

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

PREVALÊNCIA DAS VARIANTES DO GENE *NPHS2* NA
GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL FAMILIAR E
ESPORÁDICA

RAFAEL DE ALMEIDA

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

PREVALÊNCIA DAS VARIANTES DO GENE *NPHS2* NA
GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL FAMILIAR E
ESPORÁDICA

RAFAEL DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr Francisco José Veríssimo Veronese.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meus pais Julio Cezar de Almeida e Eliane Bernardete de Almeida pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Agradeço, especialmente a minha esposa, Roberta Dalmolin Bergoli de Almeida pela compreensão nos momentos de ausência e pelo maior presente de todos, minha filha, Maria Teresa Bergoli de Almeida, a elas todo o amor, admiração e orgulho.

Ao meu orientador Francisco Veronese por ter sido um orientador incansável na busca de recursos, na realização dos objetivos do projeto, e, principalmente, pelo exemplo como pessoa, como profissional e como pesquisador.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo espaço disponibilizado ao ensino e a pesquisa, pelo uso da estrutura e tecnologias disponíveis na instituição. Ao Serviço de Nefrologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre e ao Hospital da Criança Santo Antônio pelo acolhimento, incentivo e disponibilidade, especialmente a Dra. Clotilde Druck Garcia e Dra. Elizete Keitel

Aos profissionais da UAMP do HCPA pelos ensinamentos, pela colaboração e fundamentalmente na execução do projeto, à minha amiga Fernanda Pereira por toda dedicação e suporte. Aos alunos William Israel Cardoso da Silva, Thiago Itaquy e Henrique Garbin por todo o acompanhamento do projeto, deslocamentos em horários inconvenientes e a insistência para conseguirmos atingir o maior número de participantes possível do projeto, o que gerou, até mesmo, detenções inesperadas por falha na comunicação com os participantes.

À CAPES e a FINE pelo apoio e incentivos financeiros que ajudaram na execução desse projeto e que são fundamentais para a Ciência Brasileira e desenvolvimento de novos pesquisadores.

Ao PPG Ciências Médicas e a secretária Vera Ribeiro pela assistência e orientação durante a pós-graduação. A todas as pessoas que não tiveram seus nomes citados mas que tiveram importância ímpar nesse período, o meu muito obrigado.

RESUMO

Introdução: A Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) é um padrão de lesão glomerular que tem diferentes etiologias, podendo se apresentar de forma primária ou secundária a outras doenças. A GESF primária apresenta manifestações clínicas heterogêneas, especialmente em relação à resposta à terapia imunossupressora e progressão para doença renal crônica terminal (DRCT). Recentemente, formas hereditárias e as bases moleculares da genética da GESF têm sido definidas em associação com o gene *NPHS2*. O gene *NPHS2* codifica uma proteína denominada podocina, localizada na fenda diafragmática, necessária para a organização estrutural do podócito e manutenção do seu citoesqueleto. As variantes deste gene *p.R229Q*, *R138Q* e *p.A242V* são prevalentes com uma frequência que varia de 20% a 30% na GESF familiar e 1% a 30% na GESF esporádica, estando associados com síndrome nefrótica resistente a corticosteroides (SNRC). Ainda não foi determinado no sul do Brasil a prevalência desses polimorfismos, assim como a sua correlação com aspectos de apresentação clínica, evolução e resposta ao tratamento.

Objetivo: Determinar a prevalência das variantes do gene *NPHS2* *p.R229Q*, *p.A242V* e *p.R138Q* em pacientes portadores de GESF nas suas formas familiar e esporádica, correlacionando o genótipo específico com as diferentes formas de apresentação clínica, resposta ao tratamento imunossupressor e desfechos clínicos.

Métodos: Estudo transversal de prevalência. Foram incluídos no estudo 40 crianças e 70 adultos com diagnóstico de GESF confirmada por biópsia renal. Foram avaliados idade

de surgimento da doença, síndrome nefrológica de apresentação, nível de proteinúria, taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) pela CKD-EPI (ml/min/1,73m²), resistência ao corticosteroide (SNCR) e desfechos clínicos. A genotipagem dos três *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) foi realizada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT), analisando-se duas variantes localizadas no exon 5 - p.R229Q (rs61747728) e p.A242V (rs61747727), e uma variante localizada no exon 3 - p.R138Q (rs74315342). A presença da variante foi correlacionada com a etnia, a forma de apresentação clínica, a resposta ao tratamento e aos desfechos renais.

Resultados: Das 40 crianças analisadas, 8 (20%) apresentavam GESF familiar e 32 (80%) esporádica. A mediana de idade foi 15 (10-21) anos e a idade de início dos sintomas de 6 (2-11) anos. Nos adultos, a mediana de idade foi 47 (38-63) anos e a idade de início dos sintomas de 40 (27-50). Apenas 3 (4,3%) apresentavam GESF familiar e 67 (95,7%) a forma esporádica. Quarenta e nove (70%) dos adultos e 36 (90%) das crianças tinham SNRC. Nos pacientes com menos de 18 anos, a presença das variantes foi encontrada em apenas 2 (5%) com GESF esporádica (nenhum paciente com GESF familiar), um com p.R229Q e outro com p.A242V. Nos adultos, as variantes analisadas estavam presentes em 9 pacientes (12,9%), todos com GESF esporádica, sendo 4 com p.R229Q e 5 com p.A242V. Nenhum paciente apresentou a variante p.R138Q. Quando analisados os pacientes com menos de 18 anos não transplantados, não houve diferença estatística comparando pacientes com presença ou ausência da variante em relação à idade de início dos sintomas, proteinúria, função renal, uso de imunossupressão ou evolução para doença renal crônica terminal. Entre os adultos, nenhuma diferença foi observada também, apenas uma tendência de maior proteinúria ao final do seguimento ($p=0,06$) nos casos com as variantes. Comparando o uso prolongado de ciclosporina (> 3 anos) entre pacientes portadores das variantes ($n=4$, 36,4%) e aqueles sem variantes ($n=17$, 17,2%), não houve

diferença estatística entre os grupos ($p=0,124$). Em relação à etnia, 17% dos afrodescendentes eram portadores das variantes contra 8% dos pacientes caucasianos ($p=0,184$). Todos os pacientes portadores da variante p.R229Q eram brancos, e 67% dos portadores da variante p.A242V negros.

Conclusão: Nesses pacientes portadores de GESF familiar ou esporádica, a prevalência das variantes p.R229Q e p.A242V em crianças foi 5% e em adultos 12,9%; nenhum paciente apresentou a variante p.R138Q. Não houve associação da presença das variantes do gene *NPHS2* com etnia ou dependência do tratamento imunossupressor com ciclosporina.

ABSTRACT

Introduction: Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is a pattern of glomerular injury, associated with various etiologies that may present as a primary condition or secondary to other diseases. Primary FSGS has heterogeneous clinical manifestations, especially regarding response to immunosuppressive therapy and progression to end-stage renal disease (ESRD). Recently, hereditary forms and the molecular bases of FSGS have been defined in association with the *NPHS2* gene. The *NPHS2* gene encodes podocin, a protein located in the podocyte slit diaphragm that is essential for the structural organization of the podocyte and maintenance of its cytoskeleton. Variants of this gene such as p.R229Q, p.R138Q and p.A242V alleles are found in 20% to 30% of cases of familial FSGS and 1% to 30% of cases of sporadic FSGS, and are associated with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS). The prevalence of these variants has not yet been assessed in southern Brazil, nor has their correlation with clinical presentation, disease course, and response to treatment.

Objective: To determine the prevalence of the *NPHS2* gene variants p.R229Q, p.A242V and p.R138Q in patients with familial and sporadic FSGS, and to investigate whether specific genotypes correlates with different clinical presentations, response to immunosuppressive treatment and clinical outcomes.

Methods: Cross-sectional prevalence study. The sample consisted of 40 children and 70 adults diagnosed with FSGS confirmed by renal biopsy. Age at disease onset, nephrological presentation syndrome, proteinuria, estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the CKD-EPI equation ($\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$), steroid resistance (SRNS), and

clinical outcome were evaluated. Genotyping for the three single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Two variants were localized in exon 5 -p.R229Q (rs61747728) and p.A242V (rs61747727) – and one in exon 3 -p.R138Q (rs74315342). These variants were correlated with ethnicity, clinical presentation, treatment response and renal outcomes.

Results: Among the 40 children analyzed, 8 (20%) had familial FSGS and 32 (80%) had sporadic FSGS. The median (interquartile range) age was 15 (10-21) years, and the age at symptom onset, 6 (2-11) years. Among adults, the median age was 47 (38-63) years and the age at symptom onset was 40 (27-50) years. Only 3 (4.3%) had familial FSGS; 67 (95.7%) had the sporadic form. Overall, 49 adults (70%) and 36 children (90%) had SRNS. Among children, variants were detected in only 2 (5%) with sporadic FSGS: p.R229Q in one and p.A242V in another. No children with familial FSGS carried any variant. Among adults, variants were present in 9 patients (12.9%), all with sporadic FSGS: 4 had p.R229Q and 5 had p.A242V. No patient had the p.R138Q variant. Comparing non-transplanted patients under 18 years of age with or without variants, there was no significant difference in age at symptom onset, presenting syndrome, laboratory findings, treatment performed, or clinical outcome at the end of follow-up. Among adults, no difference was observed as well, only a trend of higher proteinuria at the end of follow-up ($p=0.06$) in cases carrying a variant. Comparing prolonged cyclosporine use (> 3 years) between patients with variants ($n=4$, 36.4%) and those without variants ($n=17$, 17.2%), there was no statistical difference between the groups ($p=0.124$). In relation to ethnicity, 17% of African descendants had variants against 8% of Caucasian patients ($p=0.184$). All patients carrying the p.R229Q variant were white, while 67% of carriers of the p.A242V variant were black.

Conclusion: In these patients with familial or sporadic FSGS, the prevalence of p.R229Q and p.A242V variants in children was 5% and in adults 12.9%; no patient presented the p.R138Q variant. There was no association between the presence of *NPHS2* variants with ethnicity or dependence on immunosuppressive treatment with cyclosporine.

Keywords: focal segmental glomerulosclerosis, podocin, *NPHS2*, polymorphisms, mutations, p.R229Q, p.A242V

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes da estrutura do glomérulo.....	19
Figura 2. Esquematização da podocina e a interação com outras proteínas da fenda diafragmática.....	21
Figura 3. Formas histológicas de GESF.....	23
Figura 4. Mapa conceitual do estudo.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas	18
Tabela 2. Características das variantes pesquisadas.....	25
Tabela 3. Frequência dos alelos estudados do gene NPHS2 por área geográfica e população estudada.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
NPHS1	Gene da nefrina
NPHS2	Gene da podocina
CD2AP	Proteína associada a CD2
ACTN4	alfa actinina-4
TRPC6	Transient Receptor Potential Cation Channel, member 6
PLCE1	Fosfolipase C épsilon
DRCT	Doença renal crônica terminal
SNRC	Síndrome Nefrótica Resistente a Corticosteróides
SNSC	Síndrome Nefrótica Sensível a Corticosteróides
MBG	Membrana basal glomerular
IPC	Índice proteinúria/creatininúria
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms

SUMÁRIO

1.Introdução	15
2.Revisão da Literatura	17
2.1.Barreira de Filtração Glomerular.....	19
2.2.O gene.....	20
2.3.Células Epiteliais Podocitárias	21
2.4.Glomeruloesclerose Segmentar e Focal	22
2.5.Mutações Genéticas e Variantes Polimórficas do Gene NPHS2 na Glomeruloesclerose Segmentar e Focal e na Síndrome Nefrótica resistente a corticosteróide	24
3.Marco Conceitual	32
4.Justificativa	34
5.Objetivos	36
5.1. Objetivo Geral	36
5.2. Objetivos Específicos	36
6.Referências	37
7. Artigo	43
8.Considerações finais	69
9. Perspectivas	71
10. Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

A Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) é um padrão de lesão glomerular que tem diferentes etiologias, e é definido pela presença de aumento da matriz mesangial e esclerose segmentar no glomérulo, acometendo alguns mas não todos os glomérulos renais. A GESF pode ser uma doença primária ou idiopática, ou ser secundária à outras doenças, incluindo obesidade, infecção pelo HIV, nefropatia do refluxo, hipertensão arterial sistêmica grave ou redução de massa renal [1].

A GESF primária apresenta manifestações clínicas bastante heterogêneas, especialmente em relação à resposta à terapia imunossupressora, progressão para doença renal crônica terminal (DRCT) e recorrência da doença após transplante renal. Aproximadamente 10 a 20% das crianças e 40% dos adultos não atingem remissão sustentada após a terapia com corticosteróides; mais de 60% de todos os casos evoluem para doença renal crônica terminal em 10 anos [2], e a recorrência da doença após o transplante é observada em 30% dos pacientes [3].

Embora a apresentação primária seja considerada como uma doença esporádica, formas hereditárias de GESF têm sido frequentemente reconhecidas. Recentemente, ocorreram avanços na definição da base molecular da genética da GESF [4], sendo descobertas as moléculas que provêm à manutenção estrutural e funcional dos podócitos em seus diferentes domínios. Na fenda diafragmática foram descritas a nefrina, codificada pelo gene NPHS1, a podocina (NPHS2), a proteína associada a CD2 (CD2AP); no citoesqueleto, α -actinina-4 (ACTN4); na membrana luminal o receptor transitório potencial do canal 6 (TRPC6). A mutação no gene que codifica a fosfolipase C épsilon (PLCE1) também está associada a síndrome nefrótica na infância [5, 6, 7, 8, 9, 10].

Mutações e polimorfismos nesses diferentes genes resultam em síndrome nefrótica congênita ou síndrome nefrótica resistente a corticosteróides (SNRC), com progressão para doença renal crônica terminal e necessidade de terapia renal substitutiva.

A podocina é uma proteína localizada na fenda diafragmática a qual une dois podócitos adjacentes, e é necessária para organização estrutural do podócito e para a regulação da filtração glomerular. A sua interação com as proteínas Neph1, CD2AP e TRPC6 sinaliza alterações mecânicas, polaridade celular, organização do citoesqueleto e sobrevivência do podócito. Mutações no gene NPHS2 foram inicialmente descritas na infância, em crianças com síndrome nefrótica resistente a esteróides de início precoce, e alteração histopatológica nas biópsias renais consistente com GESF [10]. Entretanto, casos de início tardio, na segunda a quinta décadas de vida, têm sido descritos, mas a frequência das mutações em cada faixa etária descrita na literatura é muito variável, diferindo nas diversas etnias e regiões do mundo em que as mutações e variantes polimórficas são determinadas.

