



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
DOUTORADO 2014-2018

**PREVALÊNCIA DE VARIANTES DO GENE *APOL1* NUMA AMOSTRA DE
PACIENTES AFRODESCENDENTES EM DIÁLISE CRÔNICA NO BRASIL**

ALUNO: TOBIAS AUGUST SIEMENS
ORIENTADOR: DR. THYAGO PROENÇA DE MORAES

CURITIBA
DEZEMBRO / 2017

**PREVALÊNCIA DE VARIANTES DO GENE *APOL1* NUMA AMOSTRA DE
PACIENTES AFRODESCENDENTES EM DIÁLISE CRÔNICA NO BRASIL**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de doutorado pelo
Programa de Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná.

TOBIAS AUGUST SIEMENS
ORIENTADOR: DR. THYAGO PROENÇA DE MORAES

CURITIBA
DEZEMBRO / 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Dr. Miguel C. Riella, mentor do projeto, que me aceitou como aluno quando estava concluindo minha Residência Médica em Nefrologia. Devo a ele não apenas a concepção e elaboração do projeto, mas também sua contribuição decisiva para aprovação do mesmo junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Também foi através dele o contato com o Dr. Martin Pollak, autoridade mundial no assunto e com quem pude ter o privilégio de conviver por um mês em Boston (EUA). Agradeço a todos que ajudaram no recrutamento dos participantes da pesquisa, em especial às assistentes sociais da Fundação Pró-Renal, com seu incansável trabalho em contatar pacientes e familiares para nosso projeto. Agradeço também ao Dr. Rodrigo Peixoto Campos pela cooperação decisiva para a realização da etapa no Nordeste da nossa pesquisa. Agradeço ainda ao Laboratório Scribner, por sua ajuda na coleta e no processamento das amostras da primeira fase da pesquisa e à enfermeira Sandra Regina de Araújo, pelo auxílio no recrutamento e coleta de sangue dos participantes da segunda fase. Agradeço também ao Dr. Cristian V. Riella, que realizou toda a genotipagem da primeira fase deste projeto e me ensinou pacientemente como realizá-la na minha estadia em Boston, além de estar sempre disponível para discutir ideias para enriquecer este trabalho. Agradeço em especial ao Dr. Thyago Proença de Moraes, por aceitar o desafio de me orientar com o projeto já em andamento, ajudando na formatação final e nos cálculos estatísticos.

Quero terminar agradecendo meus pais, que me ensinaram a viver de maneira digna e me proporcionaram um ambiente de amor e estímulo ao aprendizado, sempre acreditando no meu potencial. Agradeço também aos meus sogros, por terem me acolhido como filho em sua família. Agradeço ainda a Deus, por ter me criado e me mostrado o verdadeiro sentido da vida.

Não poderia deixar de agradecer ainda à pessoa que me deu apoio desde o início desta jornada, sem a qual certamente não teria concluído esta tese. Aquela que, apesar de conhecer todos meus defeitos, demonstra seu amor diário por mim, através de palavras de afirmação, respeito e companheirismo. E além disto ainda é uma mãe maravilhosa para nossas filhas, Melanie e Nicole. Minha querida Carolina, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIÇÕES.....	10
1 - INTRODUÇÃO.....	2
1.1 - DIFERENÇAS DE ACOMETIMENTO RACIAL PELA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA.....	12
1.2 - DESCOBERTA DAS MUTAÇÕES NO GENE DA <i>APOL1</i> E ASSOCIAÇÃO À DRC.....	14
1.3 - ORIGEM DAS MUTAÇÕES	20
1.4 - FISIOLOGIA.....	20
1.5 - TOXICIDADE DE <i>APOL1</i> , VARIANTES <i>G1</i> E <i>G2</i>	24
1.6 - "SECOND HIT" NECESSÁRIO PARA DESENVOLVIMENTO DA DRC.....	27
1.7 - EFEITO DA APOLIPROTEÍNA L1 NOS PODÓCITOS.....	28
1.8 - EFEITO DA APOLIPOPROTEÍNA L1 CIRCULANTE.....	31
1.9 - <i>APOL1</i> E A HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA.....	32
1.10 - <i>APOL1</i> E O TRANSPLANTE RENAL.....	32
1.11 - <i>APOL1</i> E RISCO CARDIOVASCULAR	35
1.12 - <i>APOL1</i> E HIVAN	37
1.13 - UTILIDADE FUTURA	39
2 - JUSTIFICATIVA.....	41
3 - OBJETIVOS.....	42
3.1 - OBJETIVO PRINCIPAL.....	42
3.2 - OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	42

