

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

JÉSSICA HILÁRIO BONOMO

**Perfil Genético de Doenças Renais Raras: Síndrome
de Bartter e Síndrome Unha-Patela**

SÃO CARLOS -SP
2025

JÉSSICA HILÁRIO BONOMO

Perfil Epidemiológico e Genético de Doenças Renais Raras: Síndrome de Bartter e Síndrome Unha-Patela

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutor em Ciências.

Orientador: Anderson Ferreira da Cunha

São Carlos-SP
2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jéssica Hilário Bonomo, realizada em 02/12/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. Andrei Leitão (IQSC/USP)

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra (UFPE)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTO

Começo agradecendo ao meu orientador, Professor Anderson, por todas as vezes que fui na sua sala para desabafar, reclamar e chorar. A orientação acadêmica, apoio na bancada com experimentos que não andavam, e cobrança por resultados são esperados de um orientador (e muito apreciados!). Mas o apoio quando tive problemas de saúde, lidei com a partida dos meus cachorros, ou tive conflitos pessoais e busquei amparo são evidências de uma pessoa atenciosa e gentil que se importa além do dever.

Agradeço também a minha co-orientadora, Professora Amélia, que confiou a mim o seu projeto de buscar melhorar um pouco o cenário das doenças renais raras no Brasil.

Aos meus pais Giselle e Elço, que sempre buscaram oferecer a melhor educação e as melhores oportunidades para que eu pudesse conquistar meus sonhos; e meu irmão Rafael, que nunca perde o bom humor e me lembra que as coisas não são tão sérias quanto parecem. Amo vocês!

Ao meu parceiro e companheiro, Leo, que me incentiva e apoia dia após dia, mesmo quando eu (mesmo inadvertidamente) faço tudo para que o incentivo e apoio sejam muito difíceis de oferecer. Te amo. Não posso deixar de citar aqui também os cães companheiros Lambda e ômega (os vovôs sempre em mente), e Zero e Tim (os moleques arteiros).

Agradeço aos meus amigos do movimento escoteiro, em particular a família do Grupo Escoteiro Araucária. minha família longe de casa, meu refúgio e esconderijo dos problemas da vida. Amanda, Chico, Adilson, Kátia, por todos os pepinos e alegrias compartilhados. Agatha, minha afilhada não oficial, em nome de todos os jovens que já passaram pelo grupo. Vocês me dão força pra enfrentar qualquer desafio, mesmo com vontade de desistir. Sempre alerta para servir o melhor possível, meus irmãos de lenço.

Agradeço aos amigos de laboratório, em particular a Marília, que compartilhou comigo a alegria de ver bandas no gel de uma PCR que não estava dando certo nem com reza. Também ao pessoal que participou da força tarefa dos testes diagnósticos de COVID-19, as únicas pessoas além do Leo que vi pessoalmente em quase um ano. Olinda, João, Fer, Mari, Carla, Grazi, Cleiton, Hosana, Matheus, Manu, Samara, e todos os outros membros do “Grupo do Anderson”, antigos e novos. Foi estressante

e trabalhoso, mas muito bom poder ter a companhia de vocês.

Aos amigos de vida, que sempre estão prontos pra ouvir, ajudar, acolher, criticar, celebrar... mesmo que nem sempre com a frequência que gostaríamos. Ana, Mari, Alô, Aru, Jerê, Pascotto, Santiago, Guiga, Hindi, Ste, e todos os frequentadores da Nerdon.

À minha amiga mais antiga, Isa Mastrangelli, que sempre vai ser minha irmã de coração.

Aos colegas Técnicos Administrativos da UFSCar, que me receberam de braços abertos na carreira. Regina, Heber, Lindomar, Bel, Matheus. Também os colegas docentes, entre os quais destaco Professor Francis, que me recebeu como chefe de departamento, Professora Maria Teresa, Professor Iran, e novamente Professor Anderson, que me receberam no dia a dia do trabalho em laboratório.

Aos novos colegas do SINTUFSCar, que reconhecem minha vontade de lutar por direitos e melhorias não só da carreira e do serviço público, mas da sociedade como um todo.

À Fernanda, que me manteve sã por todos esses anos. E a todos que fizeram e fazem parte desse caminho e contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao Departamento de Genética e Evolução (DGE) e o Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) pela infraestrutura e apoio institucional. À equipe do Laboratório de Genética Molecular IIS Biocruces - Bizkaia (Espanha), por continuar o trabalho de diagnóstico quando fomos obrigados a suspendê-los por imposição da pandemia.

Por fim, agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo financiamento dessa pesquisa, através de equipamentos, infraestrutura e bolsa de estudos.

RESUMO

A Síndrome de Bartter (SB) e a Síndrome Unha-Patela (SUP) são doenças genéticas renais raras. A SB afeta cerca de 1 em 1000000 nascidos vivos e tem herança autossômica recessiva. É uma tubulopatia, tendo origem em disfunções no transporte de sais na porção ascendente espessa da alça de Henle, localizada no néfron. É dividida em tipos, de acordo com o gene, e consequentemente a proteína, em que a mutação ocorre (*SLC12A1*, *KCNJ1*, *CLCNKB*, *BSND*, ou *CLCNKA* e *CLCNKB*). Os sintomas da SB incluem perda de sal, alcalose hipocalêmica, atraso no crescimento e alterações no desenvolvimento. A Síndrome Unha-Patela tem prevalência aproximada de 1 em 50 000 nascidos vivos, e tem herança autossômica dominante. Ocorre em pessoas que tem mutações patogênicas no gene *LMX1B*, que codifica um fator de transcrição essencial ao desenvolvimento de várias estruturas no processo embrionário. Os pacientes podem apresentar alterações nas unhas, articulações, olhos, rins, entre outras. O diagnóstico preciso de doenças genéticas raras é importante para orientar o tratamento, oferecer melhor aconselhamento genético às famílias, e contribuir para o entendimento dos processos fisiológicos envolvidos nessas patologias. Este trabalho se trata da reunião de relatos de caso, tendo como objetivo identificar alterações genéticas associadas às síndromes de Bartter e Unha-Patela em pacientes brasileiros com suspeita clínica das mesmas. Após devido consentimento, foi realizado o diagnóstico molecular dos pacientes e, quando possível, seus pais. As variantes identificadas foram analisadas através de consulta a bancos de dados e algoritmos de predição de patogenicidade para confirmar sua relação com o quadro clínico dos pacientes. O estudo contou com uma paciente de SUP, com manifestações clínicas típicas. O sequenciamento revelou a variante rs1588307477 (p.Val265Leu), no gene *LMX1B*. Cinco pacientes apresentavam SB tipo III, apresentando mutações no gene *CLCNKB*. Um dos pacientes apresentou variante inédita na literatura (c.1408+1G>C). Um paciente possui SB tipo IV. Teve diagnóstico tardio, confirmado neste estudo pela identificação de duas variantes em heterozigose composta, incluindo a variante inédita c.784delG. A contextualização dos casos apresentados perante a literatura levou à apresentação de duas hipóteses: que a variante *BSND* c.139G>A;p.Gly47Arg está associada a apresentação fenotípica mais branda de SP tipo IV, e que a variante *BSND* variante c.784delG;p.(Ala262Profs*68) tem como mecanismo fisiopatológico o comprometimento da regulação do transporte dos canais CIC-K.

Palavras-chave: Síndrome de Bartter, Síndrome Unha-Patela, nefropatia, doenças genéticas raras, sequenciamento de DNA

ABSTRACT

Bartter Syndrome (BS) and Nail–Patella Syndrome (NPS) are rare renal genetic diseases. BS affects about 1 in 1,000,000 live births and has autosomal recessive inheritance. It is a tubulopathy, originating from dysfunctions in salt transport in the thick ascending limb of the loop of Henle, located in the nephron. BS is divided into types according to the gene, and consequently the protein, in which the mutation occurs (*SLC12A1*, *KCNJ1*, *CLCNKB*, *BSND*, or *CLCNKA* and *CLCNKB*). The symptoms of BS include salt loss, hypokalemic alkalosis, growth delay, and developmental alterations. Nail Patella Syndrome has an approximate prevalence of 1 in 50,000 live births and has autosomal dominant inheritance. It occurs in people who have pathogenic mutations in the *LMX1B* gene, which encodes a transcription factor essential to the development of various structures in the embryonic process. Patients may present alterations in the nails, joints, eyes, kidneys, among others. The precise diagnosis of rare genetic diseases is important to guide treatment, provide better genetic counseling to families, and contribute to understanding the physiological processes involved in these pathogeneses. This work is a series of case reports, and aims to identify genetic alterations associated with Bartter and Nail–Patella syndromes in Brazilian patients with clinical suspicion of these conditions. After due consent, molecular diagnosis of the patients and, when possible, their parents was performed. The identified variants were analyzed through consultation of databases and pathogenicity-prediction algorithms to confirm their relation to the patients' clinical presentation. The study included one NPS patient, with typical clinical manifestations; sequencing revealed the variant rs1588307477 (p.Val265Leu) in the *LMX1B* gene. Five patients presented BS type III, carrying mutations in the *CLCNKB* gene, and one of these patients presented a variant not previously reported in the literature (c.1408+1G>C). One patient has BS type IV, with late diagnosis confirmed in this study by the identification of two variants in compound heterozygosity, including the novel variant c.784delG. The contextualization of the presented cases in light of the literature led to the proposal of two hypotheses: that the *BSND* variant c.139G>A; p.Gly47Arg is associated with a milder phenotypic presentation of type IV SP, and that the *BSND* variant c.784delG; p.(Ala262Profs*68) has as its pathophysiological mechanism an impairment in the regulation of ClC-K channel transport.

Keywords: Bartter Syndrome; Nail–Patella Syndrome; nephropathy; rare genetic diseases; DNA sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O rim, néfron, e os seus componentes. O néfron é a unidade básica do rim, e é composto pelo corpúsculo renal, conjunto do glomérulo e uma porção de capilares, e o túbulo renal. O túbulo, por sua vez, é subdividido em túbulo contorcido proximal, Alça de Henle (contendo porção fina descendente, porção fina ascendente e porção espessa ascendente) túbulo contorcido distal e túbulo coletor.(autoria própria, adaptada de Tanner (2013) (13), utilizando Servier Medical Art (https://smart.servier.com))	2
Figura 2 - Proteínas envolvidas no transporte transepitelial de sais na porção ascendente espessa da alça de Henle (autoria própria, adaptada de Tanner (2013) (13), utilizando Servier Medical Art (https://smart.servier.com)).....	5
Figura 3 - O gene LMX1B e o fator de transcrição por ele codificado (autoria própria)	6
Figura 4 - Cromatograma mostrando a alteração na paciente e a mesma posição na mãe, sem alteração (autoria própria).	23
Figura 5 - Homologia de aminoácidos entre LMX1B selvagem humano, p.Val265Leu, e LMX1B de camundongo (autoria própria, utilizando BioEdit (90))...	24
Figura 6 - O gene CLCNKB, seus éxons, e CIC-Kb,por ele codificada. A proteína está representada em sua estrutura secundária. As variantes patogênicas pontuais encontradas nos pacientes desta tese estão indicadas. A variante sublinhada é inédita na literatura (autoria própria).	30
Figura 7 - Cromatograma mostrando as alterações na paciente 007 e sua mãe (autoria própria).....	32
Figura 8 - Esquema do gene BSND, a proteína Bartina e as variantes descritas na literatura (autoria própria).....	34
Figura 9 – Homologia de DNA (A) e Proteína (B) entre BSND selvagem, as variantes presentes na paciente, e outros primatas (autoria própria, utilizando BioEdit (90)) .	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados.....	15
Tabela 2 - Diagnóstico molecular dos pacientes com Síndrome de Bartter tipo III ..	29

LISTA DE ABREVIATURAS

nº	Número
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
del	Deleção
indel	Inserção e/ou deleção

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido desoxiribonucleico (do inglês, Deoxiribonucleic acid)
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>SLC12A1</i>	solute carrier Family 13 member 1
NKCC2	Na-K-2Cl cotransporter 2
<i>KCNJ1</i>	potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 1
ROMK	renal outer medullary potassium channel
<i>CLCNKB</i>	gene chloride voltage-gated channel Kb
CLC-Kb	proteína chloride voltage-gated channel Kb
<i>CLCNKA</i>	gene chloride voltage-gated channel Ka
CLC-Ka	proteína chloride voltage-gated channel Ka
<i>BSND</i>	gene derivado da descoberta: barter syndrome neurossensorial deafness
<i>CASR</i>	calcium sensing receptor
MAGED2	melanoma-associated antigen D2
<i>SLC12A3</i>	solute carrier Family 12 member 3
SUP	Síndrome Unha-Patela
<i>LMX1B</i>	LIM homeobox transcription fator 1 beta
LIM	LIN-11, Isl-1 e MEC-3 (genes onde o domínio foi primeiramente identificado)
PNAIPDR	Programa nacional de atenção integral às pessoas com doenças raras
SUS	sistema único de saúde
DRC	doença renal crônica
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TALE	termo de assentimento livre e esclarecido
EDTA	ácido etilendiaminotetracético (do inglês ethylenediaminetetraacetic acid)
FTA	do inglês Fast Technology for Analysis of nucleic acids
PBS	tampão salino de fosfato (do inglês Phosphate buffered saline)
NCBI	do inglês national center for biotechnology information
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês polymerase chain reaction
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfatado
PEG	polietilenoglicol
UV	ultravioleta
TAE	tampão tris-acetato-EDTA
ABI	extensão do formato para arquivos de sequenciamento de DNA

FASTA	extensão de formato para arquivos de texto representando sequências de nucleotídeos ou aminoácidos
PHD	extensão do formato PHRED
PDF	portable document format
BLAST	basic local alignment Search tool
EMBL-EBI	european molecular biology laboratory – european bioinformatics institute
HGMD	human gene mutation database
CADD	combined annotation dependente depletion
dATP	desoxiadenosina trifosfatada
LB	luria-bertani
IPTG	isopropil-beta-D-1-tiogalactopiranosídeo (do inglês Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
IMC	índice de massa corporal
COVID-19	coronavírus disease 2019
CNV	copy number variation
NGS	next Generation sequencing
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
SARS-COV2	coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
mRNA	ácido ribonucleotídico mensageiro
SNP	single nucleotide polymorphism
HUB	hospital universitário de Brasília
SP	São Paulo
PHRED	do inglês “Phil’s Read Editor”, formato de arquivos de dados de sequenciamento de DNA

LISTA DE SÍMBOLOS

Cl ⁻	ión de cloro
K ⁺	ión de potássio
Na ⁺	ión de sódio
Ca ²⁺	ión de cálcio
Mg ²⁺	ión de magnésio
ml	mililitro
°C	graus Celsius
mm	milímetro
G	unidade de gravidade
s	segundo
µl	microlitro
min	minuto
M	molar
V	volume
MgCl	cloreto de magnésio
kg/m ²	quilograma por metro quadrado
cm	centímetro
mmHg	milímetro de mercúrio
g	grama
kg	quilograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SÍNDROME DE BARTTER.....	3
1.2 SÍNDROME UNHA-PATELA	5
1.3 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE DOENÇAS RENAI RARAS.....	7
1.4 IMPACTO DAS SÍNDROMES DE BARTTER E UNHA-PATELA	8
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	12
3.2. COLETA DE SANGUE	12
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA	12
3.3.1 Extração a partir de sangue em frasco com EDTA.....	12
3.3.2 Extração a partir de cartão de FTA.....	13
3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE.....	13
3.5. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	17
3.5.1. Purificação com Polietilenoglicol (PEG).....	17
3.5.2 Purificação utilizando kit de extração	17
3.5.3 Purificação a partir de gel de agarose	17
3.6 SEQUENCIAMENTO.....	18
3.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	18
3.8 ANÁLISE DE HOMOLOGIA.....	20
3.9 INSERÇÃO DOS FRAGMENTOS EM PLASMÍDEO PGEM-T EASY	20
3.10 TRANSFORMAÇÃO DE PLASMÍDEOS CLONADOS EM E. COLI DH5A	20
3.11 CONFIRMAÇÃO DE HETEROZIGOSE (GENE <i>LMX1B</i>).....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 SÍNDROME UNHA-PATELA (PACIENTE 015).....	22
4.2 SÍNDROME DE BARTTER.....	24
4.2.1 Paciente 001	24
4.2.2 Paciente 017	25
4.2.3. Paciente 020	26
4.2.4 Pacientes 022 e 023	27
4.2.5 Síndrome de Bartter Tipo III	28
4.2.6 Paciente 007 e Síndrome de Bartter Tipo 4.....	30
4.3 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO	37

5. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
6. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A – TABELAS DE VARIANTES DESCRITAS EM BANCOS DE DADOS E LITERATURA.....	53
ANEXO A – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (SÍNDROME DE BARTTER)	62
ANEXO B – TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (SÍNDROME UNHA-PATELA)	63
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (SÍNDROME DE BARTTER)	64
ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (SÍNDROME UNHA-PATELA).....	66
ANEXO E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS.....	68
ANEXO F – ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	74

1. INTRODUÇÃO

As doenças genéticas, de modo geral, resultam de alterações no genoma que comprometem processos biológicos essenciais e, conseqüentemente, a saúde do indivíduo. Uma mutação é qualquer alteração na sequência de DNA que possa ser herdada. Tais alterações podem ocorrer em diferentes escalas, desde um único nucleotídeo até cromossomos completos (1). Entre os tipos mais frequentes estão as deleções, inserções e substituições de nucleotídeos, que podem ocorrer tanto em nível cromossômico quanto gênico. As mutações estruturais envolvem modificações extensas à estrutura dos cromossomos, como deleções, duplicações, inversões ou translocações que atingem segmentos de DNA maiores que 1000 pares de base. (2). Essas alterações costumam originar síndromes de natureza cromossômica e geralmente associadas a quadros clínicos complexos. Já as mutações gênicas, por outro lado, correspondem a alterações mais pontuais, podendo envolver apenas um ou poucos pares de bases (1; 2). Essas mutações, embora de menor proporção em nível genômico, podem comprometer a expressão, a estrutura ou a função de proteínas essenciais, levando ao surgimento de doenças monogênicas, como é o caso das síndromes de Bartter e Unha-Patela (3; 4).

No contexto da genética, mutações de interesse médico são denominadas variantes, e classificadas como patogênica, provavelmente patogênica, significado incerto, provavelmente benigna e benigna (2; 5). As variantes tem nomenclatura padronizada pela HGVS (Sociedade da Variação do Genoma Humano, do inglês *Human Genome Variation Society*) (6), e, quando completa, inclui a localização do nucleotídeo (ou nucleotídeos) alterado(s), o tipo de alteração, o conteúdo da alteração e a consequência na proteína (<https://hgvs-nomenclature.org>).

A Síndrome de Bartter e a Síndrome Unha-Patela são doenças genéticas raras que afetam o funcionamento renal, caracterizando-se por manifestações clínicas complexas e mecanismos moleculares distintos. A OMS considera doença rara aquela que afeta até 1 em 2000 pessoas vivas no mundo (7), enquanto o Ministério da Saúde do Brasil considera raras as doenças que afetam até 65 em 100000 pessoas vivas (8). Apesar de uma doença rara única afetar um número pequeno de pessoas, são reconhecidas mais de 7000 doenças raras, afetando aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo (9).

Doenças genéticas renais raras podem causar desde insuficiência renal

crônica na vida adulta até a morte ainda na fase fetal (10). Na Europa, é estimado que 3% dos pacientes em terapia renal substitutiva possuam doença renal hereditária que não a doença policística renal autossômica dominante (11). Cada uma dessas doenças afeta os rins de maneira particular, porém pode-se agrupá-las de acordo com as estruturas mais afetadas pela condição.

A excreção e formação de urina ocorre nos néfrons, unidades base do rim. O néfron é dividido entre glomérulo, que é a unidade responsável pela filtração de 180 litros de sangue diariamente, e o sistema tubular, que através de complexos mecanismos reabsorve água e sais a fim de manter a homeostase. O sistema tubular é ainda dividido em 14 segmentos agrupados em 4 partes: túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e túbulo coletor. Ao longo do sistema tubular, diferentes substâncias são absorvidas e secretadas através de canais iônicos, trocadores, carreadores, cotransportadores de modo específico, ativo ou passivo, via transcelular ou paracelular, e ainda por difusão (12).

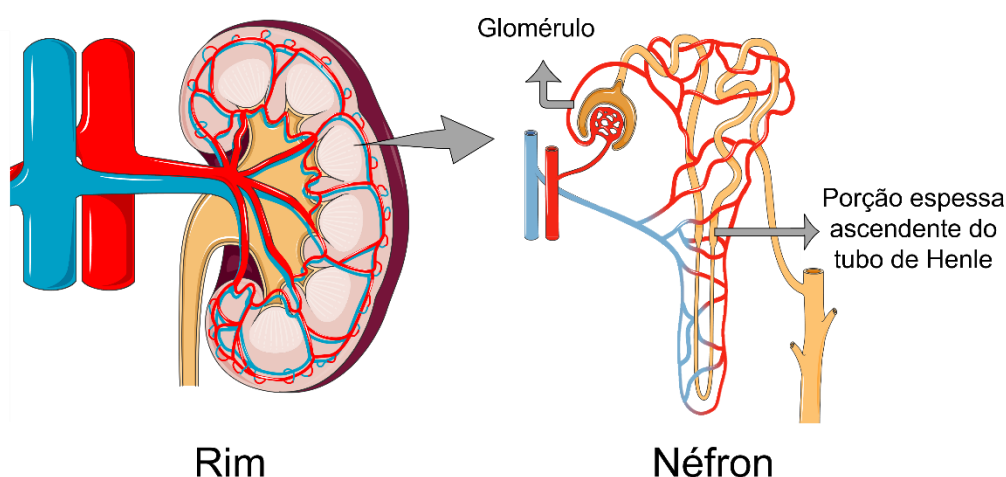


Figura 1 - O rim, néfron, e os seus componentes. O néfron é a unidade básica do rim, e é composto pelo corpúsculo renal, conjunto do glomérulo e uma porção de capilares, e o túbulo renal. O túbulo, por sua vez, é subdividido em túbulo contorcido proximal, Alça de Henle (contendo porção fina descendente, porção fina ascendente e porção espessa ascendente) túbulo contorcido distal e túbulo coletor. (autoria própria, adaptada de Tanner (2013) (13), utilizando Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>))

Como citado anteriormente, dentre as doenças renais raras estão a Síndrome de Bartter e a Síndrome Unha-Patela. Tomando como base a frequência dessas síndromes na população mundial, há no Brasil milhares de pacientes portadores,

porém poucos estudos sobre essa população no país. Os estudos publicados são estudos de caso único, nem sempre com informação genética (14; 15; 16; 17; 18; 19), ou reúnem grupos de pacientes com diagnóstico clínico sem informações genéticas (20; 21).

1.1 SÍNDROME DE BARTTER

A Síndrome de Bartter é uma doença rara autossômica recessiva causada por variantes patogênicas dos genes que codificam proteínas relacionadas ao transporte de sais na porção espessa ascendente da alça de Henle, classificando-a, portanto, como uma tubulopatia. Foi primeiramente descrita em 1962, como uma doença que causa hiperplasia e hipertrofia do aparelho justaglomerular, hiperaldosteronismo e alcalose hipocalêmica associados ao comprometimento do crescimento e desenvolvimento (3). Não há estudos que relatam o prognóstico para pacientes com Síndrome de Bartter sem tratamento. No entanto, para pacientes com acompanhamento médico, as comorbidades mais comuns são: a nefrocalcinose, que tem melhora com o tratamento; o atraso no crescimento; e doença renal crônica, podendo levar a falência renal. As causas do atraso no crescimento e fatores de risco associados à doença renal crônica não são completamente compreendidos (22).

A Síndrome de Bartter tem frequência estimada em 1 a cada 1 000 000 na população geral, porém pode chegar a proporções bem menores como é o caso da Costa Rica, onde a proporção é de até 1,2 a cada 100 000 nascidos vivos (23). Estudos de Kurtz e colaboradores indicam que a maior incidência nesse país ocorre devido a efeito fundador, ou seja, a maior parte dos portadores possui um ancestral comum, e uma população pequena e geneticamente isolada permite maior incidência de doenças de herança recessiva, como é o caso da síndrome em questão (24).

Estudos posteriores à descrição original da Síndrome de Bartter relatando diferentes casos a classificaram em clássica, conforme descrita por Bartter e colaboradores, e a pré-natal, identificada em recém-nascidos que já apresentavam manifestações clínicas desde o nascimento. Com os avanços no estudo, foram ainda subdivididas em 4 tipos, baseando-se nas características clínicas dos pacientes. Posteriormente, estudos genéticos também identificaram os genes relacionados a cada um dos tipos:

a) Tipo I, pré-natal, podendo causar polihidrânio (excesso de líquido amniótico) e nascimento prematuro, perda de sal severa e hipercalcúria, pode levar

a morte do feto ou recém-nascido; geneticamente é causada por diferentes mutações no gene *SLC12A1*, causando perda de função da proteína codificada, NKCC2, transportadora de sódio, potássio e cloro (25; 26; 27),

b) Tipo II, frequentemente pré-natal, apresenta sintomas similares ao tipo I além de hipercalemia; causada por mutações no gene *KCNJ1*, que codifica o canal ROMK, que transporta potássio para o túbulo, reciclando-o. A maioria das mutações descritas é do tipo missense ou nonsense no éxon 2, causando perda de função (28; 29),

c) Tipo III, considerada como “clássica”, tendo sido a variação inicialmente descrita por Bartter, usualmente tem início na infância com perda de sal, poliúria (aumento na produção de urina), atraso no crescimento; geneticamente causada por mutações no gene *CLCNKB*, que codifica a proteína transportadora CLC-Kb, responsável pelo transporte de cloro para o sangue (30; 31),

d) Tipo IV, pré-natal, tipicamente causando polidrâmnio (aumento no volume de fluido amniótico) e nascimento prematuro, perda de sal, hipocalcemia, atraso no crescimento, surdez sensorial, defeitos na concentração de urina; é subdividida de acordo com a origem genética em IVa, e IVb, causada por mutações concomitantes nos genes *CLCNKA* e *CLCNKB*. Apesar de origens genéticas distintas, esses subtipos são reunidos pois o efeito fisiológico das mutações é o mesmo: *CLCNKA* e *CLCNKB* codificam os transportadores CLC-Ka e CLC-Kb, responsáveis pelo transporte de Cl⁻ para a corrente sanguínea, enquanto *BSND* codifica a Bartina, cofator necessário para o funcionamento de CLC-Ka e CLC-Kb.) (32; 33; 34; 35).