Diversos estudos multicêntricos têm investigado as causas monogênicas de SNRS, buscando estabelecer uma relação do genótipo/fenótipo em crianças e adultos com GESF familiar e esporádica. A análise de mutações do gene NPHS2 em seus 8 éxons e também de variantes polimórficas tem sido foco de intensa pesquisa desde o início da década de 2000 [5,11-20]. Estes estudos realizaram múltiplas análises de mutações e variantes polimórficas do gene NPHS2 que codifica a podocina em pacientes com GESF, crianças e adultos, familiares e controles normais. Os indivíduos afetados, na sua maioria, são heterozigotos compostos para a variante p.R229Q e uma mutação patogênica, p.A284V ou p.A242V. Outras mutações, como a R138Q, também tem sido associadas à GESF, principalmente em crianças e adultos jovens. A frequência da causa monogênica de GESF no estudo de Sadowski[20], o maior estudo multicêntrico internacional

realizado até o momento e publicado recentemente, foi 29,5% em famílias com SNRC antes dos 25 anos de idade, variando inversamente com a faixa etária.

As alterações estruturais que as mutações do NPHS2 causam nas proteínas dos diferentes domínios do podócito são marcadas. Os defeitos na podocina afetam a distribuição das proteínas nos microdomínios do podócito, reduzindo a expressão glomerular de nefrina, CD2AP e alfa-actinina-4. Esse efeito demonstra o papel crucial da podocina na organização do diafragma em fenda do podócito e o seu papel na preservação do filtro glomerular[17].

Estudos de grandes coortes de pacientes com GESF, familiares e controles normais, diversificadas por idade, sexo, raça, resposta à terapia imunossupressora e risco de recorrência após o transplante renal são necessários para definir o significado clínico das observações iniciais. A análise hereditária da SNRC pode revelar potenciais terapias futuras para o tratamento desses casos e necessidade de pesquisar a causa genética nos indivíduos com GESF.

Neste contexto, o reconhecimento que doenças glomerulares como a GESF podem estar associadas a diferentes genótipos com base em combinações de mutações e variantes alélicas, ou na sua apresentação isolada, pode constituir uma ferramenta útil para determinar a evolução e o prognóstico destes pacientes, com diferentes respostas às intervenções clínicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A estratégia de busca envolveu bases de dados como: SciELO, LILACS e MEDLINE (site PubMed), utilizando palavras chave como "NPHS2", "NPHS2 and Nephrotic Syndrome", "Nephrotic Syndrome", "Focal Segmental Glomerulosclerosis", "FSGS", "Steroid-resistant", "Steroid-resistant Nephrotic Syndrome", "Mutation of

NPHS2”, “R229Q”, “R138Q”, “A242V”, “Podocin”, "Podocin and mutation", "Podocin and R229Q", “Podocin and R138Q”, “Podocin and A242V”, "NPHS2 and R229Q", “NPHS2 and R138Q” e “NPHS2 and A242V” e termos relacionados, entre 2014 e 2018.

A tabela 1 resume a estratégia de busca das referências bibliográficas relacionados às bases que fundamentam o objetivo do estudo.

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas

Palavras-chave	Pubmed	SciELO	LILACS
“ <i>NPHS2</i> ”	142	12	16
“ <i>NPHS2</i> ” and “Nephrotic Syndrome”	332	10	3
“Nephrotic Syndrome”	21941	276	484
“Focal Segmental Glomerulosclerosis”	6945	90	139
"FSGS"	2450	32	30
"Steroid-resistant"	2957	58	51
“Steroid-resistant Nephrotic Syndrome”	1306	36	24
“Mutation of <i>NPHS2</i> ”	256	4	2
“R229Q”	60	8	0
“R138Q”	30	9	2
“A242V”	6	136	8
“Podocin”	960	9	7
"Podocin" and “mutation"	248	4	4
"Podocin" and “R229Q"	40	3	0
“Podocin” and “R138Q”	19	0	0
“Podocin” and “A242V”	1	0	0
" <i>NPHS2</i> " and “p.R229Q"	42	2	0
“ <i>NPHS2</i> ” and “p.R138Q”	21	0	0
“ <i>NPHS2</i> ” and “p.A242V”	1	0	0
“ <i>NPHS2</i> ” and “FSGS”	128	2	0
“Podocin” and “FSGS”	134	3	1

2.1. Barreira de filtração glomerular

O glomérulo consiste em um conjunto de capilares em forma de alças sustentadas por células e matriz mesangial no seu eixo axial. Enquanto o plasma circula nos capilares glomerulares, a pressão intracapilar dirige o plasma através da barreira de filtração para o espaço urinário de Bowman. O primeiro componente da barreira, as células do endotélio glomerular fenestrado, separa o sangue das demais camadas do filtro e depois do compartimento intersticial e tubular. O papel das células endoteliais na filtração seletiva não parece ser substancial, uma vez que elas são altamente fenestradas e permeáveis à água e a pequenos solutos. Entretanto, estudos têm evidenciado que alterações morfológicas da célula endotelial, tornando a superfície da célula carregada negativamente, podem acarretar consequências funcionais para a permeabilidade glomerular [21].

O endotélio é completamente envolvido pela segunda camada, a membrana basal glomerular (MBG). Esta estrutura densa de componentes da matriz extracelular fornece suporte estrutural para os capilares para manter a pressão intravascular local (Figura 1). Os principais componentes da MBG (colágeno tipo IV, laminina, nidogênio e proteoglicanos) contribuem para a permeabilidade seletiva baseada em carga e tamanho. Anormalidades estruturais na MBG podem levar à proteinúria e hematúria [22-24].

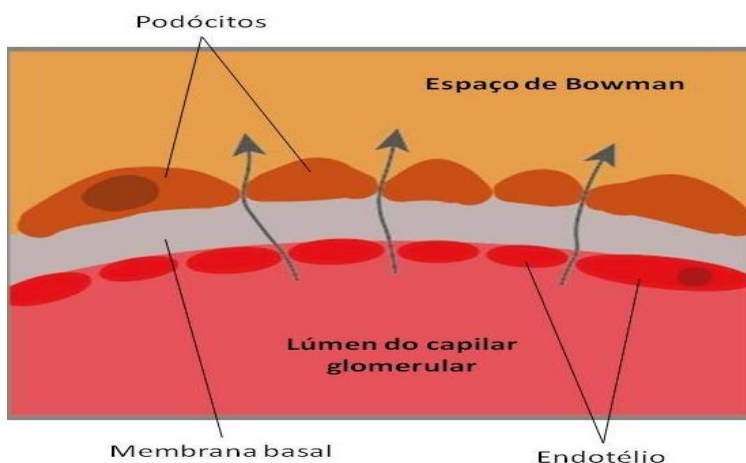


Figura 1. Componentes da estrutura do glomérulo

A disfunção na permeabilidade da barreira de filtração glomerular do rim acarreta a perda de proteínas plasmáticas através da urina, que pode se manifestar clinicamente como albuminúria, proteinúria patológica ou síndrome nefrótica. Muitos mecanismos patogênicos podem afetar as estruturas do capilar glomerular levando a proteinúria, mas das três camadas do filtro – endotélio, membrana basal glomerular e células epiteliais ou podócitos – estes são indiscutivelmente críticos na fisiopatogênese da proteinúria[23,24].

2.2. O gene

O gene *NPHS2* (OMIM número 604766) está localizado no cromossomo 1q 25-q31 e, primeiramente, foi mapeado em famílias com padrão autossômico recessivo de síndrome nefrótica resistente a esteroides [25]. O gene *NPHS2* codifica a podocina, uma proteína de 42-kDa da família das estomatinas, de localização intracitoplasmática que está associada a componente lipídico e apresenta forma de “grampo de cabelo” (Figura 2). A podocina interage com a nefrina e com a *CD2AP*, facilitando a sinalização da nefrina para o meio intracelular. A interação entre nefrina e podocina resulta em uma estreita relação com filamentos de actina, o que promove estabilização estrutural do diafragma em fenda e mantém o funcionamento adequado do filtro glomerular [26,27].

A análise do sequenciamento da podocina indica a presença de 383 aminoácidos, com domínios C e N terminais [28]. O gene tem 8 éxons e codifica a proteína de membrana podocina que está presente no tecido renal do feto até a idade adulta, exclusivamente no glomérulo, mais especificamente nos pedicelos dos podócitos da membrana basal, sendo responsável pela barreira de carga e de tamanho da filtração glomerular [26,27]. A podocina é fundamental para manutenção da barreira de filtração glomerular.

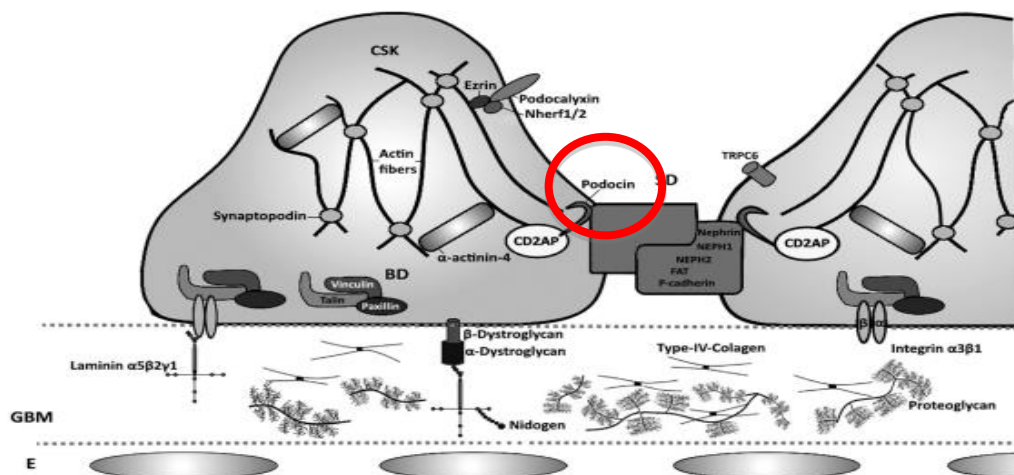


Figura 2. Esquemática da podocina e a interação com outras proteínas da fenda diafragmática.

2.3. Células epiteliais podocitárias

A descoberta de novas proteínas críticas no processo de permeabilidade glomerular faz dos podócitos o terceiro e o principal constituinte da barreira de filtração glomerular. Os podócitos são células terminais, altamente especializadas, com extensões citoplasmáticas chamadas de processos podálicos ou pedicelos. Estas células têm um papel importante na permeabilidade seletiva carga e tamanho dependente, além de sintetizar e manter a MBG[23,24]. Embriologicamente os podócitos derivam das células mesenquimais, e o corpo celular do podócito maduro situa-se no espaço urinário no lado luminal. O domínio basal do podócito está ancorado na MBG por $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e α , β -dístroglicanos [29].

O espaço interdigital entre os pedicelos é formado por poros de 25-40 nm de largura[22], também chamados de fenda diafragmática, cuja estrutura assemelha-se a uma membrana tipo zíper [30]. Neste diafragma em fenda estão expressas proteínas como nefrina, podocina, *Neph1*, *CD2AP* e Zona Ocludens-1, entre outras [31]. Diversas proteínas mantêm a arquitetura podocitária através de ligações com a actina no

citoesqueleto, como a sinaptopodina, que se conecta com a membrana luminal, e a alfa actinina-4, próxima à membrana basal. A alfa actinina-4 atua na regulação da morfologia e da motilidade do podócito, e também na cascata de sinalização intracelular.

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devida à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônicas, como a podocalixina, podoplanina e podoendina [29,31]. Essa carga negativa limita a passagem de albumina, molécula carregada negativamente, e mantém a separação física dos podócitos adjacentes. O *Transient Receptor Potential Cation Channel Member 6 (TRPC6)* está localizado na membrana luminal do podócito. Comunica-se com a alfa-actinina do citoesqueleto sendo assim uma molécula sinalizadora, ao mesmo tempo mantém a arquitetura do podócito e a integridade do filtro glomerular [31,32].

2.4. Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

A Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) não é uma doença e sim um padrão de lesão glomerular induzido por diversos tipos de injúria renal, tendo como causas alterações imunológicas (na forma primária) ou decorrente de diversas doenças sistêmicas (na forma secundária), de etiologia tanto imunológica como não imunológica. Pode-se apresentar através de cinco variantes histológicas (Figura 3), causar síndrome nefrótica e apresentar distintos desfechos clínicos [33,34]. A classificação morfológica mais utilizada é conhecida como classificação de Columbia [35]: forma colapsante (COL), celular (CEL), *tip lesion* (TIP), peri-hilar (PHI) ou sem outra especificação, esta a forma clássica (iNOS). No entanto, segundo Arias [36] a aparência histológica não parece ser um bom marcador clínico de prognóstico na GESF.

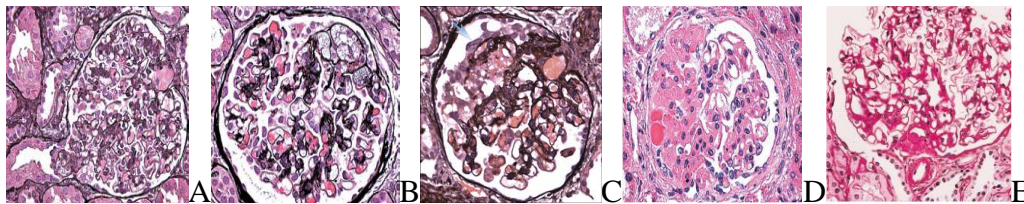


Figura 3. Formas histológicas de GESF: A.Tip Lesion, B.Celular, C.Colapsante, D. iNOS (sem outra especificação), E.Peri-hilar

O diagnóstico de GESF é definido pela histopatologia renal, em que se descrevem esclerose focal e segmentar, aumento de matriz mesangial, esclerose e/ou hialinose e poucos depósitos imunes na imunofluorescência, em geral IgM e C3 de forma granular [36]. A GESF é uma causa comum de Síndrome Nefrótica Resistente a Corticosteróides (SNRC), especialmente na população pediátrica, onde a prevalência de falha do tratamento chega a 60-70% [37, 38].

A etiopatogenia da GESF envolve três categorias: idiopática ou esporádica, genética e secundária [34,37]. Estudos identificando o envolvimento genético no desenvolvimento de síndrome nefrótica resistente ao tratamento imunossupressor têm contribuído para o entendimento da fisiopatologia desta doença, especialmente o papel das mutações de diversas proteínas dos podócitos. No diafragma em fenda, a nefrina (*NPHS1*)[4], a podocina (*NPHS2*)[5] e a proteína associada a CD2 (*CD2AP*)[7]; no citoesqueleto a α -actinina-4 (*ACTN4*)[6]; na membrana luminal o receptor transitório potencial do canal 6 (*TRPC6*) [31]. A mutação no gene que codifica a fosfolipase C épsilon (*PLCE1*) também tem sido estudada[9]. Na última década, estudos de associação genético têm identificado estes genes como envolvidos diretamente na fisiopatologia da GESF.

A SNRC é uma das doenças de mais difícil tratamento em Nefrologia, constituindo a segunda causa mais frequente de Doença Renal Crônica Terminal (DRCT)

nas duas primeiras décadas de vida [39]. Nos pacientes com SNRC a apresentação histológica mais frequente é a GESF[20].