4. MÉTODOS	43
4.1 – DESENHO DO ESTUDO	43
4.2 – CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL	44
4.3 – TERMO DE CONSENTIMENTO E QUESTIONÁRIO.....	45
4.4 - ANÁLISE GENÉTICA.....	46
4.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 – RESULTADOS	61
5.1 – FLUXOGRAMA DE ENTRADA DOS PACIENTES NO ESTUDO	61
5.2 – DESCRIÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO.....	62
5.3 – ANÁLISE GENÉTICA	65
6 – DISCUSSÃO	70
6.1 – OBJETIVO PRINCIPAL	73
6.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	84
7 – LIMITAÇÕES DO ESTUDO	90
8 – CONCLUSÃO	91
9 – BIBLIOGRAFIA	92
10 – ANEXOS	107
10.1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
10.2 – QUESTIONÁRIO	115
10.3 – APROVAÇÃO CONEP	117

RESUMO

Introdução: Há evidentes diferenças de acometimento racial pela insuficiência renal crônica entre caucasianos e afrodescendentes. Acreditava-se que isto ocorria por dificuldade de acesso à Saúde da população afrodescendente, mas estudos recentes mostram que variantes do gene *APOL1* são responsáveis por grande parte dos casos de glomerulonefrite segmentar e focal, nefropatia associada ao HIV, nefrosclerose hipertensiva e nefrite lúpica nesta população. Este é o primeiro estudo a mostrar a presença destas variantes *APOL1* em afrodescendentes no Brasil.

Métodos: Critérios de inclusão foram pacientes afrodescendentes em hemodiálise crônica em clínicas selecionadas do Paraná e de Alagoas, acima de 18 anos, sendo também recrutados familiares destes pacientes como controles. Foram excluídos pacientes abaixo de 18 anos, sem ancestralidade africana ou com relato de doenças não associados às variantes do gene *APOL1* (como uropatias obstrutivas, doença policística autossômica renal ou hipertensão maligna). Após obtenção do termo de consentimento, dados clínicos foram coletados juntamente com amostras sanguíneas para extração do DNA. A genotipagem para presença dos alelos G0, G1 e G2 foi realizada usando técnica de *protein chain reaction*.

Resultados: 443 participantes foram incluídos no estudo, sendo 274 pacientes e 169 familiares. 12% dos pacientes e 1% dos familiares apresentaram dois alelos de risco, a chamada variante de alto risco (VAR). Portadores da VAR começaram diálise em média 13 anos mais cedo, na comparação com portadores de um ou nenhum alelo de risco. Em modelo de regressão logística, a presença da VAR aumentou em 21 vezes o risco de doença renal crônica terminal (DRCT).

Conclusão: A prevalência das variantes *APOL1* em nossas amostras se mostrou inferior a estudos anteriores, provável reflexo do alto grau de miscigenação em nossa população. Reproduzimos, porém, em nosso estudo a maior prevalência das variantes em participantes com doença renal do que indivíduos saudáveis e mostramos que a presença das variantes está associada ao início mais precoce de hemodiálise.

Palavras-chave: Genética, apoproteína, HDL-colesterol, rim, HIV, insuficiência renal crônica

ABSTRACT

Background & Aim: There are striking differences in racial involvement by chronic kidney disease between Caucasians and African Americans. It was believed that this occurred due to difficulties in access to health of the African Americans, but recent studies show that *APOL1* gene variants are responsible for most cases of focal global glomerulosclerosis, HIV-associated nephropathy, hypertensive nephrosclerosis and lupus nephritis in this population. This is the first study to show the presence of these *APOL1* variants in individuals of African descendants in Brazil.

Methods: Including criteria were patients from 18 years upwards undergoing dialysis who reportedly had African Ancestry, and first degree relatives were selected as controls. Exclusion criteria were: patients under 18 years, history of obstructive uropathy, polycystic kidney disease and malignant hypertension. After informed consent was obtained, clinical data along with blood samples for DNA extraction were collected. Genotyping was performed with a protein chain reaction assay for the wild type allele G0, and G1 and G2 risk alleles.

Results: 443 participants were included in the study, 274 of them were patients and 169 were relatives. 12% of the patients and 1% of the relatives had two risk alleles, which is called high-risk allele (HRA). Carriers of the HRA started dialysis on average 13 years earlier when compared to patients with one or zero risk allele. In a multivariate logistic regression model, the presence of HRA was associated with a 21-fold increased risk of end-stage renal disease (ESRD).

