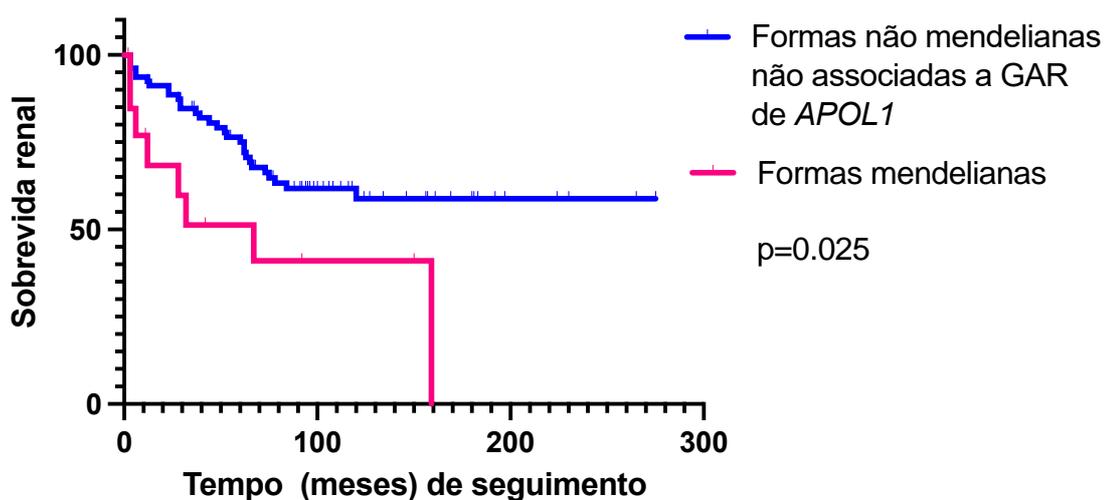


Figura 14. Análise comparativa da sobrevivência renal ao longo do tempo entre pacientes com causas mendelianas e aqueles em que não foram encontradas causas genéticas.

4.12. Descrição dos casos com variantes causativas

Dados de todos os pacientes com variantes causativas encontradas estão na Tabela 14.

Caso1:

Variantes patogênicas em *NPHS1* (NM_004646.3): c.2132G>A p.(Arg711His), c.1137T>A:p.(Ile446Asn); em heterozigose composta. Pai apresenta a variante *NPHS1* (NM_004646.3): c.2132G>A:p.(Arg711His) e a mãe a variante *NPHS1* (NM_004646.3): c.1137T>A:p.(Ile446Asn), ambas em heterozigose.

Menino de raça branca, gestação sem intercorrências, nascido de parto cesárea com idade gestacional de 36 semanas, com peso de 3.150 g e estatura de 49 cm. Edema foi notado com 17 dias de vida e a primeira avaliação foi realizada aos 20 dias, quando já apresentava edema generalizado. Exames séricos demonstravam proteína total de 3,0 g/dL, albumina de 1,5 g/dL, ureia de 12 mg/dL e creatinina de 0,3 mg/dL. As sorologias para Herpes vírus, toxoplasmose e rubéola eram negativas, VDRL não reagente, e CMV demonstrou IgG inconclusivo e IgM negativo. A relação proteína/creatinina em amostra de urina foi 24, tendo sido observadas 50 hemácias por campo. TSH sérico era de 21,32 μ U/mL, tendo sido iniciada levotiroxina, e posteriormente recebeu enalapril. Biópsia renal não foi realizada por falta de capacitação médica em seu local de origem. O paciente não recebeu imunossupressão, e evoluiu para DRET com 17 meses de seguimento. Não há história de SN na família nem de consanguinidade. Após 12 meses em diálise peritoneal, evoluiu para óbito aos 3,3 anos de idade devido a peritonite fúngica.

Tabela 14. Variantes identificadas, respectivos genes, padrão de herança, segregação familiar, critérios ACMG, frequência no gnomAD, classificação de patogenicidade, ancestralidade genética local, referências bibliográficas, idade de manifestação da SN, histologia renal, manifestações extra renais, terapia imunossupressora, tempo para atingir DRET e seguimento clínico.

Gene/Transcrito Herança	Pc	Variante/Zigose	Análise de segregação	Critérios ACMG	gnomAD	Classificação	Ancestralidade genética inferida	Pais ou região aonde a variante foi reportada	Referências bibliográficas	Idade de início de SN	Histologia renal	Manifestações extrarenais	Imunossupressão/resposta	Tempo para DRET	Seguimento
NPFS1 NM_004646.4 AR	1	c.2132G>A p.(Arg711His)/Het c.1137T>A p.(Ile446Asn)/Het	Pai Het Mãe Het	PM2, PM5, PP2, PP3 PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	- 1/0/250.602	PP PP	EUR EUR	Maori/Nova Zelândia Inglaterra/Índia	1 2,3,4	17 d	Não realizada	-	Ausente	17 a	Dialise peritoneal
	2	c.3286+1G>A/Hom	Pai e mãe não disponíveis	PVS1, PM2, PP3	-	P	NAM (ROH) EUR	Nova	Nova	10 d	EMD	-	Ausente	-	-
	3	c.514_516delCCA p.(Thr172del)/Het c.T2728C p.(Ser910Pro)/Het	Mãe Het Pai Het	PP5, PM1, PM2, PM4, PP3 PM2, PP2, PP3, PP5	2/0/251.116 1/0/251.340	P PP	AFR	Holanda, EUA EUA, Espanhan, Afro-americano	5,6,2,3 7,8,9	2 m	GESF	-	Ausente	-	Nefrectomia unilateral
NPFS2 NM_014625.4 AR	4	c.506T>C p.(Leu169Pro)/Hom	Mãe Het (Pai não disponível)	PM2, PP2, PP3, PP4, PP5	4/0/220.918	PP	EUR (ROH)	Itália, Espanha	10,11	10 a	GESF	Hipotireoidismo	Corticoide/ Tacro Proteinuria reduction	5,6 a	Hemodiálise
	5	c.914T>C p.(Leu305Pro)/Het c.686G>A p.(Arg229Gln)/Het	Mãe Het Pai Het	PM1, PM2, PP2, PP3	- 3%	PP	EUR AFR	Grécia/Chipre África, Brasil, Espanha	12,13,14, 15	5,7 a	GESF	-	Corticoide/Ciclosp/ Rituximabe Proteinuria reduction	-	DRC estágio 1 (5.6a)
	6	c.738+1G>C/Het c.928G>A p.(Glu310Lys)/Het	Pai Het Mãe Het	PVS1, PM2, PP3 PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	- -	P PP	AFR EUR	Nova França	Nova 16,17	1,4 a	Não realizada	-	Corticoide/Ciclosp Sem remissão	2,8 a	TR idade 6.9a Sem recidiva
PLCE1 NM_016341.4 AR	7	c.3698 T>C p.(Leu1233Pro)/Hom	Mãe Het Pai Het	PM2, PP3, PP4	-	VSI	NAM (ROH)	Nova	Nova	5 m	CG	-	Nenhum	2 m	TR, idade 4.2 a Sem recidiva
	8/ 9	c.4458+5G>T/Het c.6262_6264delGAG p.(Glu2088del)/Het	Mãe Het Pai Het	PM2, BP4, PP3, PP4 PM2, PM4, PP3	- -	VSI VSI	EUR EUR	Nova Nova	Nova Nova	5 m 5 m	EMD EMD	Prolapso retal Pé torto congênito Prolapso retal	Corticoide/ Sem remissão Corticoide/ Sem remissão	1 m 1 m	TR, idade 3 a Sem recidiva Dialise peritoneal/ hemodiálise
COQ2 NM_001358921.2 AR	10	c.1147T>C p.(Phe383Leu)/Het c.424C>G p.(Pro142Ala)/Het	Mãe Het (Pai não disponível)	PM2, PP3, PP4 PM2, PP3, PP4	- 0/2/225.164	VSI VSI	EUR ou NAM EUR ou NAM	Brasil Nova	18 Nova	10 m	COQ2 GC	-	Corticoide/Ciclosp Sem remissão	10 m	Dialise peritoneal
WT1 NM_024426.6 AD	11	c.1447 +5G>A/Het	Mãe Het*	PS3, PM2, BP4	-	PP	EUR	EUA/Canadá	19	11 m	GESF	Ovários em fita	Corticoide/ Ciclosp/ Micofer Mofetila Sem remissão	13 a	TR, idade 14.8 a Sem recidiva
	12	c.1447 + 4C>T/Het	Provavelmente De novo**	PS3, PM2, BP4	-	PP	EUR	França	20	6,8 a	GESF	Hipospádia	Nenhum	-	DRC estágio 3 (7.6 a)
CUBN NM_001081.4 AR	13	c.7968_7969insTTATA p.(2657fs)/Het c.3672+1G>C/Het	Mãe Het Pai Het	PVS1, PM2, PP3 PVS1, PM2, PP3	- -	P P	EUR EUR	Nova Nova	Nova Nova	5 m	GESF	-	Nenhum	-	DRC estágio 3 (3.5 a)
COL4A5 NM_033380.3 Ligada ao X	14	c.2524delC p.(Pro842fs)/Hemi	Mãe Het*** (Pai não disponível)	PVS1, PM2, PP3	-	P	EUR	Nova	Nova	12 m	LHM	Surdez neurosensorial (11.7 a)	Corticoide/Sem resposta	-	DRC estágio 1 (12.5 a)

Pc: paciente; IS: imunossupressão; DRET: doença renal terminal; AR: autossômico recessivo; AD: autossômico dominante; Het: heterozigoto; Hom: homozigoto; Hemi: hemizigoto; P: patogênico; PP provavelmente patogênico; VSI: variante de significado incerto; EUR: Europeu; NAM: Nativo-Americano; ROH: corridas de homozigose; AFR: Africano; EMD: esclerose mesangial difusa; FSGS: glomeruloesclerose segmentar e focal; GC: glomerulopatia colapsante; Tacro: tacrolimo; Ciclosp: ciclosporina; DRC: doença renal crônica; TR: transplante renal. Ref: referências: 1. Wong, *Pediatr Nephrol.* 2013; 2. Koziell, *Hum Mol Genet.* 2002; 3. Guaragna, *Nephrology (Carlton).* 2016; 4. Machuca, *J Am Soc Nephrol.* 2010; 5. Schoeb, *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 6. Lenkkeri, *Am J Hum Genet.* 1999; 7. Schapiro, *Nephrol Dial Transplant.* 2019; 8. Sabi, *Nephrol Ther.* 2013; 9. Bullich, *Eur J Hum Genet.* 2015; 10. Caridi, *J Am Soc Nephrol.* 2001; 11. Santín, *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 12. Voskarides, *Pediatr Nephrol.* 2008; 13. Rood, *Am J Kidney Dis.* 2019; 14. Mikó, *Hum Mutat.* 2018; 15. Guaragna, *BMC Med Genet.* 2015; 16. Machuca, *J Am Soc Nephrol.* 2010; 17. Tory, *Nat Genet.* 2014; 18. Feltran, *Transplantation.* 2017; 19. Bruening, *Nat Genet.* 1992; 20. Barbaux, *Nat Genet.* 1997.

*Mãe com GESF, ** Ausente na mãe e no pai; ***Mãe com história de SN.

Caso 2

Variante patogênica em *NPHS1* (NM_004646.3): c.3286+1G>A em homozigose. Não foi possível realizar o sequenciamento de Sanger dos pais. A variante encontra-se em região genômica com FROH de 0,0187, compatível com parentesco de terceiro grau.

Menina, apresentou SN aos 10 dias de vida, com marcado edema, proteinúria de 745 mg em 24 horas e albumina sérica de 1,45 g/dL. A avaliação do tecido renal, que contou com 67 glomérulos, constatou matriz e celularidade mesangial difusamente aumentadas, alguns glomérulos com aumento de volume e tamanho, adesões capsulares fibrosas e hipertrofia podocitária, com incremento da matriz mesangial, obliteração e colapso de segmentos de tufo capilares glomerulares, configurando fibrose segmentar. Esses achados foram compatíveis com esclerose mesangial difusa. Aos 2 meses de vida apresentava função renal preservada, havendo perda de seguimento a partir de então.

Caso 3

Variantes patogênicas em *NPHS1* (NM_004646.3): c.514_516delCCA p.(Thr172del) e c.T2728C p.(Ser910Pro), em heterozigose composta. A mãe apresenta a variante *NPHS1* (NM_004646.3): c.514_516delCCA p.(Thr172del) e o pai *NPHS1* (NM_004646.3): c.T2728C p.(Ser910Pro), ambas em heterozigose.