Nos pacientes com GESF esporádica o risco de recorrência da doença após transplante renal é estimado em 11% a 50%, evento que pode levar a DRCT [40,41]. Entretanto, nos pacientes com GESF de forma hereditária o risco de recorrência após transplante renal é substancialmente menor comparado a GESF esporádica [19,42]. Assim, a identificação da mutação gênica como agente causal da SNRC traz consequências terapêuticas em muitos casos. Entre estas, a contra-indicação de um re-tratamento da GESF com imunossupressores, assim evitando uma exposição desnecessária à imunossupressão e aos eventos adversos das drogas, e o planejamento de um transplante precoce de doador vivo, principalmente em crianças.

2.5. Mutações genéticas e variantes polimórficas do gene *NPHS2* na GESF e SNRC

Em 2000, Boute et al. [5] mapearam pela primeira vez o gene *NPHS2* da podocina identificando-o por clonagem posicional no cromossomo 1q25-31. Esses autores também relataram dez diferentes mutações do *NPHS2*, do tipo *nonsense*, *frameshift* e *missense*, que segregavam com a SNRC. Mutações do tipo *missense* representam o maior grupo das mutações do gene da podocina, em um total de 53 diferentes mutações descritas (42%)[5].

O polimorfismo p.A242V (c.725C>T) no éxon 5, representa a substituição de uma Citosina por Timina na posição 725, o polimorfismo p.R138Q (c.413G>A) no éxon 3, resulta da substituição de uma Guanina por uma Adenina na posição 413 e a variante p.R229Q (c.686G>A) no éxon 5, resulta da substituição de Guanina por uma Adenina na posição 686.

Tabela 2. Características genéticas das três variantes pesquisadas

	p.R138Q	p.R229Q	p.A242V
RS	74315342	61747728	61747727
Tipo	Missense	Missense	Missense
Éxon	3	5	5
Nucleotideo	c.413G>A	c.686G>A	c.725C>T
Abraoon	X	0,02	0,018

O polimorfismo R138Q é o mais prevalente em estudos com europeus [43]. A variante p.R229Q foi o polimorfismo prevalente em indivíduos caucasianos, e este achado também foi descrito no Brasil[12]; a sua frequência em europeus e americanos varia de 0,03 a 13% [11,44]. Estes autores postularam que o efeito da variante p.R229Q é de redução da ligação da nefrina à podocina, o que pode contribuir para o desenvolvimento de GESF[11]. Um estudo realizado na França avaliando 455 famílias com SNRC ou sem recorrência de GESF após transplante renal mostrou que em pacientes com SNRC, a heterozigose para a variante p.R229Q em um alelo e uma mutação patogênica em outro alelo foi a combinação prevalente nos casos cuja síndrome nefrótica iniciou mais tardiamente e evoluiu para DRCT, comparado àqueles com duas mutações patogênicas[13].

Em 2002, Tsukaguchi et al. [11] analisaram 30 famílias com GESF associada a mutações com herança autossômica recessiva e em 91 pacientes com GESF primária como controles. O alelo R229Q foi associado à doença em 9 famílias, e em 6 delas os indivíduos afetados eram heterozigotos compostos para R229Q, já nos controles apenas 3,6% apresentavam o alelo. Nesse estudo, foi sugerido que o polimorfismo comum R229Q contribui para o desenvolvimento de GESF em associação com um segundo alelo

mutante do gene NPHS2. Um grupo da Espanha[14] sugeriu que a idade pode estar relacionada com o genótipo da doença. Crianças com menos de 6 anos foram carreadoras de duas mutações patogênicas, aquelas com início mais tardio da GESF (6-18 anos) duas mutações patogênicas ou uma mutação associada com a variante p.R229Q em heterozigose, e adultos com mais de 18 anos eram carreadores da variante p.R229Q e uma mutação patogênica, mais frequentemente p.A284V[14]. Idade maior no início da doença e menor progressão para DRCT foi observado em pacientes com uma mutação patogênica e a variante p.R229Q quando comparado a duas mutações patogênicas do gene NPHS2.

Em um estudo multicêntrico americano [45] avaliando 371 pacientes com GESF de início tardio, foram identificados 15 alelos não sinônimos com mudança na sequência de aminoácidos em 63 (17%) dos casos. Os alelos mais frequentes foram p.R138Q, p.VI80M, p.R229Q, p.E237Q, p.A242V, p.A284V, p.L327F e o *frameshift* 855-856 delAA), sendo descritos também mais 7 novos alelos. As mutações do NPHS2 foram associadas à GESF familiar e esporádica em 8% e 2,8% das famílias, respectivamente. Em 3,2% dos pacientes com GESF, as variantes p.R229Q e p.A242V foram associados a doença, em contraste com a população geral e em diabéticos, nos quais estes polimorfismos não foram fator de risco para proteinúria ou disfunção renal, sugerindo assim uma associação específica com GESF primária⁴².

Em outro estudo multicêntrico, Ruf et al. [19] realizaram sequenciamento para análise de mutações do gene NPHS2 em 190 pacientes com SNRC de 165 famílias diferentes, comparado a 124 pacientes com Síndrome Nefrótica Sensível a Corticosteróides (SNSC) de 120 famílias. Mutações homozigóticas ou heterozigóticas compostas em NPHS2 foram detectadas em 26% das famílias, e em nenhum caso de SNSC. As mutações prevalentes foram R138Q e R229Q em indivíduos com idade variando entre 1 e 24 anos; 36% evoluiu para DRCT (versus 1,6% dos casos de SNSC) e

houve recorrência de GESF após o transplante renal em 8% dos pacientes com mutações versus 35% dos sem mutações, o que fundamenta a estratégia de indicar o transplante nos pacientes com essas mutações após a sua genotipagem.

A mutação do *NPHS2* parece ser mais rara em adultos com GESF esporádica ou mesmo familiar, diferente do observado em crianças, o que é um dado ainda controverso. O estudo publicado por He et al. [15] mostrou que em 87 adultos com GESF idiopática (15 SNSC, 63 SNRC, e 9 casos de GESF familiar), a mutação em heterozigose composta R229Q foi detectada em apenas 1 paciente com SNSC, sem mutações em homozigose. R229Q foi descrito em 80% dos 10 potenciais alelos mutantes detectados, como G124A, Q285fsX302, C122G, G709C e G928A. Outros estudos mostraram que neste grupo de pacientes, a frequência de mutações em homozigose ou em heterozigose do gene *NPHS2* na SNRC varia entre 30-46% na forma familiar e 10-30% na esporádica [10,16]. No estudo de Caridi et al. [16], avaliando 9 pacientes com GESF esporádica, foram descritas as mutações 419delG (*frameshift* em 3 pacientes), R138Q (substituição de aminoácido no códon 169 em 5 pacientes), e L169P (substituição de aminoácido em 1 paciente). Dois pacientes permaneceram com SNRC, sete evoluíram para DRCT aos 9 anos de idade e foram transplantados, dois dos quais recorreram GESF no enxerto mas que remitiram com plasmaférese e ciclofosfamida.

Um estudo multicêntrico americano conduzido por McKenzie et al. [18] avaliou casos esporádicos de GESF de início tardio, identificando 18 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) por re-sequenciamento em 377 pacientes com GESF confirmada por biópsia, comparado a 919 controles. Pacientes afro-americanos e euro-americanos que eram carreadores da mutação R138Q tinham maior prevalência de GESF em relação a indivíduos normais (Razão de chances=4,9, P=0,06); entretanto, a heterozigose para outras mutações tipo *missense* foi igualmente distribuída entre casos e controles. Outros

polimorfismos, inclusive p.R229Q e p.A242V, não foram associados com GESF esporádica e resistência ao tratamento neste estudo.

No Brasil, Monteiro et al [46] analisaram mutações do gene *NPHS2* em 39 adultos com GESF primária, assim como sua evolução clínica e resposta ao tratamento. A frequência do alelo p.R229Q foi muito baixa, 0,026 (2 casos em 39), e nenhum caso apresentou o alelo p.A284V. Esses achados não foram dependentes da resposta ao tratamento imunossupressor, e os autores sugeriram que, pela sua raridade, a pesquisa de mutações do *NPHS2* não deva fazer parte da rotina diagnóstica de adultos com GESF. Em um estudo brasileiro do Instituto do Coração de São Paulo, em conjunto com o Brigham and Women's Hospital de Boston, EUA, e com a Universidade Federal do Espírito Santo, Pereira et al. [12]descreveram uma forte associação entre o alelo R229Q e a presença de microalbuminúria ($p=0,008$). A razão de chances do risco de microalbuminúria foi de 2,77 (1,21-6,34, $p=0,02$), ajustado para a idade, etnia, hipertensão, obesidade e diabetes em modelo de regressão logística. Os autores sugerem que a variante R229Q pode predispor a microalbuminúria na população geral.

Os achados de Santin[14] e de Tsukaguchi [11] sugerem que a análise das mutações de *NPHS2* tem utilidade clínica tanto na infância quanto na idade adulta. Para adultos, rastrear p.R229Q, e se positivo determinar a presença de p.A284V em combinação com p.R229Q, expressa uma apresentação fenotípica característica, que é o desenvolvimento de GESF, não resposta ao tratamento com corticosteróides ou outros imunossupressores, uma evolução rápida para DRCT e um baixo risco de recorrência após transplante renal. A determinação deste fenótipo auxiliaria de forma importante no manejo terapêutico, na contra-indicação de um retratamento e no planejamento precoce de um transplante renal com doador vivo relacionado.

Sadowski et al. [20] evidenciaram em um grande estudo multicêntrico internacional publicado em 2014, uma alta porcentagem de SNRC manifesta antes dos 25 anos causada por mutação de um gene único, e com prevalência inversamente proporcional a idade de apresentação. Nesse estudo foram mapeados e sequenciados exons em 1783 famílias com SNRC, tanto para o gene *NPHS2* como para mais 27 genes associados a causas monogênicas de SNRC, em diversos países: Estados Unidos, Inglaterra, Alemanha, Austrália, Nova Zelândia, Índia, América do Sul, e outros países da Ásia. Em relação à idade da amostra estudada, foram detectadas mutações causadoras de doença em 61,3% das crianças no primeiro ano de vida, em 25% entre 2 e 5 anos, 17% dos 7 aos 12 anos e aproximadamente 10% da amostra tinha mais de 12 anos de idade. Uma mutação genética causando a doença foi encontrada em 526 das 1783 famílias (29,5%), e em mais 89 familiares afetados. Esse estudo adicionou 129 novas mutações (11,6%) às 1115 previamente descritas no *Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.org>). Em relação a SNRC de gene único, foram encontradas mutações específicas no gene *NPHS2* em 170 (42%) famílias. Quanto à distribuição dos alelos mais frequentes por região, identificaram-se Arg138Gln (Europa), Pro118Leu (Turquia), Val180Met (África do Norte), e Gly140Aspfs*41 (países da sul da Europa). O estudo mostrou uma correlação negativa entre a probabilidade de identificar a mutação gênica como causa da doença e a idade de início da proteinúria. Este estudo concluiu que quanto mais cedo a idade de apresentação, maior a probabilidade que as mutações causais podem ser detectadas. Entretanto, mesmo em adultos jovens a taxa de detecção da mutação situou-se em torno de 10%.

Em outros países como a Índia, a análise de mutações do *NPHS2* foi realizada em 484 pacientes com síndrome nefrótica primária para quatro mutações do tipo *missense*: G92C, P118L, R138Q e D160G por PCR em tempo real. Estavam presentes em 14% dos

pacientes (e em nenhum dos controles), sendo G92C em 7%, P118 L em 4%, R138Q em 2% e D160G em 1%. Em conjunto, foram associadas a SNRC em 19% dos casos; nenhum paciente com SNCS apresentou qualquer mutação[47]. Em outro estudo publicado em 2018 envolvendo crianças da África do Sul e da Índia, foram sequenciados genes associados à GESF em 15 e 63 pacientes com SNSC e SNRC respectivamente. A mutação V260E em homozigose foi descrita em 8 de 30 crianças africanas com SNRC (27%); todos os portadores de SNRC eram carreadores da variante 260E/E. Combinando os grupos, 33% tinham a mutação V260E. Nenhum dos controles, tanto da África do Sul como da Índia, eram carreadores. Os portadores da mutação desenvolveram GESF em idade mais precoce (34 vs. 78 meses, $P=0,01$) e nenhum teve resposta total ou completa a corticosteróides (0 vs. 47% em relação aos sem mutação, $P=0,002$). Neste estudo, a variante *APOLI* também foi testada, mas não mostrou associação com síndrome nefrótica [48].

Em revisão recente, Guaragna et al. [49] descrevem em associação com GESF e SNCR 39 variantes, sendo 25 *missenses*, 4 *nonsenes*, 3 *splice-sites*, 4 *frameshifts* e 3 na região *promoter* publicadas até 2017, especificando além de sua frequência, a etnia e a localização geográfica. Na América Latina, apenas 4 estudos foram publicados até então, dois do Brasil, um do Chile e um do México, o que reforça a importância de mais estudos serem realizados nesse continente em busca da prevalência de mutações e polimorfismos associados a SNRC para orientar o tratamento imunossupressor e a indicação de transplante renal em pacientes portadores, considerando a ausência de resposta ao tratamento e a um risco muito baixo de recorrência da GESF no enxerto em pacientes portadores das mutações ou polimorfismos.