Conclusion: The prevalence of *APOL1* variants in our samples was inferior to previous studies, likely reflecting the high degree of miscegenation in our population. Reproduced in our study was the more prevalent variants in subjects with renal disease than healthy individuals and the fact that the presence of variants is associated with early initiation of hemodialysis.

Keywords: Genetics, apolipoprotein, HDL, APOL1, kidney, focal segmental glomerulosclerosis, HIV, HIV associated nephropathy, hypertensive nephrosclerosis, chronic kidney disease

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CRESCIMENTO PROGRESSIVO DOS PACIENTES EM DIÁLISE.....	12
FIGURA 2. ACOMETIMENTO DESPROPORCIONAL DE NEGROS POR DRCT.....	13
FIGURA 3. CRONOLOGIA DA MUTAÇÃO <i>APOL1</i>	22
FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DO <i>TRYPANOSSOMA</i> E DAS VARIANTES DE RISCO.....	24
FIGURA 5. PADRÃO RECESSIVO DA NEFROPATIA <i>APOL1</i>	26
FIGURA 6. POSSÍVEIS <i>SECOND HITS</i> PARA NEFROPATIA <i>APOL1</i>	28
FIGURAS 7-20. GENOTIPAGEM <i>APOL1</i>	49-60
FIGURA 21. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES POR GRUPO.....	61
FIGURA 22. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES POR ESTADO.....	62
FIGURA 23. NÚMERO DE PARTICIPANTES COM VARIANTES <i>APOL1</i>	66
FIGURA 24. DISTRIBUIÇÃO DOS PARTICIPANTES CONFORME MUTAÇÕES.....	67
FIGURA 25. NÚMERO DE CASOS DA VARIANTE <i>APOL1</i> POR ESTADO.....	67
FIGURA 26. IDADE DE INÍCIO NA HD POR GENÓTIPO.....	70
FIGURA 27. DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES EM DIÁLISE POR GÊNERO.....	72
FIGURA 28. CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES EM DIÁLISE POR IMC (BRASIL).....	73
FIGURA 29. PREVALÊNCIA MUNDIAL DAS VARIANTES <i>APOL1</i>	76
FIGURA 30. DISTRIBUIÇÃO DAS VARIANTES <i>APOL1</i> NA ÁFRICA.....	78
FIGURA 31. DISTRIBUIÇÃO DO TRÁFEGO DE ESCRAVOS PARA A AMÉRICA.....	79
FIGURA 32. FLUXO DOS ESCRAVOS ORIUNDOS DA ÁFRICA.....	79
FIGURA 33. DIFICULDADE NA DETERMINAÇÃO DA RAÇA POR FENÓTIPO.....	80
FIGURA 34. COMPOSIÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA 1.....	82
FIGURA 35. COMPOSIÇÃO GENÉTICA DA POPULAÇÃO BRASILEIRA 2.....	83
FIGURA 36. INVASÕES HOLANDEASAS NO BRASIL.....	84
FIGURA 37. INÍCIO NA HD POR GENÓTIPO (EM ANOS).....	86

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1. <i>ODDS-RATIO</i> PELA PRESENÇA DAS VAR POR ESTUDO.....	18
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO.....	63
TABELA 3. GENÓTIPO DAS AMOSTRAS.....	66
TABELA 4. NÚMERO DE CASOS DA VARIANTE <i>APOL1</i> POR ESTADO.....	68
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DA GENOTIPAGEM CONFORME RAÇA.....	68
TABELA 6. DISTRIBUIÇÃO DA GENOTIPAGEM CONFORME DM.....	69
TABELA 7. REGRESSÃO LOGÍSTICA PARA DRCT	71
TABELA 8. PREVALÊNCIA MUNDIAL DAS VARIANTES <i>APOL1</i>	76

LISTA DE ABREVIações

AA-DHS: African American-Diabetes Heart Study

AFR: africana

AMR: americana (indígena)

APOL1: gene APOL1

apol1: apolipoproteína L1

AD: afrodescendentes

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DAC: doença arterial coronariana

DM: diabetes mellitus

DP: desvio-padrão

DRC: doença renal crônica

DRCT: doença renal crônica terminal

EUA: Estados Unidos da América

EUR: europeia

GESF: glomerulonefrite segmentar e focal

HAS: hipertensão arterial sistêmica

HAART: esquema tríplice de alta potência

HbA1c: hemoglobina glicada

HD: hemodiálise

HDL = *high density lipoprotein*

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HIVAN: nefropatia associada ao HIV

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICC: insuficiência cardíaca congestiva

IMC: índice de massa corporal

LES: lúpus eritematoso sistêmico

MALD: *admixture linkage disequilibrium*

MDRD: *Modification of diet in renal disease* (fórmula)