Menina, nasceu com 39 semanas de idade gestacional e peso de 2805 gramas. Evoluiu com anasarca associada a quadro infeccioso aos 2 meses de idade, quando apresentava peso de 4.215 g (escore z de -1.59) e estatura de 53 cm (escore z de -2.38). A investigação demonstrou sorologias negativas para sífilis, HIV, hepatite B, hepatite C, CMV IgG positivo com IgM negativo e toxoplasmose IgG inconclusivo e IgM negativo. Apresentava proteinúria de 61,43 g/g de creatinina em amostra isolada de urina, proteínas totais séricas de 2,54 g/dL, albumina sérica de 1,0 g/dL e intensa hipogamaglobulinemia, com IgG de 36 mg/dL. Além disso, apresentava T4L de 0,57 ng/dL e TSH de 7,72 µU/mL,

demonstrando hipotireoidismo. Devido a proteinúria intensa, iniciou anti-inflamatório não hormonal - ibuprofeno - e inibidor de enzima conversora de angiotensina (iECA), intervenção que não foi capaz de para reduzir suficientemente a proteinúria. Aos 3 meses de idade realizou nefrectomia esquerda, tendo a análise histológica GESF. Recebeu alta hospitalar quando conseguiu ficar estável, recebendo albumina ambulatorialmente três vezes por semana por meio de cateter vascular de longa permanência. Está sendo avaliada para realizar transplante renal aos 2 anos e 6 meses de idade. Tem uma irmã saudável, e outra falecida aos 7 meses de idade em vigência de quadro infeccioso; esta também apresentara diagnóstico de SN, associada a histologia de GESF.

Caso 4

Variante patogênica em *NPHS2* (NM_001297575.1): c.506T>C p.(Leu169Pro) em homozigose. Mãe apresenta a mesma variante em heterozigose e o pai morreu antes de ser possível realizar o sequenciamento, havendo história de consanguinidade.

Paciente do sexo feminino, encaminhada aos 10 anos de idade com diagnóstico de SNCR. Referia prematuridade de 35 semanas e encontrava-se em tratamento para hipotireoidismo desde os 5 anos de idade. Não apresentava edema evidente, exames urinários mostravam proteína/creatinina de 4,72 e 662 mil eritrócitos/mL; e exames séricos revelavam albumina de 2 g/dL, creatinina <0,17 mg/dL, colesterol total de 259 mg/dL, FAN negativo, frações do complemento normais (C3 156mg/dL e C4 35,5mg/dL) e sorologias negativas para HIV, hepatite B e C e EBV, com IgG positiva para CMV. Não respondeu a um curso inicial de prednisona na dose de 60 mg/m² por 8 semanas. Tal conduta foi mantida por 4 semanas adicionais, novamente sem resposta terapêutica. Realizou biópsia renal que mostrou 4/8 glomérulos escleróticos, hiperplasia mesangial focal, sinéquias em até 25% dos glomérulos, expansão segmentar da matriz em 2 glomérulos e fibrose intersticial de 5%. Foi observada deposição de IgM 1+/3+ à imunofluorescência e estabelecido o diagnóstico histológico de GESF. Foi então iniciado tacrolimo com nível sérico

alvo de 4–7 ng/mL, observando-se resposta parcial. Após 31 meses de seguimento, a paciente apresenta albumina sérica de 3 g/dL, creatinina sérica de 0,5 mg/dL, proteína/creatinina urinária de 1,2 e sedimento urinário com 120.000 eritrócitos/mL, em uso de tacrolimo, levotiroxina, atorvastatina, anlodipino, carvedilol e vitamina D. Houve progressão da DRC, atingindo DRET aos 15,6 anos de idade, após 5,6 anos da manifestação da SN.

Caso 5

Variantes patogênicas em *NPHS2* (NM_001297575.1): c.914T>C p.(Leu305Pro) e c.686G>A p.(Arg229Glu) em heterozigose composta. Mãe apresenta a variante *NPHS2* (NM_001297575.1): c.914T>C p.(Leu305Pro) e o pai a variante *NPHS2* (NM_001297575.1): c.686G>A p.(Arg229Glu), ambas em heterozigose.

Menina, manifestou a SN com 5,7 anos de idade. Nasceu a termo, com peso de 3.160 g gramas. Inicialmente apresentou proteinúria de 1715 g (67mg/kg/dia) em 24 horas e albuminemia de 2,5 g/dL, com creatinina sérica de 0,48 mg/dL. Demonstrou comportamento resistente a corticosteroide, e a histologia renal foi compatível com GESF. Apresentou redução de proteinúria após introdução de ciclosporina, com aumento de albumina sérica até 3,2 g/dL e a razão proteína/creatinina mais baixa de 0,61 g/g em amostra isolada de urina. Foi tentado rituximabe, momento em que foi suspensa a ciclosporina, havendo piora do quadro. Na última avaliação, estava recebendo tacrolimo e micofenonato mofetila, mantendo estabilidade de função renal (creatinina 0,6 mg/dL) aos 11,3 anos de idade.

Caso 6

Variantes patogênicas em *NPHS2* (NM_001297575.1): c.738+1G>C e c.928G>A p.(Glu310Lys) em heterozigose composta. Pai apresenta a variante *NPHS2* (NM_001297575.1): c.738+1G>C e a mãe a variante *NPHS2* (NM_001297575.1): c.928G>A p.(Glu310Lys), ambas em heterozigose.

Menina, manifestou a SN com 1,4 anos de idade, momento em que apresentava creatinina sérica de 0,14 mg/dL e proteína/creatinina de 13,9 g/g em amostra

isolada de urina. Apresentou comportamento córtico-resistente, e também não teve resposta à ciclosporina. Não realizou biópsia renal. Evoluiu para DRET após 2,8 anos de seguimento, recebendo transplante renal. Não apresentou recidiva da SN em um tempo de avaliação de 12 meses.

Caso 7

Variante patogênica em *PLCE1* (NM_016341.3): c.3698 T>C p.Leu1233Pro em homozigose. Pai e mãe mostraram-se heterozigotos para essa variante.

Segundo filho do sexo masculino de pais não sabidamente consanguíneos. O quadro de edema se iniciou aos 5 meses de idade e foi progressivo. Aos 7 meses foi internado por anasarca e hipertensão arterial sistêmica, sem evidência de quadro infeccioso. Nessa ocasião seu peso era de 10,2 kg (edemaciado) e estatura de 70,5 cm (p55,9%). Os exames iniciais demonstravam ureia sérica de 24 mg/dL; creatinina 0,63 mg/dL; colesterol total 246 mg/dL; proteínas totais 3,2 g/dL; albumina 1,4 g/dL; IgG 58 mg/dL. Urina: densidade 1008, pH 6, proteinúria ++, leucócitos 19.000/mL, hemácias 5000/mL. Suas sorologias incluíam CMV IgG positivo, IgM negativo; VDRL negativo; hepatite C negativo; anti-Hbc total negativo; AgHBs negativo; toxoplasmose IgG e IgM negativos. FAN era negativo, C3 78 mg/dL (90-180) e C4 13 mg/dL (10-40). Após 10 dias de internação evoluiu com piora de função renal e anasarca refratária, sendo iniciada diálise peritoneal (DP). A biópsia renal mostrou glomérulos com acentuada hiperplasia e hipertrofia podocitária ao redor de alças capilares colapsadas. A matriz mesangial encontrava-se expandida de forma segmentar e focal, formando sinéquias, e o interstício estava dissociado por edema focal. Os túbulos estavam cisticamente dilatados. O conjunto dos achados foi consistente com glomerulopatia colapsante. O paciente evoluiu para DRET, permanecendo em DP crônica. O paciente recebeu transplante renal com 4 anos e 3 meses, não tendo apresentado recidiva da SN em 18 meses de seguimento. Apresentou doença linfoproliferativa pós-transplante exclusivamente no enxerto renal, não sendo esse fenômeno relatado no receptor do rim contralateral do mesmo doador. Interessantemente, o avô materno foi um filho adotivo e era proveniente de Poço Redondo, BA, mesma cidade da família do avô paterno. A avaliação de FROH

da região genômica de *PLCE1*, conforme descrita anteriormente, foi compatível com a probabilidade de serem primos de terceiro grau.

Casos 8 e 9

Variantes patogênicas em *PLCE1* (NM_016341.3): c.4458+5G>T e c.6262_6264delGAG p.(Glu2088del) em heterozigose composta. Mãe apresenta a variante *PLCE1* (NM_016341.3): c.4458+5G>T e o pai a variante c.6262_6264delGAG p.(Glu2088del), ambas em heterozigose.

Filhos de pais não consanguíneos, os irmãos gemelares manifestaram a SN aos 5 meses de idade. Já haviam perdido um irmão aos 2 anos de vida, que também desenvolvera SN.

Gemelar 1: Aos 5 meses de idade apresentou proteína/creatinina de 64,1 g/g em amostra isolada de urina, e em exames séricos albumina de 1,7 g/dL, creatinina de 0,3 mg/dL, IgG de 16 mg/dL, sorologias para hepatite B, C e HIV negativas, CMV IgG e IgM negativas. Recebeu prednisona, evoluindo em um mês, para DRET, quando realizou nefrectomia esquerda e iniciou DP. A histologia renal foi compatível com esclerose mesangial difusa. Permaneceu em diálise peritoneal até 1 ano e 4 meses, quando foi transferido para hemodiálise devido a prolapso retal intermitente. Evoluiu a óbito devido a complicações relacionadas a instalação de catéter de hemodiálise com 1 ano e 9 meses de idade.

Gemelar 2: Aos 5 meses de idade apresentou proteinúria/creatinina acima de 100 g/g em amostra isolada de urina e seus exames séricos demonstravam albumina de 1,3 g/dL, creatinina 0,53 mg/dL e IgG indetectável ao método. As sorologias foram negativas para hepatite B e C, assim como para HIV, e apresentou IgG e IgM negativos para CMV e EBV. Também recebeu prednisona, porém em um mês iniciou DP crônica, quando realizou nefrectomia a esquerda. A histologia renal também foi compatível com esclerose mesangial difusa. Sempre mais grave que o gemelar 1, apresentava pés tortos congênitos e também prolapso retal intermitente. Assim, foi transferido para hemodiálise crônica. Recebeu transplante renal aos 3 anos e 1 mês de idade, cujo doador foi

seu pai, então com 39 anos de idade. Não apresentou recidiva até a última avaliação, realizada após 36 meses do transplante renal.

Caso 10

Variantes patogênicas em *COQ2* (NM_015697.7): c.1147T>C p.(Phe383Leu), c.424C>G p.(Pro142Ala) em provável heterozigose composta. A mãe apresenta a variante *COQ2* (NM_015697.7): c.1147T>C:p:Phe383Leu em heterozigose, e o pai não se submeteu à genotipagem.

Paciente do sexo masculino de pais não consanguíneos, iniciou as manifestações de SN aos 10 meses de idade apresentando oligúria, ganho de 15,7% do peso referido de 8,9 kg (p42.1%) e PA de 80/60 mmHg (p37%/p98%). Os exames iniciais mostravam albumina sérica de 1,2 g/dL, creatinina de 0,2 mg/dL, C3 e C4 normais, proteína/creatinina urinária de 46,7 g/g e urina I com 10 hemácias/campo. As sorologias foram negativas para hepatite A, B, C, CMV, EBV, Toxoplasmose, Herpes I e II, HIV e sífilis, com IgG positiva para CMV. A biópsia renal revelou glomérulos aumentados, hipertrofia e hiperplasia de podócitos, ausência de crescentes, aumento de matriz mesangial, obliteração e colapso de segmentos capilares, fibrose túbulointersticial discreta e túbulos dilatados. A imunofluorescência foi negativa para IgA, IgG, IgM, C3, C1q, kappa, lambda e fibrinogênio. A microscopia eletrônica demonstrou intensa hiperplasia mitocondrial, achado consistente com GC. Não foi observada resposta a corticosteroide, ciclosporina e reposição de coenzima Q10, esta introduzida aos 1,2 anos de idade. Evoluiu com DRET, iniciando DP aos 1,8 anos. Apresentou parada cárdio-respiratória rapidamente revertida ao implante do catéter de DP, tendo evoluído com sequelas neurológicas importantes.

Caso 11

Variante patogênica em *WT1* (NM_024426.2): c.1447 +5G>A em heterozigose. Mãe apresenta a mesma variante em heterozigose.

Menina, nascida com idade gestacional de 30 semanas, com peso de 1450 g e 40 cm devido a pré-eclampsia materna. Aos 11 meses apresentou proteinúria identificada em exame de urina devido a suspeita de infecção de trato urinário. Com 1 ano e 9 meses não apresentava edema clínico, e exames laboratoriais demonstravam albumina sérica de 2,3 g/dL, creatinina de 0,3 mg/d, colesterol

total de 237 mg/dL e triglicérides de 334 mg/dL. Suas sorologias eram negativas para hepatite B, hepatite C, HIV, rubéola e toxoplasmose, apresentando IgG positivo e IgM negativo para EBV e CMV. A razão proteína/creatinina em amostra de urina era 16,3 g/g, com 2.300 hemácias/mL. Apresentou comportamento córtico-resistente, sem redução de proteinúria em resposta a ciclosporina e, posteriormente, a micofenolato mofetila.

Biópsia renal realizada aos 2 anos de idade revelou 16 glomérulos com forma, volume e celularidade preservadas, espaço e cápsula de Bowmann preservados, assim como a MBG. Os túbulos se mostravam atróficos focalmente, com espessamento e enrugamento da MBG. Análise por imunofluorescência mostrou depósito de C3 ++. O diagnóstico histopatológico através de microscopia de luz e imunofluorescência foi de expansão segmentar ou global de matriz mesangial, padrão focal, sugestivo de esclerose mesangial difusa. A microscopia eletrônica mostrou glomérulos com aumento global da matriz mesangial, irregularidades de MBG, compressão de lúmens capilares, células mesangiais e podócitos hiperplásicos encerrando vacúolos lipídicos citoplasmáticos, podócitos tumefeitos e hiperplásicos com fusão difusa de pedicelos, e alteração viliforme do citoplasma, além de células endoteliais tumefeitas. Após discussão e revisão, o diagnóstico foi firmado como GESF.