Outros dois subtipos da Síndrome de Bartter foram descritos, mas com características muito particulares. O primeiro, causado por mutações de ativação no gene *CASR*. Tem herança autossômica dominante. A proteína *CASR*, codificada pelo gene de mesmo nome, é um receptor de cálcio que regula diversos transportadores de membrana e o transporte paracelular de cálcio. Pacientes com esse subtipo apresentam hipocalcemia, hipercalcúria e perda de sal (36; 37; 38; 39; 40; 41). O segundo, causado por mutações na proteína *MAGE-D2*, codificada pelo gene *MAGED2* (de herança ligada ao X), causa uma síndrome de Bartter transiente, nas fases pré- e peri-natal. *MAGE-D2* é um antígeno associado ao melanoma D2, e está associado à expressão de *NKCC2* e *SLC12A3* durante o período fetal (42; 43).

Todas as proteínas mencionadas e sua função estão representadas na Figura 2.

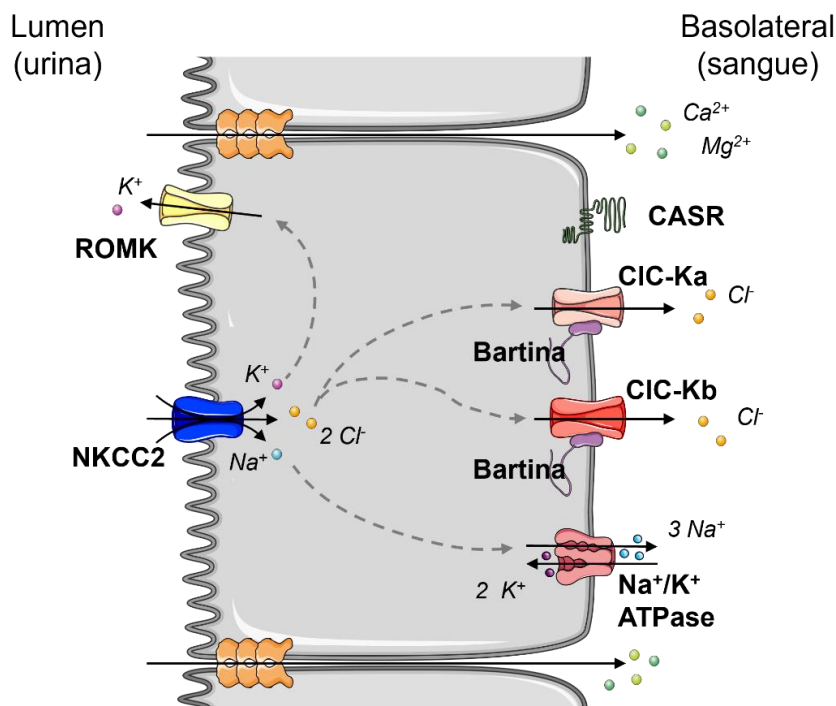


Figura 2 - Proteínas envolvidas no transporte transepitelial de sais na porção ascendente espessa da alça de Henle (autoria própria, adaptada de Tanner (2013) (13), utilizando Servier Medical Art (<https://smart.servier.com>)).

1.2 SÍNDROME UNHA-PATELA

Também conhecida como Síndrome de Fong, a Síndrome Unha-Patela (SUP) trata-se de uma síndrome primariamente ortopédica, tendo sido inicialmente descrita e nomeada pelo conjunto de manifestações mais comuns: alterações nas unhas, articulações e patela (44).

A SUP é autossômica dominante, causada por alterações no gene *LMX1B*, localizado em 9q33.3 (45; 46). Este gene codifica o fator de transcrição de mesmo nome, pertencente à família de proteínas de homeodomínio LIM. Essa proteína apresenta dois domínios LIM (LIM-A e LIM-B) na porção N-terminal, um Homeodomínio e uma sequência de ativação C-terminal (Figura 3) (47). Os domínios LIM possuem dedos de zinco e estão envolvidos em interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição e modificadores, enquanto o Homeodomínio liga-se a DNA. Entre os genes-alvo e parceiros de interação conhecidos de *LMX1B* estão genes para a formação da membrana basal glomerular, nos néfrons, e fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento renal (48; 49; 50). Por ser um fator de transcrição que atua de maneira importante no desenvolvimento embrionário, existem outras várias características e sintomas reportados relacionados à síndrome

em diversos sistemas além de seus sinais clássicos e nefropatia (51; 52; 53; 54; 55; 56; 57).

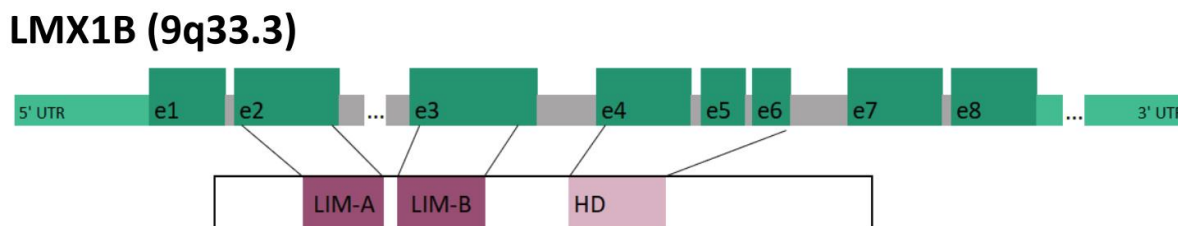


Figura 3 - O gene LMX1B e o fator de transcrição por ele codificado (autoria própria)

Posteriormente, descobriu-se que a doença afetava também os rins, em particular a membrana basal glomerular, portanto caracterizando-a como uma glomerulopatia (58). A incidência dos pacientes com Síndrome Unha-Patela é de aproximadamente 1 em 50000 nascidos vivos, porém pode ser maior devido a subnotificação de casos com fenótipo brando, já que há grande variação de expressividade, inclusive com pacientes que apresentando apenas alterações nas unhas e nenhum outro sintoma característico, ou mesmo nefropatia isolada (54; 59).

Com frequência variada na população de pacientes, foram reportados: alterações na coluna e parede torácica, alterações ósseas no quadril e outras articulações, glaucoma e hipertensão ocular, sinal de Lester (porção de pigmentação mais escura na íris), constipação e síndrome do intestino irritável, alterações de sistema nervoso periférico, epilepsia, alterações de circulação periférica. Um sinal interessante da síndrome são os cornos ilíacos, proeminências ósseas que se projetam dos ossos ilíacos, que não causam qualquer prejuízo ao paciente, porém são considerados um achado patognomônico, ou seja, exclusivo e indicativo definitivo da Síndrome Unha-Patela. (44) É importante ressaltar que a variação fenotípica da Síndrome Unha-Patela é grande mesmo entre uma família, havendo diversidade não só de sintomas e sinais como de sua expressividade, ou seja, dois pacientes com a mesma mutação podem apresentar sintomas diferentes e em níveis variados, que afetam sua qualidade de vida de maneiras distintas.

O envolvimento renal é o principal fator para o prognóstico da doença. Por ter sinais bastante característicos (cornos ilíacos, alterações nas unhas e patela), testes genéticos e biópsias raramente são solicitados no processo diagnóstico. A literatura reporta valores variados para a frequência do envolvimento renal na Síndrome Unha-Patela, de 5% a 40%, e a presença e severidade do comprometimento renal avaliada por exames metabólicos ou histopatológicos não necessariamente se correlacionam

com o prognóstico (54; 58; 60; 61; 62). Alguns estudos apontam que a localização da mutação pode ser um indicativo do envolvimento renal na doença (15; 54), porém são necessários mais estudos e maiores para melhor compreender os mecanismos dessa variação, que são em grande parte ainda desconhecidos. A falta do diagnóstico nesses casos pode levar a tratamentos inadequados, como por exemplo o uso de anti-inflamatórios não esteroidais para o controle de dor, o que aumenta as chances de doença renal, dada a nefrotoxicidade dessa classe de medicamentos. Devido a esses fatores, é possível que portadores da síndrome desenvolvam sintomas renais sem nunca serem diagnosticados de acordo com os sinais ortopédicos clássicos (63; 64), e cheguem até a terapia renal substitutiva, fazendo parte da porção de pacientes em tratamento dialítico sem diagnóstico.

1.3 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE DOENÇAS RENAIIS RARAS

É evidente que a biologia molecular e seus avanços beneficiam de maneira importante os estudos das doenças raras hereditárias, permitindo diagnósticos mais precisos e definitivos, o esclarecimento dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas. No caso das síndromes tratadas neste estudo, além da identificação dos genes associados à síndrome, a biologia molecular contribuiu também na elucidação do mecanismo de filtração e reabsorção de substâncias no néfron (46; 49; 50; 65; 66).

O diagnóstico da Síndrome de Bartter é guiado por exames laboratoriais, porém só pode ser definitivo com teste genético, garantido no Brasil pela Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras (PNAIPDR), instituída por portaria em 2014 (8). Na prática, no entanto, tais exames diagnósticos não estão disponíveis aos pacientes pela falta de centros diagnósticos e alto custo.

O diagnóstico molecular promove além do diagnóstico de mutações já conhecidas, a descoberta e divulgação de novas mutações, que por sua vez facilita o diagnóstico futuro de portadores da mesma variante. O subsequente estudo dessas variantes de forma global auxilia na associação de regiões do gene com maior risco de complicações específicas e amplia o conhecimento sobre essas doenças de maneira geral, promovendo melhor entendimento de seus mecanismos e o desenvolvimento de estratégias de tratamento, culminando no aumento de qualidade de vida do paciente (2; 67; 68; 69; 70).

Há ainda questões a respeito da população de pacientes em si, em particular no Brasil, onde os registros clínicos e genéticos dessas doenças ainda são escassos e pouco sistematizados, o que dificulta estimar sua real prevalência, compreender a diversidade genotípica dos casos e estabelecer protocolos de diagnóstico e tratamento mais eficazes. Assumindo as estimativas para a população em geral, 1 em cada 1 000 000 para Síndrome de Bartter e 1 em cada 50 000 para Síndrome Unha-Patela, no Brasil, há aproximadamente 210 pessoas com Síndrome de Bartter e 4200 pacientes com Síndrome Unha-Patela. Dada a miscigenação presente na população brasileira, é bastante provável que os pacientes apresentem mutações já descritas em outros países, e também novas mutações nunca reportadas.

É de extrema importância que o diagnóstico clínico seja complementado pelo diagnóstico molecular, uma vez que muitas dessas enfermidades raras compartilham sintomas semelhantes, dificultando sua distinção apenas por critérios clínicos (71; 72; 73; 74; 75; 76; 77). Aliado ao desconhecimento de grande parte de profissionais da saúde desconhecem essas condições (consequência natural da característica rara das doenças) a jornada diagnóstica torna-se difícil e conturbada para as famílias afetadas. É comum não só a demora no diagnóstico como o diagnóstico incorreto, às vezes múltiplas vezes, até chegar ao diagnóstico correto. A confirmação molecular, além de oferecer maior precisão e confiabilidade, proporciona compreensão, segurança e melhor direcionamento terapêutico aos pacientes e seus familiares (2; 69; 70).

1.4 IMPACTO DAS SÍNDROMES DE BARTTER E UNHA-PATELA

No Brasil, a maior parte das doenças renais raras hereditárias permanecem negligenciadas, com processo diagnóstico frequentemente interrompendo na suspeita clínica, ou seja, sem a identificação de mutação, muitas vezes necessária para confirmação do diagnóstico (17; 19; 20).

O Sistema Único de Saúde (SUS) possui diretrizes clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica (DRC), com a identificação de grupos de risco e estratégias para a prevenção da DRC. No entanto, não há menção a doenças renais hereditárias, e apesar de comprovada relação com polihidrânio e pais consanguíneos, esse não é considerado um grupo de risco e não há protocolo de avaliação da saúde renal nestes casos. Isso tem como consequência a descoberta do possível diagnóstico apenas após o aparecimento de sintomas, que incluem

atraso no crescimento e desenvolvimento e insuficiência renal (78).

De acordo com a Sociedade Brasileira de nefrologia, em julho de 2017, estimava-se que havia no Brasil 126 583 pacientes em tratamento dialítico, dos quais 10% não possui definição da causa da insuficiência renal (79). A Síndrome Unha-Patela é raramente investigada como causa de doença renal, e pode ser responsável por parte desses casos. Ademais, é comum em pacientes com a Síndrome Unha-Patela o uso de medicamentos anti-inflamatórios nefrotóxicos, para alívio dos sintomas ortopédicos, o que pode elevar a incidência de insuficiência renal nesses pacientes.

A legislação brasileira, através da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doenças Raras (PNAIPDR) (8), garante o subsídio do diagnóstico e tratamento de doenças raras, incluindo análises genéticas, através de laboratórios contratados, mas não há estimativa do número de pacientes portadores de síndrome de Bartter e Síndrome Unha-Patela no país. A identificação e caracterização das variantes genéticas associadas a essas doenças representam um passo fundamental para o aprimoramento do diagnóstico, a compreensão das correlações genótipo-fenótipo e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais personalizadas. O diagnóstico precoce dessas síndromes permite intervenção que não só reduz a morbidade e mortalidade dos pacientes, como evitam a evolução para insuficiência renal crônica, reduzindo os gastos públicos com terapias renais substitutivas.

2. OBJETIVO

O estudo tem como objetivo identificar e caracterizar mutações associadas às Síndromes de Bartter e Unha-Patela em pacientes brasileiros, correlacionando as variantes encontradas com a apresentação clínica e avaliando sua relevância patogênica, incluindo a análise *in silico* de variantes ainda não descritas na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

A participação na pesquisa foi vinculada a assinatura do termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) (Anexos A e B) para os pacientes menores de idade e de termo consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos C e D) pelos responsáveis, em três vias cada um: uma para deixar anexada no prontuário médico, uma via para entregar ao responsável legal e outra para o laboratório de pesquisa.

A pesquisa foi autorizada (Aprovação nº 81191617.3.0000.5504, opinião nº 2.550.807) a partir de parecer consubstanciado do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Carlos (Anexo E).

3.2. COLETA DE SANGUE

Foram coletadas amostras de sangue do paciente e de seus genitores. Foram coletados 5 ml de sangue periférico em tubo de sangue total (contendo EDTA) ou, alternativamente, em cartões FTA. Nesse último caso é necessário volume menor, de 0,3 ml ou algumas gotas. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, acompanhado dos Termos já citados e do formulário com informações clínicas.

As amostras foram catalogadas e os formulários com informações clínicas arquivados. A partir deste momento os pacientes foram identificados com códigos para garantir seu anonimato.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de DNA genômico extraídas foram armazenadas a -20°C devidamente identificadas com o código de cada paciente. Amostra remanescente foi armazenada: a -80°C quando em frascos de sangue ou em envelopes a temperatura ambiente quando em cartões FTA.

Após a extração do DNA sempre foi realizada a quantificação e eletroforese em gel de agarose para a avaliação da qualidade.

3.3.1 Extração a partir de sangue em frasco com EDTA

Para a extração de DNA de amostras de sangue em frasco foi utilizado o kit Gen Elute Blood Genomic DNA kit (MilliporeSigma), de acordo com as instruções do

fabricante.

3.3.2 Extração a partir de cartão de FTA

Para as amostras em cartões de FTA foi utilizado um protocolo adaptado a partir de um protocolo sugerido pela empresa Sigma em seu site (80). O protocolo sugerido utiliza materiais do kit “ilustra tissue and cells genomicPrep Mini Spin”, enquanto para essa extração foi usado material do kit “ilustra blood genomic prep. Mini Spin”.

Foi cortado um disco de aproximadamente 1,5mm de diâmetro do cartão de FTA com amostra e colocado em um microtubo de 1,5 ml. Ao disco foi adicionado 1 ml de tampão PBS 1X e foi feita centrifugação a 16 000 g por 30 s. Uma ponteira foi utilizada pra macerar o disco, e foi feita nova centrifugação, a 1 000 g por 10 s. Foi adicionado 50 µl de Lysis Buffer 10 (do kit mencionado) e 10 µl de Proteinase K, e então vortexado por 10 s. Após incubação por 1 hora a 56 °C, foi feita uma centrifugação a 2000 g por 10 s, adicionado 5 µl de RNase A, e novamente incubado, dessa vez por 10 min à temperatura ambiente. A fração líquida da amostra foi adicionada à coluna do kit, que foi colocada sobre um tubo coletor e centrifugada a 11 000 g por 1 min. A fração no tubo de coleta foi descartada e a coluna lavada 2 vezes com 500 µl de Wash Buffer. A coluna foi então colocada sobre um microtubo novo, e sobre ela colocado 20-50 µl de elution buffer pré aquecido a 56 °C. Após incubação a temperatura ambiente por 1min, foi feita uma centrifugação final a 11 000 g por 1min para a coleta da amostra purificada.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES DE INTERESSE

Primers específicos para as regiões exônicas dos genes de interesse (LMX1B, SLC12A1, KCNJ1, CLCNKB, BSND) foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ou retirados da literatura (32; 46). A sequência dos primers utilizados estão descritos na Tabela 1.

A amplificação foi feita através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*). A enzima utilizada para a reação foi escolhida baseado no propósito da reação e tamanho do fragmento a ser amplificado. Para reações iniciais, feitas com o propósito de determinar a melhor condição de amplificação, foi utilizado sempre o Master Mix Taq Pol (Cellco, São Carlos – SP, Brasil, cat. POL-102), produto em que a polimerase já se encontra no buffer ótimo

para PCR, contendo Mg^{2+} e dNTPs. Para reações com o propósito de gerar

Tabela 1 - Primers utilizados

Gene_exon	F	R
LMX1B_e1	GCTGCAAGTGTCCGGGAGAGC	CCTGCAAACCCATTTCTTTATCCG
LMX1B_e2	CGAGGACTGGGACGGACTAGCC	TCTCGGAACCCTTGGAGCTGC
LMX1B_e3	CTCTAGGCAGGATGCCAGCA	ACCTGAGCTGCACACAGATGG
LMX1B_e4-6	CCACGGCAGGTGTCAACAGAG	GCCTTCCACCAAGGCCATC
LMX1B_e7-8	CTGAGCCTGGAGGAGGAGCT	AGACCGGTAGATGGGCACAG
SLC12A1_e2	AGCTCCCTAATGGAAGCACA	GTAAGTAAGATGGATAGTGTTT
SLC12A1_e3-4	TCAATTGTTTTGATTTGCTTTGA	TGCTTATTGAATTTATGATTTACATGC
SLC12A1_e5	GAGGCATGGACCTGAAACT	GCATCCAGCTCCTCCAAATA
SLC12A1_e6	TCAGATAGTCACAATCGTTTGGTT	TCCCTTAGTGCCCTGAGAAG
SLC12A1_e7	CCTATATGGCCCCAGGTGTA	TGCCTGCTCATTTACCATA
SLC12A1_e8	TCTGGGTAGCAGAGACTTAACTGA	TGATGGGGATGGTGATGAG
SLC12A1_e9	GGACTAGGGAAGCCAATGGT	TTTGAATCTGTAGGGTAATATGGTCA
SLC12A1_e10	CATCAACTTGCTGTTTGCTTG	TGCTGCATTGAAAGCTCACT
SLC12A1_e11	CAGAGGCTAAGAAATGGACCTT	GCCAATAATCAATCAGTTGCAG
SLC12A1_e12	CTGGGCGATAGAGCGAGACT	ACTTGAGCCAGATGCAAACA
SLC12A1_e13	TCCCCAAATCTTCTTGTTTGA	CAAATAAAAGGAAAGCCCTATGA
SLC12A1_e14	TGACAGATGCTCGCTATGTTTT	GGATTACGCTTCCCCTAGG
SLC12A1_e15	AGATTCTGGAACCTTGGCCTAAA	ATCCACCTTACATATGCCTCA
SLC12A1_e16	ATTTGGGCACTCATCTTTGC	TTTGTATGACTGCTTATTTTTAGAATG
SLC12A1_e17	GAGAGGTTGCCCATTTTTTC	GCATGTACCTTTTCTCCTCACC
SLC12A1_e18	GGTCATCTCCAAAAGGCTGA	TGCTTGGCTGCCTAACTACA
SLC12A1_e19	TCAGGATCTTCAGAACATTACTTCA	AAGTCAGAGTACCAGGGGAATG
SLC12A1_e20	AAATGCATCAGCTCTTGGCTA	GCCCTGCTGTATCCCATAAC
SLC12A1_e21	GGTGATTTTGTCTTCTTTCATCA	TGGAGAGAAACCTTTCAGTTCCT
SLC12A1_e22	TTGTTTCTGCCCTCAAAGC	TCCCATATACCTTCTCATGCAGT
SLC12A1_e23	ACTTAATTAAGAGCTATCAA	ATTAAGCAACAAACCTCTGAAATG
SLC12A1_e24	CCAACCAAAAAGCCTCTGTC	TCAAGAAGTCGCTGCAGTAAA

<i>SLC12A1_e25</i>	GCATGATATTCAGCTCTGATTCC	TGAAAAATGCAGAAAGCTTGG
<i>SLC12A1_e26</i>	AAACACCATAAGTTTCTAAGCCTGA	CCTGAAGAGTCCCAAGCTTTT
<i>SLC12A1_e27</i>	GCTCAGAAATACTAGTGCCGTTA	TCCTCTCCAGAGGTTTGCAT
<i>KCNJ1_e1</i>	CCACTGACTGTGCGCCTACAA	ACCCCTGATTGATCACTTG
<i>KCNJ1_e2</i>	TTGTCAGCTTGCCAAATGAT	GGGTCTTTGTGCTGGTAGA
<i>CLCNKB_prom</i>	CTCTCCCCATTACAGGGTG	TGGACAGGTGTGTGTTCCAA
<i>CLCNKB_e1</i>	CTCTGTGCAGCTATGGTGGG	CTGTCCACCTATGAGCACCC
<i>CLCNKB_e2</i>	ACTGGAAGGGCCTAGAGGCAGT	GATGTCCTGAGTGGTCCTCCAG
<i>CLCNKB_e3</i>	CACTGTGTCACCACTGTCACC	AGGAGTAAAGCCAGGACCAGA
<i>CLCNKB_e4</i>	GAGGCTGTGGGTGCCTCCCTG	AGTGGGGACTGGCGTAGCGAC
<i>CLCNKB_e5-7</i>	AGATCTTGTCCCCAAAGGAAA	GGCTGAAGTGAGAACTAGAATGA
<i>CLCNKB_e8</i>	GGAGGGCCCACCTGAGATCAG	GCAGGGCCAGGGTCAGGCAG
<i>CLCNKB_e9-10</i>	CGCCATCTTGGCTCCCCACTG	AGCTCGCTGAGAGGTCCCCAG
<i>CLCNKB_e11-12</i>	CTGACCCACAGGTTCTGT	CCAGGGCAGAGGTTAGAGGC
<i>CLCNKB_e13-14</i>	TCTAGGACACTCCCCTGTCCC	CCCTGGGGAACCACCAGCCAA
<i>CLCNKB_e15</i>	CATCACTCCCTCGTGGCTCCTG	CTACGGTGGCGTTTCTTTTTCG
<i>CLCNKB_e16</i>	GCTAAAGTGGAGCTGGTCTG	GCAACAAGGATTTGGAGG
<i>CLCNKB_e17-18</i>	CACAATAGCCCCATAGGAACA	CTCTCCCACTTCCCTCATCTC
<i>CLCNKB_e19</i>	GGGCACCTTCTACCCTCCAGTG	GTCTTCTCAGGCATAGGTTCCCTG
<i>CLCNKB_e20</i>	CTACATCCCCCGCACCACCAC	AGGGTCTCAGCCCAACCTC
<i>BSND_e1</i>	GAACAGAGAGAAGACCGAGTC	TGTCTTCTCTCCCTGTGTAAGC
<i>BSND_e2</i>	TGCCTAACTCACAGAATTGAGAG	ACAGAGGCTGTCTCTCCTTTG
<i>BSND_e3</i>	CTCTCCTTTTTAACCCTTGAAGT	GACCACATACCCAAAGCAAAC
<i>BSND_e4</i>	CGGGAAGGTGGATTATCCTAC	CCATTTTGCAGATAGGGAAAC

amostras para sequenciamento, foi utilizada a enzima Taq Polimerase Phusion recombinante ou o Master Mix High Fidelity (Cellco, São Carlos – SP, Brasil, cat. POL-119), similar o Master Mix Taq Pol, porém utilizando enzima de alta fidelidade, conforme a disponibilidade no momento.

Após a amplificação, as amostras eram submetidas a eletroforese em gel de agarose (1%) para verificação da presença, qualidade e tamanho do fragmento produto. Para a visualização dos fragmentos foi usado Brometo de Etídio no gel de agarose e a imagem capturada pelo fotodocumentador Gel Doc XR+ (Bio-Rad) com o software ImageLab (Bio-Rad).