NEPTUNE: Nephrotic Syndrome Study Network

ONU: Organização das Nações Unidas

OR: *odds ratio*

PAD: pressão arterial diastólica

PAS: pressão arterial sistólica

PR: Estado do Paraná

RAC: relação albumina-creatinina

SNP: *single nucleotide polymorphism*

SPRINT: Systolic Blood Pressure Intervention Trial

SRA: *serum resistant-associated*

TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

VBR: variantes de baixo risco

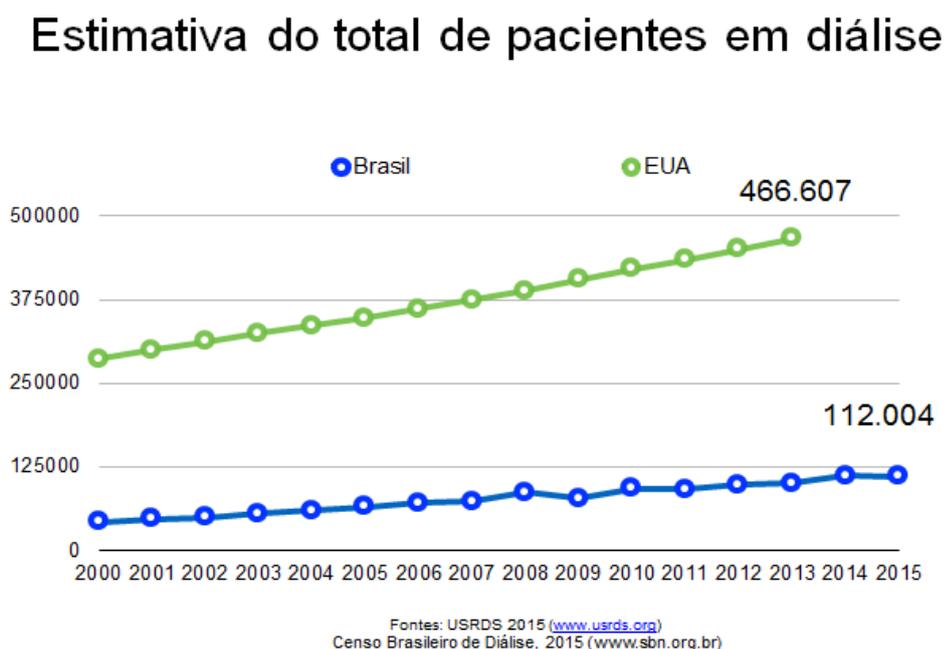
VAR: variantes de alto risco

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – DIFERENÇAS DE ACOMETIMENTO RACIAL PELA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), a doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde de magnitude mundial e a mortalidade por esta doença quase dobrou entre 1990 e 2010. Ao final de 2013, mais de três milhões de pessoas estavam em terapia substitutiva renal no mundo, sendo destas 2.5 milhões em hemodiálise ou diálise peritoneal e quase 700 mil transplantadas renais. Estes números tendem a seguir aumentando, pois a prevalência mundial da DRC avança a uma taxa de 6% ao ano(1), conforme mostra a Figura 1.

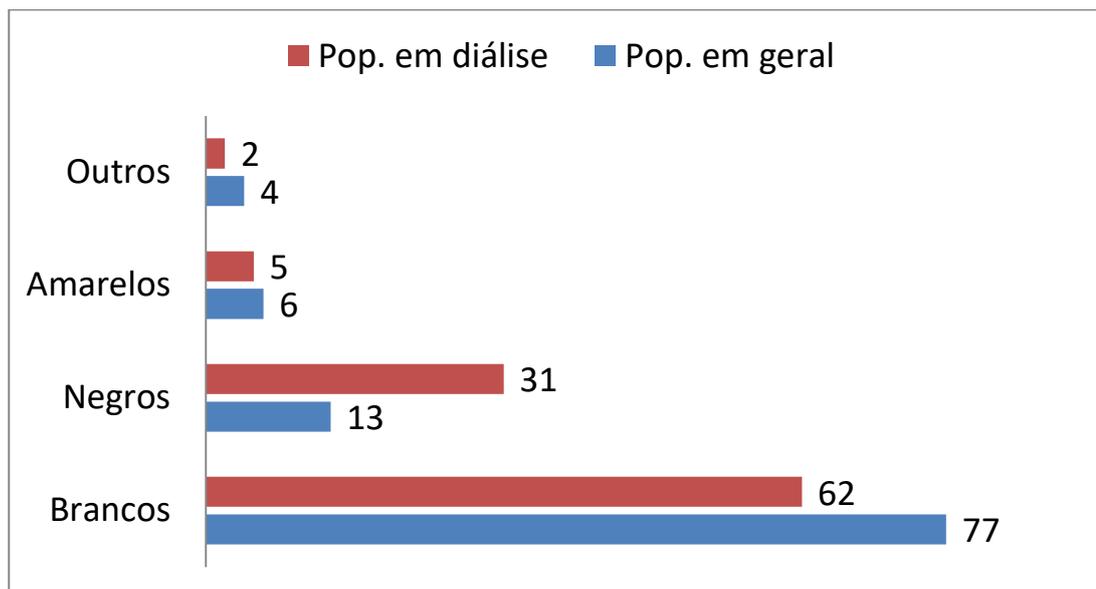
Figura 1 – Crescimento progressivo dos pacientes em diálise (Brasil x EUA)