Aos 12 anos de idade, a paciente não apresentou sinais de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, e exame ultrassonográfico revelou ovários em fita. Avaliação de cariótipo mostrou cromossomos sexuais XY. Foi então feito o diagnóstico clínico de Síndrome de Frasier. Evoluiu para DRET aos 13 anos. Realizou transplante renal após 5 meses de tratamento de hemodiálise, não tendo apresentado recidiva da doença após 24 meses de seguimento.

A mãe que também albergava a variante *WT1*: c.1447 +5G>A em heterozigose, apresentou pré-eclâmpsia durante a sua única gestação. Logo após o nascimento da paciente, manteve hipertensão arterial sistêmica e evoluiu com proteinúria, tendo sido feito estabelecido o diagnóstico histológico de GESF. Coursou com piora progressiva da função renal, sem remissão da proteinúria em resposta a ciclosporina. Evoluiu para DRET terminal, encontrando-se atualmente em hemodiálise.

Caso 12

Variante patogênica em *WT1* (NM_024426.2): c.1447 + 4C>T em heterozigose. Ambos os genitores não apresentam a variante.

Paciente apresentou genitália ambígua, com hipospádia e criptorquidia, realizando cirurgias corretivas pela Divisão de Urologia e sendo acompanhado pela Divisão de Endocrinologia para investigação de Distúrbios de Diferenciação Sexual, quando foi avaliado geneticamente por o painel genético e encontrada a variante em *WT1* previamente descrita em pacientes com Síndrome de Frasier. Foi detectada proteinúria em níveis nefróticos quando este apresentava 6,8 anos de idade. Em sua primeira avaliação no Serviço de Nefrologia Pediátrica, já com 9 anos de idade, apresentava proteína/creatinina de 4,6 g/g em amostra isolada de urina, albumina sérica de 3,4 g/dL, e creatinina de 0,87 mg/dL (TFG estimada de 65 ml/min/1,73m²) e sorologias negativas para hepatite B, C e HIV. Realizou biopsia renal, que foi compatível com GESF, e não recebeu terapia imunossupressora. Após 7,6 anos da manifestação da proteinúria, apresenta DRC estágio 3, recebendo iECA.

Caso 13

Variantes patogênicas em *CUBN* (NM_001081.4): c.7968_7969insTTATA p.(2657fs) e c.3672+1G>C em heterozigose composta. A mãe apresenta a variante *CUBN* (NM_001081.4): c.7968_7969insTTATA p.(2657fs) e o pai a variante c.3672+1G>C, ambas em heterozigose.

Aos 5 meses de idade, o paciente apresentou hematúria macroscópica, proteinúria de 2,58 g/g de creatinina em amostra isolada de urina, redução sérica das frações C3 e C4 do complemento, e sorologias para hepatite B, C e HIV negativas, e CMV e EBV IgG positivo e IgM negativo. A análise da biopsia renal estabeleceu o diagnóstico histológico de GESF. O paciente não recebeu imunossupressão, o edema se resolveu espontaneamente e a relação da proteína/creatinina em amostra de urina isolada se reduziu para um nível fixo de 1,2 g/g, mantendo função renal normal para idade, que se mantém estável por 3,5 anos.

Caso 14

Variante patogênica em *COL4A5* (NM_033380.3): c.2524delC p.(Pro842fs) em hemizigose. A mãe apresenta a mesma variante em heterozigose. O pai não foi avaliado.

O paciente apresentou 186.000 hemáceas/ml e proteinúria (3 cruzeiros) em exame de urina 1 com 1 ano de idade. Apresentava albuminemia de 3,3 g/dL e creatinina sérica de 0,22 mg/dL. Recebeu prednisona, porém não atingiu remissão. Sua mãe apresentava história de SN. Realizou biópsia renal aos 7,8 anos de idade, que foi compatível com LHM, porém não foi realizada microscopia eletrônica. Aos 11,7 anos de idade a audiometria demonstra moderada perda neurossensorial, compatível com a Síndrome de Alport.

4.13. Ancestralidade local das variantes mendelianas identificadas

Ao analisar a ancestralidade local das regiões onde as variantes mendelianas identificadas se encontravam nos genomas dos pacientes, encontramos 13 variantes de ancestralidade europeia (65%), três de africana (15%) e dois de nativo-americana (Tabela 15). Não foi possível determinar a ancestralidade local de duas variantes. Vale destacar que entre as nove variantes novas (não previamente publicadas), oito são ausentes e uma foi encontrada em frequência muito baixa na base de dados gnomAD (Tabela 14). Das novas variantes, cinco encontram-se em regiões genômicas de ancestralidade europeia (55%), um de africana (11%), dois de nativo-americana (22%) e para uma não foi possível determinar a ancestralidade.

Tabela 15. Ancestralidade das variantes identificadas. Em preto, as variantes previamente descritas, e em vermelho as variantes novas.

Gene	Europeia	Africana	Nativo-americana	Não foi possível determinar
<i>NPHS1</i> (NM_004646.4)	c.2132G>A p.(Arg711His) c.1137T>A p.(Ile446Asn) c.514_516delCCA p.(Thr172del)	c.T2728T>C p.(Ser910Pro)	c.3286+1G>A	
<i>NPHS2</i> (NM_014625.4)	c.506T>C p.(Leu169Pro) c.914T>C p.(Leu305Pro) c.928G>A p.(Glu310Lys)	c.738+1G>C c.686G>A p.(Arg229Glu)		
<i>PLCE1</i> (NM_016341.4)	c.4458+5G>T c.6262_6264delGAG p.(2088_2088del)		c.3698 T>C p.(Leu1233Pro)	
<i>WT1</i> (NM_024426.6)	c.1447 +5G>A c.1447 + 4C>T			
<i>CUBN</i> (NM_001081.4)	c.7968_7969insTTATA p.(2657fs) c.3672+1G>C			
<i>COL4A5</i> (NM_033380.3)	c.2524delC p.(Pro842fs)			
<i>COQ2</i> (NM_001358921.2)				c.1147T>C p.(Phe383Leu) c.424C>G p.(Pro142Ala)

4.14. Análise comparativa dos perfis demográficos e clínicos entre pacientes com causas mendelianas, com GAR de *APOL1* e sem achados genéticos identificados relacionados a SN

Pacientes com causas Mendelianas manifestaram a SN em idades mais precoces, apresentaram história familiar de SN ou DRET mais frequentemente, e histologia renal de EMD mais prevalente que nos outros de pacientes com GAR de *APOL1* e sem achados genéticos identificados a SN (Tabela 16). Os pacientes com GAR de *APOL1*, por sua vez, manifestaram mais tardiamente a SN, apresentaram predominantemente histologia de GC e evoluíram mais frequentemente para DRET (Tabela 16), Vale notar que pacientes com causas Mendelianas e aqueles com GAR de *APOL1* atingiram mais rapidamente DRET que pacientes sem achados genéticos identificados relacionados a SN (Figura 15). Entretanto, não apresentaram recidiva da SN após o transplante renal, o que ocorreu em 47,6% dos casos sem achados genéticos identificados relacionados a SN.

Tabela 16. Análise comparativa dos aspectos demográficos, de raça autodeclarada, clínicos, história familiar, evolução para DRET e recidiva pós-transplante renal entre pacientes com causas mendelianas, GAR de *APOL1* e sem achados genéticos associados a SN.

	Mendeliana n=14/101 (13,9%)	GAR de <i>APOL1</i> n=8/101 (7,9%)	Não mendeliana/não GAR de <i>APOL1</i> n=79/101 (78,2%)	p
Idade de manifestação (anos)	0,67 (0,35-2,48)	10,99 (10,00-14,52)	2,9 (1,7-5,00)	<0,001
DRET	8 (57,1%)	7 (87,5%)	29 (36,7%)	0,012
História familiar de SN ou DRET	5 (38,5%)	1 (12,5%)	8 (10,1%)	0,024
Raça autodeclarada				
Branca	10 (76,9%)	3 (37,5%)	48 (61,5%)	0,196
Não branca	3 (23,1%)	5 (62,5%)	30 (38,5%)	
Histologia				
GESF	6 (50%)	3 (37,5%)	45 (60,0%)	<0,001
LHM	1 (8,3%)	-	19 (25,3%)	
EMD	3 (25%)	-	3 (4,0%)	
GC	2 (16,7%)	5 (62,5%)	5 (6,7%)	
Outra	-	-	3 (4,0%)	
Recidiva de SN	0/4	0/4	10/21 (47,6%)	0,055

SN: síndrome nefrótica; DRET: doença renal estágio terminal; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; EMD: esclerose mesangial difusa; GC: glomerulopatia colapsante
*1 paciente sem dado de história familiar**1 paciente sem autodeclaração de raça e um paciente de origem leste-asiática foram excluídos da análise.

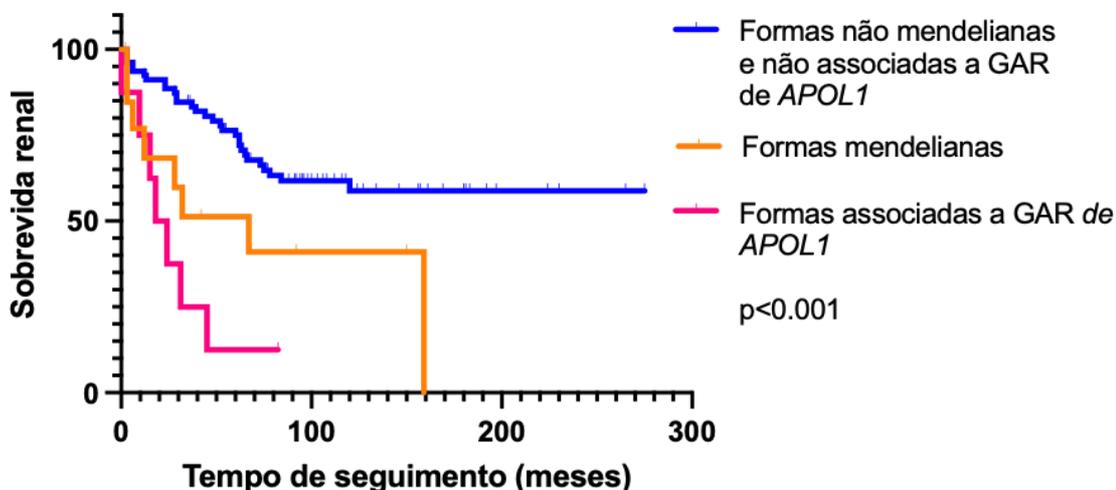


Figura 15. Análise comparativa de sobrevivida renal ao longo do tempo entre pacientes com causas mendelianas, com GAR de *APOL1* e sem achados genéticos identificados associados a SN.

4.15. Efeitos da idade de manifestação da síndrome nefrótica sobre a evolução clínica e associação com o perfil genético dos pacientes

Ao avaliar as características clínicas, demográficas, histológicas, genéticas e evolutivas da população de pacientes avaliada, pudemos distinguir três grupos etários aparentemente com características próprias (Tabela 17). Pacientes que manifestaram SN antes de 1 ano de vida se autodeclararam brancos com maior frequência, apresentaram EMD como histologia renal mais frequente e concentraram as causas mendelianas encontradas. Por outro lado, aqueles que manifestaram SN com 9 anos ou mais apresentaram apenas GESF e GC como formas histológicas renais e concentraram todos os casos associados a GAR de *APOL1*. Além disso, todos os casos cuja histologia renal foi LHM manifestaram SN entre 1 e 8,9 anos de idade. Pacientes nessa faixa etária evoluíram menos frequentemente para DRET quando comparados àqueles que manifestaram SN antes de 1 ano ou após 9 anos de idade. Evolução para DRET ocorreu mais rapidamente em pacientes que manifestaram SN após 1 ano de idade, seguidos por aqueles que manifestaram a doença com 9 anos ou mais (Figura 16).

Tabela 17. Análise comparativa dos aspectos clínicos, histológicos, e evolutivos entre as idades de manifestação da SN menor que 1 ano, entre 1 ano e 8,9 anos e maior ou igual a 9 anos.

