

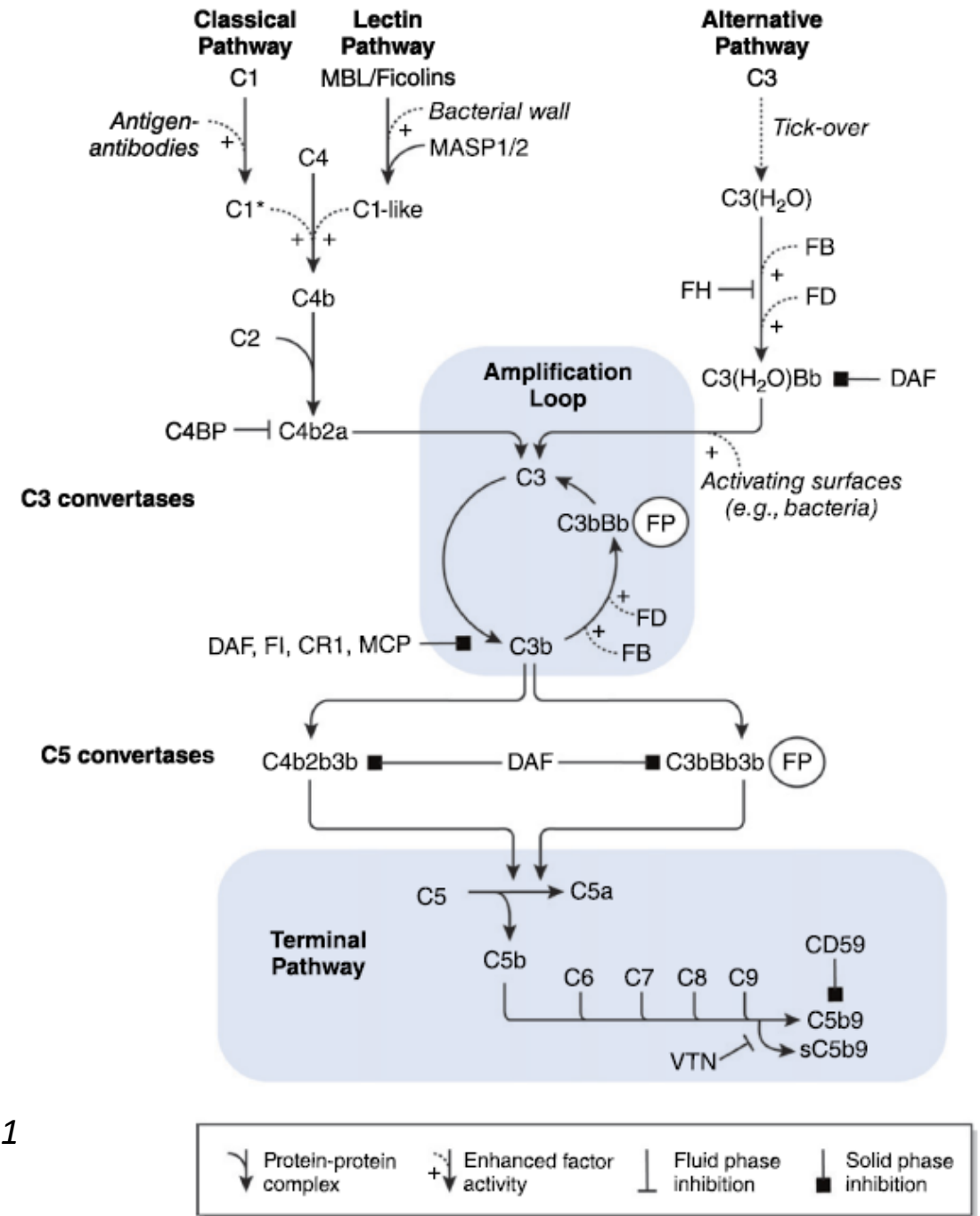
Bases Genéticas do Sistema Complemento

Luiz Fernando Onuchic

Faculdade de Medicina da USP

Maio de 2023

O sistema complemento pode ser ativado por meio de 3 vias diferentes

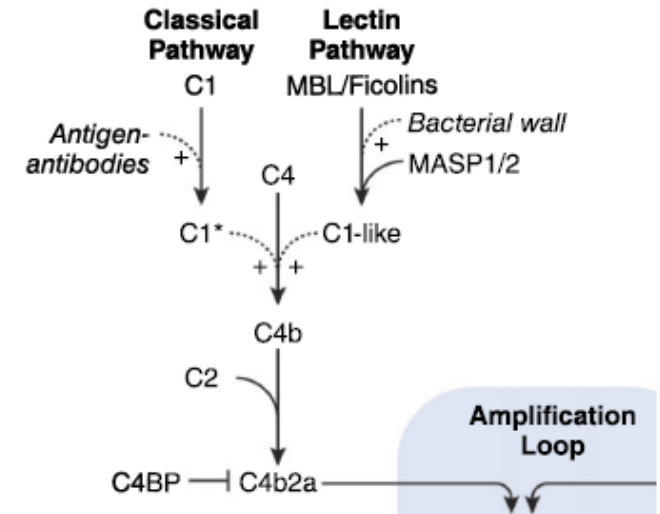


Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

O cluster HLA classe III de genes componentes do sistema complemento inicial

C2	<i>C2</i>	6p21.3	C-MHC III	SLE, Neisserial infections (NI), RI	SNP, gene partial deletion
Factor B	<i>CFB</i>	6p21.3	C-MHC III	Homozygote: vary rare (fatal), heterozygote: NI	–
C4A (isotype)	<i>C4A</i>	6p21.3	C-MHC III	ICD, RI, autoimmune disorders (e.g. SLE, type 1 diabetes mellitus, autoimmune hepatitis, scleroderma)	Gene deletion, gene conversion, non-expression due to insertion
C4B (isotype)	<i>C4B</i>	6p21.3	C-MHC III	RI, autoimmune disorders (e.g. primary biliary cirrhosis)	Gene deletion, gene conversion, non-expression due to insertion

Os genes *C4A* e *C4B*



- *C4A*, *C4B*, *RP*, *CYP21* e *TNX*: formam uma unidade genética - módulo RP-C4-CYP21-TNX (RCCX).
- Presença de uma duplicação de RCCX: polimorfismo estrutural complexo > deleções e duplicações segmentares dos genes *C4A* e *C4B* > causa importante de deficiência de C4 genética.
- Deficiência de C4: também ocorre por conversão gênica *C4A*>*C4B* ou *C4B*>*C4A*. E mutações de ponto.
- Deficiência completa ou parcial de *C4A* e/ou *C4B*: muitas doenças infecciosas e autoimunes
Hohler et al, J Hepatol, 2002, Yu et al, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 2003
- Número de genes C4 no genoma: varia de 2-8.
Blanchong et al, Int Immunopharmacol, 2001
- Deficiência de *C4B* em heterozigose: estudos sugerem associação com risco aumentado para esquizofrenia

O gene C2

➤ Codifica uma serina protease.

➤ Deficiência de C2 em homozigose: uma das deficiências hereditárias de complemento mais comuns em populações europeias

- A maior parte dos pacientes não manifesta qualquer doença aparente.

Pickering et al, Adv Immunol, 2000

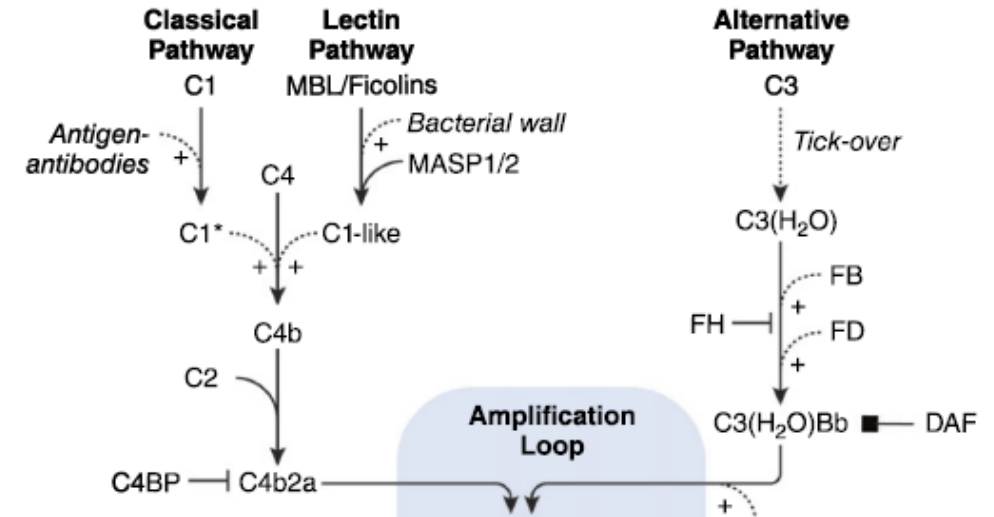
- Quase 40% desses indivíduos desenvolvem doença autoimune sistêmica.

Day et al, J Clin Invest, 1973; Sjöholm et al; Mol Immunol, 2006

➤ Deficiência de C1, C2 ou C4: associação com LES sugere que estes componentes tenham papel na depuração de imunocomplexos.

Law and Reid, Complement, 1995

- Deficiência de C4: também associada a doenças não associadas a anormalidades de clareamento de imunocomplexos.