Tabela 3. Frequência dos alelos estudados do gene NPHS2 por área geográfica e população estudada

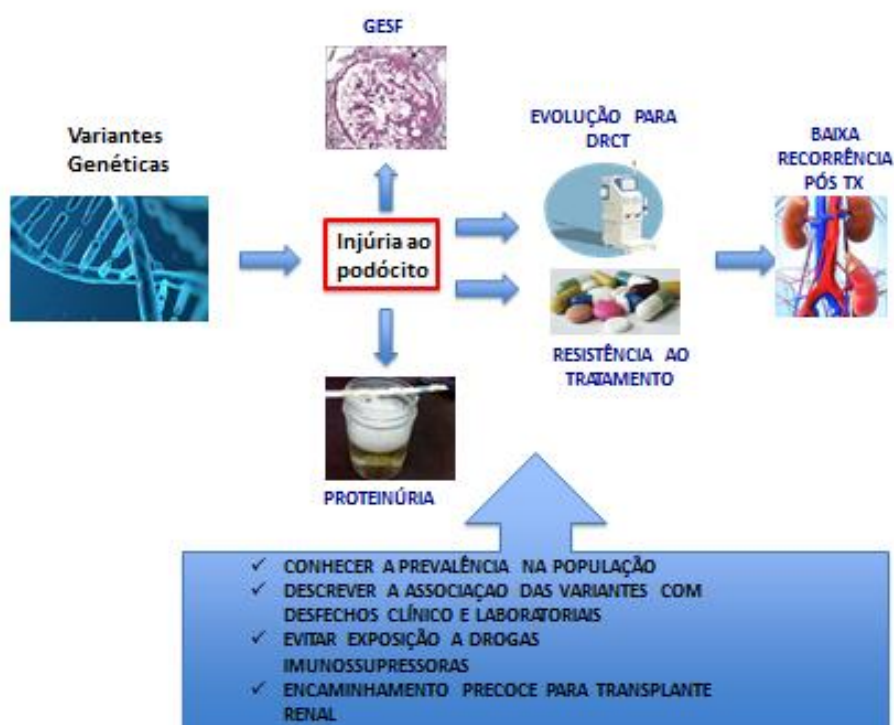
Variante	País	Etnia	N	Frequência do alelo	Referência
R138Q	EUA	Eurodescendente	272	0.002 (0.00 a 0.005)	NIH
	EUA	Afrodescendente	75	0.002 (0.00 a 0.009)	NIH
	Alemanha	Europeus	100	Não observado	Karle et al
R229Q	EUA	Afrodescendente	32	0.016 (0.01 a 0.05)	Tsukaguchi et al
	Brasil	Não informado	49	0.031 (0.00 a 0.07)	Tsukaguchi et al
	EUA	Afrodescendente	634	0.013 (0.007 a 0.02)	NIH
	EUA	Eurodescendente	272	0.039 (0.02 a 0.06)	NIH
	EUA	Afrodescendente	96	0.005 (0.00 a 0.01)	Dusel et al
	Alemanha	Europeus	100	0.03 (0.006 a 0.05)	Karle et al
	França	Europeus	160	0.038 (0.02 a 0.06)	Weber et al
	Brasil	Afrodescendente	NI	0.025	Pereira et al
A242V	EUA	Eurodescendente	282	0.002 (0.00 a 0.006)	NIH
	EUA	Afrodescendente	603	0.062 (0.05 a 0.08)	NIH
	EUA	Afrodescendente	278	0.087 (0.06 a 0.01)	Dusel et al
	França	Euro e Afrodescendentes	160	0.006 (0.00 a 0.01)	Weber et al
	França	Afrodescendente	75	0.04 (0.008 a 0.07)	Weber et al

3. MARCO CONCEITUAL

A Glomeruloesclerose segmentar e focal é uma doença renal que se apresenta como síndrome clínica e patológica de lesão primariamente glomerular, e compreende diversas variantes histológicas que evidenciam lesão podocitária. Conforme a resposta ao tratamento, podem ser classificadas entre síndrome nefrótica sensível a corticosteroide (SNSC) ou síndrome nefrótica resistente a corticosteroide (SNRC). A SNRC é a segunda causa mais frequente de doença renal crônica nas primeiras décadas de vida. As causas monogênicas relacionadas à SNRC e o estabelecimento de uma relação do genótipo/fenótipo em crianças e adultos com GESF familiar e esporádica têm sido motivo de diversos estudos em diversas regiões geográficas do mundo, envolvendo diferentes etnias, faixas etárias, formas de apresentação da doença, correlações com parâmetros clínicos e laboratoriais. Crescentes evidências mostram que as causas monogênicas de GESF apresentam-se como resistência ao tratamento imunossupressor convencional, evolução para doença renal crônica terminal e baixos índices de recidiva após o transplante renal, diferenciando esses pacientes do desfecho observado em pacientes portadores da mesma doença, mas sem a presença de polimorfismos ou mutações que interferem no seu desfecho clínico.

Nesse contexto, buscou-se avaliar a prevalência de polimorfismos na população de pacientes adultos e crianças portadoras de GESF primária em centros de Nefrologia nas cidades de Porto Alegre e de Pelotas, uma vez que não temos estudos no sul do Brasil estudos realizados com esse objetivo e nessa população de pacientes. Desta forma, é primordial avaliar o efeito da presença de polimorfismos na apresentação clínica da doença e na sua evolução ao longo do tempo.

A presente pesquisa avaliou a prevalência de polimorfismos do gene NPHS2 em pacientes com GESF esporádica ou familiar, levando em consideração formas de apresentação da doença, idade de apresentação, etnia, resposta à terapia imunossupressora e seus desfechos clínicos. A figura 4 representa esquematicamente o marco conceitual do estudo. Esse esquema foi elaborado com o objetivo de apresentar a base teórica que sustenta a investigação da pesquisa.



Mapa conceitual do estudo

4. JUSTIFICATIVA

O conjunto dos resultados dos estudos descritos no referencial teórico aponta para a necessidade de se realizar a análise de polimorfismos genéticos no contexto clínico da Glomeruloesclerose segmentar e focal primária pelo impacto que tem na evolução clínica dos paciente, tanto adultos como crianças. Primeiramente, questiona-se se o impacto da determinação do genótipo correlaciona-se de forma absoluta ou aproximada com o fenótipo dos indivíduos com GESF familiar ou esporádica. Se a resposta é positiva, estes pacientes provavelmente não responderão ao tratamento imunossupressor convencional, incluindo-se aqui corticosteróides, ciclosporina, tacrolimus e ciclofosfamida, podendo assim evitar tratamentos de elevada toxicidade pela baixa probabilidade de resposta clínica e laboratorial.

Segundo, se pacientes homozigotos ou heterozigotos compostos de mutações ou polimorfismos do gene *NPHS2* tem risco reduzido de recorrência de GESF no rim transplantado, comparado com pacientes sem essas variantes, o transplante renal de doador vivo relacionado deve ser considerado mais precocemente, principalmente em crianças.

Terceiro, o sequenciamento das variantes do gene *NPHS2* pode revelar, além do melhor entendimento da fisiopatologia da GESF, potenciais terapias e futuros tratamentos a serem investigados para esses pacientes.

No Brasil apenas dois trabalhos foram publicados sobre a genética da GESF/SNRC, realizados por dois grupos de São Paulo, Pereira et al¹² e Monteiro et al⁴³. Desta forma, a realização de um estudo multicêntrico no sul do Brasil se impõe pela necessidade de determinar-se que mutações genéticas e variantes polimórficas do gene *NPHS2* são prevalentes na nossa população de pacientes. Estes dados precisam ser

levantados de acordo com as diferentes formas de apresentação clínica, do diagnóstico, da evolução e do prognóstico, incluindo o acompanhamento de pacientes não respondedores ao manejo clínico que evoluíram para a necessidade de diálise e transplante renal.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a prevalência dos polimorfismos do gene *NPHS2* da podocina em pacientes portadores de Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) nas formas familiar ou esporádica, correlacionando os genótipos com as características clínicas desses pacientes.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1 Determinar a prevalência das variantes do gene *NPHS2* p.R229Q, p.R138Q e p.A242V em pacientes adultos e crianças portadores de Glomeruloesclerose Segmentar e Focal com e sem resistência ao tratamento com corticosteróides.

5.2.2 Avaliar a correlação entre genótipo e fenótipo de pacientes com Glomeruloesclerose Segmentar e Focal familiar ou esporádica, portadores destes polimorfismos, considerando idade de início da GESF, fatores demográficos e clínicos, presença de síndrome nefrótica, resposta ao tratamento imunossupressor, progressão para doença renal crônica terminal e índice de recorrência da GESF no rim transplantado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Braden GL, Mulhern JG, O'Shea MH, Nash SV, Ucci AA Jr, Germain MJ. Changing incidence of glomerular disease in adults. *Am J Kidney Dis* 2000; 35:878-883.
2. Somlo, S., and Mundel, P. Getting a foothold in nephritic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24:333-335.
3. Tejani A, Stablein DH. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation: a special report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:S258-S263.
4. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin – is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-582.
5. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-354.
6. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-256
7. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Koop JB, Miner JH et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003; 300: 1298-1300.
8. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawking AF et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308: 1801-1804.

9. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nürnberg G et al. Positional cloning uncovers mutations in *PLCE1* responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006; 38: 1397-1405.
10. Weber S, Gribouval O, Esquivel E, Morinière V, Tête MJ, Legendre C et al. *NPHS2* mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 66: 571-579.
11. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA et al. *NPHS2* mutation in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002; 110: 1659-1666.
12. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Pollak MR et al. *NPHS2* R229Q functional variant is associated with micro-albuminuria in the general population. *Kidney Int* 2004; 65: 1026–1030.
13. 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: 727–735.
14. Santín S, Tazón-Veiga B, Silva I, Cobo MA, Gimenez I, Ruiz P et al. Clinical value of *NPHS2* analysis in early and adult-onset steroid-resistant nephritic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 344-354.
15. He N, Zahirieh A, Mei Y, Lee B, Senthilnathan S, Wong B et al. Recessive *NPHS2* (Podocin) mutations are rare in adult-onset idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2:31-37.
16. 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 nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2742-2746.

17. Zhang S, Marlier A, Gribouval O, Gilbert T, Heidet L, Antignac C et al. In vivo expression of podocyte slit diaphragm-associated proteins in nephritic patients with NPHS2 mutation. *Kidney Int* 2004; 66: 945-954.
18. Mckenzie LM, Hendrickson SL, Briggs WA, Dart RA, Korbet SM, Mokrzycki MH et al. NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2987–2995.
19. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M et al. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 722–732.
20. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst WL, Gee HY, Kohl S et al. A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephritic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2014; 26: 1-10.
21. Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F111-116.
22. Löwik MM, Groenen PJ, Levtchenko EN, Monnens LA, Van den Heuvel LP. Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis – a review. *Eur J Pediatr* 2009; 168: 1291–1304.
23. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253–307.
24. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* 2006; 11: 274-281.

25. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, Gubler MC, Broyer M, Beckmann JS et al. Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 1995;4:2155-2158.
26. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459-1466.
27. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1621-1629.
28. Horinouchi I, Nakazato H, Kawato T, Iyama K, Furuse A, Arizono K et al. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular disease. *Kidney Int* 2003; 64: 2092-2099.
29. Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Disease. *Am J Nephrol* 2003; 23: 353-360.
30. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; 60: 423– 433.
31. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the Biology and Genetics of the Podocytopathies Implications for Diagnosis and Therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 201-216.
32. Mundel P, Reiser J, Borja AZM, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997; 236: 248-258.
33. D'Agati VD. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol* 2003; 23: 117-134.

34. Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, Ten Holder S, Jennette CE, Falk RJ et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int* 2006; 69: 920-926.
35. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JÁ, Jennette CE. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis* 2004; 43: 368–382.
36. Arias LF, Jiménez CA, Arroyave MJ. Histologic variants of primary focal segmental glomerulosclerosis: presentation and outcome. *J Bras Nefrol* 2013; 35(2): 112–119.
37. D'Agati VD. Pathobiology of focal segmental glomerulosclerosis: new developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21: 243-250.
38. Chesney R. The changing face of childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004; 66: 1294–1302.
39. Hamiwka LA, Midgley JP, Wade AW, Martz KL, Grisaru S. Outcomes of kidney transplantation in children with nephronophthisis: an analysis of the NorthAmericanPediatricRenalTrials and CollaborativeStudies (NAPRTCS) Registry. *Pediatr Transplant* 2008;12(8):878-882.
40. Cheong HI, Han HW, Park HW, Ha IS, Han KS, Lee HS et al. Early recurrent nephritic syndrome after renal transplantation in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 78-81.
41. Senggutuvan P, Cameron JS, Hartley RB, Rigden S, Chantler C, Haycock G at al. Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in transplanted kidneys: Analysis of incidence and risk factors in 59 allografts. *Pediatr Nephrol* 1990; 4: 21–28.

42. Höcker B, Knüppel T, Waldherr R, Schaefer F, Weber S, Tönshoff B. Recurrence or proteinuria 10 years post-transplant in NPHS2-associated focal segmental glomerulosclerosis after conversion from cyclosporin A to sirolimus. *Pediatr Nephrol* 2006; 21: 1476–1479.
43. Bouchireb K, Boyer O, Gribouval O, Nevo F, Huynh-Cong E, Moriniere V et al. NPHS2 mutation in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2014; 35: 178-186.
44. Franceschini N, North KE, Kopp JB, McKenzie L, Winkler C. NPHS2 gene, nephritic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet Med* 2006; 8: 63-75.
45. Tonna S, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ et al. NPHS2 variant in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrology* 2008; 9:13-22.
46. Monteiro EJ, Pereira AC, Pereira AB, Krieger JE, Mastroianni-Kirsztajn G. NPHS2 mutations in adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *J Nephrol* 2006; 19: 366-371.
47. Jaffer A, Unnisa W, Raju DSB, Jahan P. NPHS2 mutations analysis and primary nephrotic syndrome in Southern Indians. *Nephrology* 2014; 19: 398-403
48. Asharam K, Bhimma R, David VA, Coovadia HM, Qulu WP, Naicker T et al. *NPPHS2* V260E Is a Frequent Cause of Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome in Black South African Children. *Kidney Int Reports* 2018; 3: 1354-1362
49. Guaragna MS, Lutaif AC, Maciel-Guerra AT, Belangero VM, Guerra-Junior G, de Mello MP. NPHS2 Mutations: A Closer Look to Latin American Countries. *BioMed Res Int* 2017; 7518789. doi: 10.1155/2017/7518789.

7. ARTIGO EM INGLÊS

***NPHS2* Gene Polymorphisms in Sporadic and Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis**

Rafael de Almeida¹, Thiago Pereira Itaquy², William Cardoso da Silva², Henrique Iahnke Garbin², Fernanda dos Santos Pereira³, Clotilde Druck Garcia⁴, Elizete Keitel⁴, Francisco Veríssimo Veronese^{1,2,3}

¹Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Hospital Dom Vicente Scherer, Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Francisco Veríssimo Veronese, MD, PhD. Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 2030, ZIP code 90035-003. Porto Alegre, RS, Brazil

Fax: 55.51.3359-8121

e-mail: fveronese@hcpa.edu.br

Running head: *NPHS2* gene polymorphisms in focal segmental glomerulosclerosis

Abstract

Introduction: The molecular basis of the genetics of segmental and focal glomerulosclerosis (FSGS) has been defined in association with the NPHS2 gene. Mutations and polymorphisms of this gene, such as the non-synonymous p.R229Q, p.R138Q and p.A242V alleles are prevalent, with a frequency ranging from 20% to 30% in familial FSGS and 1 to 30% in sporadic FSGS, and are associated with corticosteroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS). The objective of this study was to determine the prevalence of these polymorphisms in patients with FSGS in their familial and sporadic forms, correlating the genotypes with different forms of clinical presentation, response to immunosuppressive treatment, and with clinical outcomes.

Methods: The sample consisted of 40 children and 70 adults diagnosed with FSGS confirmed by renal biopsy. Age at disease onset, presenting renal syndrome, proteinuria, estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the CKD-EPI equation ($\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$), steroid resistance, and clinical outcomes were evaluated. Genotyping for the three single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Two polymorphisms were found in exon 5 - p.R229Q (rs61747728) and p.A242V (rs61747727), and one in exon 3 - p.R138Q (rs74315342). Polymorphisms were correlated with ethnicity, clinical presentation, treatment response, and renal outcomes.