	<1 ano n=14	1 – 8,9 anos n=69	≥9 anos n=18	p
Sexo				
Masculino	10 (71,4%)	43 (62,3%)	8 (44,4%)	0,255
Feminino	4 (28,6%)	26 (37,7%)	10 (55,6%)	
Raça autodeclarada				
Branca	12 (92,3%)	42 (61,8%)	7 (38,9%)	0,011
Não branca	5 (7,7%)	23 (38,2%)	10 (61,1%)	
Histologia renal				
GESF	4 (30,8%)	39 (60,9%)	11 (61,1%)	<0,001
LHM	0	20 (31,3%)	0	
EMD	6 (46,2%)	0	0	
GC	3 (23,1%)	2 (3,1%)	7 (38,9%)	
Outra	0	3 (4,7%)	0	
Mendeliana	9 (64,3%)	4 (28,6%)	1 (7,1%)	<0,001
GAR de <i>APOL1</i>	0	0	8 (44,4%)	<0,001
DRET	9 (69,2%)	19 (27,5%)	16 (88,9%)	<0,001

SN: síndrome nefrótica; DRET: doença renal terminal; GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; LHM: lesões histológicas mínimas; EMD: esclerose mesangial difusa; GC: glomerulopatia colapsante

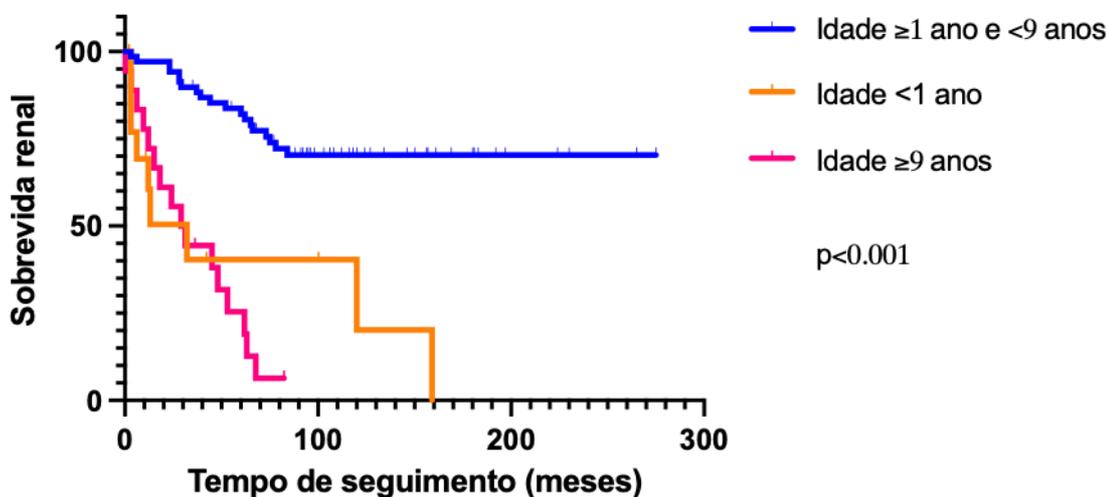


Figura 16: Análise comparativa de sobrevivência renal ao longo do tempo entre pacientes com idade de manifestação de SN < 1 ano, entre 1 e 9 anos e com 9 anos ou mais.

4.16. Fatores de risco de progressão para doença renal estágio terminal identificados na coorte analisada

Os resultados anteriores mostraram que pacientes com causas mendelianas, pacientes com GAR de *APOL1*, pacientes com manifestação de SN antes de 1 ano de idade ou aos/após 9 anos de idade e pacientes autodeclarados não brancos evoluíram mais rapidamente para DRET. Também verificamos que nenhum paciente com histologia renal LHM atingiu DRET no período do estudo. Nesta altura procedemos à realização de análise de regressão logística de Cox a fim de avaliar e quantificar a associação de variáveis selecionadas com o risco de atingir DRET no tempo de seguimento analisado. Esta análise revelou que idade de manifestação de SN antes de 1 ano de idade ou com 9 anos ou mais, raça autodeclarada não branca e histologia que não LHM apresentaram risco aumentado de progressão para DRET, enquanto não foi observado aumento de risco significativo para pacientes com GAR de *APOL1* ou com causas mendelianas (Tabela 18). Além, disso, quartis com maior porcentagem de ancestralidade não europeia se a associaram a riscos crescentes de se atingir DRET (Tabela 19).

Tabela 18. Avaliação de risco de progressão para doença renal estágio terminal por meio de análise por regressão de Cox incluindo idade de manifestação da SN, raça autodeclarada, presença de causa mendeliana, presença de GAR de *APOL1* e outras histologias que não LHM.

	OR	IC	p
Idade de manifestação de SN < 1 ano	5,99	2,15-15,64	<0,001
Idade de manifestação de SN ≥ 9 anos	3,52	1,42-8,40	0,008
Autodeclarado não Branco	2,73	1,31-5,82	0,007
Causa mendeliana	1,02	0,37-2,54	0,96
Genótipo de alto risco (GAR) de <i>APOL1</i>	1,76	0,63-4,86	0,28
Outras histologias que não LHM	10,97	2,97-325,75	0,002

Tabela 19. Avaliação de risco de progressão para doença renal estágio terminal por meio de análise por regressão de Cox incluindo idade de manifestação da SN, ancestralidade genética não europeia, presença de causa mendeliana, presença de GAR de *APOL1* e outras histologias que não LHM.

	OR	IC	p
Idade de manifestação de SN < 1 ano	4,35	1,59-10,92	0,005
Idade de manifestação de SN ≥ 9 anos	4,44	1,85-10,28	0,001
Ancestralidade não Europeia	1,40	1,01-1,97	0,045
Causa mendeliana	1,30	0,45-3,46	0,61
Genótipo de alto risco (GAR) de <i>APOL1</i>	1,36	0,50-3,65	0,52
Outras histologias que não LHM	12,74	2,08-582,99	0,002

A fim de contemplar os 99 pacientes na análise, excluídos apenas o paciente sem autodeclaração de raça e o paciente com ancestralidade leste-asiática, e visto que 6 pacientes não foram submetidos a biópsia renal, realizamos análise por regressão logística de Cox excluindo histologia. O risco aumentado de atingir DRET em pacientes autodeclarados não brancos se manteve, porém com um peso menor (Tabela 20), mas não a ancestralidade não europeia (Tabela 21).

Tabela 20. Avaliação de risco de progressão para doença renal estágio terminal por meio de análise por regressão de Cox incluindo idade de manifestação da SN, autodeclarados não brancos, presença de causa mendeliana e presença de GAR de *APOL1*.

	OR	IC	p
Idade de manifestação de SN < 1 ano	9,35	3,40-24,31	<0,001
Idade de manifestação de SN ≥ 9 anos	5,21	2,14-12,18	<0,001
Autodeclarados não brancos	2,81	1,37-5,95	0,049
Causa mendeliana	1,17	0,47-2,69	0,73
Genótipo de alto risco (GAR) de <i>APOL1</i>	1,9	0,67-5,27	0,73

5. DISCUSSÃO

Causas mendelianas, susceptibilidade genética, alterações da homeostase imunológica, assim como fator(s) de permeabilidade circulante(s), têm sido implicados em alterações estruturais do diafragma em fenda e/ou da membrana basal glomerular que culminam em dano podocitário, evento central na patogênese da SN^{16,17,48,55,87}. A descoberta de variantes genéticas causadoras de SN nas últimas décadas auferiu, de fato, importantes contribuições para a compreensão e elucidação de mecanismos moleculares e celulares envolvidos na SN⁸⁷. Tais variantes têm sido detectadas em populações com alto nível de consanguinidade, assim como em populações de ancestralidade predominantemente caucasiana^{92,101}. Indivíduos do hemisfério sul, assim como os de populações multirraciais e altamente miscigenadas, estão pouco representados nesses estudos, em grande parte por pertencerem a países de menor grau de desenvolvimento social e econômico^{11,91,92}. Esse panorama nos levou a estudar e caracterizar o perfil genético de uma população pediátrica de pacientes com síndrome nefrótica resistente a corticosteroide ou de manifestação congênita, assim como de pacientes que apresentaram GESF à histologia renal. Nesse estudo procuramos identificar e analisar suas particularidades relacionadas a variantes mendelianas, o papel de GAR de *APOL1* e suas características clínicas, demográficas e de ancestralidade genética, assim como a ancestralidade local das variantes mendelianas detectadas. Também utilizamos análise *in silico* de mecânica molecular, de modo a ampliar e fortalecer a avaliação de patogenicidade das VUSs identificadas.

As frequências de causas mendelianas apresentam grande variação entre as coortes de SN pediátrica ao redor do mundo, estando relacionadas a diferenças na taxa de consanguinidade parental e de casos familiares, na faixa etária de manifestação da SN, na origem geográfica do paciente e/ou no método de avaliação genética molecular, assim como nos critérios empregados para avaliação de patogenicidade das variantes encontradas^{91,92,95,96,97,98,99,101,102,103,104}.

A frequência de causas mendelianas de 13,3% detectada em nossa população pediátrica é menor que as da maioria das encontradas em outras coortes. Estudos em coortes multicêntricas identificaram frequências de causas mendelianas entre 23,6% e 30%^{91,92,96,101,102,104}, exceto o de um centro coreano que reportou uma frequência mais elevada de 43,6%¹⁰³. Um estudo brasileiro que incluiu casos de SNCR encaminhados de diferentes centros para a realização de transplante renal, por sua vez, identificou causas monogênicas em 8,4% de 96 pacientes avaliados geneticamente, entre os quais nenhum apresentara SNC⁹⁸. Entre 72 pacientes pediátricos com SNCR prevalentes em um único centro norte-americano, 11,1% apresentavam causas monogênicas, à semelhança da taxa de 11% identificada nos casos prevalentes em nosso ambulatório do ICr-HCFMUSP. Faz-se importante notar que uma análise de subgrupo de dois centros norte-americanos, que fizeram parte do maior estudo multicêntrico pediátrico de SNCR até o momento, observou frequência de causas mendelianas em cerca de 14% dos casos, enquanto tal frequência atingiu 45% em países com alta consanguinidade parental⁹². No mesmo sentido, uma outra avaliação de coorte multicêntrica mostrou que, independentemente da origem geográfica dos pacientes, os com consanguinidade parental apresentaram frequência de causas mendelianas de SN de 38%, comparada a 13% naqueles em que a consanguinidade parental foi ausente¹⁰¹. Outro fator determinante na frequência de causas mendelianas encontradas é a idade de manifestação da SN. De fato, tal frequência de SN é maior entre pacientes com manifestação de SN antes de 1 ano de vida, atingindo 97% nos casos que se manifestam antes de 3 meses de idade^{90,91,92}. Em nossa casuística, a baixa frequência de pacientes com manifestação de SN antes de 1 ano de idade, assim como a ausência de avaliação de variação de número de cópias na análise genética, pode ter contribuído para a baixa frequência de causas mendelianas identificada em nossa população. Por outro lado, a maior taxa de formas mendelianas observada no grupo de pacientes encaminhados de centros externos (21,4%) comparada à de nosso centro reflete possivelmente um viés de seleção de encaminhamento por parte dos serviços externos.

A SNC é caracterizada por proteinúria maciça e edema grave iniciados antes dos três meses de vida. Quando não causada por infecções congênitas, variantes

patogênicas são identificadas em uma frequência bastante elevada em genes que codificam proteínas que participam da barreira de filtração glomerular¹⁵⁵. Variantes em *NPHS1* constituem a causa genética mais frequente de SNC^{91,92,96}, tendo sido responsáveis por todos os nossos casos de SNC nos quais identificamos variantes causativas mendelianas^{90,91}. Pacientes de ascendência finlandesa apresentam em sua maioria duas variantes: 1) c.121_122delCT p.(Leu41Fs), uma deleção de 2 pares de bases (pb) que resulta em mudança do quadro de leitura e consequente códon de parada no éxon 2, com geração de uma proteína de apenas 90 aa¹⁵⁶; e 2) c.3325C>T p.(Arg1109Term), variante *nonsense*, mais comum, que gera um produto proteico de 1109 aa. Esse truncamento remove parte o domínio intracelular da nefrina¹⁵⁶. Uma série de outras variantes de *NPHS1*, localizadas ao longo de seus 29 éxons, têm sido associadas à SN, determinando cursos clínicos variados^{157,158}. No nosso primeiro caso identificamos duas variantes *missense* descritas anteriormente como patogênicas, sendo uma delas a variante *NPHS1*: c.2132C>A p.(Arg711Ser). Interessantemente essa variante apresenta efeito fundador em população de etnia Maori¹⁵⁹, tendo sido relacionada a fenótipos mais leves de SN, refletidos em sobrevida renal de até 37 anos quando em homozigose. Tal observação sugere que a outra variante identificada no paciente, c.1137T>A p.(Ile446Asn), a qual já foi descrita em um paciente brasileiro com SNC¹⁶⁰, determine um efeito deletério significativo. Nosso segundo caso apresenta a variante patogênica em *NPHS1* c.3286+1G>A em sítio de *splicing* em homozigose, variante não descrita previamente. De modo interessante, tal variante se encontra em região genômica de ancestralidade nativo-americana, pouco representada em estudos anteriores. As variantes *NPHS1*: c.514_516delCCA p.(Thr172del) e c.2728T>C p.(Ser910Pro), por sua vez, encontradas no terceiro caso, já haviam sido descritas previamente em população caucasiana¹⁶¹. Neste caso, a identificação da causa mendeliana logo após a manifestação da SN nos auxiliou no manejo clínico da paciente, sempre desafiador na SNC¹⁶². Tal manejo frequentemente inclui suplementação de albumina endovenosa e uso de diuréticos, e utilização de anti-inflamatórios não hormonais e de inibidores do eixo renina-angiotensina-aldosterona, além das possibilidades de nefrectomia unilateral ou bilateral, diálise peritoneal ou

hemodiálise e transplante renal, se possível de maneira preemptiva, ou assim que for possível¹⁶².