Há evidentes diferenças de acometimento racial pela DRC (Figura 2), com afrodescendentes tendo quatro vezes maior incidência do que caucasianos(1)(2) e apresentando mais rápido declínio da função renal nos estágios iniciais da doença(3). Isto faz com que haja uma prevalência quase três vezes maior de afrodescendentes com doença renal crônica terminal (DRCT) do que caucasianos não hispânicos nos Estados Unidos da América

(EUA)(4). Sabe-se também que o risco de afrodescendentes desenvolverem DRCT ao longo da vida é de 8%, enquanto em caucasianos esta porcentagem é de 2-3%(5). Esta maior incidência de DRC em afrodescendentes foi identificada pela primeira vez há trinta anos(6)(7). Em 2004, a incidência em afrodescendentes nos EUA era de 1000 por milhão de pessoas, comparado com apenas 260 por milhão em caucasianos(6). O *United States Renal Data System Report* de 2011 demonstra um aumento anual e consistente de incidência de DRCT em afrodescendentes, que chega a ser cinco vezes maior do que o constatado em caucasianos. Latinos nos EUA também têm risco aumentado de DRC comparado com caucasianos, mas isto é mais evidente justamente nos subgrupos com ancestralidade africana(8). Um fator que já em 1993 chamou a atenção de Freedman *et al.* foi a maior prevalência de doenças renais em familiares de pacientes afrodescendentes com DRCT(9).

Figura 2 – Acometimento desproporcional de negros por DRCT (EUA, em %)



Fontes: *United States Census* (www.census.gov) e *USRDS 2015* (www.usrds.gov)

Várias teorias surgiram para tentar explicar essa diferença étnica. Inicialmente se propôs que o padrão socioeconômico mais baixo da população afrodescendente levaria a mesma a um pior acesso a diagnósticos e tratamentos, e com isso tornaria esta população mais suscetível às principais causas de DRC, como diabetes mellitus (DM) e hipertensão arterial sistêmica (HAS)(10). Volkova *et al.* levantaram a hipótese de que essa diferença de

padrão socioeconômico levasse à uma falta de disponibilidade de alimentos saudáveis ou mesmo exposição à fatores tóxicos ambientais(6). Foi proposto também que um menor número de glomérulos ao nascimento estivesse presente na população afrodescendente, o que aumentaria a suscetibilidade à DRC na vida adulta(11). Isto seria similar ao que é observado em indivíduos que nascem com baixo peso, decorrente de retardo de crescimento intrauterino. Esta correlação foi descrita pela primeira vez em 1942, durante a 2ª Guerra Mundial, por David Barker e recebeu o nome de Hipótese de Brenner. Ela propõe que um menor de número de glomérulos por rim, independente da causa, resulta em hipertensão e hiperfiltração glomerular, levando à hipertrofia do volume glomerular e, conseqüentemente, à hipertrofia e esclerose glomerular(12). Estudos posteriores, porém, não confirmaram tal hipótese(13).

1.2 – DESCOBERTA DAS MUTAÇÕES NO GENE DA *APOL1* E ASSOCIAÇÃO À DRC

Sabendo deste desproporcional acometimento da doença renal pela população afrodescendente, pesquisadores usaram técnicas modernas como *admixture linkage disequilibrium* e *genome wide admixture study* (GWAS) (mapeamento de genoma) para quantificar o percentual de ancestralidade de cada locus em um gene. GWAS permitem analisar milhões de marcadores genéticos, como polimorfismos de nucleotídeos únicos, e testar por associações com determinados fenótipos(14). Claro que a mera existência de uma associação estatística não significa relação causal entre um polimorfismo e determinada doença. O mais frequente, inclusive, é que os GWAS identifiquem variantes genéticas comuns, com discretos impactos sobre o risco de determinada doença(14). Uma vantagem de estudos usando GWAS é que o recrutamento de participantes é muito mais fácil do que em estudos familiares, visto que não pode haver parentesco(14). As novas técnicas inclusive ocasionaram uma curiosa inversão do clássico paradigma “da bancada ao paciente” (em que descobertas científicas do laboratório eram testadas em pacientes) para “do paciente à bancada”, quando doenças com alto impacto populacional (como a DRC) levam pesquisadores ao laboratório em busca de respostas(15).