3.5. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Uma vez determinada a melhor condição de reação, foram feitas reações de maior volume com a finalidade de serem purificadas e enviadas para serem sequenciadas. O método de purificação utilizado para cada amostra foi utilizado conforme a disponibilidade de seu uso no momento, podendo ser:

3.5.1. Purificação com Polietilenoglicol (PEG)

A partir do produto da reação de PCR, foi adicionada solução de PEG (20% PEG 8000, NaCl 2,5 M) na razão 1:1 V. A amostra foi incubada por 20 min a 37°C, e centrifugada a 13 000 por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e ao pellet foi adicionado 125 µl de etanol 80% gelado, para lavagem, e então centrifugado por 4 min a 13 000 g. A lavagem foi repetida, e o pellet foi deixado para secar em banho seco a 50 °C por 5 min e, caso ainda não completamente seco, deixado a temperatura ambiente até não haver sinal de etanol no tubo. O pellet foi então ressuscitado em 20 µl de água MilliQ e armazenado a -20 °C até o uso.

3.5.2 Purificação utilizando kit de extração

A partir de fragmento em gel de agarose (após eletroforese), foi feita a purificação utilizando o kit Agarose Gel Extraction Kit (Cellco; São Carlos, SP, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. A amostra purificada foi armazenada a -20 °C até o uso.

3.5.3 Purificação a partir de gel de agarose

A partir do fragmento de DNA obtido em gel de agarose após eletroforese, procedeu-se ao recorte do gel sob luz UV, garantindo-se a seleção exclusiva da banda de interesse e a ausência de fragmentos de outros tamanhos na porção isolada. A purificação do DNA foi realizada por meio de uma coluna confeccionada

em um microtubo de 0,6 mL, no qual foi perfurado o fundo com o auxílio de uma agulha, sendo posteriormente adicionada uma fina camada de algodão estéril, previamente umedecida com tampão TAE 0,5X. O fragmento de gel recortado foi posicionado sobre o algodão e o microtubo de 0,6 mL foi acoplado a um microtubo de 1,5 mL, utilizado como tubo coletor. O conjunto foi submetido à centrifugação a 5.200 g por 10 minutos, permitindo a eluição do DNA para o tubo coletor. A fração obtida foi então armazenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua posterior utilização. Este protocolo foi adaptado de Obrador-Sánchez et al. (81).

3.6 SEQUENCIAMENTO

As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento através do serviço EZ-Seq da empresa Macrogen Inc. (Coréia do Sul). Para os produtos de PCR, empregaram-se os mesmos primers utilizados na etapa de amplificação, enquanto para os plasmídeos foram utilizados os primers específicos do vetor plasmidial. Foi utilizado o método de Sanger. Foram utilizados, para produto de PCR, os mesmos primers utilizados na amplificação, e para plasmídeos, primers do plasmídeo.

Devido às restrições impostas pela pandemia de COVID-19, parte das amostras foi enviada ao Laboratório de Genética Molecular IIS Biocruces – Bizkaia (Espanha), onde as análises foram concluídas através de análise de CNV (Variação do Número de Cópias, do inglês *Copy Number Variation*) por sequenciamento massivo (NGS) e pela técnica MLPA (Amplificação Multiplex de Sondas dependente de Ligação, do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

3.7 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

O resultado do sequenciamento foi analisado a partir do arquivo no formato ABI, que permite a visualização detalhada do cromatograma e a edição das bases atribuídas. Essa etapa foi essencial, uma vez que cada sequência passou por um processo de curadoria para remoção de ruídos de fluorescência e regiões de baixa qualidade antes da análise final. Para isso, os arquivos foram visualizados nos softwares FinchTV e BioEdit. No FinchTV, realizou-se o ajuste da magnificação do cromatograma nos eixos x e y, possibilitando melhor discriminação dos picos individuais e avaliação do score de qualidade associado a cada base. O BioEdit foi utilizado para a edição das sequências, com a exclusão das regiões iniciais e finais que apresentavam baixa qualidade. A definição das porções a serem removidas foi

realizada de forma individual para cada sequência, considerando-se tanto os escores de qualidade quanto a avaliação visual da morfologia e nitidez dos picos cromatográficos, assegurando a confiabilidade dos dados utilizados nas análises subsequentes.

Para isso, o arquivo era aberto para visualização no software FinchTV e no software BioEdit, sendo que no FinchTV era possível alterar a magnificação do cromatograma nos eixos x e y para melhor visualização dos picos individuais e o score de qualidade de cada base, e o BioEdit era utilizado para editar a sequência, retirando as porções inicial e final onde a qualidade era baixa. Para determinar qual porção seria excluída da análise, cada sequência foi analisada individualmente e considerado o score e também avaliação visual dos picos.

A sequência restante era submetida ao software BLAST (82), que realizou o alinhamento da sequência do paciente com a montagem primária (primary assembly) do genoma humano para procurar por alterações. Cada fragmento foi sequenciado pelo menos duas vezes, e, caso a mesma alteração fosse encontrada em ambos resultados, era então considerada para avaliação mais detalhada. Além do alinhamento via BLAST, cada cromatograma era investigado visualmente a procura de picos duplos ou outros sinais de alteração que poderiam não ser evidenciados pela sequência em texto. A presença de picos duplos no cromatograma é indicativa de heterozigose; contudo, a base automaticamente atribuída pelo software pode corresponder àquela presente no genoma de referência. Assim, na ausência de uma análise visual criteriosa do cromatograma, essa possível variante em heterozigose poderia não ser detectada, resultando na subestimação de alterações genéticas relevantes.

Cada uma das alterações identificadas em, no mínimo, dois sequenciamentos independentes foi consultada na tabela de variantes do Ensembl (EMBL-EBI; https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index), que integra informações dos bancos de dados dbSNP, ClinVar e HGMD public, com o objetivo de auxiliar na determinação de sua relevância clínica e potencial patogênico. Quando a variante não foi encontrada nesses repositórios, procedeu-se à busca adicional na literatura científica. As variantes não descritas em bancos de dados ou na literatura tiveram sua patogenicidade predita por meio de ferramentas de bioinformática, incluindo o MutationTaster2 (<http://www.mutationtaster.org>) (83) e o CADD Score (<https://cadd.gs.washington.edu/score>) (84), permitindo a inferência do possível

impacto funcional dessas alterações no contexto molecular e clínico.

3.8 ANÁLISE DE HOMOLOGIA

Esta análise foi realizada exclusivamente no estudo de caso da paciente 007, que originou o artigo derivado desta tese. Para esse procedimento, a sequência correspondente à forma selvagem da proteína bartina foi utilizada como sequência-query em buscas no pBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Foram selecionadas as sequências completas que apresentaram identidade superior a 90%, excluindo-se aquelas classificadas como sintéticas, para a análise de homologia em nível de aminoácidos. Adicionalmente, as sequências de DNA codificantes correspondentes a esses resultados foram selecionadas para a análise de homologia nucleotídica, permitindo a avaliação comparativa entre as regiões conservadas em nível proteico e genético.

A ferramenta ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para alinhamento múltiplo foi utilizada para realizar o alinhamento das sequências de aminoácidos e DNA selecionadas e as sequências da proteína Bartina e sua sequência de DNA codificante, bem como as sequências equivalentes das variantes c.139G>A;p.Gly47Arg e c.784delG;p.(Ala262Profs*68).

3.9 INSERÇÃO DOS FRAGMENTOS EM PLASMÍDEO PGEM-T EASY

Quando o fragmento havia sido amplificado utilizando uma DNA polimerase com atividade exonucleásica 3'→5' (proofreading), procedeu-se previamente à etapa de adenilação do produto de PCR, a fim de garantir a presença de uma extremidade 3'-A necessária para a clonagem por TA. Para esse fim, empregou-se uma DNA polimerase desprovida de atividade exonucleásica, especificamente a Taq DNA Polimerase, em reação contendo tampão comercial apropriado, MgCl₂ e dATP. A mistura reacional foi incubada por 15 minutos a 72 °C, permitindo a adição de uma adenina nas extremidades 3' dos fragmentos amplificados. Após a confirmação de que os fragmentos encontravam-se devidamente adenilados, realizou-se a etapa de ligação ao vetor utilizando o kit pGEM-T Easy (Promega), seguindo as especificações do fabricante, possibilitando a inserção eficiente dos produtos de PCR no vetor por complementaridade A-T.

3.10 TRANSFORMAÇÃO DE PLASMÍDEOS CLONADOS EM E. COLI DH5A

Todo o volume da reação de ligação foi adicionado a 50 µl de células de bactéria *E. coli* competentes. O microtubo contendo a mistura foi incubado por 1 min 30 s a 42 °C, e logo em seguida colocado no gelo. À mistura resfriada, foi adicionado 800 µl de meio LB líquido, e o microtubo foi incubado por 1 hora a 37 °C, sob baixa agitação (até 80 rpm). Após a incubação, 200 µl da amostra foi utilizada para inoculação de placas de petri contendo meio LB sólido, IPTG, ampicilina, e X-gal. As placas foram incubadas por 16 a 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, foram selecionadas as colônias brancas para confirmação da transformação através de PCR.

3.11 CONFIRMAÇÃO DE HETEROZIGOSE (GENE *LMX1B*)

As colônias foram transformadas com plasmídeo ligado ao produto de PCR utilizando DNA genômico como molde. Dessa forma, de cada transformação haveria populações distintas de *E. coli* contendo alelos diferentes do mesmo genoma. Várias colônias foram selecionadas para crescimento, extração de plasmídeo e sequenciamento, para a verificação dos alelos distintos e confirmação da heterozigose. Os procedimentos de análise foram os mesmos descritos anteriormente

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que as análises deste estudo foram realizadas em dois grupos de pacientes acometidos por síndromes geneticamente e clinicamente distintas (Síndrome Unha-Patela e Síndrome de Bartter), os resultados serão apresentados separadamente para cada condição. Inicialmente, serão descritos os achados referentes ao paciente com Síndrome Unha-Patela, seguidos pelos resultados obtidos para os casos de Síndrome de Bartter. Nesse último, os resultados serão ainda subdivididos conforme os diferentes tipos clínicos e moleculares identificados. Para uma abordagem mais detalhada das variantes genéticas associadas para cada paciente, serão apresentados os dados clínicos relevantes, os resultados do diagnóstico molecular, e, posteriormente, a discussão dos achados frente à literatura científica atual. Os pacientes estão identificados em cada caso na forma de número, que os identifica em dados anônimos e randomizados, como previsto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da UFSCar. O diagnóstico clínico foi realizado por médicos nefrologistas que fizeram parte da equipe de estudo.

4.1 SÍNDROME UNHA-PATELA (PACIENTE 015)

Paciente do sexo feminino, 14 anos de idade, IMC 17,06 kg/m² (pouco acima do 3º percentil). Apresenta proteinúria, displasia de unhas, displasia da cabeça do rádio, patela esquerda ausente, patela direita hipoplásica, escoliose, hipercifose, dismetria de membros inferiores, assimetria de volume renal. Não apresenta cornos ilíacos. Foi diagnosticada clinicamente com síndrome Unha-Patela.

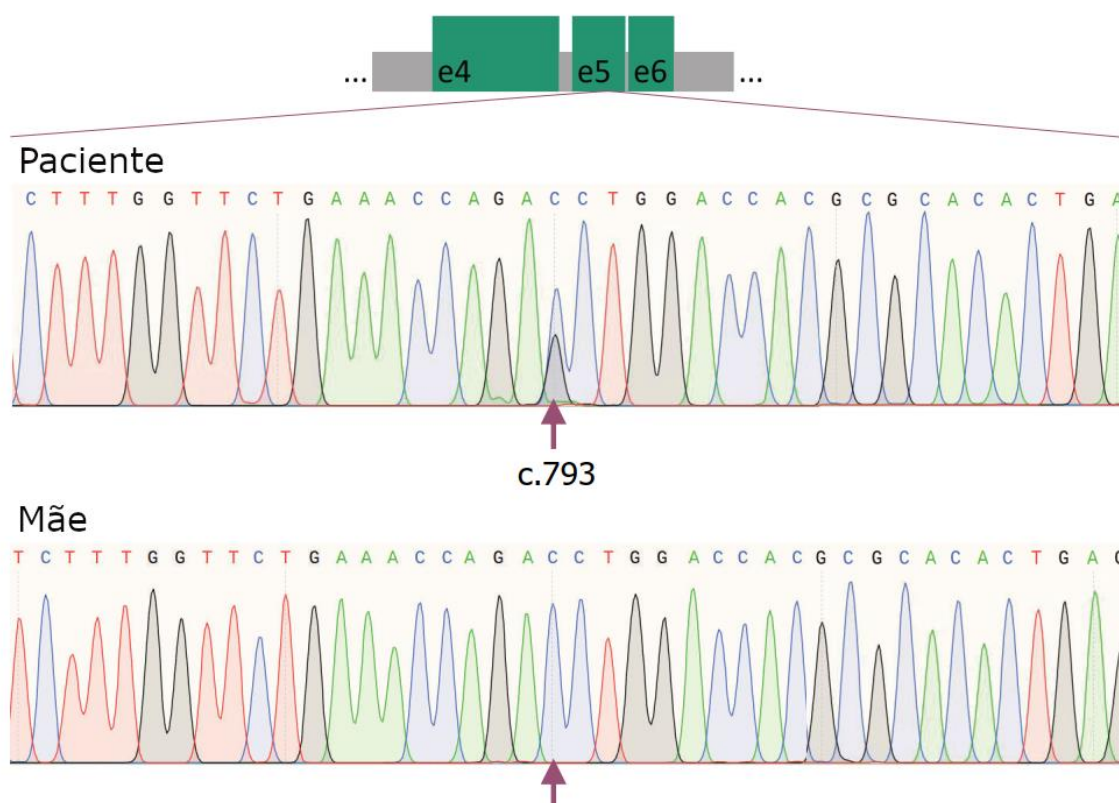
O diagnóstico molecular revelou a variante rs1588307477 CM042393 (c.G>C;p.Val265Leu) em heterozigose no gene *LMX1B*. A mãe da paciente também foi avaliada, não apresentando a SUP, e o sequenciamento revelou que não possui a variante encontrada na paciente ou outra variante patogênica (Figura 4). O pai não participou do estudo, portanto não é possível afirmar se trata-se de uma mutação *de novo*.

LMX1B codifica um fator de transcrição da família LIM-Homeobox (Lhx), proteínas que possuem dois domínios LIM no N-terminal seguidos por um Homeodomínio. Os domínios LIM se associam a cofatores específicos com alta afinidade, enquanto o homeodomínio interage com o DNA. Estas interações formam um complexo de regulação transcricional tecido-específico (85). *LMX1B*, em

particular, é expressado já no início da fase embrionária, regulando a padronização

Figura 4 - Cromatograma mostrando a alteração na paciente e a mesma posição na mãe, sem alteração (autoria própria).

de membros e o desenvolvimento de órgãos, especificamente o epitélio visceral do glomérulo (néfron), o segmento anterior do olho e neurônios das vias 5-HT e dopaminérgica (55).



O gene *LMX1B* é altamente conservado, tendo identidade quase total na sequência de aminoácidos entre humano e camundongo, com a exceção de um trecho de 6 resíduos adicionais próximos ao N-terminal (upstream de LIM-A) em camundongos, e um trecho de 7 resíduos adicionais próximos ao C-terminal em humanos. (Figura 5). Este fator de transcrição está envolvido no estabelecimento da polaridade dorsoventral nas extremidades (86; 87), na expressão de cadeias de colágeno IV e na diferenciação de podócitos (o que leva às anormalidades da membrana basal glomerular) (46; 88; 89). Essa larga gama de funções de *LMX1B* no desenvolvimento embrionário explica a variedade de sistemas afetados nos pacientes com SUP.

Em camundongos, a perda de *LMX1B* resulta na perda da padronização de mãos/pés e antebraços/pernas, assim como alterações no desenvolvimento dos olhos, cérebro e rins (88). Em humanos, variantes patogênicas no gene estão

associadas à Síndrome Unha-Patela (45; 46).

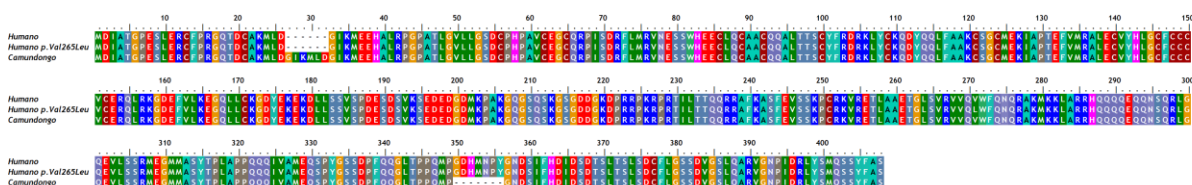


Figura 5 - Homologia de aminoácidos entre LMX1B selvagem humano, p.Val265Leu, e LMX1B de camundongo (autoria própria, utilizando BioEdit (90)).

A variante c.G>C;p.Val265Leu, identificada na paciente, foi descrita inicialmente por Dunston et al em 2004 (47). Estudo funcional da variante mostrou que apresenta atividade de transativação bastante diminuído quando comparado à forma selvagem, devido a incapacidade de ligação ao DNA (91). Val 265, alterado pela mutação, está localizado no homeodomínio do fator de transcrição, portanto é esperado que a ligação ao DNA seja afetada.

4.2 SÍNDROME DE BARTTER

4.2.1 Paciente 001

Paciente do sexo masculino, 6 meses de idade na data do diagnóstico. Filho de pais consanguíneos, nascido a termo (40 semanas), com 3290 g e 52 cm (IMC 12,2; percentil 15% (92)), a mãe tendo apresentado polidrâmio. Primeiros sintomas iniciaram aos 3 meses de idade. Ao diagnóstico apresentava 4650 g e 63,5 cm (IMC 11,5; percentil abaixo de 3%), considerável atraso no crescimento e perda de peso, baixa pressão arterial (53x35mmHg), proteinúria e hematúria (presença de proteína e sangue na urina); hipocalemia, hipocloremia, hipercalcemia, aumento de renina, hiper calciúria e alcalose metabólica. Não apresenta nefrocalcinose ou insuficiência renal.

A suspeita clínica era de Síndrome de Bartter sem especificação de tipo, portanto buscou-se sequenciar os éxons dos genes *KCNJ1*, *CLCNKB*, *SLC12A1* e *BSND* visando identificar a causa molecular. Foram sequenciados com sucesso toda a região codificante *KCNJ1*, éxons 6, 7, 11, 15 e 18 de *SCL12A1*, toda a região codificante de *BSND*. Nessas regiões, não foi encontrada alteração possivelmente patogênica. Em razão da pandemia de COVID-19, e as medidas restritivas impostas por consequência, o trabalho no laboratório precisou ser suspenso e optamos por enviar as amostras (deste paciente, e dos pacientes 017, 020, 022 e 023) ao Laboratório de Genética Molecular IIS Biocruces – Bizkaia (Espanha), onde as

análises foram concluídas.

Foi visto que o paciente 001 apresenta em homozigose uma deleção ao menos do éxon 1 ao 19 do gene *CLCNKB* [c.(?-12)(1961+?) del; p.?]. A deleção foi descrita previamente como causadora da Síndrome de Bartter tipo 3 (30).

Dado que o paciente é filho de pais consanguíneos, não surpreende a homozigose da alteração apresentada. Essa variante é uma das primeiras descritas e bastante representada na literatura em pacientes com Síndrome de Bartter tipo 3 (93; 94; 95).

4.2.2 Paciente 017

Paciente do sexo masculino, 2 anos e 8 meses de idade no momento do diagnóstico, tendo apresentado sintomas inicialmente aos 6 meses de idade. Nascido de pais não consanguíneos, a termo (39 semanas e 5 dias), com 3560g e 50 cm (IMC 14,2; entre 50% e 85%), a mãe tendo apresentado polidrâmio. Ao diagnóstico, apresentava com 9,275 kg e 80,5 cm de altura (IMC 14,3; entre 3 e 15%), atraso no desenvolvimento e perda de peso, pressão arterial no limite inferior da referência (80x40mmHg). Em ultrassom, foi constatado rins de dimensões aumentadas e ecogenicidade levemente aumentada (indicativo de doença renal). Exames laboratoriais apontaram hipocloremia, hipocalcemia, hipermagnesemia, renina baixa, altos níveis de potássio na urina, alcalose metabólica. Não apresenta nefrocalcinose ou insuficiência renal.

Assim como no caso anterior, a estratégia inicial foi de analisar os genes relacionado à Síndrome de Bartter, *KCNJ1*, *CLCNKB* e *SLC12A1* visando a identificação molecular causadora da síndrome. Neste caso específico, não havia sinal de surdez neurossensorial, portanto o gene *BSND* não foi incluído. Foram sequenciados, sem a identificação de alteração possivelmente patogênica, toda a região codificante de *KCNJ1*, éxons 6, 7, 11, 15, 18 e 20 de *SLC12A1*; éxons 8 e 15 de *CLCNKB*.

Foi observado duas variantes patogênicas em heterozigose combinada no gene *CLCNKB*: Substituição em heterozigose (c.1408+1G>C; p.), localizada na região de *splicing* do éxon 14; e deleção em heterozigose de ao menos os éxons 1 ao 19 do gene *CLCNKB* c.(?-12)(1961+?) del; p.? Análise das amostras dos pais mostrou que o pai apresenta em heterozigose a variante por substituição no íntron 14 do gene *CLCNKB* (c.1408+1G>C; p.), e a mãe apresenta deleção em heterozigose nos éxons de 1 à 19 do gene *CLCNKB* (c.(?-12)(1961+?) del; p.).

A variante c.1408+1G>C; p.?, presente no genoma do paciente e do pai, ambos em heterozigose, não foi descrita previamente na literatura. Os softwares de predição de patogenicidade In sílico consultados (VarSome, Mutation Taster e VarSeak) predizem uma mudança no splicing que afeta a proteína. O paciente herdou a variante do pai, portador em heterozigose da mesma.

A deleção em heterozigose completa da região codificante do gene *CLCNKB* foi identificada através da análise das CNV (Copy Number Variation) por sequenciamento massivo (NGS). Pela técnica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) foi identificada deleção que inclui ao menos do éxon 1 ao 19 do gene *CLCNKB* (c.(?_-12)_(1961+?) del; p.), confirmando o achado. A deleção foi descrita previamente como causadora da Síndrome de Bartter tipo 3 (30). O paciente herdou a alteração da mãe, portadora em heterozigose da mesma mutação.

4.2.3. Paciente 020

Paciente do sexo masculino, filho de pais consanguíneos, nascido prematuro (32 semanas), com 2480g e 48 cm (percentil entre 90 e 97 para ambos); não se sabe se houve polidrâmnio. Diagnosticado aos 3 meses de idade, tendo iniciado os sintomas aos 2 meses de idade, quando a desidratação e poliúria foram as razões para a busca de médico. No momento do diagnóstico, apresentava com 2,88kg e 52 cm (percentil 3% ou abaixo), e pressão arterial normal. Audiometria sem alterações, ultrassonografia revelou dilatação pielocalical leve no rim Direito (podendo estar relacionada à poliúria). Exames laboratoriais mostraram aumento de creatinina, hipercalcemia, hipermagnesemia, níveis aumentados de cloro, renina baixa, potássio e sódio na urina, nível baixo de cálcio na urina, alcalose metabólica. Não apresenta nefrocalcinose ou insuficiência renal

Assim como nos casos apresentados anteriormente, o foco inicial foi a amplificação e sequenciamento dos éxons dos genes relacionado à Síndrome de Bartter, *KCNJ1*, *CLCNKB*, *SLC12A1* e *BSND*. Foram sequenciados toda a sequência codificante de *KCNJ1*, éxons 6, 7, 11, 15 de *SLC12A1*. Nestas regiões, não foi identificada alteração possivelmente patogênica.

Constatou-se que o paciente apresenta uma deleção em homozigose de ao menos os éxons 1 ao 19 do gene *CLCNKB* c.(?_-12)_(1961+?) del; p.?. Sua mãe apresenta a mesma deleção em heterozigose. Para confirmar a deleção foi utilizada a técnica Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) que confirma que o paciente apresenta em homozigose uma deleção que inclui ao menos do éxon 1

ao 19 do gene *CLCNKB* (c.(?_-12)_(1961+?) del; p.?). A deleção foi descrita previamente como causadora da Síndrome de Bartter tipo 3 (30). O pai não participou da pesquisa, porém, dada a consanguinidade conhecida entre os pais, é de se esperar que este também apresente a deleção em heterozigose, tendo o paciente herdado a deleção de cada progenitor e apresentando a síndrome de Bartter devido a homozigose da alteração.

4.2.4 Pacientes 022 e 023

Ambas do sexo feminino, irmãs, nascidas de pais não consanguíneos.

022 nasceu prematura (35 semanas), com 2560g e 46cm (ambos entre 50 e 90%). 023 nasceu a termo (37 semanas), com 2675g e 47,5 cm (IMC 11,3; percentil 3-15). A mãe não apresentou polidrâmnio em nenhuma das gestações.

022 teve início dos sintomas aos 7 meses de idade, sendo diagnosticada apenas aos 4 anos e 7 meses de idade. Na data do diagnóstico, apresentava com 14,9 kg e 100 cm de altura (IMC 14,9, percentil 15-50), pressão normal. Tinha queixa de desnutrição, polidipsia (excesso de sede) e poliúria. Exames laboratoriais revelaram hipercalcemia e hipermagnesemia, excesso de sódio e cálcio na urina, hipoclorúria (nível baixo de cloro na urina) e alcalose metabólica. Ultrassom e audiometria sem alterações.

023 teve início dos sintomas aos 4 meses de idade. A irmã mais velha já havia sido diagnosticada, portanto levando os pais a investigarem a síndrome de Bartter imediatamente. O diagnóstico se deu aos 8 meses de idade, quando apresentava com 5,9 kg e 62 cm, (IMC 15,3; ~15%). Exames laboratoriais revelaram hipocloremia, hipercalcemia, hipermagnesemia, níveis altos de potássio na urina, e níveis baixos de cálcio e cloro na urina, alcalose metabólica. Ultrassom e audiometria sem alterações.