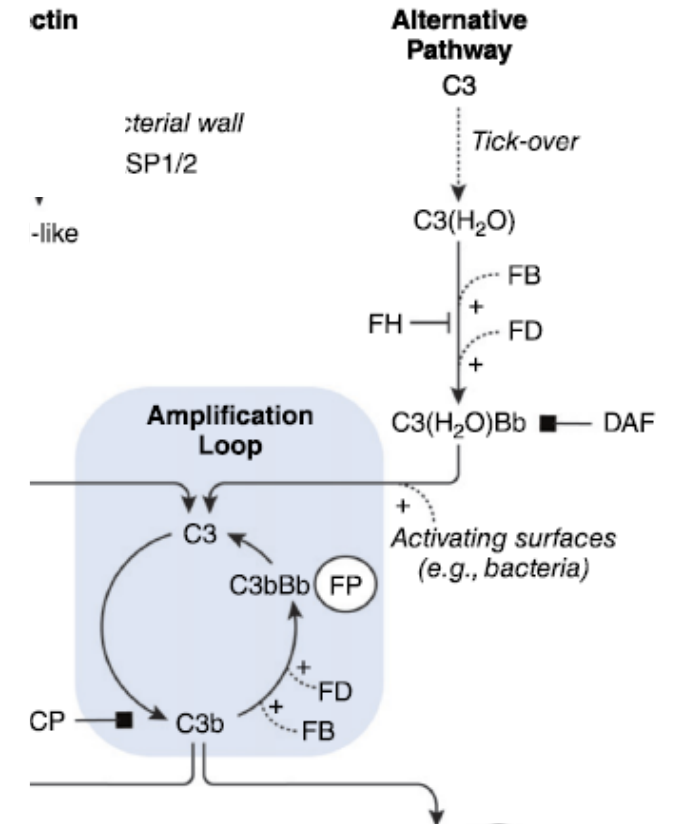
Os genes *CFB* e *C3*

- Deficiência de fator B em homozigose: não descrita > provavelmente fatal

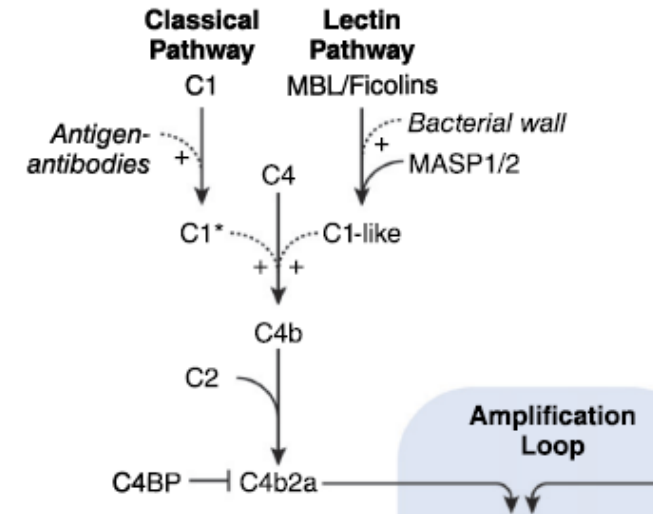
Law and Reid, Complement, 1995

- Deficiência completa de C3: infecções sérias > sugere que C3 seja crucial para a integração funcional do complemento com a imunidade inata.

Reis et al, Scand J Immunol, 2003



A via da lectina

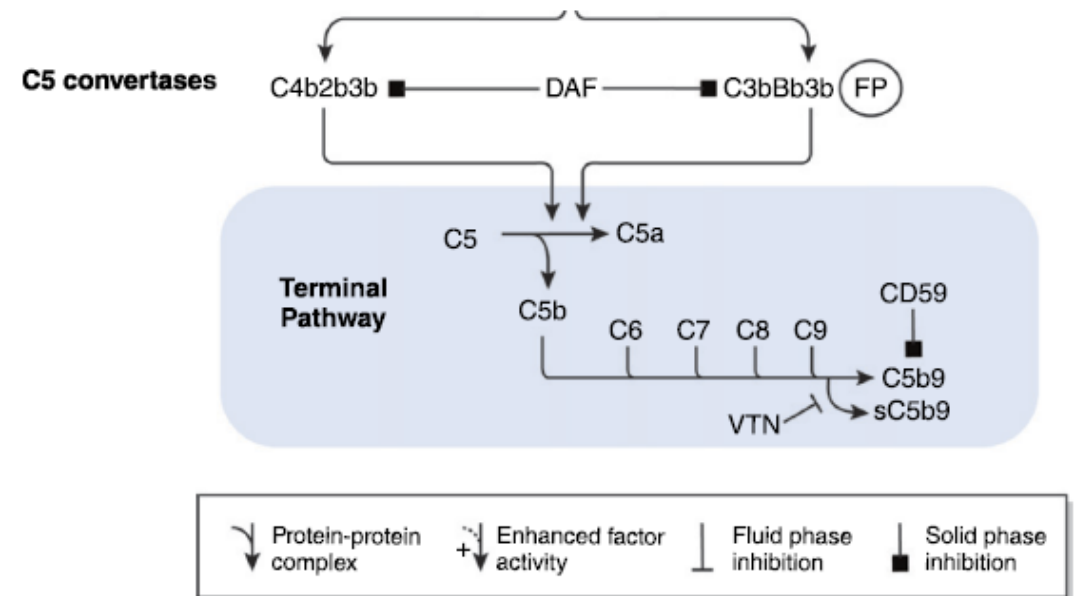


MBL	<i>MBL2</i>	10q11.2-q21	RI in children	GP and SNP
MASP-1	<i>MASP1</i>	3q27-q28	—	—
MASP-2	<i>MASP2</i>	1p36.3-p36.2	—	GP and SNP
M-ficolin	<i>FCN1</i>	9q34	—	—
L-ficolin	<i>FCN2</i>	9q34.3	—	—
H-ficolin	<i>FCN3</i>	1p36.11	RI	Frameshift mutation

Os genes *MBL*, *MASP2* e *FCN3*

- Deficiência de lectina ligada a manose (MBL): crianças com uma síndrome de infecções frequentes e deficiência de opsonina.
Turner and Hamvas, Rev Immunogenet, 2000
- Deficiência de MBL: associação com diferentes doenças autoimunes e infecciosas
Martiny et al, J Rheumatol, 2012; Glesse et al; Clin Exp Rheumatol, 2011; Heitzeneder et al, Clin Immunol, 2012
- Alta frequência de deficiência de *MBL* em homozigose em indivíduos normais: via de ativação do complemento mediada por MBL parece ser importante para opsonização em indivíduos com sistema imune imaturo ou deficiente.
- Paciente dinamarquês com deficiência completa de MASP-2: infecções piogênicas recorrentes > esta mutação em *MASP2* parece ser comum.
Stengaard-Pedersen et al, N Engl J Med, 2003
- Mutação *frame-shift* em *FCN3*: associada a deficiência de H-ficolina > paciente com infecções recorrentes.
Munthe-Fog et al, N Engl J Med, 2009

A via terminal



C5	C5	9q33-q34		Recurrent NI	SNP
C6	C6	5p13	MAC	Recurrent NI	GP and SNP
C7	C7	5p13	MAC	Recurrent NI	SNP, gene partial deletion
C8: α-chain	C8A	1p32		Recurrent NI	SNP
C8: β-chain	C8B	1p32		Recurrent NI	SNP
C8: γ-chain	C8G	9q34.3		Recurrent NI	SNP
C9	C9	5p14-p12	MAC	Recurrent NI	SNP

Os genes C5, C6, C7, C8A, C8B, C8G e C9

- Deficiências de C5, C6, C7, C8 e C9: infecções invasivas recorrentes por *Neisseria meningitidis* e *Neisseria gonorrhoeae* > função bactericida sérica do complexo de ataque à membrana (MAC) é importante na defesa de infecções por neisseria.

Figueroa and Densen, Clin Microbiol Rev, 1991

- Doenças LES-like: raramente associadas à deficiência desses componentes

- C8 é codificado por 3 genes diferentes: diferenças no tipo de deficiência de C8

- Várias deficiências de componentes do complemento ocorridas de forma natural em diferentes espécies animais: uso em modelos experimentais de inflamação e infecção > papel de fatores específicos do complemento na patogênese de doenças.

Linton, Mol Biotechnol, 2001

Reguladores e receptores do complemento

Regulators and receptors

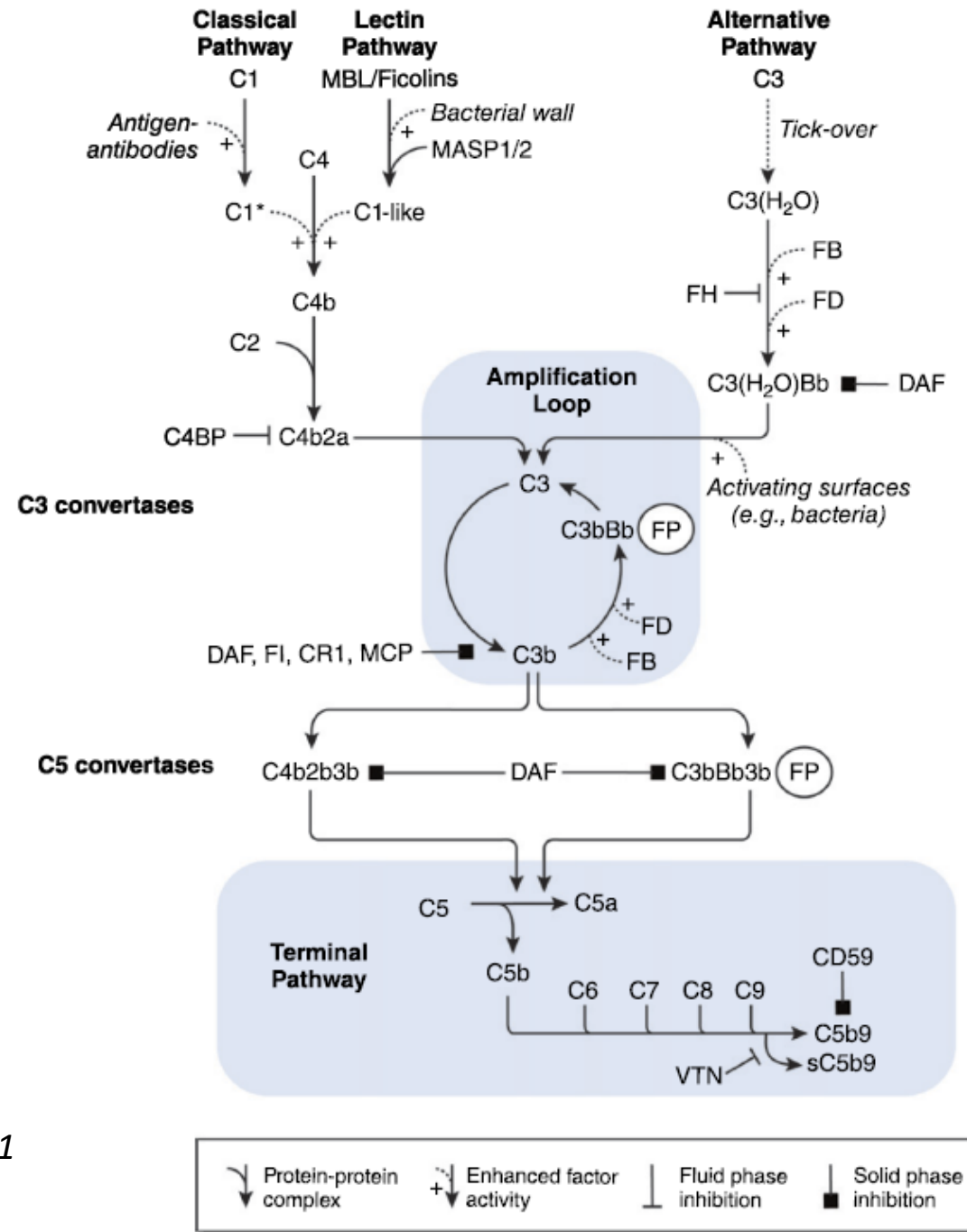
C4 binding protein: α chain	<i>C4BPA</i>	1q32	RCA	-	-
C4 binding protein: β chain	<i>C4BPB</i>	1q32	RCA	-	-
CR1 (CD35)	<i>CR1</i>	1q32	RCA	ICD, glomerulonephritis	SNP
CR2 (CD21)	<i>CR2</i>	1q32	RCA	-	-
CD55 (decay accelerating factor, DAF)	<i>CD55</i>	1q32	RCA	Inab blood group phenotype	Gene partial deletion