Analisando o genoma de indivíduos acometidos por certas nefropatias, os pesquisadores perceberam que estes tinham uma ancestralidade africana acima da esperada no cromossomo 22, comparados com controles (pacientes afrodescendentes saudáveis). A chance de isso ter ocorrido ao acaso é de vários bilhões para um(16)(17). Estudos isolaram então uma região específica do cromossomo 22q12, com mais de 21 genes, entre eles o gene *MYH9*. Esse gene codifica uma proteína expressa nos podócitos que é essencial para o adequado funcionamento do seu citoesqueleto e adesão intercelular. Com essa plausibilidade fisiológica, foi sugerido ser ele o gene o responsável pelo aumento de suscetibilidade à nefropatia não-diabética e glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) em afrodescendentes(18)(19). Mas apesar de enormes esforços por parte da comunidade científica, incluindo detalhada genotipagem e sequenciamento do gene *MYH9*, não foi encontrada nenhuma mutação que estivesse relacionada a um efeito deletério no funcionamento renal(1).

O foco passou então para genes vizinhos do cromossomo 22. Genovese *et al.* compararam 205 pacientes afrodescendentes com GESF comprovada por biópsia com 180 indivíduos afrodescendentes sem doença renal e reanalisaram a região cromossômica 22q12, usando dados do *Internacional HapMap Project* e do *1000 Genome Project*(20)(21). A aproximadamente vinte kilobases de distância do gene *MYH9*, foi localizado o gene *APOL1*, com presença de mutações com forte poder estatístico em afrodescendentes(22). Foram encontradas ao todo 7479 mutações do tipo polimorfismos de nucleotídeo único, sendo três delas relacionadas estatisticamente ao aumento de risco de certas nefropatias em afrodescendentes. Duas delas (rs73885319 e rs60910145) se encontram no último éxon do gene *APOL1* (éxon sete) e resultam em duas substituições de aminoácidos, serina por glicina e isoleucina por metionina (nas posições 342 e 384, respectivamente). Essas duas mutações passaram a ser denominadas de alelo *G1*, por se encontrarem em completo *linkage disequilibrium* ($r^2 = 1.0$), ou seja, sempre se expressam em conjunto. A terceira mutação encontrada (rs71785313), também no éxon sete do gene *APOL1*, a apenas doze pares de bases de distância da mutação *G1*, se traduz por uma deleção de dois aminoácidos (aspargina e tirosina, posições de aminoácidos 388 e 389), sendo denominada de alelo *G2*(23). As mutações

se encontram em perfeito *linkage disequilibrium* negativo, ou seja, nunca ocorrem no mesmo cromossomo(24) Isto permite duas conclusões: (a) *G1* e *G2* surgiram de maneira independente; (b) os dois alelos nunca sofreram recombinação genética (por isso estão em *linkage disequilibrium* negativo). Poderia ainda haver a explicação de que as populações com as variantes *G1* e *G2* nunca tenham se encontrado, não possibilitando um contato genético que gerasse um *crossing-over*. Mas isto parece menos provável pela proximidade geográfica das variantes no território africano e por elas terem surgido há mais de 4 mil anos. Portanto não há haplótipo carregando *G1* e *G2* simultaneamente.

Foi descrito ainda a existência de uma outra mutação no gene *APOL1*, denominada pelos pesquisadores como *G3*. Ao contrário das variantes *G1* e *G2*, esta mutação apresenta distribuição mundial, sugerindo que sua gênese tenha ocorrido fora do continente africano. Estudos também mostraram que esta mutação não confere proteção contra subespécies do *Trypanossoma*, assim como sua presença não aumenta risco de nefropatias em afrodescendentes(25).