NPHS2 é o gene mais frequentemente associado a SNCR ou GESF em todas as faixas etárias, exceto no Japão e na Coreia^{102,103,164,165}. Variantes que levem ao truncamento da podocina ou à mudança no quadro de leitura, em homozigose ou em heterozigose composta com outra variante patogênica, podem levar à SNC¹⁶⁵. A variante em *NPHS2* c.503G>A p.(Arg168His), por sua vez, está associada a início precoce de SNCR quando em homozigose ou em heterozigose composta, enquanto a variante c.538G>A p.(Val180Met) foi associada a início tardio de SNCR¹⁶⁵. A variante c.413G>A p.(Arg138Gln), provavelmente relacionada a efeito fundador no norte da Europa, constitui-se na variante mais prevalente nas séries reportadas de pacientes desse continente^{164,165}. A proteína resultante dessa variante é retida no retículo endoplasmático e perde a capacidade de recrutar a nefrina nas jangadas lipídicas¹⁶⁴. A variante R229Q por sua vez, está presente em 3% da população de ascendência europeia, tendo sido identificada como causa de SNCR mais tardia quando em *trans* com determinadas variantes patogênicas em *NPHS2*¹⁶⁶.

Identificamos variantes causativas em *NPHS2* em 3 de nossos 14 pacientes com causas mendelianas. Um desses casos apresentou a variante R229Q em um alelo em *trans* com a variante p.(Leu305Pro) localizada no éxon 8 e classificada como provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG. Espera-se, assim, que a variante p.(Leu305Pro) exerça um efeito dominante negativo nesse caso, alterando a dimerização e a localização da podocina R229Q conforme descrito para variantes específicas localizadas no éxon 7 ou 8 de *NPHS2*¹⁶⁷. Vale ressaltar que dados *in vivo* e *in vitro* sugerem que a podocina R229Q arg231gln em camundongos, apresentou expressão reduzida e degradação proteossômica aumentada, respectivamente¹⁶⁸. Uma vez que inibidor de calcineurina pode restaurar a expressão de podocina e sinaptopodina induzida por aminoglicosídeo puromicina (PAN) em podócitos, é possível que seu efeito benéfico em nossos dois pacientes tenha seguido esse mecanismo¹⁶⁹. Além disso, a podocina pode ter sua expressão e localização modificadas em doenças inflamatórias, de modo que seu perfil de expressão possa ser restaurado em algum grau em resposta a utilização desses imunossupressores¹⁶⁹. Curiosamente, esse paciente e o que

albergava a variante c.506T>C:p.(Leu169Pro) em *NPHS2* em homozigose foram os dois únicos da coorte que apresentaram redução significativa de proteinúria, mas não remissão, após terapia com corticosteroide e inibidor de calcineurina. É importante mencionar que resposta parcial a imunossupressão, que neste caso incluiu prednisona, ciclofosfamida e ciclosporina, foi previamente descrita em um paciente com a variante c.506T>C:p.(Leu169Pro) em homozigose¹⁶³.

Três pacientes de duas famílias apresentaram variantes em *PLCE1*, todos com manifestação de SN aos 5 meses de idade e rápida evolução para DRET. Em um estudo prévio com uma coorte de 139 pacientes de 95 famílias, 14 casos apresentaram variantes consideradas patogênicas em *PLCE1*¹⁷⁰. Nestes pacientes, a idade média de manifestação da SN foi de $22,8 \pm 5,0$ meses, com evolução para DRET em $29,1 \pm 3,0$ meses. Esclerose mesangial difusa foi o padrão histológico mais encontrado em pacientes que manifestaram SN em idade mais precoce, enquanto GESF foi o mais frequente nos demais. Não se detectou relação entre o tipo da variante patogênica identificada em *PLCE1* e o diagnóstico histológico. Vale dizer que até o momento não há relatos de associação entre variantes em *PLCE1* e glomerulopatia colapsante. Um dos nossos pacientes com variante causativa em *PLCE1* constitui, portanto, a primeira observação de tal associação. De fato, sua manifestação de SN aos 5 meses de idade e evolução em 1 mês para DRET são consistentes com elevada gravidade e com o diagnóstico histológico de glomerulopatia colapsante. Vale mencionar, por outro lado, que um estudo anterior reportou um paciente com resposta a ciclosporina, bem como indivíduos com variantes em *PLCE1* consideradas patogênicas em homozigose que não manifestaram a doença até a idade adulta^{170,171,172}. Nesses casos, as variantes encontradas foram *nonsense* ou geraram alteração do quadro de leitura. Admite-se, portanto, que o tipo e localização da variante em *PLCE1*, o *background* genético e/ou fatores ambientais possam ser determinantes às consequências clínicas da doença renal associada a este gene.

Variantes em *COQ2* foram associadas a dois padrões de glomerulopatias¹⁷³. O primeiro é glomerulopatia colapsante, caracterizada por proliferação de células epiteliais associada a colapso do todo glomerular, com presença de mitocôndrias abundantes e dismórficas em podócitos. Esse padrão foi observado em um dos

nossos pacientes em que foram encontradas variantes causativas em *COQ2*. No segundo padrão histológico descrito, observa-se depleção de células epiteliais viscerais secundária a apoptose, acúmulo de matriz extracelular e esclerose do tufo glomerular, caracterizando GESF^{173,174}. *COQ2* codifica polipreniltransferase, enzima que catalisa o segundo passo da reação de biossíntese de CoQ10, gerando o produto intermediário da CoQ10 ligado à membrana. Variantes patogênicas em *COQ2* foram associadas a um amplo espectro de acometimento neurológico e/ou renal¹⁷⁵. Há descrição de que a reposição de CoQ10 iniciada imediatamente após identificação de proteinúria em criança com variantes patogênicas nesse *locus* e função renal normal reduziu a proteinúria^{93,176}. No nosso caso, é possível que o tipo de mutação e/ou o momento da introdução da reposição de CoQ10 - quando a doença renal já se apresentava em estágio avançado – tenham sido determinantes na ausência resposta. Vale dizer que suplementação oral de CoQ10 não se correlacionou com melhora significativa dos sintomas neurológicos em pacientes com mutações em *COQ2*¹⁷⁶.

O gene *WT1* possui 10 éxons que codificam 36 isoformas potenciais em mamíferos, tendo papel importante no desenvolvimento genitourinário e renal. A proporção de transcrição associada a duas isoformas, com ausência ou presença da tríade de aa lisina-treonina-serina - isoformas KTS- e KTS+ - desempenha papel fundamental no desenvolvimento sexual masculino e renal. Tais isoformas são definidas pelo sítio de *splicing* doador localizado no íntron 9. Variantes patogênicas neste sítio de *splicing* determinam redução da razão entre KTS+/KTS-. A decisão sobre feminino ou masculino é bastante complexa, e depende primeiramente da presença ou ausência do gene *SRY* localizado no cromossomo Y¹⁷⁷. *SRY* induz a expressão de *SOX9*, importante para desencadear a rede genética da formação dos testículos. Em indivíduos XX ou naqueles XY com deficiência de *SRY*, a rede genética da formação de ovários é ativada. As duas vias de ativação parecem evoluir de maneira antagônica durante o desenvolvimento.

Na síndrome de Frasier, é observada redução do número de células expressando *SRY* e redução de níveis de *SRY* nos precursores das células de Sertoli. Esse efeito é determinado por diminuição da atividade de *WT1*, traduzida na redução da razão KTS+/KTS-. Diante dessa alteração, a interação com os

fatores de transcrição *Gata4/Fog2*, necessária para a ativação de *Sry*, analisada em modelo de camundongo é comprometida¹⁷⁷. A expressão de *SRY* é essencial para a ativação de *SOX9*, proteína com papel importante na proliferação e recrutamento de células progenitoras adicionais. *WT1* participa da regulação negativa de vários genes envolvidos no desenvolvimento renal, incluindo os genes que codificam as proteínas caixa pareada 2 (*PAX2*), proteína 1 de reposta de crescimento precoce (*EGR1*), fator de crescimento de transformador beta (*TGFβ*) e fator de crescimento semelhante a insulina (*IGF*). Variantes em *WT1*, por sua vez, foram associadas a proteinúria e SN. A síndrome de Frasier é clinicamente caracterizada por glomerulopatia progressiva¹⁷⁸. Indivíduos com cariótipo XX parecem desenvolver apenas SN, enquanto indivíduos XY desenvolvem SN e graus variados de alteração do desenvolvimento sexual¹⁷⁹. Nos dois casos observados, ambos os pacientes são 46XY e apresentam alteração da diferenciação sexual, um dos quais fenotipicamente feminino e outro com hipospádia e criptorquidia¹⁸⁰. Além disso, um dos pacientes tem a mãe com a mesma variante causativa em *WT1*, a qual desenvolveu SN associada ao diagnóstico de GESF, à semelhança do caso anteriormente descrito.

Destacamos também que a identificação das fenocópias associadas a variantes em *COL4A5* e *CUBN* podem orientar a investigação de outros órgãos possivelmente afetados no primeiro caso e o acompanhamento em ambos.

CUBN codifica cubilina, proteína que serve como receptor de captação, envolvida na reabsorção de albumina e proteínas de baixo peso molecular pelas células epiteliais do túbulo proximal. Cubilina também participa da absorção de vitaminas em células epiteliais do trato gastrointestinal¹⁸¹. Enquanto variantes patogênicas localizadas em posição 5' até o éxon 8 estão associadas a má absorção intestinal de vitamina B12, variantes patogênicas localizadas em posição 3' ao éxon 8 associam-se a proteinúria tubular e parecem não afetar a função renal a longo prazo⁸⁸. De maneira muito interessante, o paciente que apresentou variantes patogênicas em *CUBN* em heterozigose composta parece ter tido uma glomerulopatia inicial com resolução clínica espontânea, associada a proteinúria tubular determinada pelas variantes patogênicas em *CUBN*. De fato, sua função renal se manteve preservada, e a proteinúria fixa em níveis não nefróticos após a aparente resolução da GESF.

Fenocópias associadas a *COL4A3-5* consistem nas causas mendelianas mais frequentemente relacionadas à GESF em adultos^{182,183}, e também têm sido encontradas em coortes pediátricas de SN^{96,98,101}. A identificação de variantes causativas em *COL4A5*, em particular, pode direcionar não apenas o monitoramento e o manejo das consequências nos rins, ouvidos e olhos, mas também na identificação de outros familiares afetados. Ainda que sem tratamento específico estabelecido até o momento, a utilização de iECAs ou de bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II antes do declínio da função renal aumenta a sobrevida renal em cerca de 13 anos¹⁸³.

Os pacientes em nossa população pediátrica que apresentaram GAR de *APOL1* manifestaram SN em idades mais avançadas e evoluíram rapidamente para DRET, à semelhança de pacientes com SNCR e GESF das coortes CKiD e Neptune¹⁸⁵, e de uma coorte brasileira na qual houve a participação de uma porcentagem significativa dos pacientes deste estudo¹¹⁹. Nos nossos pacientes, os padrões histológicos associados a GAR de *APOL1* incluíram apenas GC ou GESF, achado consistente com o pior desfecho da SNCR relacionado a esse *locus* de suscetibilidade. Embora não tenhamos demonstrado que pacientes com apenas um alelo de risco de *APOL1* apresentam progressão mais rápida para DRET ou atingem DRET com mais frequência que pacientes sem tais alelos, tendência de progressão mais rápida para DRET foi observada no estudo que analisou o impacto dos genótipos de *APOL1*¹¹⁹.

GAR de *APOL1* também tem sido associado a risco de pré-eclâmpsia em parturientes afro-americanas cujos fetos apresentam GAR de *APOL1*¹⁸⁶, a prematuridade em crianças afro-americanas que posteriormente desenvolveram GESF¹⁸⁵, a presença de microalbuminúria em crianças africanas com HIV¹⁸⁷ e de microalbuminúria de início mais precoce em crianças com anemia falciforme¹⁸⁸.

Embora marcadamente associado a africanos e afro-americanos, GAR de *APOL1* não se associou à raça autodeclarada em nossa população avaliada, estando presente em pacientes autodeclarados brancos. Também não observamos diferença na porcentagem de ancestralidade genética continental africana entre pacientes que albergam zero AAR de *APOL1*, um AAR de *APOL1* ou GAR de *APOL1*. Vale notar que este último grupo apresentou apenas 28%

de ancestralidade global africana. Tais achados, embora diferentes da maior parte dos estudos anteriores, são consistentes com características de populações multirraciais e altamente miscigenadas, onde a percepção da raça a partir das características fenotípicas da pele e do cabelo, ainda potencialmente modificadas pelo contexto sociocultural, não necessariamente se correlacionam com a ancestralidade genética.

Observamos em nossa casuística predominância de ancestralidade global europeia (~65%), seguida pela africana (~22%), nativo-americana (~10%) e leste asiática (~2%), distribuição similar às encontradas na coorte Saúde, Bem-Estar e Envelhecimento (SABE)¹²², onde os indivíduos saudáveis avaliados também apresentaram predominância de ancestralidade europeia (73%), seguida pela africana (18%), nativo-americana 7% e leste asiática (3%).