CD46 (membrane cofactor protein, MCP)	<i>CD46</i>	1q32	RCA	Atypical hemolytic uremic syndrome (HUS),	
Factor H	<i>CFH</i>	1q32	RCA	NI, glomerulonephritis, HUS, thrombotic thrombocytopenic purpura, age-related macular degeneration (AMD)	SNP, gene partial deletion
Complement Factor H-Related 1	<i>CFHR1</i>	1q32	RCA	Atypical HUS; protective for AMD	Deletion
Complement Factor H-Related 2	<i>CFHR2</i>	1q31.3	RCA	-	-
Complement Factor H-Related 3	<i>CFHR3</i>	1q32	RCA	Atypical HUS; protective for AMD	Deletion
Complement Factor H-Related 4	<i>CFHR4</i>	1q32	RCA	-	-
Complement Factor H-Related 5	<i>CFHR5</i>	1q31.3	RCA	-	-
CSMD2 (CUB and Sushi multiple domains 2)	<i>CSMD2</i>	1p35.1-34.3		-	-
CSMD1 (CUB and Sushi multiple domains 1)	<i>CSMD1</i>	8p23.2		-	-
CSMD3 (CUB and Sushi multiple domains 3)	<i>CSMD3</i>	8p23.3		-	-
CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL)	<i>CD59</i>	11p13		Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria	
Factor I	<i>CFI</i>	4q25		RI	SNP
C1 Inhibitor	<i>SERPING1</i>	11q12-q13.1		Angioedema	SNP, gene partial deletion
MASP-3	<i>MASP1</i>	3q27-q28		-	-
MAp44	<i>MASP1</i>	3q27-q28		-	-
MAp19	<i>MASP2</i>	1p36.3-p36.2		-	-
CR3 (CD11b/CD18) α -chain = α M-Integrin (CR3A, CD11b); β -chain = β ₂ -Integrin (Leucocyte adhesion molecule, CD18)	<i>ITGAM</i>	16p11.2		Recurrent bacterial skin infections	-
CR4 (CD11c/CD18) α -chain = α X-Integrin (CD11c)	<i>ITGB2</i>	21q22.3		Leucocyte adhesion deficiency	SNP, gene partial deletion
CR4 (CD11c/CD18) α -chain = α X-Integrin (CD11c)	<i>ITGAX</i>	16p11.2		-	-
C5aR1 (C5a receptor 1)	<i>C5AR1</i>	19q13.3-q13.4		-	-
C3aR1 (C3a receptor 1)	<i>C3AR1</i>	12p13.31		-	-
CD93	<i>CD93</i>	20p11.21		-	-

Mayilyan, Protein Cell, 2012

Genes codificadores de reguladores e receptores do complemento

- Proteínas reguladoras: defendem as células hospedeiras contra a superativação do sistema complemento por meio da inativação de C3b.
- Deficiência genética de fator I: ativação descontrolada da via alternativa
- Pacientes com fator I insuficiente, como no caso de deficiência de fator H: geralmente infecção bacteriana devido à baixa atividade opsonica através da via alternativa *Reis et al, Adv Immunol, 2006*
- Deficiências de proteínas reguladoras ancoradas na membrana de células hospedeiras por meio de um grupo glicofosfatidilinositol: aumenta a sensibilidade de eritrócitos a lise por complemento.
- Deficiência desses moduladores associados à membrana: propensão a hemoglobinúria paroxística noturna. *Takeda et al; Mol Immunol, 1993*
- Deficiência de CR1: foi associada a GN mesangiocapilar. *Ohi et al, Complement, 1986*
- Deficiência de fator H: fortemente associada a SHU atípica. *Imbasciati et al, Complement, 2003*
- Deficiência de C1-INH: pode resultar em angioedema hereditário.
- Deficiências de CR3 e CR4: ocorrem simultaneamente em pacientes com deficiência de adesão leucocitária tipo 1.



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Conclusões conceituais

- Deficiências genéticas dos componentes iniciais da via clássica se associam a doenças autoimunes devido à falência da via em desenvolver uma resposta humoral normal e em realizar um processo de “limpeza basal” (remoção de imunocomplexos, material apoptótico e debris necróticos).
- Deficiências de componentes iniciais da via da lectina e da via alternativa aumentam a suscetibilidade a infecções e recorrências devido à falta de complemento para reconhecer e opsonizar invasores externos.
- A manifestação clínica de deficiências de componentes da via terminal é similar à de deficiências de componentes das vias da lectina e alternativa, exceto que a suscetibilidade aumentada a infecções é devida à falência do sistema complemento em lisar células microbianas.
- Dependendo das etapas regulatórias ou de sinalização em que estejam envolvidos, as consequências de deficiências de reguladores e receptores do complemento variam.
- O espectro diverso de deficiências homozigóticas do complemento realça o envolvimento multifacetado do sistema complemento na imunidade inata e adaptativa e além.
- A herdabilidade de doenças associadas ao sistema complemento não se limita a deficiências em homozigose ou em heterozigose de componentes do complemento.
- A significância clínica de variantes genéticas conhecidas e desconhecidas do sistema complemento, os efeitos epigenéticos, interações gene-gene e interações gene-ambiente devem ser investigadas.

Genética do complemento no rim

➤ ~50%-60% dos casos incidentes de SHUa e ~20%-25% dos casos de glomerulopatia C3 dominante: estima-se que sejam doenças mendelianas.

Smith et al, Nat Ver Nephrol, 2019

➤ Diagnóstico molecular confirmado: pode evitar a realização de biópsia renal, auxiliar no planejamento familiar e, em determinadas situações de SHUa, ter consequências imediatas no tratamento.

Groopman et al, Nat Ver Nephrol, 2018

➤ Identificar um genótipo causador de SHUa: importante para estratificar pacientes em grupos com risco de recorrência alto, moderado e baixo após transplante renal > espera-se que o genótipo de pacientes com glomerulopatia C3 dominante também venha a ser útil no manejo clínico

Ahmad & Bomback, Adv Chronic Kidney Dis, 2020

➤ Variação significativa no número de genes relevantes testados atualmente para SHUa e glomerulopatia C3 > avaliação da patogenicidade de variantes não recorrentes associadas a doenças raras permanece um procedimento desafiador.

➤ Maior parte das variantes novas: dados funcionais não são disponíveis para determinar seu efeito clínico potencial > predição realizada com base na análise de segregação, avaliação de frequência alélica e avaliação do grau de conservação evolutiva num *locus* específico.

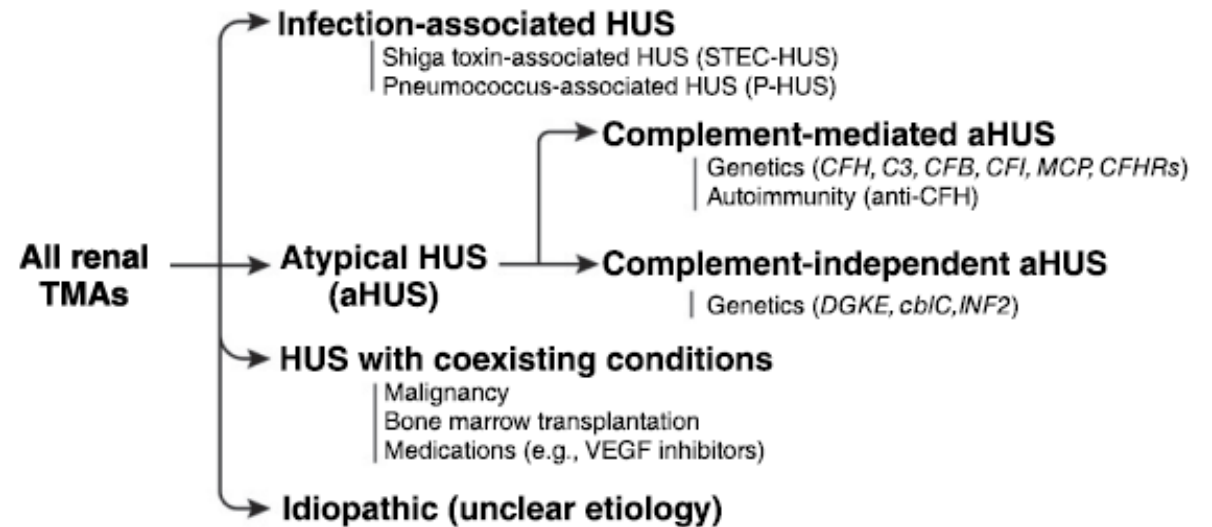
ClinGen's Kidney Complement Disease Working Group

- ClinGen investigators > Kidney Clinical Domain Working Groups > um deles focado em avaliar variantes causadoras de doenças renais associadas ao complemento > harmonização dos painéis genéticos utilizados e sistematização da interpretação de variantes genéticas.
- Tarefa desafiadora: tem que considerar várias fontes adicionais de complexidade:
 - Condições mendelianas prototípicas com co-segregação familiar são raras > penetrância incompleta e expressividade variável são a norma. *Zlotogora, Genet Med, 2003*
 - Todas as formas reconhecidas de heterogeneidade genética estão no contexto dessas desordens: heterogeneidade alélica, lócica, fenotípica e do padrão de herança. *MacClellan & King, Cell, 2010*
- Importante que o nefrologista saiba da complexidade das doenças renais hereditárias mediadas por complemento.
- SHUa e glomerulopatia C3 dominante: principais doenças renais causadas por variantes em genes que codificam efetores ou reguladores do sistema complemento.

Síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa)

- Síndrome hemolítica urêmica atípica (SHUa): todas as formas de SHU não causadas por infecções ou condições médicas coexistentes > incidência de ~0,25-2/milhão/ano - <10% dos casos incidentes de SHU pediátrica.

Noris & Remuzzi, Semin Nephrol, 2010



- Procedimento diagnóstico atual: inclui geralmente avaliação detalhada da função do complemento, detecção de autoanticorpos e avaliação mutacional em genes associados a SHUa conhecidos.