Novamente, iniciamos com a amplificação e sequenciamento dos genes *KCNJ1*, *CLCNKB* e *SLC12A1*, já que as pacientes não apresentavam surdez neurosensorial. Foram sequenciados, sem apresentar alterações possivelmente patogênicas, os éxons 15 e 20 de *SLC12A1*, a região promotora e os éxons 2 e 15 de *CLCNKB*.

Após análises dos resultados apresentados, observou-se que ambas pacientes apresentam duas variantes patogênicas em heterozigose composta nos éxons 7 (c.610 G>A; p.Ala204Thr) e 17 (c.1783C>T; p.Arg595*) do gene *CLCNKB*: A primeira, localizada no éxon 7, consiste na substituição de uma guanina por uma

adenina na posição 610 da sequência de nucleotídeos (c.610G>A), o que ocasiona na proteína uma mudança de uma alanina por uma treonina na posição 204 (p.Ala204Thr). Esta variante foi descrita previamente na literatura associada a síndrome de Bartter tipo 3 (30). As pacientes herdaram a variante da mãe, portadora em heterozigose da mesma variante. A segunda, localizada no éxon 17, consiste na substituição de uma citosina por uma timina na posição 1783 da sequência de nucleotídeos (c.1783C>T) o que leva ao surgimento de um códon de parada prematura no códon 595, situado a 93 aminoácidos do final da proteína (p.Arg595*). Esta variante foi descrita previamente na literatura associada a síndrome de Bartter tipo 3 (96; 97). Essa variante foi herdada através do pai, portador em heterozigose da mesma. Com base nos estudos moleculares realizados concluímos que as pacientes são portadoras da Síndrome de Bartter tipo 3, por terem duas mutações em heterozigose composta.

4.2.5 Síndrome de Bartter Tipo III

Todos os pacientes descritos até esse ponto foram diagnosticados com Síndrome de Bartter tipo III (Tabela 2). Sendo assim, vamos discuti-los em um tópico unificado.

Das 4 famílias (5 pacientes) dentro desse estudo que possuem diagnóstico de Síndrome de Bartter tipo III, 2 possuem deleção do gene ou de sua maior parte, sendo 2 delas em homozigose. De fato, a deleção completa ou de maior parte do gene *CLCNKB* é bastante representada na literatura (22; 30; 104; 105; 93; 95; 98; 99; 100; 101; 102; 103).

CLC-Kb é um canal de sódio presente na porção espessa ascendente do tubo de Henle, e faz parte de um conjunto de proteínas de canal e receptores responsável pela reabsorção de sais nesta porção do néfron. O canal é formado por um homodímero de CLC-Kb, e é direcionado para a membrana, ativado e regulado por Bartina. Há variantes patogênicas descritas igualmente ao longo da sequência, sem região particularmente susceptível a mutações. Devido a proximidade e alta identidade com *CLCNKA*, tanto *CLCNKA* quanto *CLCNKB* são particularmente susceptíveis a deleções através de erros de pareamento durante a recombinação homóloga na formação de gametas. A Tabela 2 resume os achados moleculares dos pacientes 001, 017, 020, 022 e 023. A Tabela A-1 (Apêndice) reuni as variantes descritas em *CLCNKB* em pacientes de Síndrome de Bartter tipo 3 em bancos de

Tabela 2 - Diagnóstico molecular dos pacientes com Síndrome de Bartter tipo III

Paciente	Zigosidade	Alelo(s)	Origem	Referência Bibliográfica
001	Homozigose	Del gene	mãe e pai	(22; 30; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104)
017	Heterozigose	c.1408+1G>C; p.?	pai	Inédito
		Del 1-20	mãe	(22; 30; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104)
020	Homozigose	Del 1-19	mãe e pai	(93; 94; 95)
022 e 023	Heterozigose	c.610G>A; p.Ala204Thr	mãe	(93; 97; 104)
		c.1783C>T; p.Arg595*	pai	(96; 97)

dados e na literatura, e a Figura 6 esquematiza o gene *CLCNKB* e seus éxons, e a estrutura secundária da proteína codificada, mostrando a localização das alterações pontuais identificadas nos pacientes deste estudo.

Há evidência de que os genes *CLCNKA* e *CLCNKB* originaram-se de um evento de duplicação recente (106). Eles apresentam alto grau de homologia, e estão localizados na mesma probanda do cromossomo 1 (1p36), separados por apenas 11 mil pares de base (30). Além disso, ambas proteínas necessitam a ativação por Bartina. A homologia entre os genes pode favorecer erros de pareamento no processo de recombinação homóloga, levando à deleção de um dos genes.

O paciente 017 apresentou uma variante inédita, c.1408+1G>C. Tal variante altera a região reguladora de splicing, o que normalmente leva à exclusão do éxon seguindo do mRNA processado. Neste caso, o éxon 15 seria omitido, o que levaria a um frameshift com STOP códon apenas 5 aminoácidos após a substituição inicial (p.Gly470Valfs*5). Não há variantes com consequência proteica semelhante à

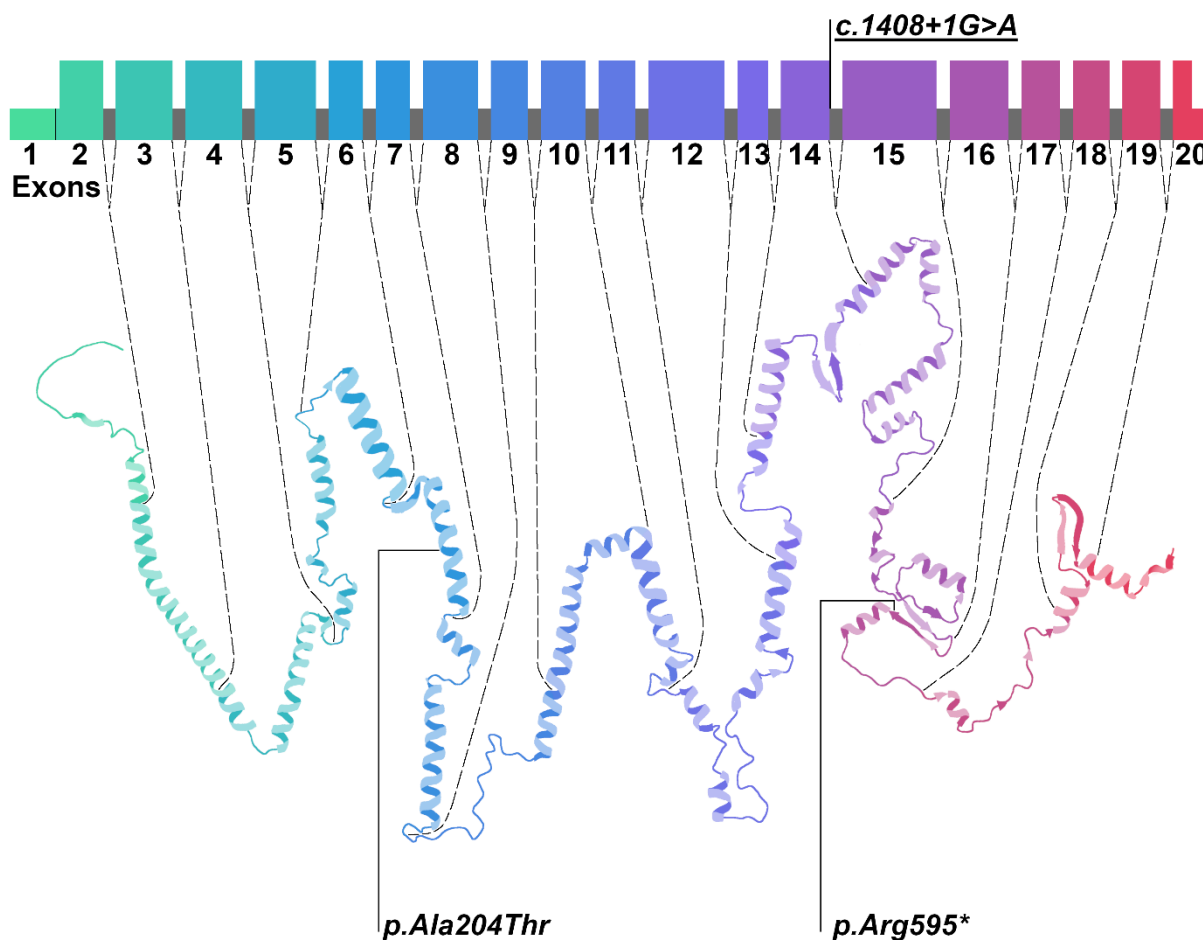


Figura 6 - O gene *CLCNKB*, seus éxons, e *CIC-Kb*, por ele codificada. A proteína está representada em sua estrutura secundária. As variantes patogênicas pontuais encontradas nos pacientes desta tese estão indicadas. A variante sublinhada é inédita na literatura (autoria própria).

esperada para $c.1408+1G>C$, portanto não é possível comparar este caso com a literatura. No entanto, é esperado que modificação tão extensa na proteína leve a proteólise e perda total de função (107).

4.2.6 Paciente 007 e Síndrome de Bartter Tipo 4

Paciente do sexo feminino, 10 anos de idade na data do diagnóstico. O pai é falecido. Não há familiares afetados. Devido ao baixo nível sócio econômico, teve muita dificuldade em acessar o serviço médico especializado. A princípio foi encaminhada para acompanhamento na pediatria por quadro de constipação intestinal crônica e baixo peso. Durante investigação, ao realizar ultrassonografia abdominal foi constatado nefrocalcinose e só então aos 10 anos e 10 meses de idade

foi encaminhada para o serviço especializado em nefrologia pediátrica. A paciente foi diagnosticada a partir dos dados clínicos em julho de 2017, quando sua mãe foi informada desta pesquisa, e o sangue das duas foi coletado. A paciente foi diagnosticada e tratada no Hospital Universitário de Brasília (HUB).

A paciente é filha de pais não consanguíneos, prematura (31 semanas), pesando 1715 g ao nascimento, com a mãe apresentando polidrâmnio. O início dos sintomas ocorreu por volta dos 7 anos de idade, mas tubulopatia renal não foi suspeitada, apesar do histórico de atraso no crescimento, surdez neurosensorial e repetidas convulsões, levando ao diagnóstico de epilepsia.

No momento do diagnóstico apresentava peso de 26,5 kg (abaixo do percentil 15), estatura de 136,3 cm (percentil 15), nefrocalcinose, surdez neurosensorial, hipercolesterolemia, hipocalemia, hipocitratúria e epilepsia. Não apresentava insuficiência renal.

O acompanhamento e tratamento da paciente foi feito pelo serviço de nefrologia pediátrica do HUB até o ano de 2021, 15 anos de idade, quando a família abandonou o acompanhamento devido a dificuldades em seguir as orientações e aquisição de medicamentos. No último retorno, apresentava peso de 50,9 kg, estatura de 158 cm, pressão arterial 90x60 mmHg, e bom estado geral. A surdez neurosensorial levou a alteração na fala. Mantinha o quadro de nefrocalcinose (presença de cristais no tecido renal) bilateral e nefrolitíase (presença de cristais nos túbulos), porém apresentava função renal normal.

O diagnóstico clínico da Síndrome de Bartter tipo IV direcionou a análise ao gene *BSND*, por ser o mais comum quando se trata deste tipo, com poucos casos relatados de mutação concomitante em *CLCNKA* e *CLCNKB* (66; 102). Análise dos sequenciamentos revelou que, de fato, o gene *BSND* era o responsável pela Síndrome apresentada pela paciente, através de duas mutações em heterozigose. c.139G>A;p.Gly47Arg (rs 74315289) e c.784delG;p.(Ala262Profs*68), esta última relatada pela primeira vez nessa pesquisa. No éxon 1, foi identificada a variante patogênica c.139G>A;p.Gly47Arg (rs 74315289), já descrita em diversos pacientes com Síndrome de Bartter tipo IV (28-32,42,43,49). No éxon 4 foi identificada uma variante ainda não descrita na literatura ou presente em bancos de dados, c.784delG;p.(Ala262Profs*68) (Figura 7).

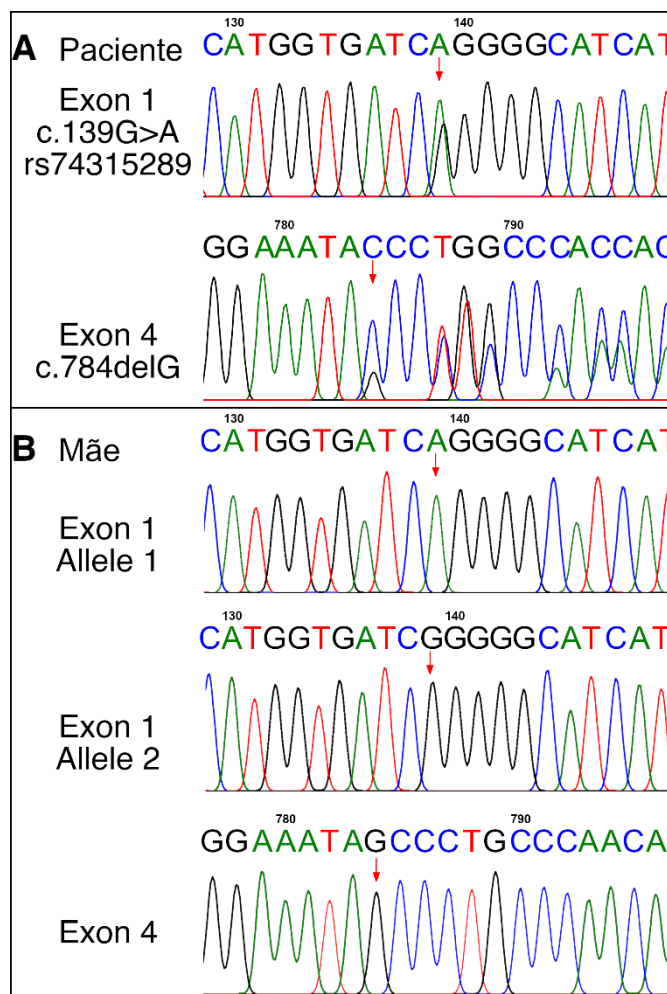


Figura 7 - Cromatograma mostrando as alterações na paciente 007 e sua mãe (autoria própria)

A paciente 007 tem apresentação clínica típica, porém diagnóstico tardio, apesar de seu histórico. O diagnóstico de SB tipo IV normalmente acontece antes mesmo da infância, principalmente em casos pré-natais (40; 108; 109; 110; 111; 112). Há alguns casos descritos de diagnóstico tardio (16; 113; 114; 115), no entanto estes costumam apresentar quadro clínico mais leve do que a paciente em questão. Ela apresentava atraso moderado de desenvolvimento e um diagnóstico de epilepsia aos 7 anos de idade.

A variante patogênica c.139G>A;p.Gly47Arg já foi descrita em diversos pacientes com Síndrome de Bartter tipo IV (28-32,42,43,49). Notadamente, todos os casos de diagnóstico tardio referenciados acima ocorreram em pacientes que apresentavam a variante c.139G>A;p.Gly47Arg em homozigose. Essa variante, presente na paciente 007 em heterozigose, foi caracterizada por Brum et al., que mostraram que acarreta na diminuição da condutância de CNC-Ka quando co-

expressada em oócitos de *Xenopus*, de maneira similar a outras variantes patogênicas (116). Apesar de não haver análise da co-expressão com CIC-Kb, o grupo de Brum et al. aponta que a mesma função residual vista em CIC-Ka pode acontecer em CIC-kb, levando a um fenótipo mais leve relacionado a essa variante (114). Um único estudo descreve outro paciente que apresenta a variante em heterozigose, em composição com c.94C>T (a variante nonsense, ou seja, causa códon de parada prematuro e consequente truncamento da proteína em Gly32), o paciente teve apresentação clínica leve no período perinatal, mas deterioração renal rápida e severa no início da adolescência (117). Esse quadro se assemelha ao da paciente 007, que não apresentou sintomas graves até os 7 anos de idade. Nestes casos, a possível retenção de função oferecida por c.139G>A;p.Gly47Arg pode não ter se estendido devido à heterozigose.

Atualmente, há 21 variantes patogênicas de *BSND* descritas em pacientes com SB tipo IV (Tabela A-2, Apêndice). Entre elas, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês Single Nucleotide Polymorphism), pequenas deleções ou inserções, e grandes deleções (Figura 8) (16; 32; 114; 115; 117; 118; 119; 120; 121; 122; 33; 40; 101; 104; 110; 111; 112; 113). Das 21 variantes, 3 causam perda do códon de iniciação, 8 são SNPs missense (quando há alteração do aminoácido codificado pelo códon) – 3 localizadas na porção N-terminal, uma na primeira hélice, 4 na segunda hélice - ,3 afetam regiões de splicing, 3 causam códon de parada prematuro (truncamento), 2 são deleções grandes que envolvem pelo menos 2 éxons, e 2 causam mudança de leitura de frame alterando ou truncando a maior parte da cauda citoplasmática C-terminal.

14 das 18 mutações pontuais descritas alteram a proteína nos primeiros 72 aminoácidos, ou seja, na porção N-terminal ou nas duas alfa-hélices (Figura 8). Isso não é exatamente surpreendente, já que essa região é a responsável pela interação com os canais CIC-K e sua ativação. Estudos mostraram que truncamentos de Bartina antes do aminoácido 72 causam a perda da função de estímulo de canais CLC-K, enquanto truncamentos após esse ponto tem pouca interferência na inserção na membrana e função de canais CLC-K, função primária de Bartina(116; 123; 124; 125).

Apesar de estudos com Bartina truncada demonstrarem que essa versão truncada da proteína cumpre sua função celular, alguns estudos incluem a cauda intracelular, ressaltando que a região C-terminal é importante para a localização na

membrana e funcionamento correto dos canais CLC-K (125; 126).

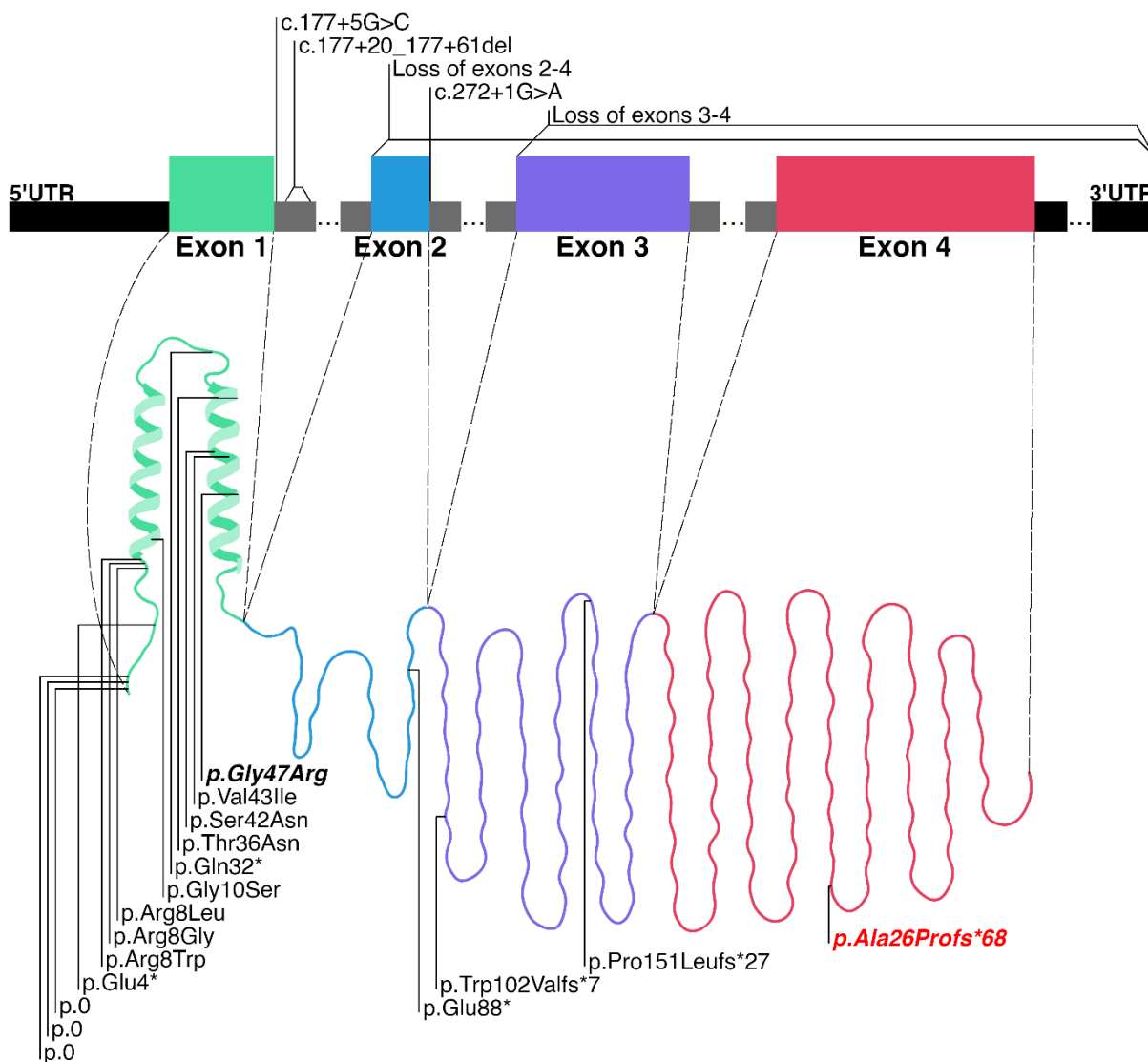


Figura 8 - Esquema do gene BSND, a proteína Bartina e as variantes descritas na literatura (autoria própria)

Na paciente 007, foi identificada no éxon 4 a inédita c.784delG;p.(Ala262Profs*68) (Figura 8). Trata-se de uma deleção de uma única citosina, causando uma mudança no quadro de leitura de códons (frameshift), e por consequência alterando toda a sequência de aminoácidos codificada a partir deste códon. Os 58 aminoácidos terminais da proteína são substituídos por 58 resíduos diferentes. Esta é a primeira descrição de uma variante patogênica de *BSND* que afeta apenas o éxon 4. A homologia mostra que há conservação deste trecho com outros primatas, sugerindo que possui função relevante (Figura 9)

Alterações no quadro de leitura dos códons são reportadas em várias doenças genéticas, e normalmente resultam em truncamentos significativos (127; 128), e/ou

a perda de motivos importantes (129). Em particular, um estudo de Al Salmani et al

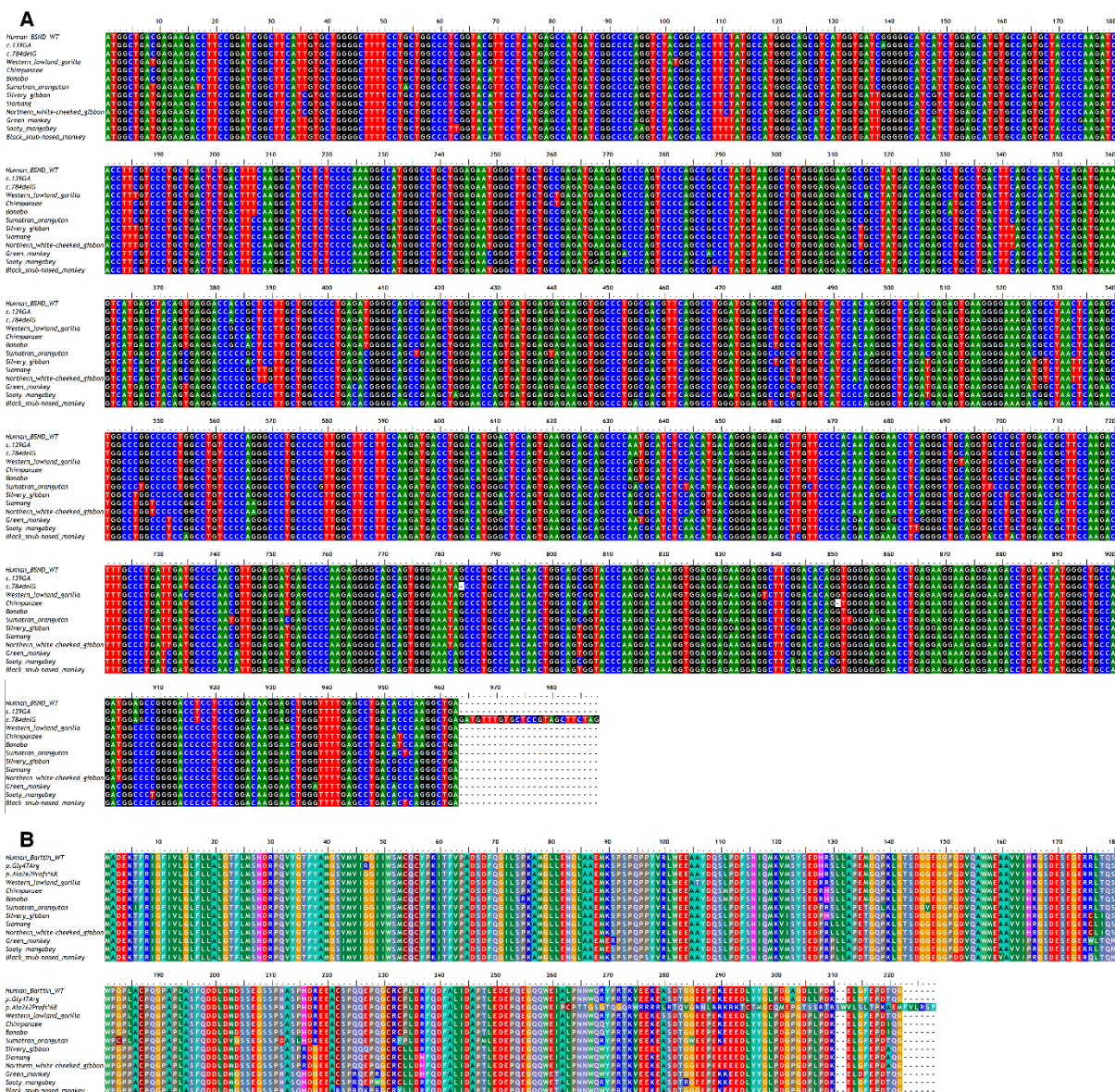


Figura 9 – Homologia de DNA (A) e Proteína (B) entre BSND selvagem, as variantes presentes na paciente, e outros primatas (autoria própria, utilizando BioEdit (90))

(130), relata uma alteração no quadro de leitura na porção C-terminal intrinsecamente desordenada de um canal de potássio afeta sua função através de diferentes mecanismos.