A presença das variantes do gene *APOL1* é possível nas formas homozigotas (*G1/G1* ou *G2/G2*), heterozigota composta (*G1/G2*) ou heterozigota simples (*G1/G0* ou *G2/G0*). Como apenas nas primeiras duas formas o paciente apresenta risco aumentado de nefropatia, pela presença de dois alelos de risco, as formas homozigota e heterozigota composta foram chamadas de variantes de alto risco (VAR). A forma heterozigota simples, com presença de apenas um alelo de risco, foi chamada de variante de baixo risco (VBR), por não aumentar o risco de doença renal nesses pacientes(26)(27)(28). Não houve mais relação causal entre o gene *MYH9* e doenças renais após o ajuste para presença das variantes do gene *APOL1*(20).

Vários estudos subsequentes confirmaram estes achados. Analisando a população afrodescendente nos Estados Unidos, verificou-se que os portadores das VAR apresentavam risco quase três vezes maior de desenvolver nefrite lúpica, sete vezes maior de desenvolver nefrosclerose hipertensiva, 17 vezes maior de desenvolver GESF primária e 29 vezes maior de desenvolver nefropatia associada ao HIV (HIVAN), comparados com não afrodescendentes(24)(29), além de uma associação entre as VAR e risco

aumentado de nefropatia por anemia falciforme(26). Além disso, as VAR aceleraram a progressão da DRC em pacientes com GESF ou nefroesclerose hipertensiva, mesmo com terapia imunossupressora e adequado controle pressórico, respectivamente, resultando em início mais precoce de hemodiálise(30). Em relação à nefropatia hipertensiva, foi sugerido inclusive que o termo deveria ser mudado para glomeruloesclerose com alterações intersticiais e vasculares, já que o fator predominante não parece mais ser a hipertensão em si, mas alterações causadas pela presença das VAR(14). Estudo realizado por Kasembeli *et al.* com negros da África do Sul mostrou que a presença das VAR conferiu um risco 89 maior para desenvolvimento de HIVAN(31). Percebe-se que as nefropatias associadas às variantes genéticas são geralmente doenças sem envolvimento de órgãos extra-renais, o que sugere não haver efeitos sistêmicos, como será discutido mais adiante(32). Esta variação expressiva do risco entre as diversas nefropatias associadas às VAR sugere que apenas sua presença não é fator suficiente para induzir injúria renal, mas sim um potente co-fator(28). Apesar destas diferentes doenças serem classificadas de acordo com achados de patologia glomerular, elas apresentam pronunciadas alterações intersticiais e vasculares que podem estar ligadas às variantes *APOL1*(33). Foi necessário confirmar estas associações de risco encontradas nos estudos caso-controles, visto que estes têm o potencial de superestimar riscos, por terem sido realizados em pacientes com doenças renais já em estágios avançados. Este tipo de estudo pode ter também vieses de seleção (em que os casos e controles não são similares) e vieses de sobrevivência, comum em estudos em participantes com doenças com altas taxas de mortalidade (como é o caso de pacientes que recebem terapia substitutiva renal)(34). Estes estudos populacionais prospectivos mantiveram a associação entre as VAR e as nefropatias citadas, com risco em torno de duas vezes maior nos portadores das VAR(35)(27). Um sumário dos estudos realizados se encontra na Tabela 1.

Mais recentemente, Hoy *et al.*(30) analisaram microscopicamente rins de afrodescendentes saudáveis e descreveram os fenótipos de acordo com seu perfil *APOL1*. Eles mostraram que indivíduos com as VAR perdem glomérulos já a partir das primeiras décadas de vida, enquanto a população saudável geralmente só começa a perder glomérulos a partir dos cinquenta anos de

idade. Estas diferenças persistem após ajuste de variáveis como hipertensão arterial, mais presentes nos portadores das VAR. A perda chegou a 350.000 néfrons nos primeiros 38 anos de vida, número expressivo considerando que um rim normal contém em torno de 900.000 néfrons. Associado à redução no número total de glomérulos, ocorreu aumento no volume dos glomérulos. Isto pode ser explicado por uma hipertrofia compensatória, consequência da relação inversa entre o número e volume dos glomérulos(30). Esta piora precoce da função renal parece ocorrer nos moldes da nefropatia diabética, com albuminúria seguida de rápida deterioração da função renal(36).