Loirat et al, Pediatr Nephrol, 2016

Diferentes formas de SHUa

➤ ~60%-70% dos pacientes com SHUa: ativação constitutiva da via alternativa, geralmente devido a disfunção de uma proteína reguladora.

- Alguns pacientes albergam mutações em fatores inibidores - *CFH*, *CFI*, *MCP* ou *THBD* - ou mutações de ganho de função em fatores ativadores - *CFB* e *C3*.

Loirat & Frémeaux-Bacchi, Orphanet J Rare Dis, 2011

- ~10% dos casos: autoanticorpos contra reguladores do complemento

Dragon-Durey et al, J Am Soc Nephrol, 2010

➤ Modo de herança para a maioria dos pacientes com formas genéticas de SHUa: autossômica dominante, com penetrância incompleta.

- Pacientes com mutações em homozigose em *CFH* ou *MCP*: têm tipicamente início de doença mais precoce e fenótipos mais graves.

- Mutações em *DGKE* e *MMACHC* (sem disfunção aparente do complemento): transmissão autossômica recessiva

Lemaire et al, Nat Genet, 2013

	Atypical HUS		C3-dominant glomerulopathy	
	Genetic	Auto-Abs	Genetic	Auto-Abs
<i>CFH</i>	Strong	Strong	Strong	Strong
<i>C3</i>	Strong	Weak	Strong	Moderate
<i>CFHR*</i>	Strong	Weak	Strong	Weak
<i>CFI</i>	Strong	Moderate	Strong	Weak
<i>CFB</i>	Strong	Weak	Moderate	Weak**
<i>MCP</i>	Strong	Weak	Weak	Weak
<i>DGKE</i>	Strong	Weak	Weak	Weak
<i>THBD</i>	Moderate	Weak	Weak	Weak
<i>PLG</i>	Weak	Weak	Weak	Weak
<i>CFP</i>	Weak	Weak	Weak	Weak

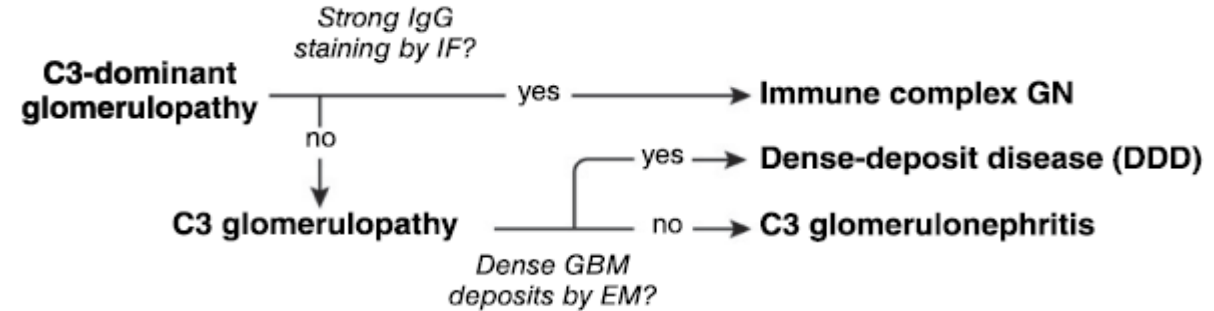
Evidence level

Strong Moderate Weak

Glomerulopatias C3 dominante

- Limitações dos critérios diagnósticos para GNMP e avanços na avaliação da via alternativa do complemento: reclassificação de um grupo de GNMPs > glomerulopatias C3 dominante
- Glomerulopatia C3 dominante: termo que abarca qualquer padrão de biópsia renal mostrando sinais de IF para C3 em glomérulo > idealmente evidência de via alternativa anormal por meio de exames quantitativos ou funcionais

Smith et al, Nat Rev Nephrol, 2019



- Presença de marcação codominante para Ig à IF: diferencia GN por imunocomplexo de glomerulopatia por C3 (C3G).
- Microscopia eletrônica - necessária para distinguir 2 subtipos de C3G: doença de depósito denso (DDD) e glomerulonefrite por C3 (GNC3)
Pickering et al, Kidney Int, 2013
- Muitos pacientes com GNMP com mutações em *CFH* em homozigose ou heterozigose > etiologia genética
- Descoberta de mutações raras em *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFHR5* e *CFB*, e rearranjos genômicos raros nos clusters gênicos *CFH-CFHR* em outros pacientes com GNMP: reforçaram essa etiologia.

Noris & Remuzzi, Semin Nephrol, 2017

Variantes em *CFH* e *C3* associadas a SHUa e glomerulopatias C3 dominante

➤ Mutações na maior parte dos genes *CFI*, *MCP*, *C3*, *CFHR5* e *CFB* e rearranjos *CFH*-*CFHR*: encontradas em SHUa

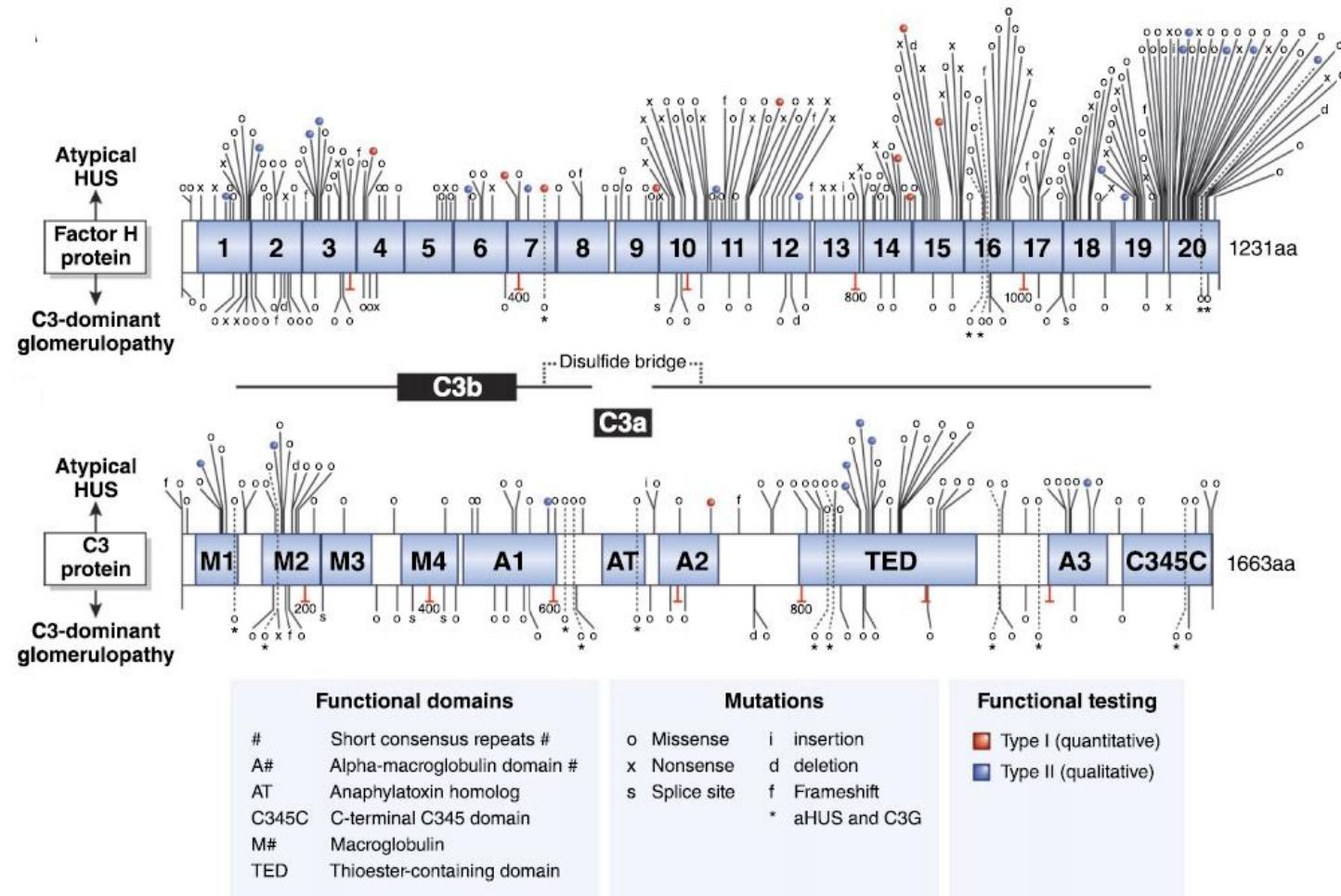
➤ Fenótipo específico: provavelmente influenciado por fatores adicionais genéticos, autoimunes ou ambientais.

- Fatores C3 nefríticos documentados apenas em glomerulopatias C3 dominante

Servais et al, Kidney Int, 2012

➤ Por que alguns pacientes com glomerulopatia C3 dominante (~30%-50%) se beneficiam de tratamento com eculizumabe, uma vez que esta doença é causada por desregulação do complemento na fase fluida ao nível de C3?

Le Quintrec et al, Am J Kidney Dis, 2018



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Genes implicados em doenças renais do complemento

- Painéis de rastreio para identificar mutações de ponto patogênicas, aplicados para SHUa e glomerulopatia C3 dominante: atualmente 9 genes
 - 6 diretamente relacionados ao sistema complemento: *CFH*, *C3*, *CFI*, *MCP*, *CFB* e *CFP*
 - 3 implicados em coagulação: *PLG*, *THBD* e *DGKE*

Genes associados a 2 fenótipos: SHUa e glomerulopatia C3 dominante

- FI e FH atuam juntos para inibir a função de C3 > deficiência de FH leva a consumo de C3.

Whaley & Ruddy, Science, 1976; Whaley & Thompson, Immunology, 1978

- *CFH* é o gene mais frequentemente mutado na SHUa > ~20%-30% dos pacientes incidentes > mais de ~250 mutações patogênicas descritas em *CFH*

Kavanagh et al, Semin Nephrol, 2013

- Maior parte dos pacientes com SHUa-*CFH*: antes dos 4 anos ou entre 20-40 anos

- Variantes em homozigose em *CFH*: quase exclusivamente em crianças > variantes em heterozigose em todos os grupos etários, apresentando geralmente penetrância incompleta.