Análise in silico da deleção c.784delG na ferramenta MutationTaster2 (83) a classifica como “causadora de doença”, e evidencia a alteração de 58 resíduos de aminoácidos no C-terminal. Há também a perda do códon de parada original, e adição de 9 resíduos além do número de resíduos na forma selvagem da proteína. Foi feita também análise CADD O CADD gera um “PHRED-scaled score” (aqui referido como “pontuação escalonada”), em que valores mais altos indicam maior probabilidade de

deleção funcional. Não é recomendado usar valores rígidos para determinar a patogenicidade de uma variante, porém os desenvolvedores da ferramenta sugerem que um valor entre 10 e 20 seria adequado, já que uma pontuação de 10 indicaria que a variante está entre as 10% mais deletérias, e uma pontuação de 20 representa 1% do parâmetro (84). A variante c.784delG apresenta uma pontuação escalonada de 18,80, que indica estar entre as 1,3% variantes mais deletérias. A variante c.139G>A;p.Gly47Arg, sabidamente patogênica, apresenta pontuação escalonada CADD de 26,7 (0,02%).

A estrutura da proteína Bartina ainda não foi determinada empiricamente. No entanto, modelos preditivos de estrutura indicam que a região citoplasmática C-terminal é intrinsecamente não estruturada. Proteínas ou regiões intrinsecamente desordenadas são comuns em diversos organismos, e não possuem estrutura secundária ou terciária definida em condições fisiológicas. Apesar de fugirem do padrão estrutura-função, proteínas ou regiões intrinsecamente desordenadas já foram relacionadas a muitas funções, incluindo interação a DNA, RNA ou proteínas, sinalização celular, e regulação de canais dependentes de voltagem (131; 132; 133).

O gene *BSND*, seus éxons, a estrutura predita de Bartina e todas as variantes descritas na literatura são apresentados na Figura 8.

Há na literatura outras duas variantes que resultam em mudança do quadro de leitura, ambas no éxon 3. Uma delas é a variante c.452delC;p.Pro151Leufs*27 (33; 40; 119), e a variante mais próxima do loco da alteração encontrada pela primeira vez na paciente 007. Também é uma deleção de uma única base resultando em mudança de quadro de leitura, afetando apenas a cauda C-terminal (a partir do aminoácido 262). O paciente naquele estudo é homocigoto para a variante, mas não há menção ou hipótese a respeito de possível mecanismo responsável pela patogenicidade (40). Um truncamento patogênico em Glu88, descrito em 2006 (110) resulta na perda quase total da cauda C-terminal. Estudos sobre essa mutação revelaram que, mesmo que a expressão e função proteica fossem mantidas, houve aumento de proteólise e a distribuição incorreta de canais CLC-K, levando a uma redução do transporte epitelial (126). Isso sugere que há alguma função de regulação de tráfego após Glu88. Já que estudos com versões truncadas de Bartina avaliam apenas observações eletrofisiológicas, não seria percebido o efeito da disposição incorreta dos canais na membrana celular. Esse efeito poderia explicar em parte a patogenicidade de c.784delG;p.(Ala262Profs*68), se assumirmos que a região além

de Ala262 tem parte na função reguladora de transporte.

Outro fator a ser considerado é o impacto dos 68 aminoácidos alterados pela mudança no quadro de leitura no C-terminal da proteína em seu dobramento, levando ao aumento de proteólise. Para conclusões mais robustas, no entanto, são necessários experimentos futuros para a avaliação de expressão, tradução, proteólise, localização celular e função da proteína mutada.

Os éxons 1 e 4 da paciente e sua mãe foram amplificados e clonados no plasmídeo pGEM-T para confirmar a heterozigose das variantes. Após a clonagem, foram selecionadas múltiplas colônias transformadas já que, assumindo a heterozigose, cerca de 50% das colônias conteria o plasmídeo inserido com um alelo e 50% conteria o plasmídeo contendo o outro alelo. De fato, foi comprovado por sequenciamento destes plasmídeos que havia duas populações de plasmídeo para a paciente, e duas populações para a mãe, sendo que ambas apresentaram a variante c.139G>A;p.Gly47Arg. Infelizmente, o pai da paciente já era falecido no momento da coleta, portanto não é possível determinar se a variante c.784delG;p.(Ala262Profs*68) foi herdada ou é mutação *de novo*.

4.3 LIMITAÇÕES DESTE ESTUDO

O número de casos abordados foi reduzido devido a restrições impostas pela pandemia de COVID-19, uma vez que esses pacientes pertencem ao grupo de risco para a infecção, e optamos por interromper o processo de recrutamento e coleta de amostras para evitar expô-los ao ambiente médico-hospitalar. Foram adquiridos plasmídeos de expressão em célula de mamífero para as proteínas CLCNKB, BSND selvagem e BSND p.(Ala262Profs*68), com e sem a fusão a proteínas fluorescentes. Esses seriam utilizados em ensaios funcionais e de localização para a confirmação da hipótese de alteração da localização membranar de CLCNKB por BSND p.(Ala262Profs*68). No entanto, devido a limitação do tempo e acesso a linhagens de células adequadas, esses ensaios não foram executados.

5. CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo confirmou, pelo diagnóstico molecular, o diagnóstico clínico de sete pacientes com doenças genéticas renais raras: um com Síndrome Unha-Patela, cinco com Síndrome de Bartter tipo III e um com Síndrome de Bartter tipo IV.

Mesmo com número reduzido de pacientes, foi reafirmada a importância do diagnóstico molecular de pacientes com doenças genéticas raras com a descrição de duas variantes inéditas na literatura: c.1408+1G>C;p.? em *CLCNKB* e c.784delG;p.(Ala262Profs*68) em *BSND*. Além disso, foi possível contextualizar a apresentação clínica dos pacientes frente a outros casos descritos na literatura, como a apresentação mais branda associada à variante *BSND* c.139G>;A;p.Gly47Arg, mesmo em heterozigose com outras variantes. no paciente 007.

A variante inédita c.784delG;p.(Ala262Profs*68) em *BSND* é a única descrita até o momento no éxon 4. A presença da variante inédita no éxon 4 sugere que a porção citoplasmática C-terminal, em particular os últimos cerca de 60 aminoácidos, tem função importante, apesar de ainda não compreendida plenamente. Experimentos futuros são necessários para comprovar a função da porção C-terminal de Bartina e o efeito específico da variante c.784delG;p.(Ala262Profs*68). Porém foi apresentada a hipótese de que a alteração prejudica a regulação do transporte dos canais CIC-K, função de Bartina, para a porção correta da membrana, acarretando por consequência em falha no transporte epitelial de sair na porção espessa ascendente da alça de Henle. Nesse sentido, foi aceita a publicação de um artigo, agora em fase de publicação, na revista *Biomedical Reports* da editora Spandidos (Anexo A).

Estudos com a co-expressão de Bartina (em sua forma selvagem e mutada) e canal do tipo CIC-K em linhagem de células epiteliais diferenciadas (ex. MDCK) possibilitaria a avaliação da função eletrofisiológica dos canais CIC-K sob diferentes versões de Bartina, dos níveis de expressão e proteólise de Bartina, e sua localização celular, já que tais células possuem a diferenciação de membrana basal e membrana basolateral. Foram preparados plasmídeos para tal fim, porém não foi possível incluir estes ensaios na presente tese devido a limitações de tempo e capacitação no cultivo de culturas de células de mamíferos.

6. REFERÊNCIAS

1. GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 2016a.
2. JACKSON, M.; MARKS, L.; MAY, G. H. W.; WILSON, J. B. The genetic basis of disease. **Essays in Biochemistry**, vol. 62, no. 5, pp. 643–723, 2018b. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>.
3. BARTTER, F. C.; PRONOVE, P.; GILL, J. R.; MACCARDLE, R. C. Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis: a new syndrome. **American Journal of Medicine**, vol. 33, no. 6, pp. 811–828, 1962c. https://doi.org/10.7326/0003-4819-58-4-740_1.
4. HAWKINS, C. F.; SMITH, O. E. RENAL DYSPLASIA IN A FAMILY WITH INCLUDING ILIAC HORNS. **The Lancet**, pp. 803–808, 1950d.
5. RICHARDS, S.; AZIZ, N.; BALE, S.; BICK, D.; DAS, S.; GASTIER-FOSTER, J.; GRODY, W. W.; HEGDE, M.; LYON, E.; SPECTOR, E.; VOELKERDING, K.; REHM, H. L. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, vol. 17, no. 5, pp. 405–424, 2015e. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
6. DEN DUNNEN, J. T.; DALGLEISH, R.; MAGLOTT, D. R.; HART, R. K.; GREENBLATT, M. S.; MCGOWAN-JORDAN, J.; ROUX, A. F.; SMITH, T.; ANTONARAKIS, S. E.; TASCHNER, P. E. M. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. **Human Mutation**, vol. 37, no. 6, pp. 564–569, 2016f. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>.
7. WANG, C., M.; WHITING, A. H.; RATH, A.; ANIDO, R.; ARDIGÒ, D.; BAYNAM, G.; DAWKINS, H.; HAMOSH, A.; LE CAM, Y.; MALHERBE, H.; MOLSTER, C. M.; MONACO, L.; PADILLA, C. D.; PARISER, A. R.; ROBINSON, P. N.; RODWELL, C.; SCHAEFER, F.; WEBER, S.; MACCHIA, F. Operational description of rare diseases: a reference to improve the recognition and visibility of rare diseases. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, vol. 19, no. 1, pp. 4–9, 2024g. <https://doi.org/10.1186/s13023-024-03322-7>.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 199, de 30 de Janeiro de 2014. 2014h. Available at: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt0199_30_01_2014.html.
9. THE LANCET GLOBAL HEALTH. The landscape for rare diseases in 2024. **The Lancet Global Health**, vol. 12, no. 3, p. e341, 2024i. DOI: 10.1016/S2214-109X(24)00056-1. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(24\)00056-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(24)00056-1).
10. SOEIRO, E. M. D.; HELOU, C. M. de B. Clinical, pathophysiological and genetic aspects of inherited tubular disorders in childhood. vol. 37, no. 3, pp. 385–398, 1 Jul. 2015j. <https://doi.org/10.5935/0101-2800.20150060>.
11. CHESNAYE, N. C. **European disparities in the incidence and outcomes of children with end-stage renal disease**. 2017k. University of Amsterdam, 2017. .
12. TANNER, G. A. Kidney Function. **Medical Physiology**. 2nd ed. 2003l. ed. 2nd, p. 781.
13. TANNER, G. A. Kidney Function. **Medical Physiology**. 4th ed. 2013m. ed. 4th, pp. 399–426.
14. FERNANDES, G. C. D.; TORRES, U. dos S.; FUNES, E.; TOLEDO, R. A. de. Nail-Patella Syndrome. **Journal of Clinical Rheumatology**, vol. 17, no. 7, p. 402, 2011n. <https://doi.org/10.1097/RHU.0b013e31823272ed>.
15. HALL, G.; LANE, B.; CHRYST-LADD, M.; WU, G.; LIN, J. J.; QIN, X. J.; HAUSER, E. R.; GBADEGESIN, R. Dysregulation of WTI (-KTS) is Associated with the Kidney-Specific

Effects of the LMX1B R246Q Mutation. **Scientific Reports**, vol. 7, no. 39933, pp. 1–9, 2017o. DOI: 10.1038/srep39933. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep39933>.

16. HEILBERG, I. P.; TÓTOLI, C.; CALADO, J. T. Adult presentation of Bartter syndrome type IV with erythrocytosis. **Einstein (São Paulo)**, vol. 13, no. 4, pp. 604–606, 2015p. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082015rc3013>.
17. MENEGON, L. F.; AMARAL, T. N.; GONTIJO, J. A. R. Renal sodium handling study in an atypical case of Bartter's syndrome associated with mitochondriopathy and sensorineural blindness. **Renal Failure**, vol. 26, no. 2, pp. 195–197, 2004q. <https://doi.org/10.1081/JDI-120038522>.
18. RICHIERI-COSTA, A. Antecubital Pterygium and Cleft Lip / Palate Presenting as Signs of the Nail-Patella Syndrome : Report of a Brazilian Family. **American Journal of Medical Genetics**, vol. 38, pp. 9–12, 1991r.
19. ZEN, P. R. G.; ROSA, R. F. M.; GRAZIADIO, C.; SILVA, A. P. da; PASKULIN, G. A. Omphalocele-exstrophy-imperforate anus-spinal defects (OEIS) complex in a child with nail-patella syndrome. **Pediatrics International**, no. 52, pp. 847–848, 2010s. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2010.03216.x>.
20. NASCIMENTO, C. L. P.; GARCIA, C. L.; SCHVARTSMAN, B. G. S.; VAISBICH, M. H. Treatment of Bartter syndrome. Unsolved issue. **Jornal de Pediatria**, vol. 90, no. 5, pp. 512–517, 2014t. DOI: 10.1016/j.jpmed.2014.01.012. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpmed.2014.01.012>.
21. VAISBICH, M. H.; FUJIMURA, M. D.; KOCH, V. H. Bartter syndrome: Benefits and side effects of long-term treatment. **Pediatric Nephrology**, vol. 19, pp. 858–863, 2004u. <https://doi.org/10.1007/s00467-004-1527-8>.
22. CHOI, N.; KIM, S. H.; BAE, E. H.; YANG, E. M.; LEE, G. H.; LEE, S.-H.; LEE, J. H.; AHN, Y. H.; CHEONG, H. II; KANG, H. G.; HYUN, H. S.; KIM, J. H. Long-term outcome of Bartter syndrome in 54 patients: A multicenter study in Korea. **Frontiers in Medicine**, vol. 10, no. March, pp. 1–8, 2023v. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1099840>.
23. MADRIGAL, G.; SABORIO, P.; MORA, F.; RINCON, G.; GUAY-WOODFORD, L. M. Bartter syndrome in Costa Rica: A description of 20 cases. **Pediatric Nephrology**, vol. 11, no. 3, pp. 296–301, 1997w. <https://doi.org/10.1007/s004670050280>.
24. KURTZ, C. L.; KAROLYI, L.; SEYBERTH, H. W.; KOCH, M. C.; KNOERS, N. V. A. M.; MADRIGAL, G.; GUAY-WOODFORD, L. M. A Common NKCC2 Mutation in Costa Rican Bartter's Syndrome Patients : Mutation Evidence for a Founder Effect. **Journal of the American Society of Nephrology**, pp. 1706–1711, 1997x.
25. VARGAS-POUSSOU, R.; FELDMANN, D.; VOLLMER, M.; KONRAD, M.; KELLY, L.; VAN DEN HEUVEL, L. P. W. J.; TEBOURBI, L.; BRANDIS, M.; KAROLYI, L.; HEBERT, S. C.; LEMMINK, H. H.; DESCHÉNES, G.; HILDEBRANDT, F.; SEYBERTH, H. W.; GUAY-WOODFORD, L. M.; KNOERS, N. V. A. M.; ANTIGNAC, C. Novel molecular variants of the Na-K-2Cl cotransporter gene are responsible for antenatal Bartter syndrome. **American Journal of Human Genetics**, vol. 62, no. 6, pp. 1332–1340, 1998y. <https://doi.org/10.1086/301872>.
26. SIMON, D. B.; KARET, F. E.; HAMDAN, J. M.; PIETRO, A. Di; SANJAD, S. A.; LIFTON, R. P.; HUGHES, H.; VIA, A. Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. vol. 13, no. june, pp. 183–188, 1996z.
27. SUN, M.; NING, J.; XU, W.; ZHANG, H.; ZHAO, K.; LI, W.; LI, G.; LI, S. Genetic heterogeneity in patients with Bartter syndrome type 1. **Molecular Medicine Reports**, vol. 15, no. 2, pp. 581–590, 2017aa. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6063>.
28. SIMON, D. B.; KARET, F. E.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; HAMDAN, J. H.; DIPIETRO,

- A.; TRACHTMANS, H.; SANJAD, S. A.; LIFTON, R. P. Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK. vol. 14, pp. 152–156, 1996ab.
29. TIAN, M.; PENG, H.; BI, X.; WANG, Y. Q.; ZHANG, Y. Z.; WU, Y.; ZHANG, B. R. Late-Onset Bartter Syndrome Type II Due to a Novel Compound Heterozygous Mutation in KCNJ1 Gene: A Case Report and Literature Review. **Frontiers in Medicine**, vol. 9, no. April, pp. 1–7, 2022ac. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.862514>.
30. SIMON, D. B.; BINDRA, R. S.; NELSON-WILLIAMS, T. A. M. C.; MENDONCA, E.; STONE, R.; SCHURMAN, S.; NAYIR, A.; ALPAY, H.; BAKKALOGLUS, A.; RODRIGUEZ-SORIANO, J.; MORALES, J. M.; SANJAD, S. A.; TAYLOR, C. M.; PILZ, D.; BREM, A.; TRACHTMAN, H.; GRISWOLD, W.; RICHARD, G. A.; JOHN, E.; LIFTON, R. P. Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. **Nature Genetics**, vol. 17, no. october, pp. 171–178, 1997ad.
31. WANG, C.; HAN, Y.; ZHOU, J.; ZHENG, B.; ZHOU, W.; BAO, H.; JIA, Z.; ZHANG, A.; HUANG, S.; DING, G.; ZHAO, F. Splicing Characterization of CLCNKB Variants in Four Patients With Type III Bartter Syndrome. **Frontiers in Genetics**, vol. 11, no. February, pp. 1–7, 2020ae. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00081>.
32. BIRKENHÄGER, R.; OTTO, E.; SCHÜRMAN, M. J.; VOLLMER, M.; RUF, E. M.; MAIER-LUTZ, I.; BEEKMANN, F.; FEKETE, A.; OMRAN, H.; FELDMANN, D.; MILFORD, D. V.; JECK, N.; KONRAD, M.; LANDAU, D.; KNOERS, N. V. A. M.; ANTIGNAC, C.; SUDBRAK, R.; KISPERT, A.; HILDEBRANDT, F. Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. **Nature Genetics**, vol. 29, no. 3, pp. 310–314, 2001af. <https://doi.org/10.1038/ng752>.
33. SHAJAN, A. M.; KUMAR, M.; NAVANEETHAN, P.; DANDA, S.; BECK, M. M. An Unusual Case of BSND Gene-Related (Type IV) Bartter Syndrome Presenting as Antenatal Bartter Syndrome: A Case Report and Review of Literature. **Maternal-Fetal Medicine**, vol. 5, no. 2, pp. 128–130, 2023ag. <https://doi.org/10.1097/FM9.000000000000182>.
34. FLOREA, L.; CABA, L.; GORDUZA, E. V. Genetic Heterogeneity in Bartter Syndrome: Clinical and Practical Importance. **Frontiers in Pediatrics**, vol. 10, no. June, pp. 1–10, 2022ah. <https://doi.org/10.3389/fped.2022.908655>.
35. STEVENSON, M.; PAGNAMENTA, A. T.; MACK, H. G.; SAVIGE, J.; GIACOPUZZI, E.; LINES, K. E.; TAYLOR, J. C.; THAKKER, R. V. The Bartter-Gitelman Spectrum: 50-Year Follow-up With Revision of Diagnosis After Whole-Genome Sequencing. **Journal of the Endocrine Society**, vol. 6, no. 7, pp. 1–8, 2022ai. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvac079>.
36. VARGAS-POUSSOU, R.; HUANG, C.; HULIN, P.; HOUILLIER, P.; JEUNEMAÎTRE, X.; PAILLARD, M.; PLANELLES, G.; DÉCHAUX, M.; MILLER, R. T.; ANTIGNAC, C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a Bartter-like syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 13, no. 9, pp. 2259–2266, 2002aj. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000025781.16723.68>.
37. WATANABE, S.; FUKUMOTO, S.; CHANG, H.; TAKEUCHI, Y.; HASEGAWA, Y.; OKAZAKI, R.; CHIKATSU, N.; FUJITA, T. Association between activating mutations of calcium-sensing receptor and Bartter's syndrome. **Lancet**, vol. 360, no. 9334, pp. 692–694, 2002ak. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09842-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09842-2).
38. CUNHA, T. da S.; HEILBERG, I. P. Bartter syndrome: Causes, diagnosis, and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, vol. 11, pp. 291–301, 2018al. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S155397>.
39. SEYBERTH, H. W.; WEBER, S.; KÖMHOF, M. Bartter's and Gitelman's syndrome. **Current Opinion in Pediatrics**, vol. 29, no. 2, pp. 179–186, 2017am. <https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000447>.

40. WALSH, P. R.; TSE, Y.; ASHTON, E.; IANCU, D.; JENKINS, L.; BIENIAS, M.; KLETA, R.; VAN'T HOFF, W.; BOCKENHAUER, D. Clinical and diagnostic features of Bartter and Gitelman syndromes. **Clinical Kidney Journal**, vol. 11, no. 3, pp. 302–309, 2018an. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx118>.
41. ZACCHIA, M.; CAPOLONGO, G.; RINALDI, L.; CAPASSO, G. The importance of the thick ascending limb of Henle's loop in renal physiology and pathophysiology. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, vol. 11, pp. 81–92, 2018ao. <https://doi.org/10.2147/IJNRD.S154000>.
42. QUIGLEY, R.; SALAND, J. M. Transient antenatal Bartter's Syndrome and X-linked polyhydramnios: insights from the genetics of a rare condition. **Kidney International**, vol. 90, no. 4, pp. 721–723, 2016ap. DOI: 10.1016/j.kint.2016.07.031. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.07.031>.
43. LAGHMANI, K.; BECK, B. B.; YANG, S.-S.; SEAYFAN, E.; WENZEL, A.; REUSCH, B.; VITZTHUM, H.; PRIEM, D.; DEMARETZ, S.; BERGMANN, K.; DUIN, L. K.; GÖBEL, H.; MACHE, C.; THIELE, H.; BARTRAM, M. P.; DOMBRET, C.; ALTMÜLLER, J.; NÜRNBERG, P.; BENZING, T.; LEVTCHENKO, E.; SEYBERTH, H. W.; KLAUS, G.; YIGIT, G.; LIN, S.-H.; TIMMER, A.; DE KONING, T. J.; SCHERJON, S. A.; SCHLINGMANN, K. P.; BERTRAND, M. J. M.; RINSCHEN, M. M.; DE BACKER, O.; KONRAD, M.; KÖMHOFF, M. Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations. **New England Journal of Medicine**, vol. 374, no. 19, pp. 1853–1863, 2016aq. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1507629>.
44. SWEENEY, E.; HOOVER-FONG, J. E.; MCINTOSH, I. Nail-Patella Syndrome. **Gene Reviews**. 2023ar. pp. 1–22.
45. MCINTOSH, I.; DREYER, S. D.; CLOUGH, M. V.; DUNSTON, J. A.; ROIG, C. M.; MONTGOMERY, T.; ALA-MELLO, S.; KAITILA, I.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B.; FRYDMAN, M.; COLE, W. G.; FRANCOMANO, C. A.; LEE, B. **Mutation Analysis of LMX1B Gene in Nail-Patella Syndrome Patients**. [N.d.]. 1651-1658 pp.
46. DREYER, S. D.; ZHOU, G.; BALDINI, A.; WINTERPACHT, A.; ZABEL, B.; COLE, W.; JOHNSON, R. L.; LEE, B. Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. **Nature Genetics**, vol. 19, pp. 47–50, 1998at.
47. DUNSTON, J. A.; HAMLINGTON, J. D.; ZAVERI, J.; SWEENEY, E.; SIBBRING, J.; TRAN, C.; MALBROUX, M.; O'NEILL, J. P.; MOUNTFORD, R.; MCINTOSH, I. The human LMX1B gene: Transcription unit, promoter, and pathogenic mutations. **Genomics**, vol. 84, no. 3, pp. 565–576, 2004au. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.06.002>.
48. LEMLEY, K. V. Kidney disease in nail-patella syndrome. **Pediatric Nephrology**, vol. 24, pp. 2345–2354, 2009av. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-0836-8>.
49. ENDELE, S.; KLEIN, Æ. S.; RICHTER, Æ. S.; MOLTER, Æ. T.; AMANN, Æ. K.; KLANKE, B.; WITZGALL, Æ. R.; JOHNSON, Æ. R. L.; HILGERS, Æ. K. F. Renal phenotype in heterozygous Lmx1b knockout mice (Lmx1b +/-) after unilateral nephrectomy. **Transgenic Research**, vol. 16, pp. 723–729, 2007aw. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9118-7>.
50. BURGHARDT, T.; KASTNER, J.; SULEIMAN, H.; RIVERA-MILLA, E.; STEPANOVA, N.; LOTTAZ, C.; KUBITZA, M.; BÖGER, C. A.; SCHMIDT, S.; GORSKI, M.; VRIES, U. De; SCHMIDT, H.; HERTTING, I.; KOPP, J.; RASCLE, A.; MOSER, M.; HEID, I. M.; WARTH, R.; SPANG, R.; WEGENER, J.; MIERKE, C. T.; ENGLERT, C.; WITZGALL, R. LMX1B is Essential for the Maintenance of Differentiated Podocytes in Adult Kidneys. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 24, pp. 1830–1848, 2013ax. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012080788>.
51. CHIZHIKOV, V. V.; ISKUSNYKH, I. Y.; FATTAKHOV, N.; FRITZSCH, B. Lmx1a and

Lmx1b are Redundantly Required for the Development of Multiple Components of the Mammalian Auditory System. **Neuroscience**, vol. 452, pp. 247–264, 2021ay. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.013>.