Results: Among the 40 children analyzed, 8 (20%) had familial FSGS and 32 (80%) had sporadic FSGS. The median (interquartile range) age was 15 (10-21) years, and the age at symptom onset, 6 (2-11) years. Among adults, the median age was 47 (38-63) years and the age at symptom onset was 40 (27-50) years. Only 3 (4.3%) had familial FSGS; 67 (95.7%) had the sporadic form. Overall, 49 adults (70%) and 36 children (90%) had SRNS. Among children, polymorphisms were detected in only 2 (5%) with sporadic

FSGS: p.R229Q in one and p.A242V in another. No children with familial FSGS carried polymorphisms. Among adults, the analyzed polymorphisms were present in 9 patients (12.9%), all with sporadic FSGS: 4 had p.R229Q and 5 had p.A242V. No patient had the p.R138Q polymorphism. When non-transplanted patients under 18 years of age were analyzed, there was no significant difference in age at symptom onset, presenting syndrome, laboratory findings, treatment performed, or clinical outcome at the end of follow-up (preserved renal function vs. progression to ESRD). Among adults, no difference was observed as well, only a trend of higher proteinuria at the end of follow-up ($p=0.06$) in cases carrying a variant. Comparing prolonged cyclosporine use (> 3 years) between patients with variants ($n=4$, 36.4%) and those without variants ($n=17$, 17.2%), there was no statistical difference between the groups ($p=0.124$). In relation to ethnicity, 17% of African descendants had variants against 8% of Caucasian patients ($p=0.184$). All patients carrying the p.R229Q variant were white, while 67% of carriers of the p.A242V variant were black.

Conclusion: In these patients with familial or sporadic FSGS, the prevalence of p.R229Q and p.A242V variants in children was 5% and in adults 12.9%; no patient presented the p.R138Q variant. There was no association between the presence of *NPHS2* variants with ethnicity or dependence on immunosuppressive treatment with cyclosporine.

Keywords: focal segmental glomerulosclerosis, podocin, *NPHS2*, polymorphisms, mutations, p.R229Q, p.A242V

Introduction

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) presents with heterogeneous clinical manifestations, especially regarding response to immunosuppressive therapy and progression to end-stage renal disease (ESRD). Approximately 10 to 20% of children and 40% of adults do not achieve sustained remission despite corticosteroid therapy, and more than 60% of cases progress to ESRD in 10 years [1].

Analysis of mutations in the *NPHS2* gene, which encodes the protein podocin, has been the focus of intense research since the early 2000s. In 2000, Boute et al. [2] mapped the *NPHS2* gene to chromosome 1q25-31 and identified 10 different nonsense, frameshift, and missense mutations. Podocin, a protein of the stomatin family, is expressed in the visceral epithelial cells of the mature renal glomerulus, named podocytes. Podocin is a component of the slit diaphragm, or filtration slit, which joins adjacent podocytes. It is thus essential for the structural and functional organization of the podocyte, as well as for the regulation of glomerular filtration.

Polymorphisms of the *NPHS2* gene were initially described in children with early-onset steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS), who present with FSGS as histopathological diagnosis [3]. In 2002, Tsukaguchi et al. [4] described autosomal recessive mutations in one-third of patients with late-onset FSGS, with the p.R229Q variant being particularly prevalent in Caucasian individuals. In the largest international, multicenter study of FSGS to date, conducted by Sadowski et al. [5], the frequency of monogenic FSGS was 29.5% in families with SRNS presenting before 25 years of age, varying inversely with age. In this study, a disease-causing polymorphism was found in 61.3% of infants in the first year of life, 25% of those aged 2 to 5 years, 17% from 7 to 12 years, and approximately 10% in those over the age of 12. However, even in young adults the detection rate still exceeded 10%.

In another multicenter study, Ruf et al. [6] performed sequencing for *NPHS2* gene mutations in 190 SRNS patients from 165 different families, and 124 patients with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) from 120 families. Homozygosity or compound heterozygosity for *NPHS2* mutations was detected in 26% of the families with SRNS and in none with SSNS. The most prevalent mutations were p.R138Q and p.R229Q, identified in individuals aged 1 to 24 years; 36% progressed to ESRD (versus 1.6% of those SSNS). FSGS recurred after renal transplantation in 8% of patients with mutations versus 35% of those without mutations.

McKenzie et al. [7] evaluated sporadic cases of late-onset FSGS and identified 18 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) by resequencing in 377 patients with biopsy-confirmed FSGS, compared to 919 controls. African American and European American patients who were carriers of the p.R138Q mutation had a higher prevalence of FSGS than normal controls (OR 4.9, $p=0.06$); however, heterozygosity for other missense mutations was equally distributed between cases and controls. Other polymorphisms, including p.R229Q and p.A242V, were not associated with sporadic FSGS or treatment resistance in this study.

In Brazil, Monteiro et al. [8] analyzed *NPHS2* gene mutations in 39 adults with primary FSGS, as well as their clinical course and response to treatment. The frequency of the p.R229Q allele was low: 0.026 (2 cases out of 39), and no cases had the p.A284V allele. These findings were not dependent on treatment response, and the authors suggested that, because of their rarity, routine screening for *NPHS2* mutations cannot be recommended for adults with FSGS. The findings of Santin et al. [9] and Tsukaguchi et al. [4], conversely, suggest that analysis of *NPHS2* mutations has clinical utility both in childhood and in adulthood. In adults, screening for p.R229Q – and, if positive, for p.A284V in combination with p.R229Q – denotes a characteristic phenotype:

development of FSGS unresponsive to corticosteroids or other immunosuppressants, with rapid progression to ESRD, and low risk of recurrence after renal transplantation.

Within this context, the present study sought to ascertain the prevalence of the *NPHS2* gene polymorphisms p.R229Q, p.R138Q, and p.A242V in patients with familial or sporadic FSGS, and whether these variants correlate with clinical characteristics and renal outcomes in these patients.

Material and Methods

Patients

The sample comprised 110 patients: 40 children (age <18 years) and 70 adults (age ≥18 years) with primary FSGS histologically demonstrated by renal biopsy. Eleven family members (8 relatives of children and 3 relatives of adults), also with FSGS, were also included. Patients were recruited from the nephrology divisions of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital da Criança Santo Antônio da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Santa Casa de Misericórdia de Pelotas, and Grupo Hospitalar Conceição. All pediatric patients were recruited from Hospital da Criança Santo Antônio da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Of the 40 patients included, 22 were evaluated after renal transplantation, while the other 18 cases were under periodic outpatient follow-up at Santa Casa de Porto Alegre.

Patients with secondary FSGS (etiologies included obesity, HIV infection, reflux nephropathy, drug-related nephropathy, and loss of renal mass), any primary glomerulopathy other than FSGS, or autoimmune diseases were excluded. This study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and registered with the Brazilian Ministry of Health Committee for the Protection of Human Subjects Research under protocol number 00000921. Study enrollment was performed

only after an individual interview with the patient (or a legal guardian) and signature of an informed consent form.

Demographic and clinical data

Age of disease onset, sex, race/ethnicity, presence of nephrotic syndrome or pathological proteinuria, pathological diagnosis of FSGS, presence of hypertension and/or diabetes mellitus, immunosuppressants (methylprednisolone, prednisone, ciclosporin, tacrolimus, cyclophosphamide, mycophenolate mofetil), angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) and/or angiotensin II receptor blockers (ARBs), response to immunosuppressive therapy, progression to ESRD, and recurrence of FSGS after renal transplantation were evaluated. The laboratory variables of interest were serum creatinine (mg/dL), serum albumin (g/dL), 24-hour urinary protein excretion (g/24h) or protein/creatinine ratio (PCR) in a spot urine sample, estimated glomerular filtration rate (eGFR) by the CKD-EPI equation ($\text{mL}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$), total cholesterol (mg/dL), HDL cholesterol (mg/dL), LDL cholesterol (mg/dL), and triglycerides (mg/dL).

Molecular analysis of single-nucleotide polymorphisms (SNPs)

For molecular analysis of the three SNPs, 5mL of whole blood was collected in EDTA tube. The DNA from each sample was extracted into the Iprep equipment (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and quantified in the Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). For SNPs p.Arg229Gln (rs61747728) and p.Ala242Val (rs61747727), the DNA was diluted in DNase free water to a concentration of 20ng/uL and for the p.R138Q SNP p.Arg138Gln (rs74315342) the concentration of use was 50ng/uL. Genotyping was performed by real-time PCR and for each SNP was used a different TaqMan SNP

Genotyping assay (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) customized (C_33726873_10 for rs74315342, C_25636414_10 for - rs61747728 and C_25636407_10 for rs61747727). Reactions were done on 48-wells plates in StepOne equipment (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using 1uL of DNA in reactions with final volume of 11uL. On each plate a control sample previously sequenced by Sanger was placed. Genotyping was performed by real-time PCR and for each SNP customized Taqman (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) probes were used. For the cycling of the temperatures the standard protocol of StepOne (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (60 °C - 30 sec, 95 °C - 10min, 95 °C - 15 sec and 60 °C or 62 °C - 60sec for 40 cycles; 60°C - 30sec) was followed, whereby the annealing temperature was 60 °C for the p.Arg229Gln (rs61747728) and p.Ala242Val (rs61747727) SNPs and 62 °C for the p.Arg138Gln (rs74315342) SNP. The genotypes of the samples were identified by the analysis of the amplification plot generated by the equipment itself at the end of each cycle.

Statistical analysis

Data were expressed as n (%), mean \pm standard deviation, or median and interquartile range (IQR). The Shapiro-Wilk test was used to determine the normality of distributions. The chi-square test was applied to assess for association between categorical variables. For comparison of continuous variables, Student's *t*-test (for two groups) or ANOVA (for three or more groups) were used for normal variables, while the Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis test was used for asymmetrically distributed ones. All analyses were performed in PASW Statistics for Windows, Version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

The clinical and demographic characteristics of the study population are shown in Table 1. Among children, the median age was 15 years; most were male (n=23, 58%) and white (n=26, 65%). Nephrotic syndrome was the initial clinical presentation in 93% of the patients (n=37), at a median age of 6 (2–11) years. A family history of FSGS was detected in 8 patients (20%). Regarding the response to immunosuppressive treatment, 36 children (90%) had SRNS. Of the 40 patients included, 22 (55%) had already undergone renal transplantation; of these, 14 (63.3%) had experienced FSGS recurrence in the graft. The median duration of follow-up for children was 4.3 (2.2–7.0) years.

Among adults, the median age was 47 years; again, most were male (n=37, 53%) and white (n=61, 87%). As in children, the most common clinical presentation was nephrotic syndrome, observed in 53 (76%) patients. In adults, a family history of FSGS was present in only 3 patients (4%). Regarding the response to immunosuppressive treatment, 49 adults (70%) had SRNS. Only 7 adults (10.1% of the sample) had undergone renal transplantation. The median duration of follow-up for adults was 7 (3.6–14.0) years.

Polymorphisms were detected in 11 patients (10% of the sample): 6 with the p.A242V variant (Figure 1) and 5 with the p.R229Q variant (Figure 2). No adult or child carried the p.R138Q polymorphism, as shown in Figure 3. Regarding age range, polymorphisms were present in only 2 children (5%): one with p.R229Q and another with p.A242V. In adults, polymorphisms were detected in 9 patients (12.9%): p.A242V in 5 (7.1%) and p.R229Q in 4 (5.7%). On comparison of patients with and without polymorphisms, the presence of any specific polymorphism or of more than one polymorphism in combination was not significantly associated with presence of nephrotic syndrome, baseline proteinuria and renal function, type of immunosuppressive therapy, progression to chronic kidney disease, need for dialysis, or renal transplantation. Of

patients with the p.R229Q polymorphism, 3 (1 child and 2 adults, 60%) progressed to ESRD/dialysis; of those with the p.A242V polymorphism, 3 (1 child and 2 adults, 50%) ultimately needed dialysis, and 1 adult subsequently received renal transplantation.

Table 2 shows a comparison of laboratory parameters at baseline and at the end of follow-up (creatinine, eGFR, 24-h urinary protein excretion or PCR, and albumin). Regarding children, these data are limited to those who did undergo renal transplantation, because we could not obtain accurate laboratory test results for patients who had already been transplanted. There was a statistically significant reduction in proteinuria and a significant increase in serum albumin after therapeutic intervention over time, both in children and in adults ($p < 0.001$). In adults, we also observed a reduction in eGFR that was significant when comparing pre- and post-immunosuppressive treatment levels at the end of follow-up ($p < 0.001$), as shown in Table 2. However, comparisons of renal function, proteinuria, and serum albumin according to the presence or absence of polymorphisms revealed no difference between the groups except a trend for an increased proteinuria at the end of follow-up ($p = 0.06$) in cases carrying the polymorphism (Figure 4).

Comparing prolonged cyclosporine use (> 3 years) between patients with variants ($n = 4$, 36.4%) and those without variants ($n = 17$, 17.2%), there was no statistical difference between the groups ($p = 0.124$). In relation to ethnicity, 17% of African descendants had variants against 8% of Caucasian patients ($p = 0.184$). Interestingly, all patients carrying the p.R229Q variant were white, while 67% of carriers of the p.A242V variant were black.

Discussion

Chronic glomerulonephritis, the third leading cause of ESRD requiring renal replacement therapy, has an adverse prognosis, with approximately 50% renal survival at 10 years. Focal segmental glomerulosclerosis is the most common histological pattern in adults with primary glomerular disease. In addition to the idiopathic form, several etiologies – including genetic variants – are associated with its pathogenesis. Recently, polymorphisms and mutations of the podocin gene *NPHS2*, among others, have been implicated in FSGS of genetic origin, in a non-synonymous, autosomal recessive inheritance pattern that induces SRNS in both children and adults. In the present study, we demonstrated the prevalence of two polymorphisms – p.R229Q and p.A242V – in a sample of patients from southern Brazil, with frequencies in the adult population and in children of 12.9% and 5%, respectively. Among adults, the p.R229Q polymorphism was detected in 4 patients (5.7%), and p.A242V in 5 (7.2%). Among children, p.R229Q and p.A242V were detected only in 1 patient each (2.5%). In the analyzed sample, 90% of children (n=36) were resistant to steroid therapy, versus 70% of adults (n=49). Among adults, the presence of polymorphisms was associated with more prolonged ciclosporin therapy (reflecting dependence on immunosuppression) and black ethnicity with a trend toward higher proteinuria at the end of follow-up.

Mutations in the *NPHS2* gene were first described by Boute et al. [2] in 2000, among children with an autosomal recessive inheritance pattern for SRNS and FSGS. Sequence analysis of podocin indicates the presence of 383 amino acids with C- and N-terminal domains and a short hairpin trans-membrane domain [10]. The gene is composed of 8 exons and encodes podocin, a membrane protein and stomatin homolog which is present in renal tissue from fetal life into adulthood, exclusively in the glomerulus – specifically, in the pedicels of podocytes anchored in the basement membrane. Together with other molecules, such as nephrin, alpha-actinin-4, CD2AP, TRPC6, integrins, and

podocalyxin, podocin is responsible for maintaining the charge- and size-selective barrier of the glomerular filtration slit, as it stabilizes the cytoskeletal microstructure and the adhesion of podocytes to the glomerular basement membrane [11-13]. Mutations in the podocin gene result in abnormal distribution of these molecules, inducing the formation of synechia between the glomerular capillaries and Bowman's capsule, and thus progressive glomerular sclerosis which are characteristic of FSGS [14].