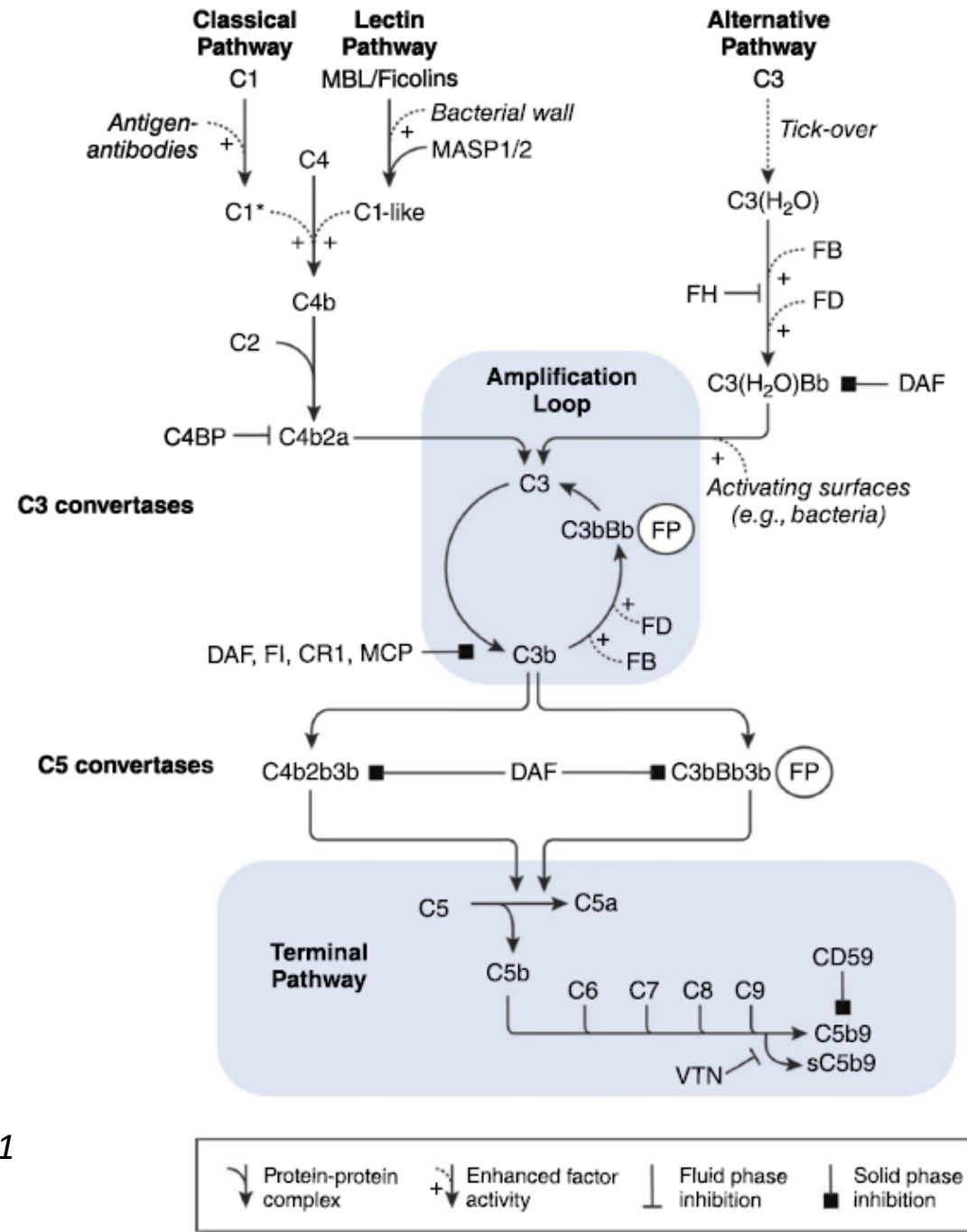
Pickering & Cook, Clin Exp Immunol, 2008

- Pacientes com SHUa-*CFH*: o risco mais alto de desenvolver falência renal.

Fremeaux-Bachi et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2013

- Transplante renal em SHUa-*CFH*: se associava a altas taxas de recidiva e baixa sobrevida do enxerto: eculizumabe melhorou dramaticamente tais desfechos.

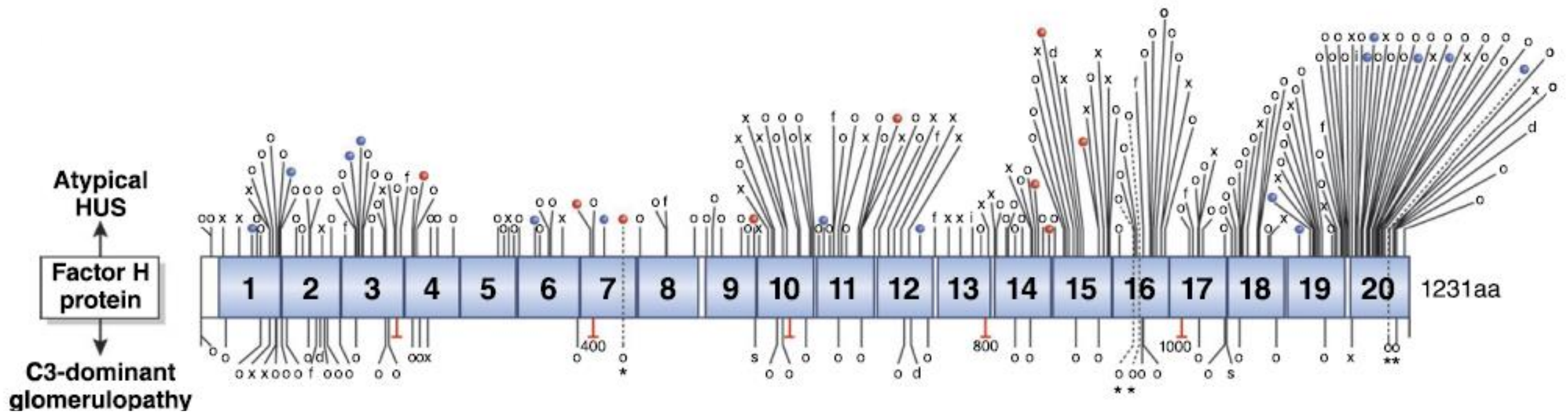
Zuber et al, J Am Soc Nephrol, 2019



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Gene *CFH* e fenótipos renais associados

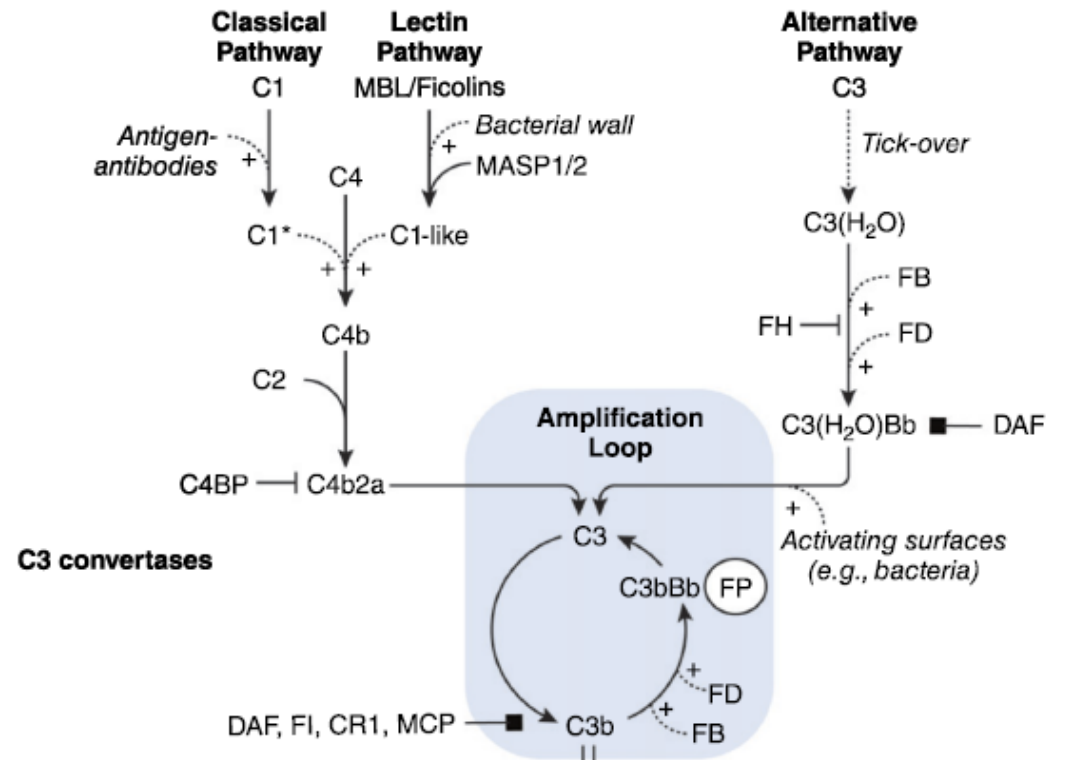
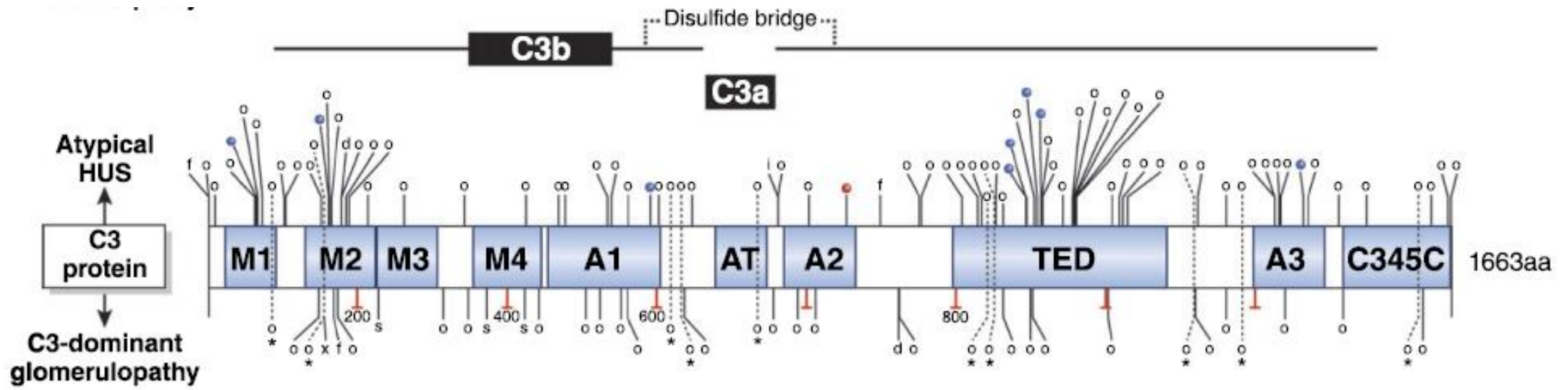
- Ligação entre deficiência de *CFH* e glomerulopatia C3 dominante foi estabelecida há ~35 anos > descoberta do primeiro paciente homozigoto para mutações em *CFH* associadas a lesões do tipo GN *Ault et al, J Biol Chem, 1997*
- Atualmente: mais de 50 variantes em *CFH* descritas em pacientes com glomerulopatia C3 dominante > variantes documentadas em homozigose e heterozigose, frequentemente com penetrância incompleta.
Osborne et al, J Immunol, 2018
- Vários pacientes com glomerulopatia C3 dominante albergam variantes em *CFH* descritas previamente em pacientes com SHUa-*CFH*.
Servais et al, J Med Genet, 2007
- Pacientes com SHUa: variantes em *CFH* localizadas ao longo de todo o gene, mas 40%-60% delas na terminação carboxi > defeitos de secreção e de atividade enzimática *Jokiranta et al, EMBO J, 2006; Lehtinen et al: J Biol Chem, 2009*
- Maior parte das variantes em *CFH* encontradas em pacientes com glomerulopatia C3 dominante: se agrupam próximo à terminação amino > variantes tipo 1 parecem ser mais comuns, resultando em baixos níveis plasmáticos de *CFH*.
Osborne et al, J Immunol, 2018