A avaliação da ancestralidade tem sido muito utilizada na identificação de variantes genéticas associadas com proteção ou susceptibilidade a doenças cuja ocorrência ou frequência variam significativamente entre as populações. Nesse cenário, estudos de associação utilizando marcadores genéticos de ancestralidade tornaram-se estratégicos nas últimas décadas. Na prática clínica, entretanto, os dados de ancestralidade genética normalmente não são acessíveis, e a autodeclaração racial ainda é muito aplicada^{189,190}. Vale enfatizar que quanto maior a miscigenação de uma dada população, menor a correlação entre a autodeclaração e a ancestralidade genética, de modo que tais características fenotípicas não deveriam ser utilizadas como equivalentes à avaliação de ancestralidade genética^{118,189}.

Neste estudo, pacientes que se autodeclararam não brancos progrediram mais rapidamente para DRET. Além disso, a autodeclaração não branca foi associada a aumento de risco de progressão para DRET, independentemente dos achados genéticos. Embora a ancestralidade genética média africana tenha sido baixa nos pacientes autodeclarados não brancos, de cerca de 31%, esta foi significativamente maior do que naqueles que se autodeclararam brancos. Em consonância com esses achados, pacientes com maior porcentagem de ancestralidade genética não europeia tenderam a evoluir mais rápido para DRET quando comparados aos pacientes com menor porcentagem de ancestralidade genética europeia. É importante atentar que no Brasil observa-se correlação

positiva entre maior proporção de ancestralidade europeia e poder aquisitivo¹⁹⁰. Além disso, indivíduos que se auto declararam não brancos apresentam maior chance de terem menor renda e apresentarem menor grau de escolaridade, fatores que impactam negativamente nos prognósticos relacionados à saúde¹⁹¹. Essas questões históricas associadas a fatores socioeconômicos dificultam a distinção entre fatores genéticos e ambientais na influência sobre o prognóstico renal.

Ao avaliar a ancestralidade das respectivas regiões genômicas das variantes identificadas, encontramos uma distribuição semelhante à da ancestralidade global da população geral de pacientes, sendo 65% europeia, 15% africana e 10% nativo americana, não tendo sido possível determinar a ancestralidade das regiões genômicas de duas variantes. Realçamos que as duas variantes em regiões genômicas de ancestralidade nativo-americana são variantes não descritas anteriormente, correspondendo a 22% das novas variantes. Apesar do número baixo de pacientes, esse dado é consistente com o fato de que a grande maioria dos estudos genéticos em doenças renais têm sido conduzidos em populações do hemisfério norte, com baixa representatividade de ancestralidade nativo-americana. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que regiões genômicas de variantes mendelianas relacionadas a SN são estudadas quanto à ancestralidade genética, sendo este o método mais preciso para definir a origem racial das mesmas. Tal abordagem é particularmente importante em populações altamente miscigenadas como o Brasil, pois permite a identificação de variantes causativas de diferentes origens raciais, bem como a análise do desempenho patogênico de diferentes variantes mendelianas em *backgrounds* genéticos distintos. Essa abordagem deverá trazer avanços na análise genética molecular e na compreensão da NS em cenários de diversidade fenotípica e de diversidade genética.

Não encontramos nenhum paciente albergando a combinação de variante(s) mendeliana(s) e GAR de *APOL1* em nossa casuística, nem mesmo combinação de variante(s) mendeliana(s) e um AAR de *APOL1*. Até o momento foi reportado um único caso de SNC que apresentava variantes causativas em *NPHS1* e genótipo *APOL1* G1/G1, identificado em uma casuística de 152 pacientes com SNCR ou GESF descendentes de africanos ou das Antilhas Francesas¹⁹².

Ao observar as características clínicas e demográficas dos pacientes analisados, identificamos 3 faixas etárias distintas relacionadas à idade de manifestação da SN, sendo elas menor que 1 ano, entre 1 ano e 9 anos incompletos e maior ou igual a 9 anos de idade. Interessantemente, a maior parte das causas mendelianas foram identificadas em pacientes menores de 1 ano e todos os pacientes que albergaram GAR de *APOL1* manifestaram a SN após 9 anos de idade. Esses achados sugerem que outros fatores além da presença de base genética associada à SN sejam importantes contribuintes para o efeito da idade sobre a gravidade da SN em pacientes pediátricos.

Um número significativo de pacientes com SNCR apresentaram LHM à histologia renal, representando 26% dos casos sem identificação de causas genéticas. Todos os pacientes com LHM manifestaram SN entre 1 ano e 9 anos de idade. Apenas um paciente com LHM apresentou causa mendeliana relacionada à síndrome de Alport, e em nenhum deles foi identificado GAR de *APOL1*. Esses achados sugerem que a SNCR com causa ou susceptibilidade genética não se apresenta ou raramente se apresenta como LHM, histologia renal associada a relativa preservação da função renal. Não observamos nenhum paciente com LHM que atingiu DRET durante o tempo do estudo. Por outro lado, todos os pacientes com GC, exceto um, evoluíram para DRET, sendo este o fenótipo renal mais frequente nos pacientes com GAR de *APOL1*.

Não foi observada recidiva de GESF ou SN após o transplante renal em pacientes com causas mendelianas ou naqueles que apresentaram GAR de *APOL1*. Em contraste, 47,6% dos pacientes nos quais não foram encontradas causas mendelianas ou GAR de *APOL1* apresentaram recidiva no enxerto renal. Esses dados são semelhantes aos encontrados em estudos prévios, nos quais a recidiva após o transplante renal é pouco provável em pacientes com causas mendelianas ou susceptibilidade genética para SN associada a GAR de *APOL1*^{198,193}. A recorrência de SN no enxerto renal, portanto, deve muito provavelmente estar associada na grande maior parte dos casos a fator(es) de permeabilidade circulante(s), não avaliados em nosso estudo.

Nossos resultados, obtidos em uma população multirracial e altamente miscigenada, ampliam consideravelmente a caracterização genética molecular e clínica da SNC, SNCR e GESF em idade pediátrica, incluindo dados robustos

advindos de análises de ancestralidade global e local. A sólida integração de tais dados estende importantemente o entendimento da patogênese da síndrome nefrótica pediátrica.

6. CONCLUSÕES

1. Pacientes com SNCR, SCN e/ou GESF que apresentaram remissão da SN em resposta a tratamento com corticosteroide ou inibidor de calcineurina não evoluíram para DRET no período analisado. Em nenhum desses casos foram identificadas causas mendelianas ou GAR de *APOL1*.
2. Pacientes com LHM à histologia renal não progrediram para DRET no período de tempo avaliado. Apenas um desses casos apresentou causa mendeliana, representada por uma variante no gene *COL4A5*.
3. Pacientes com GAR de *APOL1* evoluíram mais rapidamente e frequentemente para DRET e apresentaram diagnóstico histológico de GESF ou GC.
4. Não foi observada associação entre raça autodeclarada não branca e GAR de *APOL1* na coorte de pacientes analisada, e nem entre porcentagem de ancestralidade africana e GAR de *APOL1*, evidenciando profunda miscigenação populacional.
5. Pacientes autodeclarados não brancos evoluíram mais rapidamente para DRET. No mesmo sentido, raça autodeclarada não branca associou-se a risco aumentado de progressão para DRET, independente dos achados genéticos.
6. Pacientes com maior componente de ancestralidade genética não europeia apresentaram tendência de atingir mais rápido DRET. Na mesma linha, ancestralidade não europeia associou-se com significância marginal a risco aumentado de progressão para DRET.
7. A frequência de causas mendelianas encontrada na população avaliada foi similar às encontradas em populações equivalentes com baixo nível de

consanguinidade. Os genes mais frequentemente afetados por variantes causativas foram *NPHS1* e *NPHS2*.

8. Pacientes transplantados com causas mendelianas ou GAR de *APOL1* não apresentaram recidiva da doença no enxerto.

9. A proporção de ancestralidade genética das regiões genômicas das variantes causativas identificadas foi similar à da ancestralidade genética global encontrada na coorte. As duas únicas variantes identificadas de ancestralidade nativo-americana são novas.

10. Pacientes com manifestação de SN antes de 1 ano de idade ou aos/após 9 anos de idade evoluíram mais rapidamente para DRET. No mesmo sentido, estas faixas etárias associaram-se a risco aumentado de progressão para DRET.

7. REFERÊNCIAS

1. Hogg Rj, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics*. 2003;111:1416-21.
2. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, et al. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Mar;20(3):629-37
3. Pottel H, Björk J, Bökenkamp A, Berg U, Åsling-Monemi K, et al. Estimating glomerular filtration rate at the transition from pediatric to adult care. *Kidney Int*. 2019;95(5):1234-1243.
4. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clin Kid J*, 2016:1-9
5. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* 2012;27:363-73.
6. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/Pages/kidney-disease-statistics-united-states.aspx>.
7. Konstantyner T, Sesso R, Camargo MF, Feltran LS, Koch-Nogueira P. Pediatric Chronic Dialysis in Brazil: Epidemiology and Regional Inequalities. *Plos one* 2015:1-15.
8. NAPRTCS: <https://web.emmes.com/study/ped/annlrept/annualrept2014.pdf>.
9. ERA-EDTA Registry: ERA-EDTA Registry Annual Report 2014. Academic Medical Center, Department of Medical Informatics, Amsterdam, the Netherlands 2016.
10. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12:133-46.
11. KDIGO Conference Participants. Genetics in chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. 2022;101(6):1126-1141.
12. Stokman MF, Renkema KY, Giles RH, Schaefer F, Knoers NV, van Eerde AM. The expanding phenotypic spectra of kidney diseases: insights from genetic studies. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12:472-83.
13. Hanna MH, Dalla Gassa A, Mayer G, Zaza G, Brophy PD, Gesualdo L, Pesce F. The nephrologist of tomorrow: towards a kidney-omic future. *Pediatr Nephrol*. 2017;32:393-404
14. Benzing T, Salant D. Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. *N Engl J Med*. 2021 Apr 15;384(15):1437-1446.
15. Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, Edwards A, Binz-Lotter J, Reilly D, et al. A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab*. 2020;2(5):461-474.

16. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int.* 2010;77:571-80
17. Kawachi H, Fukusumi Y. New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria. *Clin Exp Nephrol.* 2020;24(3):193-204.
18. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999,10: 2440–45.
19. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 Co-localize at the Podocyte Foot Process Intercellular Junction and Form cis Hetero-oligomers. *J Biol Chemistry*, 2003;21:19266-271.
20. Akchurin O, Reidy KJ. Genetic causes of proteinuria and nephrotic syndrome: Impact on podocyte pathobiology. *Pediatr Nephrol* 2015;30:221-33
21. Yu SM, Nissaisorakam P, Husain I, Jim B. Proteinuric kidney diseases: a podocyte's slit diaphragm and cytoskeleton approach. *Front Med*, 2018;5:211.
22. Martin CE, Jones N. Nephrin signaling in the podocyte: an update view of signal regulation at the slit diaphragm and beyond. *Front Endocrinol*, 2018;9:302.
23. Mundel P, Shankland ST. Podocyte Biology and Response to Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002,13: 3005–15.
24. Denhez B, Lizotte,F, Marie-Odile Guimond M, Geraldès P. New Mechanism for Podocyte Dysfunction: Regulation of Nephrin by SHP-1. Abstracts / *Can J Diabetes* 37.2013: S6eS1.
25. New LA, Martin CE, Scott RP, Platt MJ, Chahi AK, Stringer CD, Lu P, Samborska B, Vera Eremina V, Takano T, Simpson JA, Quaggin SE, Jones N. Nephrin Tyrosine Phosphorylation Is Required to Stabilize and Restore Podocyte Foot Process Architecture. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:2422-35.
26. Swiatecka-Urban A. Endocytic Trafficking at the Mature Podocyte Slit Diaphragm. *Front Pediatr.* 2017;5:32.
27. Tian X, Bunda P, Ishibe S. Podocyte Endocytosis in Regulating the Glomerular Filtration Barrier. *Front Med (Lausanne).* 2022;10(9):801837.
28. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998;1(4):575-82.
29. Ristola M, Lehtonen S. Functions of the podocyte proteins nephrin and Neph3 and the transcriptional regulation of their genes. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(5):315-28.
30. Schurek EM, Völker LA, Tax J, Lamkemeyer T, Rinschen MM, et al. A disease-causing mutation illuminates the protein membrane topology of the kidney-expressed prohibitin homology (PHB) domain protein podocin. *J Biol Chem.* 2014;289:11262-71.
31. Feng D. Phosphorylation of key podocyte proteins and the association with proteinuric kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020;319(2):F284-F291.