52. YEBOAH, R.; PIRA, C. U.; SHANKEL, M.; COOPER, A. M.; HARO, E.; LY, V.; WYSONG, K.; ZHANG, M.; SANDOVAL, N.; OBERG, K. C. Sox , Fox , and Lmx1b binding sites differentially regulate a Gdf5-Associated regulatory region during elbow development. no. July, pp. 1–14, 2023az. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1215406>.

53. MEER, E.; QIN, V. L.; GUDISEVA, H. V.; MCGEEHAN, B.; SALOWE, R.; PISTILLI, M.; HE, J.; DANIEL, E.; YING, G. S.; CHAVALI, V. R. M.; O'BRIEN, J. M. Lmx1b locus associated with low-risk baseline glaucomatous features in the poaagg study. **Genes**, vol. 12, no. 8, 2021ba. <https://doi.org/10.3390/genes12081252>.

54. HARITA, Y.; KITANAKA, S.; ISOJIMA, T.; ASHIDA, A. Spectrum of LMX1B mutations : from nail – patella syndrome to isolated nephropathy. **Pediatric Nephrology**, 2016bb. <https://doi.org/10.1007/s00467-016-3462-x>.

55. GUO, C.; QIU, H. Y.; HUANG, Y.; CHEN, H.; YANG, R. Q.; CHEN, S. Di; JOHNSON, R. L.; CHEN, Z. F.; DING, Y. Q. Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. **Development**, vol. 134, no. 2, pp. 317–325, 2007bc. <https://doi.org/10.1242/dev.02745>.

56. MARKITANTOVA, Y.; SIMIRSKII, V. **Inherited eye diseases with retinal manifestations through the eyes of homeobox genes**. 2020bd. 6-8 pp. <https://doi.org/10.3390/ijms21051602>.

57. HOBERT, O.; WESTPHAL, H. Functions of LIM- homeobox genes. vol. 9525, no. 99, 2000be.

58. WITZGALL, R. Nail-patella syndrome. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, 2017bf. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2013-z>.

59. SWEENEY, E.; FRYER, A.; MOUNTFORD, R.; GREEN, A.; MCINTOSH, I. Nail patella syndrome: a review of the phenotype aided by developmental biology. **Journal of Medical Genetics**, vol. 40, no. 3, pp. 153–162, 2003bg. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.3.153>.

60. HARITA, Y.; URAE, S.; AKASHIO, R.; ISOJIMA, T.; MIURA, K.; YAMADA, T.; YAMAMOTO, K.; MIYASAKA, Y.; FURUYAMA, M.; TAKEMURA, T.; GOTOH, Y.; TAKIZAWA, H.; TAMAGAKI, K.; OZAWA, A.; ASHIDA, A.; HATTORI, M.; OKA, A.; KITANAKA, S. Clinical and genetic characterization of nephropathy in patients with nail-patella syndrome. **European Journal of Human Genetics**, vol. 28, no. 10, pp. 1414–1421, 2020bh. DOI: 10.1038/s41431-020-0655-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41431-020-0655-3>.

61. GHOUMID, J.; PETIT, F.; HOLDER-ESPINASSE, M.; JOURDAIN, A. S.; GUERRA, J.; DIEUX-COESLIER, A.; FIGEAC, M.; PORCHET, N.; MANOUVRIER-HANU, S.; ESCANDE, F. Nail-Patella Syndrome: Clinical and molecular data in 55 families raising the hypothesis of a genetic heterogeneity. **European Journal of Human Genetics**, vol. 24, no. 1, pp. 44–50, 2016bi. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.77>.

62. LEE, B. H.; CHO, T. J.; CHOI, H. J.; KANG, H. K.; LIM, I. S.; PARK, Y. H.; HA, I. S.; CHOI, Y.; CHEONG, H. II. Clinico-genetic study of Nail-patella syndrome. **Journal of Korean Medical Science**, vol. 24, no. SUPPL.1, pp. 82–86, 2009bj. <https://doi.org/10.3346/jkms.2009.24.S1.S82>.

63. ABOOBACKER, I.; KRISHNAKUMAR, A.; NARAYANAN, S.; HAFEEQUE, B.; GOPINATHAN, J.; AZIZ, F. Nail-Patella syndrome: A rare cause of nephrotic syndrome in pregnancy. **Indian Journal of Nephrology**, vol. 28, no. 1, pp. 76–78, 1 Jan. 2018bk. https://doi.org/10.4103/ijn.IJN_362_16.

64. PRICE, A.; CERVANTES, J.; LINDSEY, S.; HU, S.; AICKARA, D. Nail-patella syndrome: Clinical clues for making the diagnosis. **Cutis**, vol. 101, no. 2, pp. 126–129, 2018bl.
65. KONRAD, M.; VOLLMER, M.; LEMMINK, H. H.; HEUVEL, L. P. W. J. V. A. N. D. E. N.; JECK, N.; VARGAS-POUSSOU, R.; LAKINGS, A.; RUF, R.; ENES, G. D.; ANTIGNAC, C.; GUAY-WOODFORD, L.; KNOERS, N. V. A. M.; ORG, H. Mutations in the Chloride Channel Gene CLCNKB as a Cause of Classic Bartter Syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 11, pp. 1449–1459, 2000bm.
66. NOZU, K.; INAGAKI, T.; FU, X. J.; NOZU, Y.; KAITO, H.; KANDA, K.; SEKINE, T.; IGARASHI, T.; NAKANISHI, K.; YOSHIKAWA, N.; IJIMA, K.; MATSUO, M. Molecular analysis of digenic inheritance in Bartter syndrome with sensorineural deafness. **J Med Genet**, vol. 45, pp. 182–186, 2008bn. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.052944>.
67. CHAUDHARY, A.; KUMAR, V. Rare diseases: a comprehensive literature review and future directions. **Journal of Rare Diseases**, vol. 4, no. 1, 2025bo. <https://doi.org/10.1007/s44162-025-00099-6>.
68. GRAF VON DER SCHULENBURG, J. M.; FRANK, M. Rare is frequent and frequent is costly: rare diseases as a challenge for health care systems. **European Journal of Health Economics**, vol. 16, no. 2, pp. 113–118, 2015bp. <https://doi.org/10.1007/s10198-014-0639-8>.
69. VINKŠEL, M.; WRITZL, K.; MAVER, A.; PETERLIN, B. Improving diagnostics of rare genetic diseases with NGS approaches. **Journal of Community Genetics**, vol. 12, no. 2, pp. 247–256, 2021bq. <https://doi.org/10.1007/s12687-020-00500-5>.
70. WRIGHT, C. F.; FITZPATRICK, D. R.; FIRTH, H. V. Paediatric genomics: Diagnosing rare disease in children. **Nature Reviews Genetics**, vol. 19, no. 5, pp. 253–268, 2018br. DOI: 10.1038/nrg.2017.116. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.116>.
71. BOCKENHAUER, D.; KLETA, R. Tubulopathy meets Sherlock Holmes: biochemical fingerprinting of disorders of altered kidney tubular salt handling. **Pediatric Nephrology**, vol. 36, no. 8, pp. 2553–2561, 2021bs. DOI: 10.1007/s00467-021-05098-5. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05098-5>.
72. OE, Y.; MISHIMA, E.; MORI, T.; OKAMOTO, K.; HONKURA, Y.; NAGASAWA, T.; YOSHIDA, M.; SATO, H.; SUZUKI, J.; IKEDA, R.; SOHARA, E.; UCHIDA, S.; KATORI, Y.; MIYAZAKI, M. A Novel Mutation in LMX1B (p.Pro219Ala) Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis with Alport Syndrome-like Phenotype. **Internal Medicine**, vol. 60, no. 18, pp. 2991–2996, 2021bt. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.6987-20>.
73. ABDELGADIR, I. S.; ELGHARBAWY, F.; SALAMEH, K. M.; JUMA, B. E. Antenatal Bartter syndrome presenting with vomiting and constipation mimicking subacute intestinal obstruction in a 20-day-old neonate. **BMJ Case Reports**, vol. 2017, 2017bu. <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-221062>.
74. JDIAA, S. S.; WALSH, S. B.; BOCKENHAUER, D.; FAKHREDINE, S. W.; KOUBAR, S. H. The hypokalemia mystery: Distinguishing Gitelman and Bartter syndromes from “pseudo-Bartter syndrome.” **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 37, no. 1, pp. 29–30, 2022bv. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa100>.
75. GUVEN, S.; GOKCE, I.; ALAVANDA, C.; CICEK, N.; DEMIRCI, E. B.; SAK, M.; PUL, S.; TURKKAN, O. N.; YILDIZ, N.; ATA, P.; ALPAY, H. Differential diagnosis of classical Bartter syndrome and Gitelman syndrome: Do we need genetic analysis? **Marmara Medical Journal**, vol. 34, no. 3, pp. 254–259, 2021bw. DOI: 10.5472/marumj.1012351. Available at: <https://dergipark.org.tr/tr/pub/marumj>.
76. MORI, T.; CHIGA, M.; FUJIMARU, T.; KAWAMOTO, R.; MANDAI, S.; NANAMATSU, A.; NOMURA, N.; ANDO, F.; SUSU, K.; SOHARA, E.; RAI, T.; UCHIDA, S. Phenotypic

- differences of mutation-negative cases in Gitelman syndrome clinically diagnosed in adulthood. **Human Mutation**, no. November, 2020bx. <https://doi.org/10.1002/humu.24159>.
77. BAO, M.; CAI, J.; YANG, X.; MA, W. Genetic screening for Bartter syndrome and Gitelman syndrome pathogenic genes among individuals with hypertension and hypokalemia. **Clinical and Experimental Hypertension**, vol. 41, no. 4, pp. 381–388, 2019by. DOI: 10.1080/10641963.2018.1489547. Available at: <https://doi.org/10.1080/10641963.2018.1489547>.
78. MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Diretrizes clínicas para o cuidado ao paciente com doença renal crônica - DRC no Sistema Único de Saúde**. [N.d.]. Available at: www.saude.gov.br/sas.
79. THOMÉ, F. S.; SESSO, R. C.; LOPES, A. A.; LUGON, J. R.; MARTINS, C. T. Brazilian chronic dialysis survey 2017. **Brazilian Journal of Nephrology**, pp. 1–7, 2018ca. <https://doi.org/10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178>.
80. [HTTPS://WWW.SIGMAALDRICH.COM/BR/PT/TECHNICAL-DOCUMENTS/PROTOCOL/GENOMICS/DNA-AND-RNA-PURIFICATION/WHATMAN-RELIABLE-EXTRACTION-OF-DNA](https://www.sigmaaldrich.com/br/pt/technical-documents/protocol/genomics/dna-and-rna-purification/whatman-reliable-extraction-of-dna).
81. OBRADOR-SÁNCHEZ, J. A.; TZEC-SIMA, M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; CANTO-CANCHÉ, B. A quick and effective in-house method of DNA purification from agarose gel, suitable for sequencing. **3 Biotech**, vol. 7, no. 3, pp. 7–12, 2017cc. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0851-1>.
82. CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: Architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, vol. 10, pp. 1–9, 2009cd. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.
83. SCHWARZ, J. M.; COOPER, D. N.; SCHUELKE, M.; SEELow, D. Mutationtaster2: Mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nature Methods**, vol. 11, no. 4, pp. 361–362, 2014ce. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>.
84. RENTZSCH, P.; WITTEN, D.; COOPER, G. M.; SHENDURE, J.; KIRCHER, M. CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. **Nucleic Acids Research**, vol. 47, no. D1, pp. D886–D894, 2019cf. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1016>.
85. DOUCET-BEAUPRÉ, H.; ANG, S.; LÉVESQUE, M. Cell fate determination , neuronal maintenance and disease state : The emerging role of transcription factors Lmx1a and Lmx1b. vol. 589, pp. 3727–3738, 2015cg. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.10.020>.
86. VOGEL, A.; RODRIGUEZ, C.; WARNKEN, W.; BELMONTE, J. C. I. Dorsal cell fate specified by chick Lmx1 during vertebrate limb development. **Nature**, vol. 378, no. 7, pp. 603–605, 1995ch.
87. RIDDLE, R. D.; ENSINI, M.; NELSON, C.; TSUCHIDA, T.; JESSELL, T. M.; TABIN, C. Induction of the LIM homeobox gene Lmx1 by WNT6a establishes dorsoventral pattern in the vertebrate limb. **Cell**, vol. 83, no. 4, pp. 631–640, 1995ci. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90103-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90103-5).
88. CHEN, H.; LUN, Y.; OVCHINNIKOV, D.; KOKUBO, H.; OBERG, K. C.; PEPICELLI, C. V.; GAN, L.; LEE, B.; JOHNSON, R. L. Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. **Nature Genetics**, vol. 19, no. may, pp. 51–55, 1998cj.
89. DREYER, S. D.; MORELLO, R.; GERMAN, M. S.; ZABEL, B.; WINTERPACHT, A.; LUNSTRUM, G. P.; HORTON, W. A.; OBERG, K. C.; LEE, B. LMX1B transactivation and expression in nail-patella syndrome. **Human Molecular Genetics**, vol. 9, no. 7, pp. 1067–1074, 2000ck. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.7.1067>.
90. HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis

program for Windows 95/98/NT. vol. 41, pp. 95–98, 1999cl.

91. SATO, U.; KITANAKA, S.; SEKINE, T.; TAKAHASHI, S.; ASHIDA, A.; IGARASHI, T. Functional characterization of LMX1B mutations associated with nail-patella syndrome.

Pediatric Research, vol. 57, no. 6, pp. 783–788, 2005cm.

<https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000157674.63621.2C>.

92. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Child Growth Standards**. [N.d.].

93. CRUZ, A. J.; CASTRO, A. Gitelman or Bartter type 3 syndrome? A case of distal convoluted tubulopathy caused by CLCNKB gene mutation. **BMJ Case Reports**, pp. 1–4, 2013co. <https://doi.org/10.1136/bcr-2012-007929>.

94. BRAMBILLA, I.; PODDIGHE, D.; SEMERIA MANTELLI, S.; GUARRACINO, C.; MARSEGLIA, G. L. Bartter syndrome and growth hormone deficiency: Three siblings with a novel CLCNKB mutation. **Blackwell Publishing**, vol. 61, no. 2, pp. 193–197, 1 Feb. 2019cp. <https://doi.org/10.1111/ped.13726>.

95. CHA, E. J.; HWANG, W. M.; YUN, S.-R.; PARK, M. H. An Adult Case of Bartter Syndrome Type III Presenting with Proteinuria. **Journal of Pathology and Translational Medicine**, vol. 50, no. 2, pp. 160–164, 2016cq. <https://doi.org/10.4132/jptm.2015.08.31>.

96. BETTINELLI, A.; BORSA, N.; BELLANTUONO, R.; SYRÈN, M. L.; CALABRESE, R.; EDEFONTI, A.; KOMNINOS, J.; SANTOSTEFANO, M.; BECCARIA, L.; PELA, I.; BIANCHETTI, M. G.; TEDESCHI, S. Patients With Biallelic Mutations in the Chloride Channel Gene CLCNKB: Long-Term Management and Outcome. **American Journal of Kidney Diseases**, vol. 49, no. 1, pp. 91–98, 2007cr. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.10.001>.

97. GARCÍA CASTAÑO, A.; PÉREZ DE NANCLARES, G.; MADARIAGA, L.; AGUIRRE, M.; MADRID, Á.; CHOCRÓN, S.; NADAL, I.; NAVARRO, M.; LUCAS, E.; FIJO, J.; ESPINO, M.; ESPITALETTA, Z.; GARCÍA NIETO, V.; BARAJAS DE FRUTOS, D.; LOZA, R.; PINTOS, G.; CASTAÑO, L.; ARICETA, G. Poor phenotype-genotype association in a large series of patients with Type III Bartter syndrome. **Plos One**, vol. 12, no. 3, p. e0173581, 2017cs. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173581>.

98. JECK, N.; KONRAD, M.; PETERS, M.; WEBER, S.; BONZEL, K. E.; SEYBERTH, H. W. Mutations in the Chloride Channel Gene , CLCNKB , Leading to a Mixed Bartter-Gitelman Phenotype. vol. 48, no. 6, pp. 754–758, 2000ct.

99. ZHAO, Q.; XIANG, Q.; TAN, Y.; XIAO, X.; XIE, H.; WANG, H.; YANG, M.; LIU, S. A novel CLCNKB variant in a Chinese family with classic Bartter syndrome and prenatal genetic diagnosis. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, vol. 10, no. 10, pp. 1–8, 2022cu. <https://doi.org/10.1002/mgg3.2027>.

100. SAHBANI, D.; STRUMBO, B.; TEDESCHI, S.; CONTE, E.; CAMERINO, G. M.; BENETTI, E.; MONTINI, G.; ACETO, G.; PROCINO, G.; IMBRICI, P.; LIANTONIO, A. Functional Study of Novel Bartter's Syndrome Mutations in ClC-Kb and Rescue by the Accessory Subunit Barttin Toward Personalized Medicine. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 11, no. March, pp. 1–11, 2020cv. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00327>.

101. LEE, B. H.; CHO, H. Y.; LEE, H.; HAN, K. H.; KANG, H. G.; HA, I. S.; LEE, J. H.; PARK, Y. S.; SHIN, J. II; LEE, D. Y.; KIM, S. Y.; CHOI, Y.; CHEONG, H. II. Genetic basis of Bartter syndrome in Korea. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 27, no. 4, pp. 1516–1521, 2012cw. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr475>.

102. SCHLINGMANN, K. P.; KONRAD, M.; JECK, N.; WALDEGGER, P.; REINALTER, S. C.; HOLDER, M.; SEYBERTH, H. W.; WALDEGGER, S. Salt Wasting and Deafness Resulting from Mutations in Two Chloride Channels. **New England Journal of Medicine**, vol. 350, no. 13, pp. 1314–1319, 2004cx. <https://doi.org/10.1056/nejmoa032843>.

103. GÜVEN, S.; GÖKÇE, İ.; ALAVANDA, C.; ÇIÇEK, N.; DEMIRCI, E. B.; SAK, M.; PUL,

- S.; TÜRKKAN, Ö. N.; YILDIZ, N.; ATA, P.; ALPAY, H. Phenotypic and genotypic characteristics of children with Bartter syndrome. no. October, pp. 825–838, 2022cy.
104. ASHTON, E. J.; LEGRAND, A.; BENOIT, V.; RONCELIN, I.; VENISSE, A.; ZENNARO, M. C.; JEUNEMAITRE, X.; IANCU, D.; VAN'T HOFF, W. G.; WALSH, S. B.; GODEFROID, N.; ROTTHIER, A.; DEL FAVERO, J.; DEVUYST, O.; SCHAEFER, F.; JENKINS, L. A.; KLETA, R.; DAHAN, K.; VARGAS-POUSSOU, R.; BOCKENHAUER, D. Simultaneous sequencing of 37 genes identified causative mutations in the majority of children with renal tubulopathies. **Kidney International**, vol. 93, no. 4, pp. 961–967, 2018cz. DOI: 10.1016/j.kint.2017.10.016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.10.016>.
105. BRAMBILLA, I.; PODDIGHE, D.; SEMERIA MANTELLI, S.; GUARRACINO, C.; MARSEGLIA, G. L. Bartter syndrome and growth hormone deficiency: Three siblings with a novel CLCNKB mutation. **Pediatrics International**, vol. 61, no. 2, pp. 193–197, 2019da. <https://doi.org/10.1111/ped.13726>.
106. BRANDT, S.; JENTSCH, T. J. CIC-6 and CIC-7 are two novel broadly expressed members of the CLC chloride channel family. **FEBS Letters**, vol. 377, no. 1, pp. 15–20, 1995db. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01298-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01298-2).
107. CHENG, C. J.; LO, Y. F.; CHEN, J. C.; HUANG, C. L.; LIN, S. H. Functional severity of CLCNKB mutations correlates with phenotypes in patients with classic Bartter's syndrome. **Journal of Physiology**, vol. 595, no. 16, pp. 5573–5586, 2017dc. <https://doi.org/10.1113/JP274344>.
108. HAN, Y.; LIN, Y.; SUN, Q.; WANG, S.; GAO, Y.; SHAO, L. Mutation spectrum of Chinese patients with Bartter syndrome. **Oncotarget**, vol. 8, no. 60, pp. 101614–101622, 2017dd. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21355>.
109. PALAZZO, V.; RAGLIANTI, V.; LANDINI, S.; CIRILLO, L.; ERRICHIELLO, C.; BUTI, E.; ARTUSO, R.; TIBERI, L.; VERGANI, D.; DIRUPO, E.; ROMAGNANI, P.; MAZZINGHI, B.; BECHERUCCI, F. Clinical and Genetic Characterization of Patients with Bartter and Gitelman Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 10, p. 5641, 2022de. <https://doi.org/10.3390/ijms23105641>.
110. OZLU, F.; YAPICIOĞLU, H.; SATAR, M.; NARLI, N.; OZCAN, K.; BUYUKCELİK, M.; KONRAD, M.; DEMIRHAN, O. Barttin mutations in antenatal Bartter syndrome with sensorineural deafness [5]. **Pediatric Nephrology**, vol. 21, no. 7, pp. 1056–1057, 2006df. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0108-4>.
111. ZAFFANELLO, M.; TARANTA, A.; PALMA, A.; BETTINELLI, A.; MARSEGLIA, G. L.; EMMA, F. Type IV Bartter syndrome: Report of two new cases. **Pediatric Nephrology**, vol. 21, no. 6, pp. 766–770, 2006dg. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0090-x>.
112. ELRHARCHI, S.; RIAHI, Z.; SALIME, S.; NAHILI, H.; ROUBA, H.; KABINE, M.; BONNET, C.; PETIT, C.; BARAKAT, A. Two novel homozygous missense mutations identified in the BSND gene in Moroccan patients with Bartter's syndrome. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, vol. 113, no. March, pp. 46–50, 2018dh. DOI: 10.1016/j.ijporl.2018.07.010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2018.07.010>.
113. MIYAMURA, N.; MATSUMOTO, K.; TAGUCHI, T.; TOKUNAGA, H.; NISHIKAWA, T.; NISHIDA, K.; TOYONAGA, T.; SAKAKIDA, M.; ARAKI, E. Atypical Bartter syndrome with sensorineural deafness with G47R mutation of the β -subunit for CIC-Ka and CIC-Kb chloride channels, barttin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 88, no. 2, pp. 781–786, 2003di. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021398>.
114. BRUM, S.; RUEFF, J.; SANTOS, J. R.; CALADO, J. Unusual adult-onset manifestation of an attenuated Bartter's syndrome type IV renal phenotype caused by a mutation in BSND. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 22, no. 1, pp. 288–289, 2007dj. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ndt/gfl493>.