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Gene C3 e fenótipos renais associados

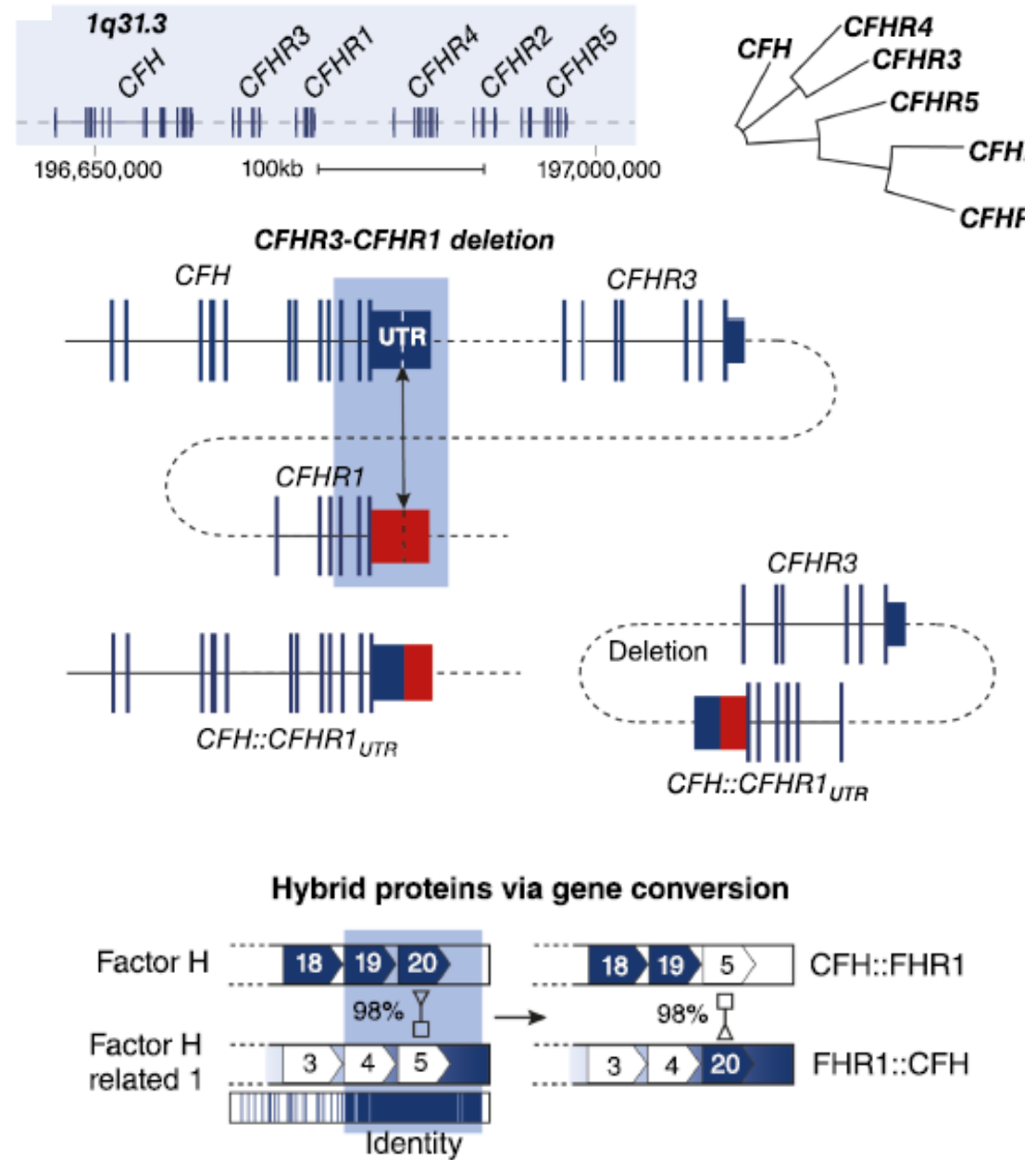
- ~90 variantes diferentes em C3 em pacientes com SHUa > padrão de herança geralmente autossômico dominante com penetrância incompleta > estima-se que ~2%-10% dos pacientes com SHUa albergam uma variante em C3.
Kavanagh et al, Semin Nephrol, 2013
- Variantes distribuídas ao longo do gene > mas há um agrupamento na região que codifica o segmento que contém o domínio tioéster crítico para a ativação de C3
Zuber et al, Nat Rev Nephrol, 2012
- Estudos funcionais: maioria das variantes em C3 resultam em um fenótipo indireto de ganho de função: proteínas C3 mutantes têm sua capacidade reduzida de se ligar a reguladores negativos, fator H, MCP ou receptor do complemento-1 > ativação da via alternativa aumenta a produção de C3bBb
Schramm et al, Blood, 2015
- As variantes p.R139W e p.V1636A foram as exceções: aumentam a ligação ao fator B > formação de C3bBb hiperativo.
Roumenina et al, Blood, 2012
- Mecanismo em pacientes com variantes em C3 em heterozigose nonsense e geradoras de mudança na fase de leitura: incerto.
- Mutações ativadoras em C3 podem também causar DDD: uma deleção de 2 aa causou aumento da atividade do complemento restrita à fase fluida > C3 mutante impediu a proteólise de C3b ativado pelo fator I na presença de fator H mas não de MCP.
Martinez-Barricarte et al, J Clin Invest, 2010
- Muitas dessas variantes: também descritas para pacientes com SHUa.



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Rearranjos *CFH* - genes *CFHR* na SHUa

- Cluster de genes relacionados a *CFH* no cromossomo 1: os 5 genes *CFHR* resultam de eventos de duplicação parcial envolvendo *CFH* (74).
Male et al, Mol Immunol, 2000
- Função principal dos *CFHRs*: antagonizar as ações reguladoras de *CFH*.
Jozsi et al, Trends Immunol, 2015
- Poucos casos de SHUa: variantes em *CFH* devido a um gene híbrido *CFH::CFHR1* originário de um evento de conversão gênica.
Venables et al, PLoS Med, 2006
- Rearranjo gênico muito mais comum associado a SHUa: macrodeleção envolvendo *CFHR3-CFHR1*.
Zipfel et al, PLoS Genet, 2007
- Associação entre anticorpos anti-*CFH* e SHUa: Acs direcionados à terminação carboxi de *CFH* > propriedades citoprotetoras da proteína *CFH* reduzidas porque *CFH* não é capaz de se ligar e regular negativamente a atividade de C3.
Jozsi et al, Blood, 2007; Blanc, J Immunol, 2012
- Deleção *CFHR3-CFHR1*: em ~90% dos pacientes com Acs anti-*CFH* antibodies
Dragon-Durey et al, J Med Genet, 2009



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

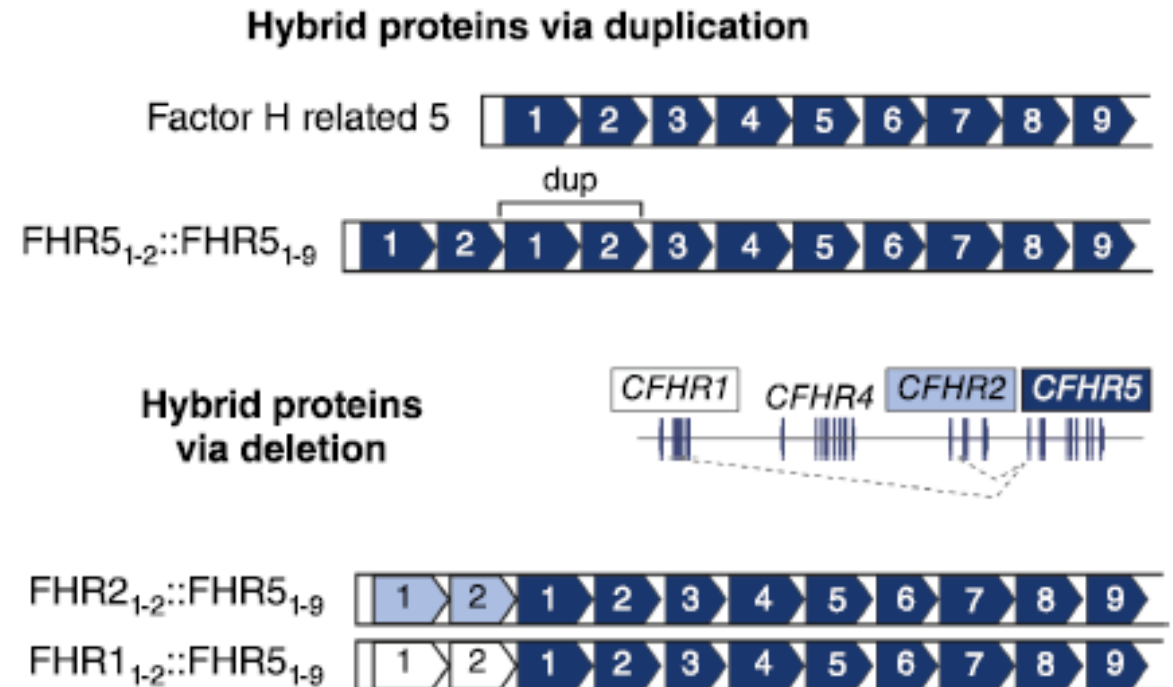
Rearranjos *CFH* - genes *CFHR* nas glomerulopatias C3 dominante

- Rearranjos genômicos complexos no cluster *CFH*-*CFHR*: associados a glomerulopatias C3 dominante > novas proteínas de fusão *CFHR*

Jozsi et al, Trends Immunol, 2015

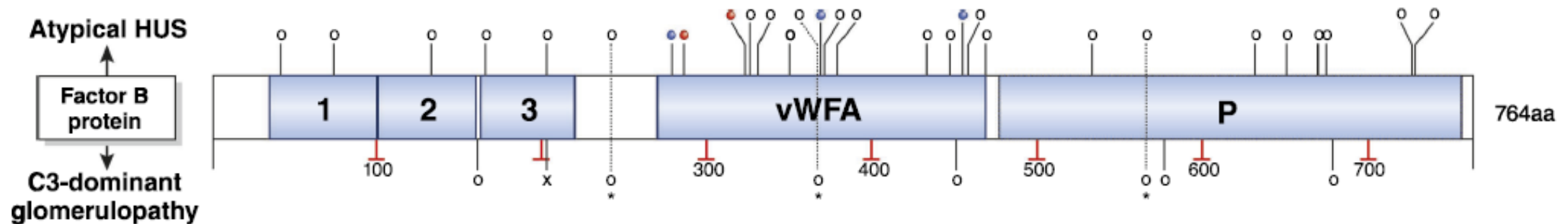
- Proteínas híbridas *CFHR5*: oligomerização anormal porque os domínios SCR extras levam a uma maior capacidade de complexar com outros *CFHRs* > provavelmente leva à ativação do complemento por meio de aumento da competição com *CFH*.

Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021



Gene *CFB* e fenótipos renais associados

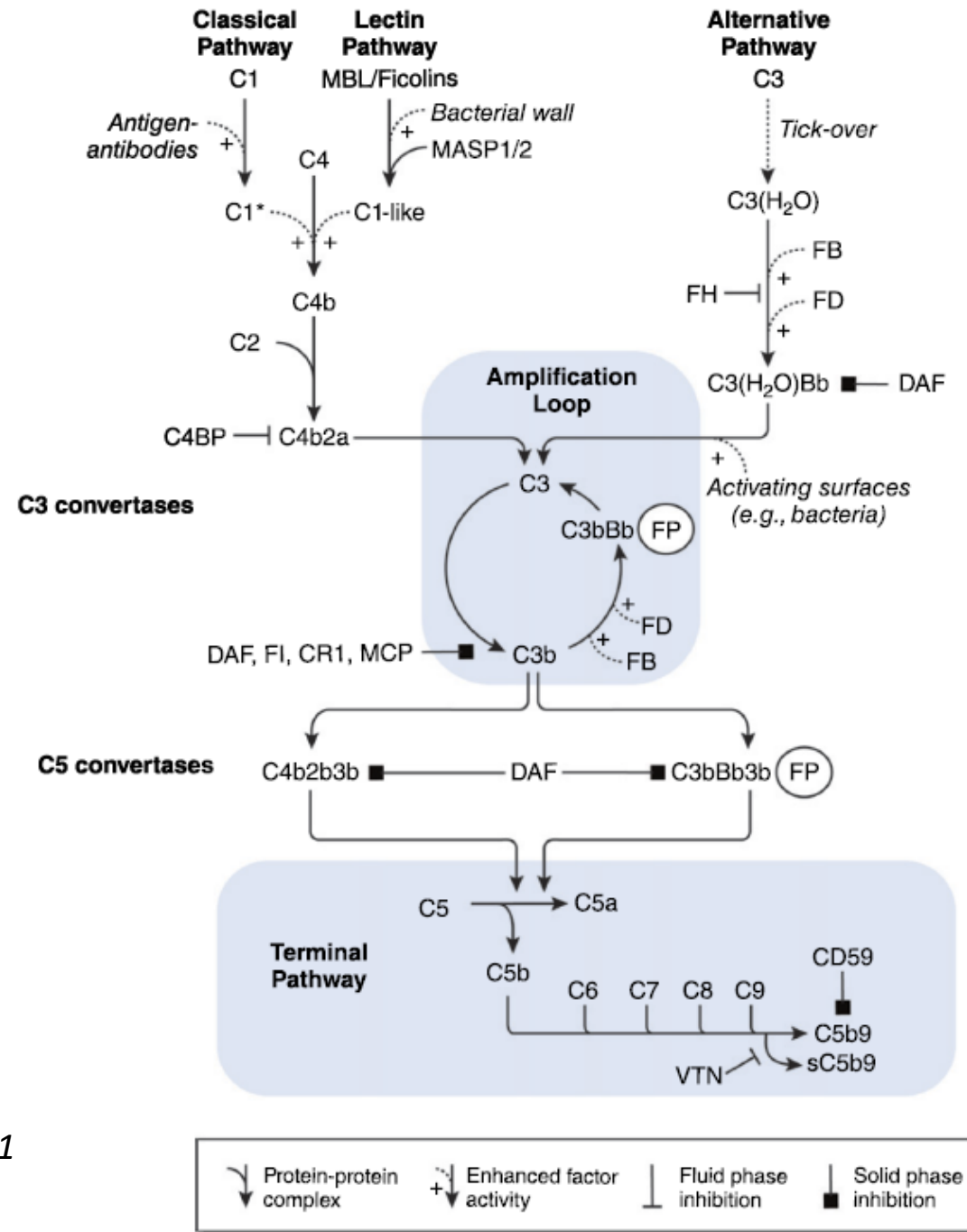
- Clivagem do fator B dependente do fator D: etapa chave na ativação e perpetuação da via alternativa > formação de C3bBb > necessária mutação de ganho de função no fator B para causar SHUa.
- Mais de 30 variantes reportadas em *CFB* > quase todas novas e associadas a penetrância incompleta



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

- Função aberrante de CFB: estimada em desempenhar um papel em ~1%-2% de todos os pacientes com SHUa.
- Poucos casos descritos de glomerulopatia C3 dominante associada a variantes em *CFB*.
- Análise funcional de 2 mutações em *CFB*: consistentes com ganho de função > produção de C3 convertase hiperativa via formação aumentada ou degradação diminuída

Goicoechea et al, Proc Natl Acad Sci, 2007

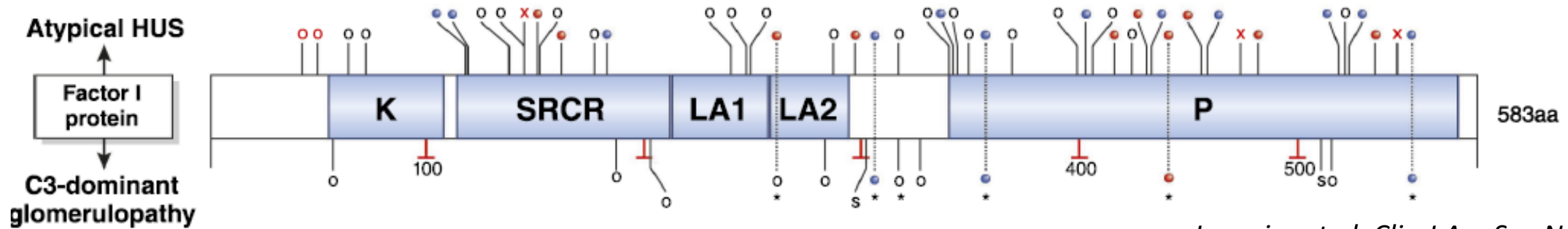


Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Gene *CFI* e fenótipos renais associados

- CFI: papel central na regulação negativa da cascata do complemento.
- Coortes francesa e britânica de SHUa: mutações em *CFI* em heterozigose em 5 de 101 pacientes.
Fremeaux-Bacchi et al, J Med Genet, 2004; Kavanagh et al, J Am Soc Nephrol, 2005
- Mais de 80 variantes distintas em *CFI* reportadas em pacientes com SHUa > ~4%-8% de todos os pacientes > penetrância incompleta quase sempre documentada

Kavanagh et al, Semin Nephrol, 2013; Fremeaux-Bacchi et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2013

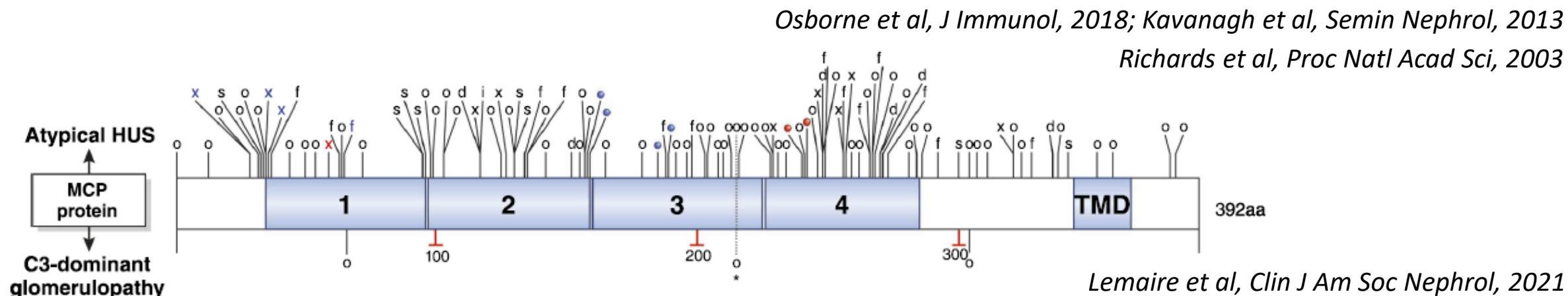


Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

- Mutações tipo 1 (secreção defeituosa) e tipo 2 (atividade enzimática comprometida) presentes em pacientes com SHUa e glomerulopatias C3 dominante > degradação diminuída de C3b de fase fluida e de superfície celular.
Nilsson et al, Mol Immunol, 2011
- Por que a maioria dos pacientes com deficiência completa de fator I apresentam infecções frequentes mas não lesão renal?
Alba-Dominguez et al, Orphanet J Rare Dis, 2012
- Evidência crescente de ligação potencial entre variantes em *CFI* e glomerulopatias C3 dominante