32. Boyer O, Woerner S, Yang F, Oakeley EJ, Linghu B, Gribouval O, et al. LMX1B mutations cause hereditary FSGS without extrarenal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24:1216-22.
33. Schell C. The evolving complexity of the podocyte cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:3166-74.
34. Margiotta A, Bucci C. Role of Intermediate Filaments in Vesicular Traffic. *Cells.* 2016;5:3-22
35. Campelloni KG, Welch MD. A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11: 237–51.
36. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;24:251-6.
37. Michaud JLR, Chaisson KM, Parks RJ and Kennedy CRJ. FSGS-associated α -actinin-4 (K256E) impairs cytoskeletal dynamics in podocytes. *Kidney Int.* 2006;70:1054-61.
38. Sun H, Al-Romaih KI, MacRae CA, Pollak MR. Human Kidney Disease-causing INF2 Mutations Perturb Rho/Dia Signaling in the *Glomerulus EBioMedicine.* 2014;1:107-15.
39. Labat-de-Hoz L, Alonso MA. The formin INF2 in disease: progress from 10 years of research. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(22):4581-4600.
40. Subramanian B, Chun J, Perez-Gill C, Yan P, Stillman IE, et al. FSGS-Causing INF2 Mutation Impairs Cleaved INF2 N-Fragment Functions in Podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(2):374-391.
41. Boyer O, Nevo F, Plaisier E, Funalot B, Gribouval O, Benoit G, et al. INF2 Mutations in Charcot–Marie–Tooth Disease with Glomerulopathy. *N Engl J Med.* 2011;365:2377-88.
42. Yaddanapudi S, Altintas MM, Kistler AD, Fernandez I, Möller CC, Wei C et al. CD2AP in mouse and human podocytes controls a proteolytic program that regulates cytoskeletal structure and cellular survival. *J Clin Invest.* 2011;121:3965-80.
43. Yu SM, Nissaisorakarn P, Husain I, Jim B. Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach. *Front Med (Lausanne).* 2018;11;5:221.
44. Akilesh S, Suleiman H, Yu H, Stander MC, Lavin P, Gbadegesin R, Antignac C, et al. Arhdap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutante form is associated with familiar focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4127-37
45. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, Hurd TW, Vega-Warner V, Fang H, et al. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3243-53.
46. Ashraf S, Kudo H, Rao J, Kikuchi A, Widmeier E, Lawson JA, et al. Mutations in six nephrosis genes delineates a pathogenic pathway amenable to treatment. *Nat Commun.* 2018;9:1960.

47. Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K and Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signaling. *Nat Cell Biol.* 2006;8:485-91.
48. Schell C and Huber TB The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:3166-74.
49. Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(10):770-788
50. Bi J, Chase SE, Pellenz CD, Kurihara H, Fanning AS, Krendel M. Myosin 1e is a component of the glomerular slit diaphragm complex that regulates actin reorganization during cell-cell contact formation in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013 15;305(4):F532-44.
51. Yu S, Choi WI, Choi YJ, Kim HY, Hildebrandt F, Gee HY. PLCE1 regulates the migration, proliferation, and differentiation of podocytes. *Exp Mol Med.* 2020;52(4):594-603.
52. Gee HY, Sadowski CE, Aggarwal PK, Porath JD, Yakulov TA, et al. FAT1 mutations cause a glomerulotubular nephropathy. *Nat Commun.* 2016;7:10822.
53. Fidler AL, Boudko SP, Rokas A, Hudson BG. The triple helix of collagens - an ancient protein structure that enabled animal multicellularity and tissue evolution. *J Cell Sci.* 2018;131(7):jcs203950.
54. Naylor RW, Morais MRPT, Lennon R. Complexities of the glomerular basement membrane. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(2):112-127.
55. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:160.
56. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(2):73-89.
57. Braun DA, Sadowski CE1, Kohl S, Lovric S, Astrinidis SA, Pabst WL, et al. Mutations in nuclear pore genes NUP93, NUP205 and XPO5 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2016;48:457-65.
58. Braun DA, Lovric S, Schapiro D, Schneider R, Marquez J, et al. Mutations in multiple components of the nuclear pore complex cause nephrotic syndrome. *J Clin Invest.* 2018;128(10):4313-4328.
59. Braun DA, Rao J, Mollet G, Schapiro D, Daugeron MC, et al. Mutations in KEOPS-complex genes cause nephrotic syndrome with primary microcephaly. *Nat Genet.* 2017;49(10):1529-1538.
60. Beenstock J, Sicheri F. The structural and functional workings of KEOPS. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(19):10818-10834.
61. Tilley FC, Arrondel C, Chhuon C, Boisson M, Cagnard N, et al. Disruption of pathways regulated by Integrator complex in Galloway-Mowat syndrome due to WDR73 mutations. *Sci Rep.* 2021;11(1):5388

62. Shaheen R, Abdel-Salam GM, Guy MP, Alomar R, Abdel-Hamid MS, et al. Mutation in WDR4 impairs tRNA m(7)G46 methylation and causes a distinct form of microcephalic primordial dwarfism. *Genome Biol.* 2015;16:210.
63. Bansal R, Hussain S, Chanana UB, Bisht D, Goel I, Muthuswami R. SMARCAL1, the annealing helicase and the transcriptional co-regulator. *IUBMB Life.* 2020;72(10):2080-2096.
64. Bökenkamp A, deJong M, van Wijk JA, Block D, van Hagen JM, et al. R561C missense mutation in the SMARCAL1 gene associated with mild Schimke immuno-osseous dysplasia. *Pediatr Nephrol.* 2005;20(12):1724-8.
65. Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grünfeld JP, Jaubert F, Kuttenn F, Fékété CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K: Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17: 467–470, 1997 10.1038/ng1297-467
66. Lipska BS, Ranchin B, Iatropoulos P, Gellermann J, Melk A, et al. PodoNet Consortium. Genotype-phenotype associations in WT1 glomerulopathy. *Kidney Int.* 2014;85(5):1169-78.
67. Boyer O, Woerner S, Yang F, Oakeley EJ, Linghu B, et al. LMX1B mutations cause hereditary FSGS without extrarenal involvement. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1216-22.
68. Ozaltin F. Primary coenzyme Q10 (CoQ10) deficiencies and related nephropathies. *Pediatr Nephrol.* 2014;29:961-9.
69. Ashraf S, Gee HY, Woerner S, Xie LX, Vega-Warner V, Lovric S, Fang H, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest.* 2013;123:5179-89.
70. Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, et al. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004;101:15070-75.
71. Saleem MA. Molecular stratification of idiopathic nephrotic syndrome. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(12):750-765.
72. Ha TS. Circulating Permeability Factors in Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Child Kidney Dis* 2019;23:7-21.
73. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med.* 2011;17(8):952-60.
74. Wei C, Spear R, Hahm E, Reiser J. suPAR, a Circulating Kidney Disease Factor. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:745838.
75. Watts AJB, Keller KH, Lerner G, Rosales I, Collins AB, et al. Discovery of Autoantibodies Targeting Nephrin in Minimal Change Disease Supports a Novel Autoimmune Etiology. *J Am Soc Nephrol.* 2022;33(1):238-252.
76. Lombel RM, Gipson DS, Hodson EM. Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO. *Pediatr Nephrol.* 2013;28:415–26.

77. Trautmann A, Vivarelli M, Samuel S, Gipson D, Sinha A, et al. International Pediatric Nephrology Association: IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2020;35: 1529–1561.
78. Noone DG, Iijima K, Parekh R: Idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet* 392: 61–74, 2018. 2018;392(10141):61-74.
- 79.
80. Tullus K, Webb H, Bagga A: Management of steroid-resistant nephrotic syndrome in children and adolescents. *Lancet Child Adolesc Health* 2018;2:880–890.
81. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003; 362:629-639.
82. Dogra S, Kaskel F. Steroid-resistant nephrotic syndrome: a persistent challenge for pediatric nephrology. *Pediatr Nephrol*. 2017;32:965-974.
83. Lovric S, Ashraf S, Tan W, Hildebrandt F. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31:1802-13.
84. Brunnham L, Hayen MR. Hunting human disease genes: lessons from the past, challenges for the future. *Hum Genet*. 2013;132:603-17.
85. Hall G, Gbadegesin RA. Translating genetic findings in hereditary nephrotic syndrome: the missing loops. *Am J Physiol Renal* 2015;309:F24-F28.
86. Watanabe A, Feltran LS, Sampson MG. Genetics of Nephrotic Syndrome Presenting in Childhood: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;74(4):549-557.
87. Kopp JB, Anders HJ, Susztak K, Podestà MA, Remuzzi G, et al. Podocytopathies. *Nat Rev Dis Primers*. 2020;6(1):68.
88. Bedin M, Boyer O, Servais A, Li Y, Villoing-Gaudé L, et al. Human C-terminal CUBN variants associate with chronic proteinuria and normal renal function. *J Clin Invest* 2020;130: 335–344.
89. Giglio S, Provenzano A, Mazzingh B, Becherucci F, Giunti L, et al. Heterogeneous genetic alterations in sporadic nephrotic syndrome associate with resistance to immunosuppression. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:230-6.
90. Büscher AK, Beck BB, Melk A, et al. German Pediatric Nephrology Association (GPN): Rapid Response to Cyclosporin A and Favorable Renal Outcome in Nongenetic Versus Genetic Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11: 245–253.
91. Trautmann A, Bodria M, Ozaltin F, Gheisari A, Melk A, Azocar M, et al. PodoNet Consortium. Spectrum of steroid-resistant and congenital nephrotic syndrome in children: the PodoNet Registry cohort. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10:592-600.
92. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabs WL, Gee HY, Kohl S, et al. A single-gene cause in 29,5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1279-89.

93. Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, et al. COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest*. 2011;121:2013-24.
94. Quinzii CM, López LC, Von-Moltke J, Naini A, Krishna S, Schuelke M, et al. Respiratory chain dysfunction and oxidative stress correlate with severity of primary CoQ10 deficiency. *FASEB J*. 2008;22:1874-85.
95. Sampson MG, Gillies CE, Robertson CC, Crawford B, Vega-Warner V, Otto EA, et al. Using Population Genetics to Interrogate the Monogenic Nephrotic Syndrome Diagnosis in a Case Cohort. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27:1970-83.
96. Bierzynska A, McCarthy HJ, Soderquest K, Sen ES, Colby E, Ding WY, et al. Genomic and clinical profiling of a national nephrotic syndrome cohort advocates a precision medicine approach to disease management. *Kidney Int*. 2017;16:30612-3.
97. Tan W, Lovric S, Ashraf S, Rao J, Schapiro D, Airik M, et al. Analysis of 24 genes reveals a monogenic cause in 11.1% of cases with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center. *Pediatr Nephrol*. 2018;33:305-14.
98. Feltran LS, Varela P, Silva ED, Veronez CL, Franco MC, Filho AP, et al. Targeted Next-Generation Sequencing in Brazilian Children With Nephrotic Syndrome Submitted to Renal Transplant. *Transplantation*. 2017;101:2905-12.
99. Guaragna MS, Lutaif AC, Piveta CS, Souza ML, de Souza SR, Henriques TB, Maciel-Guerra AT, Belangero VM, Guerra-Junior G, De Mello MP. NPHS2 mutations account for only 15% of nephrotic syndrome cases. *BMC Med Genet*. 2015;16:88.
100. Hildebrandt F. Genetics of kidney disease. *Semin Nephrol*. 2016;36(6):472-74.
101. Warejko JK, Tan W, Daga A, Schapiro D, Lawson JA, et al. Whole Exome Sequencing of Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018;13(1):53-62.
102. Nagano C, Yamamura T, Horinouchi T, Aoto Y, Ishiko S, Sakakibara N, Shima Y, Nakanishi K, Nagase H, Iijima K, Nozu K: Comprehensive genetic diagnosis of Japanese patients with severe proteinuria. *Sci Rep* 10: 270, 2020 10.1038/s41598-019-57149-5.
103. Park E, Lee C, Kim NKD, Ahn YH, Park YS, et al. Genetic Study in Korean Pediatric Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome or Focal Segmental Glomerulosclerosis. *J Clin Med* 2020;9: 2013.
104. Wang F, Zhang Y, Mao J, Yu Z, Yi Z, et al. Spectrum of mutations in Chinese children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2017;32: 1181–1192.
105. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee: 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. *Genet Med* 17: 405–424, 2015.

106. Weber S, Büscher AK, Hagmann H, Liebau MC, Heberle C, Ludwig M, et al. Dealing with the incidental finding of secondary variants by the example of SRNS patients undergoing targeted next-generation sequencing. *Pediatr Nephrol.* 2016;31:73-81.
107. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31:961-70.
108. Stefanou C, Pieri M, Savva I, Georgiou G, Pierides A, et al. Co-Inheritance of Functional Podocin Variants with Heterozygous Collagen IV Mutations Predisposes to Renal Failure. *Nephron.* 2015;130(3):200-12.
109. Lennon R, Stuart HM, Bierzynska A, Randles MJ, Kerr B, Hillman KA, et al. Coinheritance of COL4A5 and MYO1E mutations accentuate the severity of kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2015;30:1459-65.
110. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, Johnson RC, Freedman BI, et al. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2008;40(10):1175-84.
111. Freedman BI, Hicks PJ, Bostrom MA, Cunningham ME, Liu Y, 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 Apr;75(7):736-45.
112. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science.* 2010;329(5993):841-5.
113. Nichols B, Jog P, Lee JH, Blackler D, Wilmot M, et al. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. *Kidney Int.* 2015;87(2):332-42.
114. Ma L, Chou JW, Snipes JA, Bharadwaj MS, Craddock AL, et al. APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(4):1093-1105.
115. Chun J, Zhang JY, Wilkins MS, Subramanian B, Riella C, et al. Recruitment of APOL1 kidney disease risk variants to lipid droplets attenuates cell toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(9):3712-3721.
116. Shetty AA, Tawhari I, Safar-Boueri L, Seif N, Alahmadi A, et al. COVID-19-Associated Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(1):33-40.
117. Friedman DJ, Pollak MR. APOL1 Nephropathy: From Genetics to Clinical Applications. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2021;16(2):294-303.
118. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, et al. Epigen-Brazil group. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep.* 2015;5:9812.
119. Watanabe A, Guaragna MS, Belangero VMS, Casimiro FMS, Pesquero JB, et al. APOL1 in an ethnically diverse pediatric population with nephrotic syndrome: implications in focal segmental glomerulosclerosis and other diagnoses. *Pediatr Nephrol.* 2021;36(8):2327-2336.