In this study, we investigated the prevalence of three polymorphisms: p.R138Q (c.413G>A) in exon 3, which results from a glutamine-to-arginine substitution; p.R229Q (c.686G>A) in exon 5, which results from an arginine-to-glutamine substitution; and p.A242V (c.725C>T) in exon 5, which represents the substitution of cytosine for thymine at position 725 [15]. In an extensive review of the frequency of synonymous and non-synonymous alleles of *NPHS2* variants, Franceschini et al [14] reported a higher frequency of four non-synonymous variants: R229Q, with a prevalence of 0.5% to 7% in European Americans, and 0.5 to 2.5% in African Americans and Brazilians; A242V, affecting 4% of African Europeans and 6 to 8.7% of African Americans; G34E, affecting 2% of Japanese; and A61V, occurring in 1.6% of African Americans. The p.R229Q variant was thus the prevalent polymorphism in Caucasian individuals, a finding that was confirmed in Brazil [16]. In our study, we found a distribution of polymorphisms by ethnicity similar to that described by Franceschini; all patients carrying the p.R229Q variant were white, while 67% of carriers of the p.A242V variant were black.

Heterozygosity for the p.R138Q polymorphism was prevalent in studies that analyzed European patients [14], as well as in the McKenzie study conducted in the U.S. [7], which evaluated 377 adult patients with sporadic FSGS; the frequency of heterozygosity for p.R138Q was 1.2% in European Americans versus 0.4% in African Americans, and was associated with 4.9-fold higher odds of developing FSGS and SRNS.

In this study, the frequencies of polymorphisms p.R229Q and p.A242V were 4.7% and 0% respectively in European Americans and 1.0% and 7% respectively in African Americans, which is consistent with our results. No patient in our study, adult or child, carried the p.R138Q polymorphism, which may be attributable to the small sample size.

In a study by Tonna et al. [17], in 3.2% of the analyzed patients, the p.R229Q and p.A242V variants were associated with proteinuria and development of primary FSGS, in contrast to the general population and diabetics, in whom these polymorphisms were not a risk factor for proteinuria or renal dysfunction. Pereira et al. [16] analyzed 85 adult patients heterozygous for p.R229Q and found increased risk of microalbuminuria in carriers (OR 2.8, 95%CI 1.2–6.3) as compared to those without the polymorphism, even after controlling for age, ethnicity, presence of hypertension, diabetes, and obesity. We observed a trend toward greater proteinuria at the end of follow-up in patients heterozygous for polymorphisms p.R229Q and p.A242V, which, in our sample, may still reflect resistance to immunosuppressive treatment.

In 2001, Caridi et al. [18] described sporadic cases of mutations and polymorphisms in children in Italy. In a subsequent study [19], 179 children with sporadic nephrotic syndrome and corticosteroid resistance or dependence had an allele frequency of 4.2% for the p.R229Q variant. The A297V mutation in association with p.R229Q was also described in familial cases. In large cohorts of pediatric patients from Europe and the United States, the prevalence of *NPHS2* polymorphisms is up to 30–40% in familial cases of SRNS [3,20–22] and 10–30% in sporadic cases also resistant to immunosuppression [3,6,19–24]. Patients with mutations in homozygosity or composite heterozygosity commonly develop SRNS before 6 years of age [3,22], progress rapidly to chronic kidney disease, and have a low prevalence of recurrence after renal transplantation [2,3]. In our sample, of the 40 children studied, 8 (20%) had a family history of FSGS, but the presence

of polymorphisms was not identified in any such case. Steroid-resistant nephrotic syndrome was found in 90% of the children; both cases in which polymorphisms were detected, one p.R229Q and another p.A242V, had SRNS. Both patients progressed to ESRD requiring chronic dialysis, and neither had received a transplant. Of the 22 (55%) children who had already undergone renal transplantation at enrollment, 14 (63%) had relapsed after transplant, but none of these patients carried any of the analyzed variants. If the polymorphism was present, FSGS might potentially be associated with a low rate of recurrence in the renal allograft.

In 2014, Sadowski et al. [5] reported a monogenic cause of SRNS in 29.5% of unrelated families in Europe, the United States, Saudi Arabia, and Egypt (526 out of 1783 households) in which the disease manifested before the age of 25. Stratified by percentage of affected families and by age range, the prevalence of monogenic SRNS was: less than 3 months, 69.4%; 4 to 12 months, 49.7%; 1 to 6 years, 25.3%; 7 to 12 years, 17.8%; and 13 to 18 years, 10.8%. This study clearly demonstrates an inverse correlation between age at symptom onset and genetic causes of SRNS.

Some studies have reported that *NPHS2* polymorphisms are rare in adults with late-onset FSGS [3,7,8,17,20,25,26]. The findings of Santín [9] and Tsukaguchi [4], conversely, suggest that analysis for *NPHS2* mutations has clinical utility both in childhood and in adulthood. In adults, screening for p.R229Q – and, if positive, for another pathogenic mutation, such as p.A284V, in heterozygosity with p.R229Q – reveals a characteristic phenotype: development of FSGS unresponsive to corticosteroids or other immunosuppressants, with rapid progression to ESRD and low risk of recurrence after renal transplantation. It is likely that, by genotyping a larger sample of patients, one could identify late-onset FSGS in compound heterozygotes for the p.R229Q variant and another pathogenic mutation (e.g., p.A284V) [9], characterizing FSGS resistant to

immunosuppression with progression to ESRD and low risk of FSGS recurrence in the graft.

Likewise, in a study published by Machuca et al [27], 37 patients with late-onset FSGS and SRNS from Europe and South America were found to be compound heterozygotes for the p.R229Q variant and another pathogenic mutation; A284V was most prevalent (56% of mutations), while rarer ones included R291W, A288T, E310K, and A297V. These patients had a higher frequency of late-onset SRNS with progression to ESRD than those with two pathogenic mutations. McKenzie et al. [7] evaluated 377 adults with late-onset disease and identified 18 SNPs by resequencing. In this study, African American and European American carriers of the p.R138Q mutation had a higher prevalence of FSGS than normal controls, but the presence of heterozygosis for other missense mutations was equally distributed between cases and controls. In our study, we did not detect the p.R138Q variant, which may be related to an insufficient number of patients in the sample. Our adult population consisted of only 70 patients, 96% of whom had sporadic FSGS; of these, 70% had SRNS. Of the total number of patients, 28 (40.5%) progressed to ESRD. Of these, 7 underwent renal transplantation and 2 (28.5%) experienced disease recurrence in the graft. Among carriers of the p.R229Q polymorphism, 40% progressed to CKD requiring dialysis, versus 33% of p.A242V carriers

In Brazil, Monteiro et al. [8] analyzed the p.R229Q and p.A284V polymorphisms in 39 adults with primary FSGS. Due to the rarity of allele frequencies, with p.R229Q detected in only 2 cases (5.1%), these authors suggested that screening for *NPHS2* mutations should not be part of the routine diagnostic workup of adults with FSGS. Conversely, Pereira et al. [16] analyzed the p.R229Q variant in 1577 individuals in the state of Espírito Santo and found a strong association of this polymorphism with the

presence of microalbuminuria in the general population ($p=0.008$). Carriers had a 2.77-fold higher risk of microalbuminuria when compared to those without the polymorphism, even after adjusting for age, ethnicity, hypertension, obesity, and diabetes. Guaragna et al. [28] analyzed the contribution of studies carried out in Latin America to genetic research of FSGS with SRNS, and found that only three countries – Mexico, Chile and Brazil – have investigated *NPH2* gene mutations in this context. In Mexico, the heterozygous variant p.Leu139Arg was identified. In Chile, Azocar et al. [29] described *NPHS2* mutations in 21% of the children studied, specifically the p.Pro341Ser variants in homozygosity and p.Arg229Gln and p.Ala284Val in compound heterozygosity. In Brazil, Guaragna et al [30] studied 27 children with SRNS and identified a disease-causing mutation in 14.8%. They also described the p.Arg229Gln and p.Ala284Val variants, which seem to be prevalent in South American countries.

The need to include molecular analyses in the workup of children and adults with primary FSGS is a topic of current debate, considering the cost-benefit ratio and its impact on clinical management, especially in patients with SRNS, potentially preventing the immunosuppressive therapy (or its prolonged use) in cases where mutations or polymorphic variants are identified. Genetic testing for pediatric nephrotic syndrome and adult FSGS is controversial, but it should be considered for patients with congenital and infantile forms of nephrotic syndrome (children <1 year of age) or less than 2 years of age with steroid-resistant nephrotic syndrome, nephrotic syndrome associated with other syndromic features, or familial forms of steroid-resistant nephrotic syndrome/FSGS [5,31,32,33]. Adding to the controversy of when to perform genetic testing, single gene mutations have been found in up to 30% of patients under age 25 [32,33]. Testing should target relevant genes based on patient characteristics and contemporary knowledge [33].

In relation to the costs, Sadowski et al. [5] sequenced 27 SRNS-causing genes, at a cost of US\$26 per patient, and demonstrated cost-effectiveness for etiologic stratification, genotype-phenotype correlation, and especially correlation between genotype and treatment response. However, such low costs may not be reflected in other regions of the world – specifically, in developing countries such as Brazil. In our study, the cost of analysis of only three polymorphisms was approximate US\$40 per patient; the potential benefits of genotyping these patients is still unknown.

Our study has some limitations, such as the small number of patients included in each group and the low prevalence of polymorphisms in children, especially those with relatives affected by the disease. We did not find any statistically significant differences in clinical course, laboratory parameters, or renal outcomes when comparing patients with the p.R229Q and p.A242V polymorphisms and non-carriers; this may be attributable to the aforementioned limitations.

In conclusion, SRNS caused by FSGS is a unique clinical entity that may have genetic etiology, whereby glomerular abnormalities induced by polymorphisms and/or mutations in the podocin molecule result in resistance to immunosuppressive drugs and progression to ESRD. The results of this study are consistent with the prevalence of p.R229Q and p.A242V polymorphisms described in other publications in adult patients with sporadic FSGS. We believe additional studies, including a greater number of patients with familial or sporadic FSGS, are warranted to define a strategy for indication of genetic analysis and assess the therapeutic implications of such strategy for the clinical management of this common primary glomerulopathy.

Acknowledgments

The authors thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research and Event Incentive Fund (FIPE-HCPA) and the Graduate Program in Medicine: Medical Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul for financial support, as well as the Molecular and Protein Analysis Laboratory (UAMP) at the Hospital de Clínicas of Porto Alegre Experimental Research Center for technical support.

References

1. Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 333-335.
2. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-354.
3. Weber S, Gribouval O, Esquivel E, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 66: 571-579.
4. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA et al. NPHS2 mutation in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002; 110: 1659-1666.
5. Sadowski CE, Lovric S, Ashraf S, Pabst 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* 2014; 26: 1-10.
6. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M et al. Patients with mutations in NPHS2 (podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 722-732.

7. McKenzie LM, Hendrickson SL, Briggs WA, Dart RA, Korbet SM, Mokrzycki MH et al. NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2987-2995.
8. Monteiro EJ, Pereira AC, Pereira AB, Krieger JE, Mastroianni-Kirsztajn G. NPHS2 mutations in adult patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *J Nephrol* 2006; 19: 366-371.
9. Santín S, Tazón-Veiga B, Silva I, Cobo MA, Gimenez I, Ruiz P et al. Clinical value of NPHS2 analysis in early and adult-onset steroid-resistant nephritic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 344-354.
10. Horinouchi I, Nakazato H, Kawato T, Iyama K, Furuse A, Arizono K et al. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular disease. *Kidney Int* 2003; 64: 2092-2099.
11. Huber TB, Simons M, Hartleben B, Sernetz L, Schmidts M, Gundlach E et al. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutation in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 3397-3405.
12. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459-1466.
13. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1621-1629.
14. Franceschini N, North KE, Kopp JB, McKenzie L, Winkler C. NPHS2 gene, nephritic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis: a HuGE review. *Genet Med* 2006; 8: 63-75.

15. Bouchireb K, Boyer O, Gribouval O, Nevo F, Huynh-Cong E, Moriniere V et al. NPHS2 mutation in steroid-resistant nephrotic syndrome: a mutation update and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat* 2014; 35: 178-186.
16. Pereira AC, Pereira AB, Mota GF, Cunha RS, Herkenhoff FL, Pollak MR et al. NPHS2 R229Q functional variant is associated with micro-albuminuria in the general population. *Kidney Int* 2004; 65: 1026-1030.
17. Tonna SJ, Needham A, Polu K, Uscinski A, Appel GB, Falk RJ et al. NPHS2 variant in focal and segmental glomerulosclerosis. *BMC Nephrol* 2008; 9: 13-22.
18. 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-familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2742-2746.
19. Caridi G, Bertelli R, Di Luca M, Dagnino M, Emma F, Muda AO, et al. Broadening the Spectrum of Diseases Related to Podocin Mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1278-1286.
20. Karle SM, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A. Novel mutation in NPHS2 detected in both familial and sporadic steroid-resistance nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:388-393
21. Berdeli A, Mir S, Yavascan O, Serdaroglu E, Bak M, Aksu N, et al. NPHS2 (podocin) mutations in Turkish children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2007; 22: 2031-2040.
22. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nürnberg G et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 2006; 38: 1397-1405.

23. Megremis S, Mitsioni A, Mitsioni AG, Fylaktou I, Kitsiou-Tzelli S, Stefanidis CJ, et al. Nucleotide variations in the *NPHS2* gene in Greek children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* 2009; 13:249-256.
24. Jungraithmayr TC, Hofer K, Cochat P, Chernin G, Cortina G, Fargue S, et al. Screening for *NPHS2* mutation may help predict focal segmental glomerulosclerosis recurrence after transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 579-585.
25. Aucella F, De Bonis P, Gatta G, Muscarella LA, Vigilante M, di Giorgio G et al. Molecular analysis of *NPHS2* and *ACTN4* genes in a series of 33 italian patients affected by adult-onset nonfamilial focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Clin Pract* 2005; 99:c31-c36.
26. He N, Zahirieh A, Mei Y, Lee B, Senthilnathan S, Wong B et al. Recessive *NPHS2* (Podocin) mutations are rare in adult-onset idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 31-37.
27. 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: 727-735.
28. Guaragna MS, Lutaif AC, Maciel-Guerra AT, Belangero VM, Guerra-Júnior G, de Mello MP. *NPHS2* Mutations: A Closer Look to Latin American Countries. *Bio Med Res Int* 2017; doi.org/10.1155/2017/7518789.
29. Azocar M, Vega A, Farfan M, Cano F. *NPHS2* mutation analysis study in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Rev Chilena Ped* 2016; 87: 31-36.
30. Guaragna MS, Lutaif AB, Piveta CS, Souza ML, de Souza SR, Henriques TB et al. *NPHS2* mutations account for only 15% of nephrotic syndrome cases. *BMC Med Genet* 2015; 16: 88-97.