115. GARCÍA-NIETO, V.; FLORES, C.; LUIS-YANES, M. I.; GALLEGO, E.; VILLAR, J.; CLAVERIE-MARTÍN, F. Mutation G47R in the BSND gene causes Bartter syndrome with deafness in two Spanish families. **Pediatric Nephrology**, vol. 21, no. 5, pp. 643–648, 2006dk. <https://doi.org/10.1007/s00467-006-0062-1>.
116. ESTÉVEZ, R.; BOETTGER, T.; STEIN, V.; BIRKENHÄGER, R.; OTTO, E.; HILDEBRANDT, F.; JENTSCH, T. J. Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. vol. 414, pp. 558–561, 2001dl.
117. KITANAKA, S.; SATO, U.; MARUYAMA, K.; IGARASHI, T. A compound heterozygous mutation in the BSND gene detected in Bartter syndrome type IV. **Pediatric Nephrology**, vol. 21, no. 2, pp. 190–193, 2006dm. <https://doi.org/10.1007/s00467-005-2091-6>.
118. DE PABLOS, A. L.; GARCÍA-NIETO, V.; LÓPEZ-MENCHERO, J. C.; RAMOS-TRUJILLO, E.; GONZÁLEZ-ACOSTA, H.; CLAVERIE-MARTÍN, F. Severe manifestation of bartter syndrome type IV caused by a novel insertion mutation in the BSND gene. **Clinical Nephrology**, vol. 81, no. 5, pp. 363–368, 2014dn. <https://doi.org/10.5414/CN107687>.
119. PLUMB, L. A.; VAN'T HOFF, W.; KLETA, R.; REID, C.; ASHTON, E.; SAMUELS, M.; BOCKENHAUER, D. Renal apnoea: extreme disturbance of homeostasis in a child with Bartter syndrome type IV. **The Lancet**, vol. 388, no. 10044, pp. 631–632, 2016do. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)00087-8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00087-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00087-8).
120. BIRCAN, Z.; HARPUTLUOGLU, F.; JECK, N. Deletion of exons 2-4 in the BSND gene causes severe antenatal bartter syndrome. **Pediatric Nephrology**, vol. 24, no. 4, pp. 841–844, 2009dp. <https://doi.org/10.1007/s00467-008-1008-6>.
121. RIAZUDDIN, S.; ANWAR, S.; FISCHER, M.; AHMED, Z. M.; KHAN, S. Y.; JANSSEN, A. G. H.; ZAFAR, A. U.; SCHOLL, U.; HUSNAIN, T.; BELYANTSEVA, I. A.; FRIEDMAN, P. L.; RIAZUDDIN, S.; FRIEDMAN, T. B.; FAHLKE, C. Molecular Basis of DFNB73: Mutations of BSND Can Cause Nonsyndromic Deafness or Bartter Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, vol. 85, no. 2, pp. 273–280, 2009dq. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.07.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.07.003>.
122. WANG, H. han; FENG, Y.; LI, H. bo; WU, H.; MEI, L. yun; WANG, X. wei; JIANG, L.; HE, C. feng. Digenic mutations involving both the BSND and GJB2 genes detected in Bartter syndrome type IV. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, vol. 92, pp. 17–20, 2017dr. DOI: 10.1016/j.ijporl.2016.10.028. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.10.028>.
123. TAJIMA, M.; HAYAMA, A.; RAI, T.; SASAKI, S.; UCHIDA, S. Barttin binds to the outer lateral surface of the CIC-K2 chloride channel. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 362, no. 4, pp. 858–864, 2007ds. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.097>.
124. FAHLKE, C.; FISCHER, M. Physiology and pathophysiology of CIC-K/barttin channels. **Frontiers in Physiology**, vol. 1 NOV, no. November, pp. 1–12, 2010dt. <https://doi.org/10.3389/fphys.2010.00155>.
125. SCHOLL, U.; HEBEISEN, S.; JANSSEN, A. G. H.; MÜLLER-NEWEN, G.; ALEKOV, A.; FAHLKE, C. Barttin modulates trafficking and function of CIC-K channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 103, no. 30, pp. 11411–11416, 2006du. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601631103>.
126. JANSSEN, A. G. H.; SCHOLL, U.; DOMEYER, C.; NOTHMANN, D.; LEINENWEBER, A.; FAHLKE, C. Disease-causing dysfunctions of barttin in Bartter syndrome type IV. **Journal of the American Society of Nephrology**, vol. 20, no. 1, pp. 145–153, 2009dv. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008010102>.
127. SARMADI, A.; NASRNIYA, S.; FARSANI, M. S.; NARREI, S.; NOURI, Z.;

- SEPEHRNEJAD, M.; NILFOROUSH, M. H.; ABTAHI, H.; TABATABAIEFAR, M. A. A novel pathogenic variant in the LRTOMT gene causes autosomal recessive non-syndromic hearing loss in an Iranian family. **BMC Medical Genetics**, vol. 21, no. 127, pp. 1–9, 2020dw.
128. PAULHUS, K.; GLASSCOCK, E. Novel Genetic Variants Expand the Functional, Molecular, and Pathological Diversity of KCNA1 Channelopathy. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 24, no. 8826, pp. 1–18, 2023dx.
129. FAN, P.; LU, C. X.; ZHANG, D.; YANG, K. Q.; LU, P. P.; ZHANG, Y.; MENG, X.; HAO, S. F.; LUO, F.; LIU, Y. X.; ZHANG, H. M.; SONG, L.; CAI, J.; ZHANG, X.; ZHOU, X. L. Liddle syndrome misdiagnosed as primary aldosteronism resulting from a novel frameshift mutation of SCNN1B. **Endocrine Connections**, vol. 7, no. 12, pp. 1528–1534, 2018dy. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0484>.
130. SALMANI, M. K. AI; HARRASI, A. AI. Multiple mechanisms underlie reduced potassium conductance in the p.T1019PfsX38 variant of hERG. no. September 2021, pp. 1–16, 2022dz. <https://doi.org/10.14814/phy2.15341>.
131. BONDOS, S. E.; DUNKER, A. K.; UVERSKY, V. N. Intrinsically disordered proteins play diverse roles in cell signaling. **Cell Communication and Signaling**, vol. 20, no. 1, pp. 1–26, 2022ea. DOI: 10.1186/s12964-022-00821-7. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00821-7>.
132. TRIVEDI, R.; NAGARAJARAM, H. A. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, no. 22, pp. 1–30, 2022eb. <https://doi.org/10.3390/ijms232214050>.
133. DYSON, H. J.; WRIGHT, P. E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 6, no. 3, pp. 197–208, 2005ec. <https://doi.org/10.1038/nrm1589>.
134. LE, B. T.; DUONG, C. M.; NGUYEN, T. Q.; BUI, C. B. Two novel mutations in the CLCNKB gene leading to classic Bartter syndrome presenting as syncope and hypertension in a 13-year-old boy. **BMJ Case Reports**, vol. 13, no. 7, 2020ed. <https://doi.org/10.1136/bcr-2019-233872>.
135. WU, X.; YANG, G.; CHEN, S.; TANG, M.; JIAN, S.; CHEN, F.; WU, X. Bartter syndrome with long-term follow-up: a case report. **Journal of International Medical Research**, vol. 48, no. 8, 2020ee. <https://doi.org/10.1177/0300060520947876>.
136. YU, Y.; XU, C.; PAN, X.; REN, H.; WANG, W.; MENG, X.; HUANG, F.; CHEN, N. Identification and functional analysis of novel mutations of the CLCNKB gene in Chinese patients with classic Bartter syndrome. no. 7, pp. 155–162, 2010ef. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01288.x>.
137. HAN, Y.; CHENG, H.; SHAO, S.; LANG, Y.; ZHAO, X.; LIN, Y.; WANG, S.; SHI, X.; LIU, Z.; SHAO, L. Thirteen novel CLCNKB variants and genotype/phenotype association study in 42 Chinese patients with Bartter syndrome type 3. **Endocrine**, vol. 68, no. 1, pp. 192–202, 2020eg. DOI: 10.1007/s12020-019-02156-9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-019-02156-9>.
138. FUKUYAMA, S.; HIRAMATSU, M.; AKAGI, M.; HIGA, M.; HIG, M.; MEDICINE, F. Novel Mutations of the Chloride Channel Kb Gene in Two Japanese Patients Clinically Diagnosed as Bartter Syndrome with Hypocalciuria. vol. 89, no. May, pp. 5847–5850, 2015eh. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0775>.
139. ADACHI, M.; TAJIMA, T.; MUROYA, K.; ASAKURA, Y. Classic Bartter syndrome complicated with profound growth hormone deficiency: A case report. **Journal of Medical Case Reports**, vol. 7, pp. 1–5, 2013ei. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-7-283>.
140. LEE, J. W.; LEE, J.; HEO, N. J.; CHEONG, H. II. Mutations in SLC12A3 and CLCNKB and Their Correlation with Clinical Phenotype in Patients with Gitelman and Gitelman-like

Syndrome. no. 9, pp. 47–54, 2016ej.

141. HE, Y.; ZHOU, Y.; WU, W.; CHEN, Y.; OU, S. Bartter syndrome with multiple renal and liver cysts : a case report. **International Urology and Nephrology**, no. 0123456789, pp. 6–9, 2022ek. DOI: 10.1007/s11255-022-03274-6. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11255-022-03274-6>.

142. WANG, C.; CHEN, Y.; ZHENG, B.; ZHU, M.; FAN, J.; WANG, J.; JIA, Z.; HUANG, S.; ZHANG, A. Novel compound heterozygous CLCNKB gene mutations (c.1755AG/c.848_850delTCT) cause classic Bartter syndrome. **Am J Physiol Renal Physiol**, vol. 315, pp. 844–851, 2018el. DOI: 10.1152/ajprenal.00077.2017.-ln. Available at: <http://www.ajprenal.org>.

143. GARGANO, G.; MANFREDI, M.; PEDORI, S.; DI DIO, F.; SPAGNOLI, C.; FRATTINI, D. A highly unusual case of osmotic demyelination syndrome and extrapontine myelinolysis in a 3-month-old infant with Bartter syndrome. **Journal of International Medical Research**, vol. 48, no. 10, 2020em. <https://doi.org/10.1177/0300060520966494>.

144. WESTLAND, R.; HACK, W. W.; VAN DER HORST, H. J. R.; UITTENBOGAARD, L. B.; VAN HAGEN, J. M.; VAN DER VALK, P.; KAMSTEEG, E. J.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; VAN WIJK, J. A. E. Bartter syndrome Type III and congenital anomalies of the kidney and urinary tract: An antenatal presentation. **Clinical Nephrology**, vol. 78, no. 6, pp. 492–496, 2012en. <https://doi.org/10.5414/CN107206>.

145. CHIANG, W. F.; LIN, S. H.; CHAN, J. S.; LIN, S. H. Hypokalemic paralysis in a middle-aged female with classic bartter syndrome. **Clinical Nephrology**, vol. 81, no. 2, pp. 146–150, 2014eo. <https://doi.org/10.5414/CN107606>.

146. JIANG, L.; LI, D.; GUO, Q.; LI, Y.; ZAN, L.; AO, R. Adult classic Bartter syndrome: a case report with 5-year follow-up and literature review. **Endocrine Journal**, 2024ep. <https://doi.org/10.1507/endocrj.ej23-0631>.

147. MOU, L.; WU, F. Simultaneous homozygous mutations in slc12a3 and clcnkb in an inbred chinese pedigree. **Genes**, vol. 12, no. 3, pp. 1–10, 2021eq. <https://doi.org/10.3390/genes12030369>.

148. YANG, X.; ZHANG, G.; WANG, M.; YANG, H.; LI, Q. Bartter Syndrome Type 3: Phenotype-Genotype Correlation and Favorable Response to Ibuprofen. **Frontiers in Pediatrics**, vol. 6, no. May, pp. 2–8, 2018er. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00153>.

149. NOJEHDEH, S. T.; MOJBAFAN, M.; HOOMAN, N.; HOSEINI, R.; OTUKESH, H. Genetic diagnosis of Bartter syndrome in Iranian patients and detection of a novel homozygous CLCNKB mutation . **Clinical Case Reports**, vol. 10, no. 12, pp. 1–4, 2022es. <https://doi.org/10.1002/ccr3.6698>.

150. CHO, H. W.; LEE, S. T.; CHO, H.; CHEONG, H. II. A novel mutation of CLCNKB in a Korean patient of mixed phenotype of Bartter-Gitelman syndrome. **Korean Journal of Pediatrics**, vol. 59, no. Suppl 1, pp. S103–S106, 2016et. <https://doi.org/10.3345/kjp.2016.59.11.S103>.

151. ZHU, B.; JIANG, H.; CAO, M.; ZHAO, X.; JIANG, H. A novel CLCNKB mutation in a Chinese girl with classic Bartter syndrome: A case report. **BMC Medical Genetics**, vol. 20, no. 1, pp. 1–6, 2019eu. <https://doi.org/10.1186/s12881-019-0869-9>.

152. LIU, J.; ZHANG, Y.; WU, X.; LI, Y. Bartter syndrome type III with glomerular dysplasia and chronic kidney disease: A case report. **Frontiers in Pediatrics**, vol. 11, no. March, pp. 1–7, 2023ev. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1169486>.

153. UMENE, R.; KITAMURA, M.; ARAI, H.; MATSUMURA, K.; ISHIMARU, Y.; MAEDA, K.; URAMATSU, T.; OBATA, Y.; MORI, T.; SOHARA, E.; UCHIDA, S.; NISHINO, T. Bartter syndrome representing digenic-based salt-losing tubulopathies presumably accelerated by renal insufficiency. **CEN case reports**, vol. 9, no. 4, pp. 375–379, 2020ew. DOI:

10.1007/s13730-020-00489-3. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13730-020-00489-3>.

154. COLUSSI, G.; DE FERRARI, M. E.; TEDESCHI, S.; PRANDONI, S.; SYRÉN, M. L.; CIVATI, G. Bartter syndrome type 3: An unusual cause of nephrolithiasis [4]. **Nephrology Dialysis Transplantation**, vol. 17, no. 3, pp. 521–523, 2002ex.

<https://doi.org/10.1093/ndt/17.3.521>.

APÊNDICE A – Tabelas de variantes descritas em bancos de dados e literatura

Tabela A-1 - Variantes patogênicas descritas para CLCNKB. Quando não há informação em “Variant ID”, a variante não possui descrição em banco de dados, apenas na literatura.

Variant ID	Posição (GRCh38)	Classe	Consequência DNA	Exon	Intron	Consequência Proteína	Referência Bibliográfica
rs749342666	1:16044494	SNP (perda de início)	c.2T>G	2	-	perda de início	(94)
CI072545	1:16044510	indel	c.18dup	2	-	p.(Leu7Alafs*3)	(104)
-	1:16044526	SNP (missense)	c.34T>G;	2	-	p.(Ser12Ala)	(134)
-	1:16044558	SNP (ganho de parada)	c.66G>A	2	-	p.Trp22*	(103)
rs1553127141	1:16044565	indel	c.73del	2	-	p.(Cys25Valfs*15)	(104)
-	1:16044567	SNP (ganho de parada)	c.75T>A	2	-	p.(Cys25*)	(108)
rs200835418 CM100492	1:16044580	SNP (ganho de parada)	c.88C>T	2	-	p.Arg30*	(135; 136)
-	1:16045575	indel	c.118delA	3	-	p.Arg40Glyfs*4	(22)
rs777073739 CM055134	1:16045639	SNP (missense)	c.182C>A	3	-	p.(Ala61Asp)	(104)
rs370985865	1:16045683	SNP (ganho de parada)	c.226C>T;	3	-	p.(Arg76*)	(35; 104)
rs1260049089	1:16045685	SNP (sítio de splicing)	c.228A>C	-	3-4	Splicing?	(137)
rs554794449 CS043126	1:16046534	SNP (sítio de splicing)	c.230-1G>C	-	3-4	Splicing?	(138)
-	1:16046544	SNP (ganho de parada)	c.239G>A	4	-	p.(Trp80*)	(137)

rs202202425	1:16046559	SNP (missense)	c.254T>C;	4	-	p.(Ile85Thr)	(101)
rs201876924	1:16046585	SNP (missense)	c.280C>A	4	-	p.Leu94Ile	(77)
-	1:16046639	SNP (ganho de parada)	c.334C>T	4	-	p.Gln112*	(22)
rs1057521154 CM117815	1:16047905	SNP (missense)	c.359G>T	5	-	p.(Gly120Val)	(22; 73; 101)
rs121909131	1:16047917	SNP (missense)	c.371C>T;	5	-	p.(Pro124Leu)	(30; 103)
-	1:16047919	SNP (missense)	c.373G>A	5	-	p.(Glu125Lys)	(104)
-		indel?	?	5	-	p.Leu130del	(139)
rs1200818995	1:16048045	SNP (sítio de splicing)	c.498+1G>C	-	5-6	p.?	(104)
-	1:16048341	indel	c.499-2insG	-	5-6	p.?	(103)
rs753861891	1:16048343	SNP (missense)	c.499G>A	6	-	p.Gly167Ser	(103)
-	1:16048344	SNP (missense)	c.500G>T	6	-	p.Gly167Val	(100)
rs202064075 CM117109	1:16048352	SNP (missense)	c.508G>A	6	-	p.Val170Met	(97; 104)
rs1251715378	1:16048383	SNP (missense)	c.539T>G	6	-	p.(Ala204Thr)	(104)
-	1:16048418	SNP (ganho de parada)	c.574G>T;	6	-	p.(Glu192*)	(134)
rs751375763 CM160534	1:16048522	SNP (ganho de parada)	c.595G>T	7	-	p.(Glu199*)	(140)
rs121909132	1:16048537	SNP (missense)	c.610 G>A	7	-	p.Ala204Thr	Essa tese, (93; 97; 104)
rs1434140784 CM100493	1:16048556	SNP (missense)	c.629C>T	7	-	p.Ala210Val	(97; 136)
CI117818	1:16048560	indel	c.633dup	7	-	p.Val212Serfs*70	(22)
-	1:16048561	indel	c.634insA	7	-	p.Val212Serfs*69	(101)

rs1570332962 CM117813	1:16048574	SNP (missense)	c.647C>T	7	-	p.Pro216Leu	(22; 101)
-	1:16049123	SNP (ganho de parada)	c.659G>A	8	-	p.Trp220*	(22)
-	1:16049136 -16049137	indel	c.672_673del	8	-	p.(Glu225Glyfs*56)	(104)
rs1463217225 CI117819	1:16049149	indel	c.685dupT	8	-	p.Ser229Phefs*53	(22; 101)
rs748423128 CM071615	1:16049189	SNP (missense)	c.725C>A	8	-	p.Ala242Glu	(100)
rs1268241805 CD173046	1:16049217	SNP (mudança no quadro de leitura)	c.753delG	8	-	p.(Leu252fs)	(97)
-	1:16049222	SNP (missense)	c.758T>C	8	-	p.Leu253Pro	(141)
rs779908241 CS004290	1:16049616	SNP (sítio de splicing)	c.782-2A>G		8-9	splicing	(98; 104)
rs1222762167	1:16049637	SNP (ganho de parada)	c.801C>G	9	-	p.(Tyr267*)	(137)
rs1363476326 CD117816	1:16049684 -16049686	indel	c.848-850delTCT	9	-	p.(Phe248del)	(108; 142)
rs1557469252	1:16049701	SNP (missense)	c.865G>C	9	-	p.Gly289Arg	(100; 103)
-	1:16049813	indel	c.867-2delA		9-10	p.?	(103)
rs769219002	1:16049823	SNP (missense)	c.875G>T	10	-	p.Cys292Phe	(104)
rs7368151	1:16049824	SNP (ganho de parada)	c.876T>A	10	-	p.Cys292*	(99)
rs2023228317 CM117114	1:16049835	SNP (missense)	c.887G>A	10	-	p.Gly296Asp	(137)

rs377215024	1:16049858	SNP (ganho de parada)	c.910C>T,	10	-	p.(Arg304*)	(103; 143)
rs201204502 CS1211892	1:16049917	SNP (sítio de splicing)	c.968+1G>A	-	10-11	p.?	(104; 144)
rs5251	1:16050547	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.1000delG	11	-	p.Val334Phefs*15	(108)
CM127102	1:16050551	SNP (missense)	c.1004T>C;	11	-	p.(Leu335Pro)	(145)
CD173047	1:16050573	SNP (mudança de Quadro de leitura)	c.1026delC	11	-	p.(Ser343Alafs*6)	(97)
-	1:16050578	SNP (missense)	c.1031C>A	11	-	p.(Ala344Asp)	(104)
rs121909134	1:16050593	SNP (missense)	c.1046C>A;	11	-	p.(Ala349Asp)	
rs368504008 CM100491	1:16050598	SNP (missense)	c.1051C>T	11	-	p.Arg351Trp	(136)
rs1307215192 CM138093	1:16050599	SNP (missense)	c.1052G>T	11	-	p.(Arg351Leu)	(108; 146)
-	1:16050874	SNP (sítio de splicing)	c.1054-1G>A	-	11-12		(137)
-	1:16050971 -16050978	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.1150_1157delC CCCAGCA	12	-	p.Gln385Valfs*63	(108)
rs1286624133 CM160535	1:16050987	SNP (ganho de parada)	c.1166G>A	12	-	p.Trp389*	(140)
rs754672425	1:16050992	SNP (missense)	c.1171T>C,	12	-	p.Trp391Arg	(147)
rs34255952	1:16051004	SNP (missense)	c.1183C>T	12	-	p.Arg395Trp	(77)
-	1:16051013 -16051024	indel (perda de aminoácidos)	c.1192_1203del1 2	12	-	p.Ile398_Thr401del	(97)
-	1:16051476	SNP (sítio de splicing)	c.1228-2	-	12-13	splicing	(148)
rs764966080	1:16051494	SNP (missense)	c.1244T>A	13	-	p.(Leu415Gln)	(137)
rs751248175	1:16051507	Indel (mudança de	c.1257delC	13	-	p.Met421Cysfs*58	(137)

quadro de leitura)							
-	1:16051508	indel	c.1258_1259insTGCCGGG-TACA	13	-	p.(Ile419_Pro420insLeuProGlyThr)	(104)
rs769163950 CM117116	1:16051520	SNP (missense)	c.1270G>A	13	-	p.Glu424Arg	
-	1:16051544-16051545	SNP (missense)	c.1294_1295TA>CT	13	-	p.(Tyr432Leu)	(108)
rs761374224 CM071617	1:16051710	SNP (missense)	c.1298G>A	14	-	p.Gly433Glu	8
rs755714542 CM117814	1:16051721	SNP (missense)	c.1309G>A	14	-	p.(Gly437Arg)	(22; 101)
rs201540273 CM004244	1:16051725	SNP (missense)	c.1313G>A	14	-	p.Arg438His	(135)
rs1180658535 CM139424	1:16051737	SNP (missense)	c.1325A>G	14	-	p.Glu442Gly	(97)
rs1380983236	1:16051744-16051747	indel (mudança de quadro de leitura)	c.1332_1335delCTCT	14	-	p.Ser445Leufs*33	(22; 101; 149)
-	1:16051745	SNP (missense)	c.1333T>G	14	-	p.(Ser445Ala)	(108)
rs757710314 CM1616135	1:16051806	SNP (missense)	c.1394G>A;	14	-	p.(Gly465Glu)	(150)
-	1:16051807	indel	c.1395del	14	-	p.(Tyr465*)	(104)
rs750711107	1:16051807	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.1395dupG	14	-	p.Tyr466Valfs*56	(108)
-	1:16051821	SNP (sítio de splicing)	c.1408+1G>C	-	14-15	p.?	Essa tese
CM0910000	1:16052198	SNP (missense)	c.1409G>A;	15	-	p.(Gly470Glu)	(145)
rs768205317	1:16052257	SNP (missense)	c.1468G>A	15	-	p.(Glu490Lys)	(137)

rs187999813 CM160533	1:16052378	SNP (missense)	c.1589C>T	15	-	p.Pro530Leu	(140)
-	1:16053673 -16053680	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.1657_1664del-CACAGCAT	16	-	p.Ser554Hisfs*50	(108)
-	1:16053712	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.1696delG	16	-	p. Glu566fs*20	(104; 151)
-	1:16053771	SNP (sítio de splicing)	c.1755A>G	16	-	p.?	(142)
CS139426	1:16053773	SNP (sítio de splicing)	c.1756+1G>A	-	16-17	p.?	(97)
rs370221310 CM071616	1:16055461	SNP (ganho de parada)	c.1783C>T	17	-	p.Arg595*	Essa tese, (96; 97)
rs2023408029	1:16055470	SNP (ganho de parada)	c.1792C>T	17	-	p.Gln598*	(152)
rs121909136 CM042958	1:16055508	SNP (ganho de parada)	c.1830G>A	17	-	p.(Trp610*)	(22; 101; 138; 140)
-	1:16055523	SNP (sítio de splicing)	c.1845+1G>A	-	17-18	p.?	(153)
rs863224858	1:16055726	indel	c.1897del	18		p.Leu633*	(104)
CS109053	1:16056420	SNP (sítio de splicing)	c.1930-2A>C		18-19		(103)
rs1161043470	1:16056459	SNP (missense)	c.1967T>C	19	-	p.Leu656Pro	(77)
rs5255	1:16056471	SNP (ganho de parada)	c.1979C>A	19	-	p.(Ser660*)	(137)
rs1442635290	1:16056479	SNP (ganho de parada)	c.1987A>T	19	-	p.Arg663*	
CM160536	1:16056869	SNP (missense)	c.2017A>T	20	-	p.Met673Leu	(140)
CG1313053		Deleção de éxons	del 1-3	1-3	-		(22; 139)
-		Deleção de éxons	del 1-4	1-4	-		(108)
CG1922072		Deleção de éxons	del 1-10	1-10	-		(137)
CG1922074		Deleção de éxons	del 1-13	1-13	-		(137)

CG160854	Deleção de éxons	del 1-14	1-14	-	(22; 95)
CG188607	Deleção de éxons	del 1-18	1-18	-	(148)
CG1922075					
CG160855	Deleção de éxons	del 1-19	1-19	-	(93; 94; 95)
CG1912258	Deleção de éxons	del 2-3	2-3	-	(151)
-	Deleção de éxons	del 2-20	2-20	-	(141)
-	Deleção de éxons	del 4-14	4-14	-	(137)
-	Deleção de éxons	del 4-9	4-9	-	(137)
-	Deleção de éxons	del 4-20	4-20	-	(97; 108)
CG1922071	Deleção de éxons	del 2	2	-	(137)
CG024832	Deleção de éxons	del 6	6	-	(154)
CG973427	Deleção de gene	del 1-20	1-20	-	(22; 30; 98; 99; 100; 101; 102; 103; 104)

Tabela A-2 - Variantes patogênicas descritas para o gene BSND

Variant ID	Posição (GRCh38)	Classe	Consequência DNA	Exon	Intron	Consequência Proteína	Ref
rs74315284 CM013300	1:54999187	SNP (perda de início)	c.1A>T	1	-	p.0	(32)
CM065989	1:54999188	SNP (perda de início)	c.2T>A	1	-	p.0	(110)
rs74315286 CM013299	1:54999189	SNP (perda de início)	c.3G>A	1	-	p.0	(32; 104; 111)
rs121908145 CM094872	1:54999196	SNP (ganho de parada)	c.10G>T	1	-	p.Glu4*	(121)
rs74315285 CM013302	1:54999208	SNP (missense)	c.22C>T	1	-	p.Arg8Trp	(32; 122)
rs74315285 CM1812478	1:54999208	SNP (missense)	c.22C>G	1	-	p.Arg8Gly	(112)
rs74315288 CM013301	1:54999209	SNP (missense)	c.23G>T	1	-	p.Arg8Leu	(32)
rs74315287 CM013303	1:54999214	SNP (missense)	c.28G>A	1	-	p.Gly10Ser	(32)
CM063882	1:54999280	SNP (ganho de parada)	c.94C>T	1	-	p.Gln32*	(117)
rs777656311	1:54999293	SNP (missense)	c.107C>A	1	-	p.Thr36Asn	(112)
-	1:54999311	SNP (missense)	c.125G>A	1	-	p.Ser42Asn	(104)
rs34561376	1:54999313	SNP (missense)	c.127G>A	1	-	p.Val43Ile	(122)
rs74315289 CM035675	1:54999325	SNP (missense)	c.139G>A	1	-	p.Gly47Arg	Essa tese, (16; 40; 101; 113; 114; 115; 117),
rs1389952796 CG015703	1:54999343- 5499383	Indel (sítio de splicing)	c.157-177+2-del	1	1	-	(32)
-	1:54999365	SNP (sítio de splicing)	c.177+2T>A	-	1	-	(40)
CS066269	1:54999368	SNP (sítio de splicing)	c.177+5G>C	-	1	-	(111)

rs771232166 CM065990	1:55005106	SNP (ganho de parada)	c.262G>T	2	-	p.Glu88*	(110)
CI145856	1:55007026	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.302dup	3	-	p.Trp102Valfs*7	(118)
rs765135576	1:55007175-55007176	indel (mudança de quadro de leitura)	c.452delC	3	-	p.Pro151Leufs*27	(33; 40; 119)
CG094068	-	Deleção de éxons	Del exon 2-4	2 - 4	-	-	(120)
CG015704	-	Deleção de éxons	Del exon 3-4	3 - 4	-	-	(32)
-	1:55008449	Indel (mudança de quadro de leitura)	c.784delG	4	-	p.(Ala262Profs*68)	Essa tese

ANEXO A – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (Síndrome de Bartter)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
 Departamento de Medicina - DMed
 Via Washington Luís, km 235 – Caixa Postal 676
 13565-905 – São Carlos – SP - Brasil
 Fone e Fax: (16) 3351-8340 / E-mail: dmed@ufscar.br



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

Para crianças e adolescentes (maiores que 6 anos e menores de 18 anos) e para legalmente incapaz

(Resolução 466/2012 do CNS)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE TUBULOPATIAS RENAIIS”, coordenada pela professora Amélia Trindade ((16) 3351-9768/ 3351-8340 ou e-mail atrindade@ufscar.br). Seus pais permitiram que você participasse.