120. Wang K, Li M, Hakonarson H: ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38: e164, 2010 10.1093/nar/gkq603
121. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809):434-443.
122. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017 Jul;38(7):751-763
123. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MFA, Nishi MY, et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics (Sao Paulo)* 2020;75: e1913, 2020.
124. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
125. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(17):e118.
126. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(Web Server issue):W452-7.
127. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.
128. Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol*. 2011;29(1):24-6.
129. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jan 1;33(Database issue):D514-7.
130. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D1062-D1067.
131. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome Res*. 1999;9(8):677-9.
132. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*. 2003;21(6):577-81.
133. Emmert DB, Stoehr PJ, Stoesser G, Cameron GN. The European Bioinformatics Institute (EBI) databases. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(17):3445-9.
134. Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D988-D995.

135. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jan 8;49(D1):D480-D489.
136. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics.* 2019;35(11):1978-1980.
137. Edgar RC: MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004;32: 1792–1797.
138. Krieger E, Vriend G: YASARA View - molecular graphics for all devices – from smartphones to workstations. *Bioinformatics* 2014. 30: 2981–2982.
139. Schrödinger L, DeLano W. PyMOL [Internet]. 2020. Available from: <http://www.pymol.org/pymol>
140. Cheng W, Li W. Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Science.* 2014;343(6173):878-881.
141. Huang H, Levin EJ, Liu S, Bai Y, Lockless SW, Zhou M. Structure of a membrane-embedded prenyltransferase homologous to UBIAD1. *PLoS Biol.* 2014;22;12(7):e1001911.
142. Rugema NY, Garland-Kuntz EE, Sieng M, Muralidharan K, Van Camp MM, et al. Structure of phospholipase C ϵ reveals an integrated RA1 domain and previously unidentified regulatory elements. *Commun Biol.* 2020;3(1):445.
143. Essen LO, Perisic O, Lynch DE, Katan M, Williams RL. A ternary metal binding site in the C2 domain of phosphoinositide-specific phospholipase C-delta1. *Biochemistry.* 1997;36(10):2753-62.
144. Lyon AM, Begley JA, Manett TD, Tesmer JJG. Molecular mechanisms of phospholipase C β 3 autoinhibition. *Structure.* 2014;22(12):1844-1854.
145. Waldo GL, Ricks TK, Hicks SN, Cheever ML, Kawano T, et al. Kinetic scaffolding mediated by a phospholipase C-beta and Gq signaling complex. *Science.* 2010;330(6006):974-80.
146. Bunney TD, Harris R, Gandarillas NL, Josephs MB, Roe SM, et al. Structural and mechanistic insights into ras association domains of phospholipase C epsilon. *Mol Cell.* 2006;21(4):495-507.
147. Özkan E, Chia PH, Wang RR, Goriatcheva N, Borek D, et al. Extracellular architecture of the SYG-1/SYG-2 adhesion complex instructs synaptogenesis. *Cell.* 2014;156(3):482-94.
148. Gogarten SM, Bhangale T, Conomos MP, Laurie CA, McHugh CP, et al. GWASTools: an R/Bioconductor package for quality control and analysis of genome-wide association studies. *Bioinformatics* 28: 3329–3331, 2012 10.1093/bioinformatics/bts610

149. Zheng X, Levine D, Shen J, Gogarten SM, Laurie C, Weir BS: A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics* 28: 3326–3328, 2012 10.1093/bioinformatics/bts606
150. Chang CC, Chow CC, Tellier LC, Vattikuti S, Purcell SM, Lee JJ: Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* 4: 7, 2015 10.1186/s13742-015-0047-8
151. McQuillan R, Leutenegger AL, Abdel-Rahman R, Franklin CS, Pericic M, Barac-Lauc L, Smolej-Narancic N, Janicijevic B, Polasek O, Tenesa A, Macleod AK, Farrington SM, Rudan P, Hayward C, Vitart V, Rudan I, Wild SH, Dunlop MG, Wright AF, Campbell H, Wilson JF: Runs of homozygosity in European populations. *Am J Hum Genet* 2008;83: 359–372.
152. Alexander DH, Novembre J, Lange K: Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.*2009;19: 1655–1664.
153. Bergström A, McCarthy SA, Hui R, Almarri MA, Ayub Q, et al. Insights into human genetic variation and population history from 929 diverse genomes. *Science*. 2020;367(6484):eaay5012.
154. Maples BK, Gravel S, Kenny EE, Bustamante CD: RFMix: a discriminative modeling approach for rapid and robust local-ancestry inference. *Am J Hum Genet* .2013;93: 278–288.
155. Reynolds BC, Oswald RJA. Diagnostic and Management Challenges in Congenital Nephrotic Syndrome. *Pediatric Health Med Ther.* 2019;10:157-167.
156. Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tissari P, et al. Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int.* 2000;58(3):972-80.
157. Koziell A, Grech V, Hussain S, Lee G, Lenkkeri U, Tryggvason K, Scambler P. Genotype/phenotype correlations of NPHS1 and NPHS2 mutations in nephrotic syndrome advocate a functional inter-relationship in glomerular filtration. *Hum Mol Genet.* 2002;11:379-88.
158. Heeringa SF, Vlangos CN, Chernin G, Hinkes B, Gbadegesin R, et al. Members of the APN Study Group. Thirteen novel NPHS1 mutations in a large cohort of children with congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(11):3527-33.
159. Wong W, Morris MC, Kara T. Congenital nephrotic syndrome with prolonged renal survival without renal replacement therapy. *Pediatr Nephrol.*2013;28:2313-21.
160. Guaragna MS, Cleto TL, Souza ML, Lutaif AC, de Castro LC, Penido MG, Maciel-Guerra AT, Belangero VM, Guerra-Junior G, De Mello MP. NPHS1 gene mutations confirm congenital nephrotic syndrome in four Brazilian cases: A novel mutation is described. *Nephrology (Carlton).* 2016;21(9):753-7
161. Schoeb DS, Chernin G, Heeringa SF, Matejas V, Held S, et al. Gessellschaft für Paediatrische Nephrologie (GPN) Study Group. Nineteen novel NPHS1 mutations in a worldwide cohort of patients with congenital nephrotic syndrome (CNS). *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2970-6.

162. Boyer O, Schaefer F, Haffner D, Bockenbauer D, Hölttä T, et al. Management of congenital nephrotic syndrome: consensus recommendations of the ERKNet-ESPN Working Group. *Nat Rev Nephrol*. 2021 Apr;17(4):277-289.
163. Caridi G, Bertelli R, Carrea A, Di Duca M, Catarsi P, Artero M, et al. Prevalence, genetics, and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-resistant non familiar focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2741-6.
164. Bouchireb K, Boyer O, Gribouval O, Nevo F, Huynh-Cong E, Morinière V, et al. NPHS2 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutations update and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat*. 2014;35:178-86.
165. Hildebrandt F, Heeringa SF. Specific podocin mutations determine age of onset of nephrotic syndrome all the way into adult life. *Kidney Int*. 2009;75(7):669-71.
166. Machuca E, Hummel A, Nevo F, Dantal J, Martinez F, Al-Sabban E, et al. Clinical and epidemiological assessment of steroid-resistant nephrotic syndrome associated with the NPHS2 R229Q variant. *Kidney Int*. 2009;75:727-35.
167. Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, et al. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2014;46: 299–304.
168. Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, et al. Super-Resolution Imaging of the Filtration Barrier Suggests a Role for Podocin R229Q in Genetic Predisposition to Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol* 33: 138–154, 2022 10.1681/ASN.2020060858
169. Shen X, Jiang H, Ying M, Xie Z, et al. Calcineurin inhibitors cyclosporin A and tacrolimus protect against podocyte injury induced by puromycin aminonucleoside in rodent models. *Sci Rep* 6: 32087, 2016 10.1038/srep32087
170. Boyer O, Benoit G, Gribouval O, Nevo F, Pawtowski A, Bilge I, et al. Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. *Med Genet*. 2010;47:445-52.
171. Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE, Vlangos CN, Heeringa SF, et al. Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(4):1291-7.
172. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet*. 2006;38(12):1397-405.
173. Barisoni L, Diomedes-Camassei F, Santorelli FM, Caridi G, Thomas DB, Emma F, et al. Collapsing glomerulopathy associated with inherited mitochondrial injury. *Kidney Int*. 2008;74:237-43.
174. Diomedes-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G, Ghiggeri GM, et al. COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:2773-80.
175. Desbats MA, Morbidoni V, Silic-Benussi M, Doimo M, Ciminale V, Cassina M, et al. The COQ2 genotype predicts the severity of coenzyme Q10 deficiency *Hum Mol Genet*. 2016;1:4256-65.

176. Drovandi S, Lipska-Ziętkiewicz BS, Ozaltin F, Emma F, Gulhan B, et al. PodoNet Consortium; mitoNET Consortium; CCGKDD Consortium, Schaefer F. Oral Coenzyme Q10 supplementation leads to better preservation of kidney function in steroid-resistant nephrotic syndrome due to primary Coenzyme Q10 deficiency. *Kidney Int.* 2022;102(3):604-612
177. Bandiera R, Sacco S, Vidal VP, Chaboissier MC, Shedl A. Steroidogenic organ development and homeostasis: a WT1-centric view. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;15:145-55.
178. Niaudet P, Gubler MC. WT1 and glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 2006;21:1653-60.
179. Denamur E, Bocquet N, Mougénot B, Da Silva F, Martinat L, et al. Mother-to-Child Transmitted WT1 Splice-Site Mutation Is Responsible for Distinct Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:2219-23.
180. Ferrari MTM, Watanabe A, da Silva TE, Gomes NL, Batista RL et al. WT1 Pathogenic Variants are Associated with a Broad Spectrum of Differences in Sex Development Phenotypes and Heterogeneous Progression of Renal Disease. *Sex Dev.* 2022;16(1):46-54.
181. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int.* 2016 Jan;89(1):58-67.
182. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, et al. Graham N, Venkat-Raman G, Ennis S. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(6):961-70.
183. Yao T, Udwan K, John R, Rana A, Haghghi A, Xu L, Hack S, Reich HN, Hladunewich MA, Cattran DC, Paterson AD, Pei Y, Barua M. Integration of Genetic Testing and Pathology for the Diagnosis of Adults with FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(2):213-223.
184. Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, et al. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int.* 2012;81(5):494-501.
185. Ng DK, Robertson CC, Woroniecki RP, Limou S, Gillies CE, Reidy KJ, et al. APOL1-associated glomerular disease among African-American children: a collaboration of the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) and Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) cohorts. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32:983-990.
186. Reidy KJ, Hjorten RC, Simpson CL, Rosenberg AZ, Rosenblum SD, et al. Fetal-Not Maternal-APOL1 Genotype Associated with Risk for Preeclampsia in Those with African Ancestry. *Am J Hum Genet.* 2018;103(3):367-376.
187. Ekulu PM, Nkoy AB, Betukumesu DK, Aloni MN, Makulo JRR, et al. APOL1 Risk Genotypes Are Associated With Early Kidney Damage in Children in Sub-Saharan Africa. *Kidney Int Rep.* 2019;4(7):930-938.

188. Zahr RS, Rampersaud E, Kang G, Weiss MJ, Wu G, Davis RL, Hankins JS, Estep JH, Lebensburger J. Children with sickle cell anemia and APOL1 genetic variants develop albuminuria early in life. *Haematologica*. 2019;104(9):e385-e387.
189. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet*. 2014 Sep 25;10(9):e1004572.
190. Salata A. Race, Class and Income Inequality in Brazil: A Social Trajectory Analysis <https://doi.org/10.1590/dados.2020.63.3.213>
191. Hone T, Stokes J, Trajman A, Saraceni V, Coeli CM, et al. Racial and socioeconomic disparities in multimorbidity and associated healthcare utilisation and outcomes in Brazil: a cross-sectional analysis of three million individuals. *BMC Public Health*. 2021;21(1):1287
192. Gribouval O, Boyer O, Knebelmann B, Karras A, Dantal J, Fourrage C, Alibeu O, Hogan J, Dossier C, Tête MJ, Antignac C, Servais A. APOL1 risk genotype in European steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis patients of different African ancestries. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(11):1885-1893.
193. Mirza A, Kowalewska J, McCune T. Transplantation With APOL1 Risk Variant Kidney May Be Associated With Lifetime Risk for Recurrence of Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Case Report and Review of Literature. *Transplant Proc*. 2019;51(9):3077-3079.