31. Gbadegesin RA, Winn MP, Smoyer WE. Genetic testing in nephrotic syndrome - challenges and opportunities. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9: 179-184.
32. Lovric S, Ashraf S, Tan W, Hildebrandt F. Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31: 1802-1813.
33. Rovin BH, Caster DJ, Cattran DC, Gibson KL, Hogan JJ, Moeller MJ et al. Management and treatment of glomerular diseases (part 2): conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2019; 95: 281-295.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the sample

Variables	Children	Adults
N	40	70
Age (years)	15(10-21) ¹	47(38-63)
Sex		
Male	23(58) ²	37(53)
Race/Ethnicity		
White	26(65)	61(87)
Black	14(35)	9(13)
Age at disease onset	6(2-11)	40(27-50)
Family history	8(20)	3(4)
Hypertension	17(43)	58(83)
Diabetes mellitus	1(3)	7(10)
Presenting syndrome		
Nephrotic syndrome	37(93)	53(76)
Nephrotic-range proteinuria	3(8)	17(24)
Immunosuppressive treatment		
Methylprednisolone	16(40)	5(7.1)
Prednisone	39(97.5)	52(74.3)
Cyclophosphamide	5(12.5)	29(41.4)
Ciclosporin	33(82.5)	30(42.8)
Tacrolimus	6(15)	11(15.7)
Mycophenolate mofetil	4(10)	8(11.4)
ACEi/ARB	18(45)	70(100)
Treatment response		
Complete	11(27.5)	20(28.6)
Partial	7(27.5)	25(35.7)
No response	22(55)	25(35.7)
Clinical outcome		
Preserved renal function	15(37.5)	41(59.4)
Dialysis	3(7.5)	21(30.4)
Transplant	22(55)	7(10.1)
Follow-up (years)	4.3(2.2-7)	7(3.6-14)

¹Values expressed as median and interquartile range.

²Values expressed as n (%).

ACEi: angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB: angiotensin receptor blocker.

Table 2. Laboratory parameters at baseline and at the end of follow-up

	Children (n=40)*		Adults (n=70)	
	Baseline	Final	Baseline	Final
Creatinine (mg/dL)	0.8(0.6-1.3)	0.83 (0.48-2.8)	1.3(0.9-2.0)	1.87(1.07-4.35)¶
Nadir creatinine	0.22	0.16	0.45	9.33
Peak creatinine	2.0	7.0	9.3	17.4
eGFR (ml/min/1.73m ²)	89(46-120)	88 (42-115)	62.5 (31.5-103)	37(14-76)#
Nadir eGFR	27	8	7	3.4
Peak eGFR	154	125	151	167
Urinary protein excretion, 24-hour (g), or PCR	6.0(4-13.7)	0.22(0.1-1.1)§	4.17(1.8-7.1)	0.97(0.12-2.1)§
Serum albumin (g/dL)	2.4(1.8-2.9)	4.2(3.5-4.5)§	3.3(2.2-4.0)	4.2(3.8-4.5)§

*Data refer to non-transplanted patients. Values expressed as median and interquartile range. eGFR: estimated glomerular filtration rate; PCR: protein/creatinine ratio in spot urine.

¶p=0.072 (baseline vs. final); #p<0.001 (baseline vs. final); §p<0.001 (baseline vs. final).

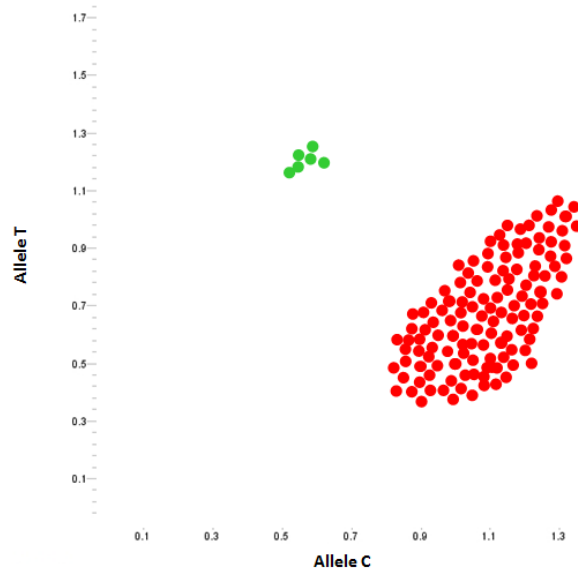


Figure 1. Amplification plot of samples analyzed for the p.A242V polymorphism (rs61747727) of the *NPHS2* gene. Green samples, C/T heterozygous. Red samples, C/C homozygous.

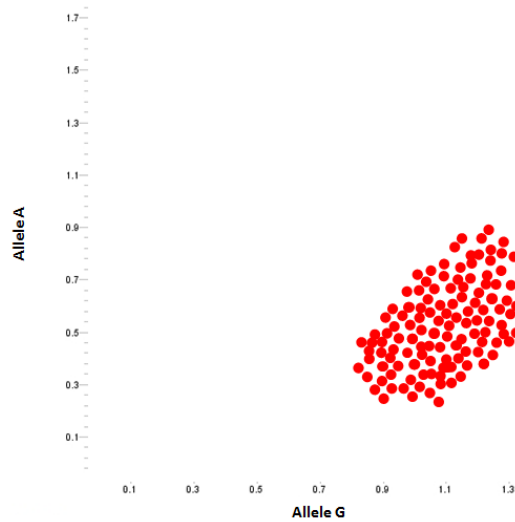


Figure 2. Amplification plot of samples analyzed for the p.R138Q polymorphism (rs74315342) of the *NPHS2* gene. All samples have the homozygous G/G genotype.

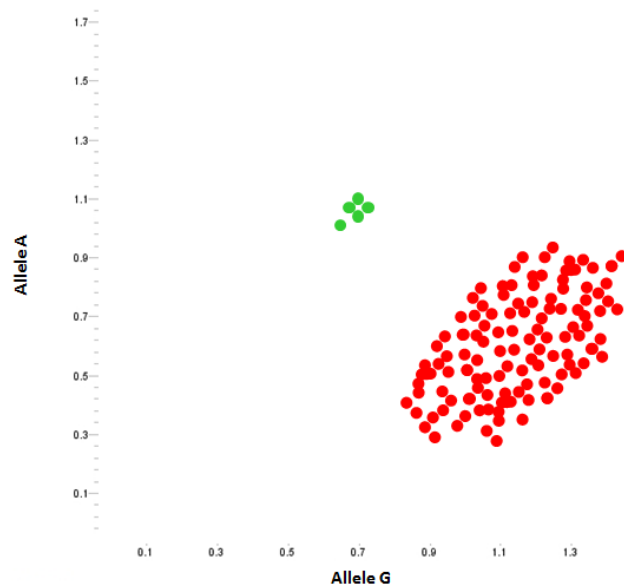


Figure 3. Amplification plot of samples analyzed for the p.R229Q polymorphism (rs61747728) of the *NPHS2* gene. Green samples, G/A heterozygous. Red samples, G/G homozygous.

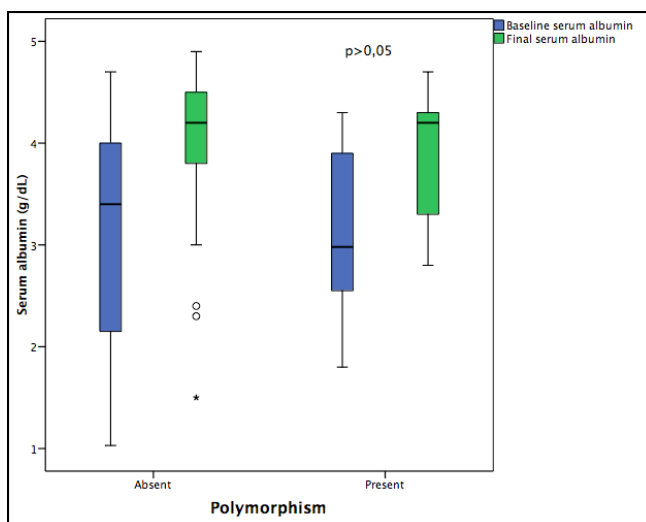
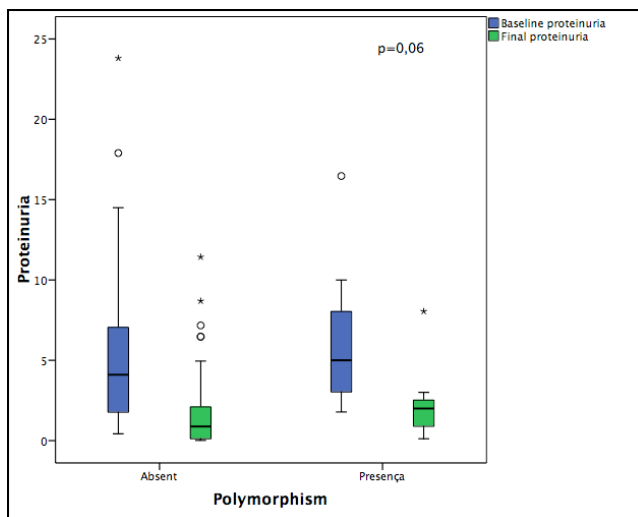
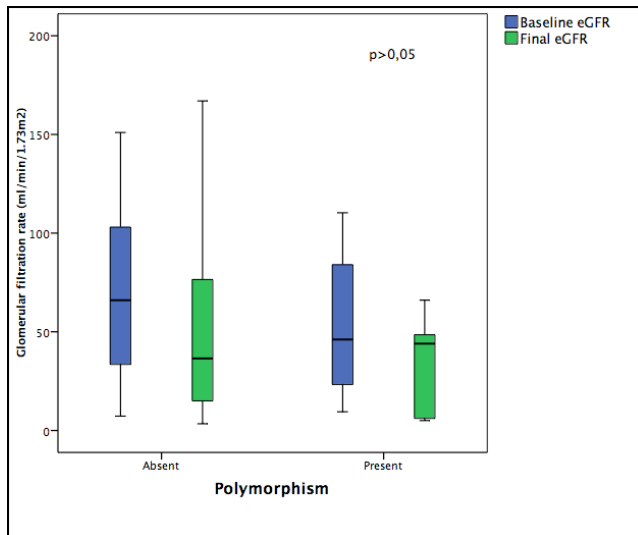


Figure 4. Progression of renal function, proteinuria, and serum albumin levels according to the presence or absence of polymorphisms, considering values at baseline and at the end of follow-up.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As causas genéticas envolvidas no desenvolvimento de GESF manifestada por SNRC nas últimas décadas são motivo de estudos em diversas regiões do mundo, no entanto a sua frequência, sua distribuição geográfica e seu acometimento por faixa etária ainda é parcialmente desconhecida. As terapias imunossupressoras atualmente empregadas no manejo da GESF, especialmente nos casos com envolvimento genético, mostram uma resposta parcial ou, na sua maioria, ausência de resposta ao tratamento, por este ser ineficaz naqueles pacientes portadores de variantes do gene *NPHS2*, os quais progridem para doença renal crônica terminal. Além disso, existem evidências de ausência de recorrência da doença nos pacientes transplantados renais e também ausência de desordens extra-renais.

O reconhecimento do envolvimento genético na etiologia da GESF com SNRC é uma estratégia importante para mudanças no manejo terapêutico, evitando assim exposição à terapia imunossupressora e seus efeitos adversos, além de proporcionar encaminhamento precoce para transplante renal. Neste contexto, a pesquisa de variantes do gene *NPHS2*, que codifica a podocina que se expressa exclusivamente nos podócitos, passa a ser uma ferramenta útil na prática clínica, podendo melhorar a qualidade de vida dos pacientes, reduzir as complicações e comorbidades decorrentes do tratamento.

No presente estudo, buscou-se analisar algumas variantes do gene *NPHS2*, especificamente p.R229Q, R138Q e p.A242V em pacientes portadores de GESF nas suas formas familiar ou esporádica, correlacionando este genótipo com as diferentes formas de apresentação clínica da doença. Como fechamento dessa tese, ponderamos que, mesmo analisando um número pequeno de variantes associados ao gene *NPHS2* e, somado a dificuldade de obter um número maior de pacientes, encontramos a prevalência das

variantes p.R229Q e p.A242V em crianças foi 5% e em adultos 12,9%; nenhum paciente apresentou a variante p.R138Q. A prevalência encontrada no nosso estudo é compatível com a encontrada em outros estudos internacionais. Não houve associação da presença das variantes do gene *NPHS2* com etnia ou dependência do tratamento imunossupressor com ciclosporina. No Brasil e na América do Sul poucos estudos exploraram a prevalência das principais variantes associadas à GESF assim como a correlação clínica que a presença destas variantes acarretam nos pacientes. Novos estudos, em diferentes regiões, podem fortalecer a investigação genética como uma arma diagnóstica ajudando no manejo dos pacientes portadores de SNRC.

9. PERSPECTIVAS

O entendimento das bases genéticas envolvidas na etiologia da GESF nos últimos 18 anos tem sido intensamente explorado, tornando-se uma ferramenta adicional no manejo da doença, mudando decisões terapêuticas a partir da confirmação da presença da mutação ou do polimorfismo. Essa estratégia reflete-se em um espectro de ações nefroprotetoras, que incluem evitar exposição às drogas imunossupressoras no seu tratamento e o encaminhamento precoce para transplante renal. Ressaltamos a importância de que mais estudos devam ser realizados na população brasileira com esse objetivo.

Nas últimas diretrizes do *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* de glomerulonefrites, recomenda-se que a investigação genética não seja feita sistematicamente, e sim em casos selecionados, pois apresenta custo muito elevado e não está disponível fora do ambiente de pesquisa científica. É possível que na sua próxima edição essas indicações se ampliem, considerando o benefício que pode trazer aos pacientes portadores de GESF.

ANEXO 1**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Título: Análise de variantes e mutações genéticas do gene *NPHS2* na glomeruloesclerose segmentar e focal familiar e esporádica.

Orientador: Prof Dr Francisco Veríssimo Veronese

Orientando: Rafael de Almeida

O Sr(Sra.) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada **Análise de variantes e mutações genéticas do gene *NPHS2* na glomeruloesclerose segmentar e focal familiar e esporádica** que será realizada com pacientes que estão em acompanhamento ambulatorial realizado por médico nefrologista. Esta pesquisa tem como objetivo identificar a prevalência de uma mutação genética associada a resistência ao tratamento com corticóide da Síndrome Nefrótica realizada com corticóide. A presença desta mutação pode alterar o tratamento e o aconselhamento ao pacientes podendo alterar protocolos de tratamento da doença. Serão realizadas entrevistas com os participantes do estudo, revisão do prontuário médico e coleta de sangue venoso periférico. Os resultados serão usados apenas para fins científicos e estarão à sua disposição sempre que solicitar. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do pesquisador. Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O estudo apresenta riscos relacionados à retirada de sangue realizada em veia periférica para coleta de material biológico. As complicações relacionadas à punção venosa podem ser classificadas em locais e sistêmicas. As locais são observadas apenas no sítio da punção como hematoma, flebite, sangramento local. As sistêmicas acometem o sistema circulatório e estão relacionadas a infecções, embolia gasosa, sepse.

Quanto aos benefícios, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a síndrome nefrótica resistente ao uso de corticóide, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar protocolos de atendimentos aos

pacientes acometidos com Síndrome Nefrótico. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

Como já me foi dito, minha participação neste estudo será voluntária e poderei interrompê-la a qualquer momento, se eu assim o desejar, sem que isso me traga prejuízo algum ao meu atendimento e/ou do meu/minha filho(a).