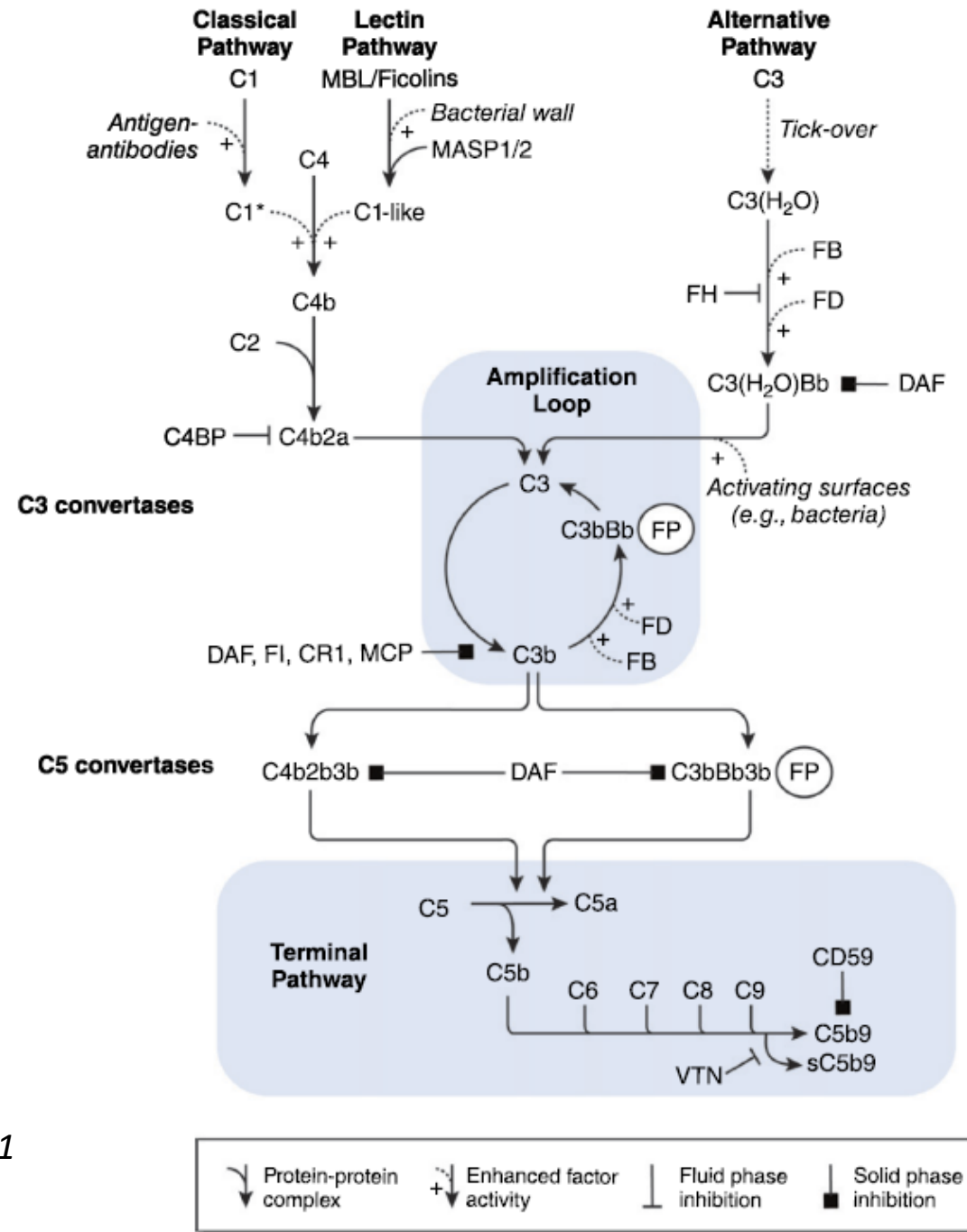
Gene *MCP* e fenótipos renais potencialmente associados

- MCP: regulador negativo da via alternativa.
- Mais de 100 mutações diferentes em *MCP* identificadas em pacientes com SHUa > mais de 75% consistentes com herança autossômica dominante, com penetrância incompleta.



- Variantes em *MCP*: ~10%-15% dos pacientes com SHUa *Fremeaux-Bacchi et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2013*
- Número limitado de publicações ligando glomerulopatias C3 dominante a variantes em *MCP*: não permite conclusões definitivas sobre causalidade.
- *MCP* com deleção em fase ou variante associada a mudança da fase de leitura: proteína retida intracelularmente (mutações tipo 1) – substituições missense: atividade deficiente contra C3b ligado à superfície (mutações tipo 2) > ~90% das mutações caracterizadas são tipo 1. *Richards et al, Proc Natl Acad Sci, 2003*
- Deficiência de MCP: controle inadequado da via alternativa na superfície de células endoteliais > risco de recidiva pós-transplante predito deveria ser baixo, mas é mais alto que o esperado > contradição aparente pode ser devido a quimerismo endotelial, onde células endoteliais do receptor povoam o leito vascular do enxerto.

Fremeaux-Bacchi et al, Am J Transplant, 2007



Lemaire et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2021

Variantes genéticas combinadas associadas ao complemento

- 795 pacientes com SHUa analisados para 5 genes (*CFH*, *MCP*, *CFI*, *C3*, *CFB*): 40% com variantes em um único gene e 3% com variantes em mais de um gene.
Bresin et al, J Am Soc Nephrol, 2013
- *MCP*, *CFH* e *CFI*: genes mais frequentemente implicados em SHUa multigênica.
- Avaliação mais recente em 3128 pacientes com SHUa incluindo mais 6 genes (*CFHR1*, *CFHR5*, *CFP*, *DGKE*, *PLG*, *THBD*): ~4% com 2 ou 3 variantes raras em genes distintos > ~4% dos pacientes com uma glomerulopatia C3 dominante apresentaram variantes raras em mais de um gene quando a mesma análise foi feita.
Osborne et al, J Immunol, 2018
- Nenhuma das combinações multigênicas encontradas na SHUa parece conferir um pior prognóstico, exceto aquelas implicando *MCP*
Bresin et al, J Am Soc Nephrol, 2013
- Gatilhos ambientais parecem desempenhar um papel importante na determinação da expressão e gravidade fenotípica.
- Uma das abordagens mais promissoras: teste genético novo que identifica modificadores reguladores da penetrância fenotípica.
- Abordagens alternativas: metodologia de score de risco poligênico

Formas genéticas de SHUa não associadas ao sistema complemento

- MAT renal: complicação conhecida de deficiência de cobalamina-C > forma herdada de SHUa não mediada por complemento.

Carrillo-Carrasco & Venditti, J Inherit Metab Dis, 2012

- Conceito de SHUa independente de complemento: mutações em homozigose em *DGKE*, mutações em heterozigose em *PLG* ou *INF2*.

Bu et al, J Am Soc Nephrol, 2014; Challis et al, J Am Soc Nephrol, 2017

- Outros genes causadores de SHUa podem ser descobertos: ~40% dos pacientes com a doença permanecem sem etiologia clara.

Por que SHUa e glomerulopatias C3 dominante são doenças distintas?

- Hipótese atual para a diferença de fenótipos entre SHUa e glomerulopatias C3 dominante: regulação aberrante do complemento nas superfícies ou na fase fluida do tecido, respectivamente.

Kaartinen et al, Semin Immunol, 2010

- SHUa: mutações em CFH predominantemente posicionadas nos domínios de reconhecimento de superfície responsável pela regulação de C3b para interação com superfícies celulares por meio da ligação a glicosaminoglicanos ou sialoglicoproteínas.

Manuelian et al, J Clin Invest, 2003; Hyvarinen et al, Blood, 2016

- Elevada proporção de mutações em CFH que causam glomerulopatias C3 dominante: comprometem suas funções inibitórias sem impedir ligação.

Osborne et al, J Immunol, 2018

Problemas do modelo proposto

- 1) Pacientes com perda de função em homozigose deveriam ter defeitos nas fases tissular e fluida, uma vez que a proteína não se expressa em qualquer estrutura.
- 2) Pacientes com perda de função em homozigose são descritos para ambas as doenças e são bem mais frequentes na SHUa.
- 3) Há muitos pacientes com SHUa que têm variantes em homozigose na região de *CFH* onde variantes causadoras de glomerulopatias C3 dominante encontram-se agrupadas, e vice-versa.
- 4) Os muitos exemplos das mesmas variantes em *CFH* causadoras de SHUa e glomerulopatias C3 dominante em pacientes não relacionados, associados ao fato de que não há relato de irmãos afetados com fenótipos discordantes > sugerem que fatores ambientais e/ou variantes comuns em múltiplos *loci* devam ser agentes capitais do processo de decisão fenotípica.
- 5) O modelo não oferece uma boa explicação para entender porque ambas SHUa e glomerulopatias C3 dominante podem ser causadas por variantes em *CFH* em heterozigose e homozigose, às vezes exatamente no mesmo *locus*.
- No momento: estas inconsistências são geralmente explicadas invocando autoanticorpos contra fatores de complemento, variantes genéticas com efeito pequeno ou fatores ambientais.

Complemento intracelular deflagra lesões renais?

- Mudança recente de paradigma: papéis intracelulares do complemento devem ser integrados a um sistema complexo
- Clivagem intracelular de C3 por meio de catepsina L em fragmentos bioativos: desempenha um papel crítico nas células T > C3 intracelular auxilia na manutenção da homeostase de células T, mas também pode ser externalizado por células T ativadas, contribuindo para uma cascata de complemento extracelular local.
Liszewski et al, Immunity, 2013
- Estes novos papéis provavelmente se estenderão bastante adiante de células T
- Dada a preponderância de complemento em várias doenças glomerulares: importante investigar se complemento intracelular está implicado na causalidade dessas doenças
Garsen et al, Kidney Int, 2016
- Como expressão intracelular de complemento é provavelmente regulada de modo tipo celular-específico: pode contribuir para responder à questão “Por que o rim?”
- Outra pergunta: Qual seria o efeito de expressar C3 com uma mutação associada a ganho de função sobre o metabolismo celular e a biologia do complemento local?

Conclusões

- Estudos genéticos detalhados baseados em coortes grandes e bem fenotipadas, integrados a análises de modelos animais: papel fundamental nos avanços científicos e clínicos.
- Vários desafios permanecem:
 - Razão do rim ser um dos poucos órgãos-alvo chaves para doenças do complemento.
 - Mecanismos responsáveis pelos fenótipos variados apresentados por pacientes com variantes nos mesmos genes.
 - Esclarecer se as informações genéticas obtidas de pacientes diagnosticados com glomerulopatia C3 dominante corresponderão à utilidade clínica de variantes encontradas em SHUa.
 - Necessidade de estudos aprofundados no grande grupo de pacientes com SHUa nos quais não foram identificadas variantes ou autoanticorpos.
- Respostas a várias dessas questões poderão vir da aplicação de multiômica em estudos com pacientes negativos para variantes, combinando genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica e/ou metabolômica.

Obrigado!

Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular

Unidade de Nefropatias Hereditárias

**Faculdade de Medicina da USP e Hospital das Clínicas
da FMUSP**