Dentro das células existem códigos que dizem tudo o que aconteceu ou que irá acontecer com o nosso corpo, chamado de DNA. São estes códigos que iremos estudar porque queremos entender o que está diferente no seu DNA. Ao encontrarmos o que está diferente no seu DNA, poderemos entender porque você tem _____ e ajudar a procurar jeitos mais rápidos de fazer o diagnóstico e melhores tratamentos.

Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. As crianças e adolescentes que irão participar desta pesquisa têm idade que varia de menos de 1 ano até adolescentes de 21 anos de idade.

A pesquisa será feita no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, para onde serão enviadas amostras de sangue das crianças e adolescentes com _____. Para isso, será retirado um pouco de sangue seu e de seus pais, do mesmo modo como costumam retirar quando você faz os exames para levar ao seu (sua) médico(a). Como você sabe a coleta de sangue tem a dor de uma picada, e às vezes pode ficar roxo no local que coloca a agulha. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone ou e-mail que tem no começo do texto. Mas há coisas boas que podem acontecer como dar a certeza de que você tem _____, desse modo o médico que está cuidando de você poderá ter dar o tratamento mais adequado.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões, revistas ou jornais científicos, mas sem identificar as crianças e adolescentes que participaram.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa “ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE TUBULOPATIAS”.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva de mim.

Os pesquisadores e o(a) meu(minha) médico(a) tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

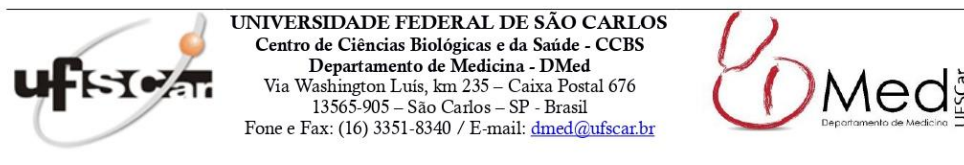
Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Local e data: _____

 Assinatura do menor

 Assinatura do Médico Assistente ou
 Pesquisador Responsável

ANEXO B – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (Síndrome Unha-Patela)



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TALE)

Para crianças e adolescentes (maiores que 6 anos e menores de 18 anos) e para legalmente incapaz

(Resolução 466/2012 do CNS)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME UNHA-PATELA”, coordenada pela professora Amélia Trindade ((16) 3351-9768/ 3351-8340 ou e-mail atrindade@ufscar.br). Seus pais permitiram que você participasse.

Dentro das células existem códigos que dizem tudo o que aconteceu ou que irá acontecer com o nosso corpo, chamado de DNA. São estes códigos que iremos estudar porque queremos entender o que está diferente no seu DNA. Ao encontrarmos o que está diferente no seu DNA, poderemos entender porque você tem a síndrome Unha-Patela e ajudar a procurar jeitos mais rápidos de fazer o diagnóstico e melhores tratamentos.

Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. As crianças e adolescentes que irão participar desta pesquisa têm idade que varia de menos de 1 ano até adolescentes de 21 anos de idade.

A pesquisa será feita no Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, para onde serão enviadas amostras de sangue das crianças e adolescentes com síndrome Unha-Patela. Para isso, será retirado um pouco de sangue seu e de seus pais, do mesmo modo como costumam retirar quando você faz os exames para levar ao seu (sua) médico(a). Como você sabe a coleta de sangue tem a dor de uma picada, e às vezes pode ficar roxo no local que coloca a agulha. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone ou e-mail que tem no começo do texto. Mas há coisas boas que podem acontecer como dar a certeza de que você tem a síndrome Unha-Patela, desse modo o médico que está cuidando de você poderá ter dar o tratamento mais adequado.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões, revistas ou jornais científicos, mas sem identificar as crianças e adolescentes que participaram.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa “ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME UNHA-PATELA”.

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva de mim.

Os pesquisadores e o(a) meu(minha) médico(a) tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Local e data: _____

Assinatura do menor

Assinatura do Médico Assistente ou
Pesquisador Responsável

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Síndrome de Bartter)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
 Departamento de Medicina - DMed
 Via Washington Luís, km 235 – Caixa Postal 676
 13565-905 – São Carlos – SP - Brasil
 Fone e Fax: (16) 3351-8340 / E-mail: dmed@ufscar.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/2012 do CNS)

ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME DE BARTTER.

A síndrome de Bartter é uma doença renal hereditária, ou seja, transmitida de geração em geração familiar, que se caracteriza por perda pela urina de grande quantidade de sais como o potássio, sódio e em alguns casos cálcio ocasionando danos ao funcionamento do corpo. Esta doença ainda não está totalmente esclarecida, sabe-se que tem uma base genética, por isso a confirmação do diagnóstico é feita com a identificação do defeito genético.

O/A seu (sua) filho(a) _____ que tem o diagnóstico clínico de síndrome de Bartter, foi selecionado(a) no ambulatório/serviço _____ está sendo convidado(a) para, se desejarem, participar da pesquisa, que tem como objetivo confirmar o diagnóstico de síndrome de Bartter ao identificar qual (quais) o(s) defeito(s) genético(s) o (a) seu (sua) filho(a) possui. A identificação dos defeitos genéticos ajudará a ampliar os conhecimentos que existem atualmente sobre a síndrome de Bartter, o que possibilitará diagnósticos mais precoces, tratamentos mais adequados, diminuindo o aparecimento de complicações da doença. Portanto, ao realizar o estudo genético será possível dar o diagnóstico de certeza da doença de Bartter, principalmente quando for realizado em conjunto o estudo genético dos pais, pois permitirá confirmar as alterações genéticas encontrada(s) no(a) seu (sua) filho(a).

Para isso, a participação de vocês consistirá em doar uma amostra de sangue do seu filho/filha _____, uma amostra de sangue (pai) _____ e uma amostra de sangue (mãe) _____. A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antisepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tonteira durante ou após o procedimento. Para minimizar esses acontecimentos, será coletado o mínimo necessário de amostra de sangue e vocês serão orientados a permanecerem sentados durante alguns minutos até que se sintam confortáveis para levantar.

A participação na pesquisa não é obrigatória, e a recusa não implicará em nenhum prejuízo no tratamento de rotina ou na relação com o pesquisador ou com a instituição. Vocês poderão, se desejarem, retirarem-se do estudo a qualquer momento sem que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo.

Os procedimentos serão gratuitos e não haverá compensação em dinheiro pela participação de vocês. Vocês terão direito a indenização por qualquer tipo de dano resultante da participação de vocês na pesquisa.

Todas as informações a respeito de vocês serão mantidas em segredo. Para isso, após cadastramento dos dados, não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. Os dados coletados poderão ser divulgados em eventos, revistas e/ou trabalhos científicos, sempre preservando a identidade de vocês.

Em caso do estudo genético mostrar resultado com alguma utilidade diagnóstica, o mesmo será enviado diretamente ao médico assistente do(a) seu (sua) filho(a) Dr(a). _____, instituição _____, com uma cópia a ser entregue a vocês (responsáveis legais).

Como benefícios indiretos da sua participação, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para podermos compreender melhor como essa doença aparece, como podemos fazer diagnósticos mais rápidos e como poderemos tratá-la de forma melhor e talvez até definitiva.

Se vocês tiverem qualquer problema ou dúvida durante a participação de vocês na pesquisa poderão comunicar-se pelo telefone (16) 3351-9768 ou entrarem em contato com o laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada no Departamento de Genética e Evolução, e procurar a Dra. Amélia Trindade, que é a pesquisadora responsável pelo projeto. Vocês receberão uma via deste termo, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal. Vocês poderão tirar suas dúvidas sobre o projeto e a participação de vocês agora ou a qualquer momento.

Declaro (declaramos) que entendi (entendemos) os objetivos, riscos e benefícios da participação do (a) meu (minha) filho (a) na pesquisa e concordo (concordamos) em participar. Fui (fomos) informado(s) que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Amélia Trindade

Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do Departamento de Genética e Evolução
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos
Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310 CEP 13565-905 São Carlos - São Paulo - Brasil.
Telefone: (16) 3351-9768/ (16) 3351-8340 e atrindade@ufscar.br

Pelo presente documento, autorizo a extração de DNA a partir de amostras de sangue com fim exclusivamente de estudar a síndrome de Bartter.

Local e data: _____

Nome do Responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

Nome do Responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Síndrome Unha-Patela)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
 Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
 Departamento de Medicina - DMed
 Via Washington Luís, km 235 – Caixa Postal 676
 13565-905 – São Carlos – SP - Brasil
 Fone e Fax: (16) 3351-8340 / E-mail: dmed@ufscar.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Resolução 466/2012 do CNS)

ESTUDO DE GENÉTICA MOLECULAR NOS PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME UNHA-PATELA.

A síndrome Unha-patela é uma doença renal hereditária, ou seja, transmitida de geração em geração familiar, que se caracteriza por alterações na pele, nas unhas, nos ossos, nos olhos e nos rins, alguns pacientes podem ter insuficiência renal. Esta doença ainda não está totalmente esclarecida, sabe-se que tem uma base genética, por isso a confirmação do diagnóstico é feita com a identificação do defeito genético.

O/A seu (sua) filho(a) _____ que tem o diagnóstico clínico de síndrome Unha-patela foi selecionado(a) no ambulatório/serviço _____ está sendo convidado(a) para, se desejarem, participar da pesquisa, que tem como objetivo confirmar o diagnóstico de síndrome Unha-patela ao identificar qual (quais) o(s) defeito(s) genético(s) o (a) seu (sua) filho(a) possui. A identificação dos defeitos genéticos ajudará a ampliar os conhecimentos que existem atualmente sobre a síndrome Unha-patela, o que possibilitará diagnósticos mais precoces, tratamentos mais adequados, diminuindo o aparecimento de complicações da doença. Portanto ao realizar o estudo genético será possível dar o diagnóstico de certeza da síndrome Unha-Patela, principalmente quando for realizado em conjunto o estudo genético dos pais, pois permitirá confirmar as alterações genéticas encontrada(s) no(a) seu (sua) filho(a).

Para isso, a participação de vocês consistirá em doar uma amostra de sangue do seu filho/filha _____, uma amostra de sangue (pai) _____ e uma amostra de sangue (mãe) _____. A coleta de sangue será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antisepsia preconizados para este tipo de procedimento. A coleta, normalmente, não acarreta maiores riscos para a saúde de vocês. Entretanto, em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tonteira durante ou após o procedimento. Para minimizar esses acontecimentos, será coletado o mínimo necessário de amostra de sangue e vocês serão orientados a permanecerem sentados durante alguns minutos até que se sintam confortáveis para levantar.

A participação na pesquisa não é obrigatória, e a recusa não implicará em nenhum prejuízo no tratamento de rotina ou na relação com o pesquisador ou com a instituição. Vocês poderão, se desejarem, retirarem-se do estudo a qualquer momento sem que isto afete os seus cuidados médicos no presente ou no futuro, ou traga qualquer tipo de prejuízo.

Os procedimentos serão gratuitos e não haverá compensação em dinheiro pela participação de vocês. Vocês terão direito a indenização por qualquer tipo de dano resultante da participação de vocês na pesquisa.

Todas as informações a respeito de vocês serão mantidas em segredo. Para isso, após cadastramento dos dados, não aparecerá nenhum nome que o identifique, apenas um número que somente o pesquisador principal saberá a quem se refere. Os dados coletados poderão ser divulgados em eventos, revistas e/ou trabalhos científicos, sempre preservando a identidade de vocês.

Em caso do estudo genético mostrar resultado com alguma utilidade diagnóstica, o mesmo será enviado diretamente ao médico assistente do(a) seu (sua) filho(a) Dr(a). _____, instituição _____, com uma cópia a ser entregue a vocês (responsáveis legais).

Como benefícios indiretos da sua participação, os dados obtidos nessa pesquisa poderão servir para podermos compreender melhor como essa doença aparece, como podemos fazer diagnósticos mais rápidos e como poderemos tratá-la de forma melhor e talvez até definitiva.

Se vocês tiverem qualquer problema ou dúvida durante a participação de vocês na pesquisa poderão comunicar-se pelo telefone (16) 3351-9768/ (16) 3351-8340 ou entrarem em contato com o laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada no Departamento de Genética e Evolução, e procurar a Dra. Amélia Trindade. Vocês receberão uma via deste termo, onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal. Vocês poderão tirar suas dúvidas sobre o projeto e a participação de vocês agora ou a qualquer momento.

Declaro (declaramos) que entendi (entendemos) os objetivos, riscos e benefícios da participação do (a) meu (minha) filho (a) na pesquisa e concordo (concordamos) em participar. Fui (fomos) informado(s) que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSCar que funciona na Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone (16) 3351-8110. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br

Endereço para contato (24 horas por dia e sete dias por semana):

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Amélia Trindade

Laboratório de Bioquímica e Genética Aplicada do Departamento de Genética e Evolução

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos

Rodovia Washington Luís, km 235 - SP-310 CEP 13565-905 São Carlos - São Paulo - Brasil.

Telefone: (16) 3351-9768/ (16)3351-8340 atrindade@ufscar.br

Pelo presente documento, autorizo a extração de DNA a partir das amostras de sangue com fim exclusivamente de estudar a síndrome Unha-patela.

Local e data: _____

Nome do Responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

Nome do Responsável Legal

Assinatura do Responsável Legal

ANEXO E – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo Genético de Doenças Renais Raras: Síndrome de Bartter e Síndrome Unha-patela.

Pesquisador: AMELIA TRINDADE

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 81191617.3.0000.5504

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Carlos/UFSCar

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.550.807

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de estudo observacional, transversal no qual serão analisadas amostras de sangue de crianças e adolescentes portadores de doenças renais hereditárias e raras. Como existem dezenas de doenças renais hereditárias, optou-se por eleger as tubulopatias devido ao fato de existirem poucos centros no Brasil que se dedicam ao estudo genético destas patologias. Inicialmente será estudada a síndrome de Bartter pela gravidade da apresentação clínica e para continuar estudo iniciado no exterior sobre mutações genéticas presentes nesta tubulopatia. Outra patologia que será estudada é a síndrome unha-patela pela associação frequente com insuficiência renal crônica e pelo fato de praticamente não ser estudada na população pediátrica brasileira.

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.550.807

Serão convidados centros de assistência médica locais, regionais e nacionais para o envio de amostras de pacientes até 21 anos com suspeita diagnóstica das duas patologias citadas, e ao mesmo tempo será realizado levantamento das demandas para a inclusão de novas patologias a serem estudadas no projeto. As amostras de sangue dos pacientes e genitores serão submetidas a análise genéticas na busca de mutações, desde a presença de SNPs, inserções ou deleções nos genes. Serão comparados com resultados internacionais em programas específicos, e será realizado mapeamento genético dos sujeitos estudados. Nesta primeira etapa serão analisadas amostras de sangue de 40 pacientes e 80 genitores (pai e mãe) no laboratório de Bioquímica e Genética aplicada do Departamento de Genética do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. Os fragmentos de DNA serão amplificados pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) de acordo com a especificidade de cada gene, que serão sequenciados e analisados utilizando ferramentas específicas. Como resultado se espera ter a confirmação diagnóstica pelas análises genéticas das suspeitas clínicas, identificação das mutações mais frequentes entre os sujeitos estudados, mapeamento das alterações genéticas encontradas, criação de centro de apoio técnico-científico para os centros que assistem aos pacientes com doença renal rara, e ampliação do conhecimento sobre as patologias estudadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar estudo genético para identificação de mutações associadas a doenças renais raras, inicialmente,

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.550.807

síndrome de Bartter e síndrome unha-patela, e aos poucos serão incluídas outras patologias renais rara de acordo com a demanda local, regional e nacional.

Objetivo Secundário:

Criar serviço de pesquisa em genética e de apoio clínico a pacientes portadores de doenças renais raras; auxiliar no estudo diagnóstico de doenças renais raras; formar profissionais em estudo de genética de doenças renais raras; difundir o conhecimento sobre as doenças renais raras, dentre elas síndrome de Bartter e Síndrome Unha-Patela; criar vínculo com centros de excelência através de intercâmbio técnico-científico com pesquisadores nacionais e internacionais que estudam doenças renais raras, em especial com as equipes da rede espanhola RenalTube.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Haverá coleta de sangue, que tem risco baixo. Para minimizá-lo a coleta será realizada em ambiente confortável e privativo por profissional habilitado em uma veia do braço usando luvas, máscara, agulha e seringa descartáveis, após serem tomados todos os cuidados de antissepsia preconizados para este tipo de procedimento. Em alguns casos poderá surgir nas primeiras horas, no local da punção, um hematoma ou pequeno desconforto que deverá desaparecer em no máximo 3 a 4 dias. Algumas pessoas poderão sentir tonteira durante ou após o procedimento. Será coletado o mínimo necessário de amostra de sangue e serão orientados a permanecerem sentados durante alguns minutos até que se sintam confortáveis para levantar.

Benefícios:

Para o paciente: confirmação diagnóstica que facilita o manejo do pacientes. Para equipe médica

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.550.807

assistente:

maior segurança após a confirmação

diagnóstica podendo escolher o melhor tratamento para o paciente. Para a ciência: ampliação do conhecimento sobre as implicações das

alterações genéticas encontradas sobre o funcionamento do sistema urinário e do corpo como um todo.

- Os riscos e benefícios foram descritos pelo pesquisador (a) e pode-se aferir que os benefícios indiretos citados suplantam os riscos de participação na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- O projeto de pesquisa é pertinente e tem caráter científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-A folha de rosto confere com o título do projeto de pesquisa e apresenta a assinatura do pesquisador responsável e do responsável pela instituição conforme a resolução 466/12 do CNS/MS.

Recomendações:

Sem novas recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisadora reformulou os pontos pendentes apontados pelo parecer anterior e esclareceu as dúvidas do CEP-UFSCAR. Pode-se considerar que o projeto atende a resolução 466/12 e segue os preceitos éticos estabelecidos pelos órgãos competentes.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1050928.pdf	05/02/2018 22:40:19		Aceito
Outros	carta_resposta.doc	05/02/2018 22:37:42	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE_S_UNHAPATELA.pdf	05/02/2018 20:34:06	AMELIA TRINDADE	Aceito

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.550.807

Ausência	TCLE_S_UNHAPATELA.pdf	05/02/2018 20:34:06	AMELIA TRINDADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_pesquisa_renaistraras.pdf	05/02/2018 11:36:45	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_tubulopatias.pdf	05/02/2018 11:34:44	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_BARTTER.pdf	05/02/2018 11:33:59	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_UNHAPATELA.pdf	05/02/2018 11:33:32	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_tubulopatias.pdf	05/02/2018 11:33:00	AMELIA TRINDADE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_SBartter.pdf	05/02/2018 11:31:21	AMELIA TRINDADE	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_AT.pdf	12/12/2017 23:04:47	AMELIA TRINDADE	Aceito
Outros	DADOS_CLINICOS.pdf	10/12/2017 23:55:52	AMELIA TRINDADE	Aceito
Outros	GEL_DE_AGAROSE_ELETROFORESE .pdf	10/12/2017 23:54:54	AMELIA TRINDADE	Aceito
Outros	EXTRACAO_DNA_FTA.pdf	10/12/2017 23:54:21	AMELIA TRINDADE	Aceito
Outros	TRANSPORTE_AMOSTRA.pdf	10/12/2017 23:53:26	AMELIA TRINDADE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

CEP: 13.565-905

UF: SP

Município: SAO CARLOS

Telefone: (16)3351-9683

E-mail: cephumanos@ufscar.br



Continuação do Parecer: 2.550.807

SAO CARLOS, 19 de Março de 2018

Assinado por:
Priscilla Hortense
(Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235
Bairro: JARDIM GUANABARA **CEP:** 13.565-905
UF: SP **Município:** SAO CARLOS
Telefone: (16)3351-9683 **E-mail:** cephumanos@ufscar.br

ANEXO F – Artigo aceito para publicação

BIOMEDICAL REPORTS 00: BR-15056-308331, 0000

Description of the novel variant c.784delG;p. (Ala262Profs*68) at *BSND* gene and its association with Bartter Syndrome Type Iva

JÉSSICA HILÁRIO BONOMO¹, LÍVIA CLÁUDIO DE OLIVEIRA², MARIA DO CARMO SORCI DIAS SCHER³, ANDERSON FERREIRA DA CUNHA^{1*} and AMÉLIA TRINDADE^{4*}

¹Laboratory of Biochemistry and Applied Genetics, Department of Genetics and Evolution, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil; ²Unit of Ambulatory Pediatrics, University Hospital of Brasília, University of Brasília, Brasília 70840-901, Brazil; ³Medicine course, University Center of Brasília (UniCEUB), Brasília 70790-075, Brazil; ⁴Department of Medicine, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, 13565-905, Brazil

DOI: 10.3892/br_XXXXXXXX

Abstract. Bartter syndrome (BS) is a group of diseases caused by variants in genes related to salt reabsorption in the thick ascending limb of the loop of Henle. It causes dysregulation in salt homeostasis and is characterized by hyperplasia and hypertrophy of the juxtaglomerular apparatus, hyperaldosteronism, hypokalemic alkalosis and impaired growth and development. BS type IVa is caused by variants in *BSND*, which encodes Barttin, a subunit for chloride channels (CLC). This specific subtype also causes sensorineural deafness due to its impact on CLC-kidney a (Ka), a channel important for the production of endolymph in the inner ear. In the present study, the case of a Brazilian girl diagnosed with BS Iva was presented, whose molecular diagnosis revealed a novel variant, c.784delG;p.(Ala262Profs*68), compound heterozygous with c.139G>A;p.Gly47Arg. This novel variant appears to be the first BS IVa causing variant described in exon 4, which encodes for the later part of the cytoplasmatic C-terminal unstructured tail. *In silico* analysis of this variant predicted the resulting frameshift as disease causing, due to alteration in significant portion of the protein. While the authors suggest this variant may cause erroneous membrane sorting of the CLC type channels, further studies are necessary to elucidate the mechanism.

Introduction

Bartter syndrome (BS) is a rare autosomal recessive disease caused by pathogenic variants in the genes coding for proteins related to salt transport and regulation in the thick ascending limb of Henle's loop in the nephrons. It was first described in 1962, characterized by hyperplasia and hypertrophy of the juxtaglomerular apparatus, hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis, associated with impaired growth and development (1,2). Later studies divided BS into classic, as described by Bartter *et al* (1), and antenatal (3). Both types were further divided into subtypes, according to the affected gene: *SLC12A1* (antenatal, type I) (4-6), *KNJI* (antenatal, type II) (7,8), *CLCNKB* (classic, type III) (9,10), *BSND* or *CLCNKA* and *CLCNKB* at the same time (antenatal, type IV) (11-14).

BS type IVa (OMIM 602522) is used to refer to BS type IV caused by variants in the gene *BSND*. BS type IV usually presents with severe clinical manifestations and is the only subtype which incurs sensorineural deafness. It is typically presented by premature birth, polyhydramnios, hyper-PGE2, severe hypokalemic hypochloremic metabolic alkalosis, iso- or hyposthenuria, and previously mentioned sensorineural deafness (12,15-18). The *BSND* gene, located in 1p32.3, is composed of 4 exons, and encodes for Barttin, the β -subunit of chloride channel (CLC)-kidney a (Ka) and CLC-Kb channels. These largely similar channels are part of the CLC family of voltage-gated chloride channels and were named after appearing to be two different channels of this family that were kidney-specific (chloride channel-kidney; letters 'a' and 'b' being used solely to differentiate the two). Further studies demonstrated that they are expressed in basolateral membranes of renal tubules, in the thick ascending limb of Henle's loop, and also the stria vascularis of the inner ear (11,19-21).

Barttin is composed of 320 amino acids: A short N-terminus (aa1-8) which affects CLC-K trafficking and activation, two transmembrane helices (aa9-26 and aa35-54), an extracellular linker between them (aa27-34),

Correspondence to: Mrs. Jéssica Hilário Bonomo, Laboratory of Biochemistry and Applied Genetics, Department of Genetics and Evolution, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos, Washington Luis, Km 235, São Carlos, São Paulo 13565-905, Brazil
E-mail: jessica.hbonomo@gmail.com

*Contributed equally

Key words: genetic disorder, molecular diagnosis, membrane channel, ion transport, renal dysfunction, hearing impairment, inner ear function