Estou ciente que a minha identidade permanecerá confidencial durante todas as etapas do estudo. Sendo que os resultados serão transcritos e analisados com responsabilidade e honestidade e usados exclusivamente para fins científicos.

CONSENTIMENTO: Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa e benefícios da presente pesquisa. Os pesquisadores responderam todas as minhas perguntas até a minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar do estudo. Este formulário de Termo Consentimento Livre e Esclarecido será assinado por mim e por um responsável, caso tenha idade inferior a 18 anos, em duas vias ficando uma em meu poder e a outra com o pesquisador responsável pela pesquisa.

Assinaturas:

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Data: ____/____/____

Contato – (53)991510229

ANEXO 2

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

Nome:				
Data da coleta:				
Instituição de origem:			Registro na instituição	
Data de Nasc.:			Idade:	
Sexo: () Masc = 1 () Fem = 2				
Cor de Pele: Branca () Negra ()				
Idade de apresentação dos sintomas: ____anos____meses				
Intervalo do início dos sintomas até a data da biópsia:_____				
Síndrome Nefrótica* () Sim () Não *presença de edema e hipoalbuminemia			Quantificação proteinúria:_____	
Proteinúria nefrótica () Sim () Não				
Comorbidades durante acompanhamento da doença: HAS () DM ()				
GNC () Obesidade () História familiar de nefrite () qual_____				
Outra glomerulopatia conhecida () qual_____				
Data da biópsia renal: _____				
Laudo:				
Droga	Sim	Não	Tempo de uso	Dose
IECA				
ARA-2				
Prednisona				
MMF/MFS				
Ciclosporina				
Tacrolimus				
Ciclofosfamida				
Azatioprina				

Evolução para TRS: () Sim () Não

Tempo do início dos sintomas ao início TRS:_____

Tempo em TRS:	
Realização de Tx: () Sim () Não	
Tempo do início dos sintomas a realização de Tx renal: _____	
Recidiva após Tx renal: _____	
Proteinúria pós Tx () Sim () Não	Quantificação proteinúria pós Tx: _____
Biópsia do enxerto: () Sim () Não	
Laudo:	

Dados Laboratoriais Bioquímicos e Urinários:

Parâmetros sanguíneos	T0 início dos sintomas	T 1 Ano 1	T2 Ano 2	T3 Ano 3
Creatinina (mg/dL)				
Colesterol Total (mg/dL)				
Colesterol HDL (mg/dL)				
Colesterol LDL (mg/dL)				
Triglicerídeos (mg/dL)				
Albumina (mg/dL)				
TFG CKD-EPI				
NS de ciclosporina				
NS de tacrolimus:				
Parâmetros urinários				
Proteína total urina (g/dL)				
Creatinina (mg/dL)				
Proteinúria 24h (g)				

Análise dos Polimorfismos:

	Sim	Não
p.R229Q		
p.A242V		
p.R138Q		

ANEXO 3**TERMO DE LIBERAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA
PELA PLATAFORMA BRASIL**

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE VARIANTES E MUTAÇÕES GENÉTICAS DO GENE NPHS2 NA GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL FAMILIAR E ESPORÁDICA

Pesquisador: FRANCISCO JOSÉ VERÍSSIMO VERONESE

Área Temática:

Versão: 7

CAAE: 48932515.8.1001.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: FIPE/HCPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.639.279

Apresentação do Projeto:

Trata-se de relatório parcial solicitando a prorrogação do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de relatório parcial solicitando a prorrogação do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa do pedido de prorrogação:

Solicito a prorrogação do projeto Análise de variantes e mutações genéticas do gene NPHS2 na glomeruloesclerose segmentar e focal familiar e esporádica:

- 1) Considerando que o projeto está em desenvolvimento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e tendo como Centro Participante do Projeto o Complexo Hospitalar da Santa Casa de Porto Alegre;
- 2) Considerando a demora no início da coleta de amostras para o estudo no Centro Participante devido ao atraso na liberação do projeto no Comitê de Ética em

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.639.279

Pesquisa local;

3) Considerando atrasos no Cronograma do Estudo não previstos como atrasos na entrega de materiais para a análise genética devida a importação dos produtos;

4) Considerando as dificuldades no preenchimento do Banco de Dados do Estudo devido ao Projeto ter caráter multicêntrico, o que traz a necessidade dos autores e participantes do Projeto se adaptarem aos sistemas de informação de cada local.

5) Considerando que o estudo contempla uma amostra populacional desde crianças até adultos e a dificuldade de atingir o tamanho amostral devido a raridade da doença.

Solicitada prorrogação do Projeto por um ano.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto prorrogado até 31/12/2019. Dos 180 participantes previstos, 112 foram incluídos até o momento.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto prorrogado até 31/12/2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1123331_E3.pdf	04/05/2018 14:29:01		Aceito
Outros	Relatorio_pesquisa.pdf	04/05/2018 14:26:46	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Prorrogacao.pdf	04/05/2018 12:41:51	Rafael de Almeida	Aceito
Cronograma	Cronograma_PB.pdf	04/05/2018 12:37:13	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	22/06/2017 11:09:32	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.639.279

Outros	Emenda.pdf	08/06/2017 13:00:50	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_justificativa.docx	06/04/2016 16:03:49	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	TCLE_3.jpg	11/03/2016 16:31:32	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	TCLE_2.jpg	11/03/2016 16:30:51	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	TCLE_1.jpg	11/03/2016 16:30:25	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Termo_assentimento_menor_3.jpg	11/03/2016 16:29:23	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Termo_assentimento_menor_2.jpg	11/03/2016 16:28:59	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Termo_assentimento_menor_1.jpg	11/03/2016 16:28:31	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Uso_de_materiais_ass.jpg	11/03/2016 16:27:50	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Riscos_e_beneficios_ass.jpg	11/03/2016 16:25:12	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Isencao_de_onus_ass.jpg	11/03/2016 16:24:33	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Dados_prontuarios_ass.jpg	11/03/2016 16:22:16	Rafael de Almeida	Aceito
Outros	Confidencialidade_ass.jpg	11/03/2016 16:18:43	Rafael de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado_final.doc	14/01/2016 18:32:12	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Texto_resposta_3.docx	14/01/2016 18:25:09	Rafael de Almeida	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Texto_resposta_2.docx	15/12/2015 14:40:34	Rafael de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado_Plataforma.docx	26/11/2015 12:55:14	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	26/11/2015 12:35:02	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Texto_resposta.docx	11/11/2015 21:29:53	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_revisado.doc	11/11/2015 21:24:00	FRANCISCO JOSE VERÍSSIMO VERONESE	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 2.639.279

Ausência	TCLE_revisado.doc	11/11/2015 21:24:00	FRANCISCO JOSÉ VERÍSSIMO VERONESE	Aceito
----------	-------------------	------------------------	---	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 07 de Maio de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador)

ANEXO 4

STROBE Statement - checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No.	Recomendação
Title and abstract	1	<p>“Análise de Polimorfismos Genéticos do Gene NPHS2 na Glomeruloesclerose Segmentar e Focal Esporádica e Familiar”</p> <p>A Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) primária apresenta manifestações clínicas bastante heterogêneas. Formas hereditárias e as bases moleculares da genética da GESF têm sido definidas em associação com o gene NPHS2. Mutações e polimorfismos deste gene, como os alelos não-sinônimos p.R229Q, p.R138Q e p.A242V tanto em homozigose como em heterozigose composta, são prevalentes com uma frequência que varia de 20% a 30% na GESF familiar e 1 a 30% na GESF esporádica, estando associados com síndrome nefrótica resistente a corticosteroides (SNRC).</p>
Introduction		
Background/rationale	2	<p>Espera-se que o estudo indique a prevalência dos polimorfismos na população estuda e a relação da presença do polimorfismos com desfechos clínicos como resposta ao tratamento e evolução para doença renal crônica.</p>
Objectives	3	<p>Objetivo Geral</p> <p>Determinar a prevalência dos polimorfismos do gene NPHS2 da podocina em pacientes portadores de GESF nas formas familiar ou esporádica, correlacionado os genótipos com as características clínicas desses pacientes.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar a prevalência das mutações do gene NPHS2 p.R229Q, p.R138Q e p.A242V em pacientes adultos e crianças portadores de GESF com e sem resistência ao tratamento com corticosteróides. - Avaliar a correlação entre genótipo e fenótipo de pacientes com GESF familiar ou esporádica, portadores destes polimorfismos, considerando idade de início da GESF, fatores demográficos e clínicos, presença de síndrome nefrótica, resposta ao tratamento imunossupressor, progressão para doença renal crônica terminal e índice de recorrência da GESF no rim transplantado.

Methods		
Desenho do estudo	4	Estudo observacional
Setting	5	Avaliar a prevalência dos polimorfismos p.R229Q, p.R138Q e p.A242V do gene NPHS2 na população portadora de GESF primária em tratamento em Serviços de Nefrologia, assim como desfechos clínicos associados a presença do polimorfismo.
Participants	6	110 pacientes, 40 crianças e 70 adultos. Portadores de GESF primária diagnosticada por biópsia renal.
Variables	7	Idade de início dos sintomas, sexo, raça, presença de síndrome nefrótica ou proteinúria patológica, presença de hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus, medicações imunossupressoras utilizadas, uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA) e/ou bloqueadores do receptor 1 da angiotensina II (BRA), tipo de resposta à terapia imunossupressora, evolução para DRCT e recorrência da GESF após o transplante renal. As variáveis laboratoriais avaliadas foram creatinina sérica (mg/dL), albumina sérica (g/dL), proteinúria de 24 horas (g/24 horas) ou calculada pelo índice proteinúria/creatininúria (IPC) em amostra aleatória de urina, taxa de filtração glomerular estimada.
Data sources/ measurement	8*	Dados clínicos e laboratoriais realizados através de revisão de prontuário. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada no Laboratório de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O DNA de cada amostra foi extraído no equipamento Iprep (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), conforme instruções do fabricante e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A genotipagem foi realizada por PCR em tempo real e, para cada SNP, foram utilizados diferentes ensaios TaqMan para genotipagem de SNP (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) (C_33726873_10 para o rs74315342, C_25636414_10 para o rs61747728 e C_25636407_10 para o rs61747727).
Bias	9	N/A
Study size	10	O cálculo amostral foi baseado em dados da literatura, utilizando-se o programa WinPepi. Para um intervalo de confiança de 95%, com poder de 80%. A estimativa do tamanho amostral foi baseada na prevalência dos polimorfismos estudados anteriormente publicados, em média 35% na GESF familiar e 15% na esporádica. Para se detectar esta diferença de 20% entre as duas formas de GESF, serão necessários incluir 60 pacientes

		pediátricos e 120 pacientes adultos (programa WinPepi, versão 7.0), de um total de 180 famílias.
Quantitative variables	11	Variáveis assimétricas foram expressas como mediana e intervalos interquartis e os dados sobre variáveis simétricas como média \pm desvio padrão.
Statistical methods	12	Os dados foram apresentados como análise descritiva, média \pm desvio padrão, ou mediana e percentis (P25-P75). A normalidade das variáveis foi estabelecida pelo teste de Shapiro Wilk. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste do Qui-quadrado. Na comparação de variáveis contínuas foram utilizados o teste t de Student (dois grupos) ou ANOVA (três ou mais grupos) para as variáveis simétricas, e para as variáveis assimétricas o teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. Todas as análises foram realizadas através do software SPSS for Windows (versão 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). O nível de significância foi estabelecido como P menor que 0,05.

Results

Participants	13*	(a) 110 pacientes
		(b) N/A
		(c) N/A
Descriptive data	14*	110 pacientes, 40 crianças e 70 adultos, portadores de GESF primária
Outcome data	15*	<p>Para as crianças, a mediana de idade foi 15 (10-21) anos, e considerando o início do quadro clínico, foi de 6 (2-11) anos. Houve predomínio do sexo masculino 23 (58%) e da etnia branca 26 (65%). A apresentação clínica inicial da doença por síndrome nefrótica ocorreu em 37 (93%) dos pacientes. História familiar de GESF foi detectada em 8 (20%) dos pacientes. Quanto à resposta ao tratamento imunossupressor, a SNRC foi encontrada em 36 (90%) das crianças. Dos 40 pacientes incluídos, 22 (55%) já haviam realizado transplante renal, e destes, 14 (63.3%) recidivaram a doença no enxerto. A mediana do tempo de acompanhamento para as crianças foi 4,3 (2,2-7) anos.</p> <p>Nos adultos, a mediana da idade foi de 47 (38-63) anos, com predomínio do sexo masculino 37 (53%) e etnia branca em 61 (87%). A principal forma de apresentação clínica da doença também foi síndrome nefrótica, observada em 53 (76%) pacientes. Nos adultos, história familiar de GESF esteve presente em apenas</p>

		3 (4%) pacientes. Em relação a resposta aos imunossuppressores utilizados, a SNRC foi encontrada em 49 (70%) dos pacientes. A prevalência de pacientes adultos transplantados foi de 7 (10,1%) da amostra. A mediana do tempo de seguimento para os adultos foi 7 (3,6-14) anos. Comparando pacientes portadores e não portadores de polimorfismo, não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação a: presença de síndrome nefrótica, nível inicial de proteinúria e de função renal, tipo de tratamento imunossupressor recebido, evolução para doença renal crônica e necessidade de diálise ou transplante renal
Main results	16	Os polimorfismos foram observados em 11 pacientes, 6 com a variante p.A242V e 5 com p.R229Q, em um total de 10% da amostra. Nenhum paciente, adulto ou criança, apresentou o polimorfismo p.R138Q. Em relação à faixa etária, nas crianças os polimorfismos estavam presentes em 2 (5%) pacientes, um para p.R229Q e outro para p.A242V. Nos adultos, os polimorfismos foram observados em 9 pacientes (12.9%), sendo p.A242V detectado em 5 (7,1%) da amostra e a variante p.R229Q em 4 pacientes (5.7%).
Other analyses	17	
Discussion		
Key results	18	A prevalência dos polimorfismos p.R229Q e p.A242V na população adulta deste estudo estão em consonância com a prevalência descrita em outras publicações em pacientes adultos com GESF esporádica.
Limitations	19	Houve análise de 3 polimorfismos relacionados ao gene NPHS2, consideramos a necessidade de novos estudos, incluindo um maior número de pacientes com GESF familiar ou esporádica, e analisando um número maior de polimorfismos para se definir uma estratégia sobre a indicação da análise genética e suas implicações terapêuticas no manejo clínico dessa condição.
Interpretation	20	Com base nos achados, consideramos que a pesquisa dos polimorfismos do gene NPHS2 podem ser uma alternativa terapêutica promissora no manejo dos pacientes com GESF primária.
Generalisability	21	Investigar os polimorfismos do gene NPHS2, a relação da presença do polimorfismo com a resistência ao tratamento imunossupressor, o potencial de mudança no protocolo de investigação dos pacientes, evitando tratamentos desnecessários e inserindo o aconselhamento genético nos pacientes com GESF primária.

Other information

Funding	22	Este estudo foi financiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE / HCPA), pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.
---------	----	--

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.