TABELA 1 – Odds-ratio pela presença das VAR

Estudo	Ano	Autor	População	OR
Caso-controle	2010	Genovese(37)	GESF ¹ (EUA)	10,5
Caso-controle	2010	Genovese(37)	DRCT-HAS (EUA)	7,3
Caso-controle	2010	Tzur(22)	DRCT-HAS ²	4,9
Caso-controle	2011	Kopp(24)	HIVAN ¹ (EUA)	29,2
Caso-controle	2011	Kopp(24)	GESF ¹ (EUA)	16,9
Caso-controle	2011	Papeta(38)	GESF ¹ (EUA)	3
Caso-controle	2011	Papeta(38)	HIVAN ¹ (EUA)	3
Populacional	2011	Friedman(39)	Dallas Heart Study – Malb ³ (EUA)	3
Populacional	2011	Friedman(39)	Dallas Heart Study – CKD ¹ (EUA)	4
Caso-controle	2012	Fine(40)	HIV ¹ (EUA)	3
Coorte DRC	2012	Lipkowitz(41)	AASK CKD ¹ (EUA)	4
Coorte DRC	2012	Lipkowitz(41)	AASK proteinúria ¹ (EUA)	6
Coorte DRC	2012	Lipkowitz(41)	AASK ¹ (EUA)	3
Caso-controle	2013	Ulas(42)	DRC ¹ (Nigéria)	6
Coorte DRC	2013	Parsa(27)	AASK progressão DRC ¹ (EUA)	2
Coorte DRC	2013	Parsa(27)	CRIC progressão DRC ⁴ (EUA)	3
Populacional	2013	Foster(43)	ARIC – DRC ⁵ (EUA)	2
Populacional	2013	Foster(43)	ARIC – DRCT ¹ (EUA)	3

- 1 = apenas afrodescendentes com DRC
- 2 = afrodescendentes e hispânicos com DRC
- 3 = população em geral
- 4 = população em geral com DRC
- 5 = afrodescendentes em geral

Estas constatações sugerem que a presença de proteinúria pode ser um indicador de *screening* para a presença das VAR, já que sem a presença da mesma a chance de piora de função renal é considerada pequena. Isto seria interessante do ponto de vista econômico, já que a detecção das variantes ainda é exame de alto custo. Parsa *et al.* mostraram, porém, que mesmo nos pacientes sem proteinúria, a presença das VAR foi fator de risco para progressão da DRC(27). Analisando participantes afrodescendentes do estudo NEPTUNE (*Nephrotic Syndrome Study Network*), foi visto que, independente da doença renal (doenças de lesões mínimas, GESF, nefropatia membranosa), aqueles com a presença das VAR estavam associados à menor taxa de filtração glomerular e menor chance de remissão completa da doença com tratamento, mesmo após correção das múltiplas variáveis. Conclui-se que apesar das VAR não aumentarem o risco de determinadas doenças ocorrerem, elas pioram seu prognóstico quando surgem(44). A associação entre formas não-diabéticas de DRC e as mutações do gene *APOL1* é tão significativa que já se propôs até uma reclassificação das causas de DRC, passando a agrupar as diversas nefropatias associadas às variantes *APOL1* num mesmo grupo(45). Calcula-se que as VAR sejam responsáveis por até 70% da disparidade na progressão para DRC de uma amplo espectro de etiologias não-diabéticas em afrodescendentes(46). O risco de progressão de doença renal conferida pela presença das VAR é muito superior comparado com outras associações de risco descritas em estudos populacionais, sendo um dos mais elevados já vistos para mutações frequentes causando doenças comuns(46). A maioria dos estudos demonstrou risco equivalente para DRCT em indivíduos carregando dois alelos de *G1*, dois alelos de *G2* ou um alelo de cada (20)(38)(24). Em alguns estudos, porém, foi observada uma tendência a risco aumentado de DRC e albuminúria em homozigotos de *G1*(47)(39)(47).

Em relação à nefropatia diabética, causa mais comum de DRC na atualidade juntamente com a HAS, estudos mostram fraca ou nenhuma associação entre a presença das VAR e o seu desenvolvimento(39). Uma vez estabelecida, porém, a nefropatia diabética progride mais rapidamente em pacientes com a presença das variantes(27). Kruzer-Davila *et al.* propuseram que qualquer associação entre as VAR e nefropatia em pacientes diabéticos na verdade não seja nefropatia diabética, mas uma patologia relacionada às VAR

(como GESF, por exemplo)(34). Mas isto não significa que as VAR sejam a única explicação para a diferença de risco entre afrodescendentes e outras etnias. Sabe-se que afrodescendentes (mesmo sem a presença das VAR) apresentam mais rápida deterioração da função renal do que caucasianos, sendo portanto ao menos parte da diferença entre os grupos ainda explicada por fatores de risco tradicionais e diferenças socioeconômicas ou mesmo por fatores a serem descobertos(27).

Ao contrário do que se poderia imaginar, a mortalidade em geral de pacientes portadores das VAR com DRC é menor comparada com controles sem as VAR, especialmente naqueles abaixo dos 50 anos de idade(48). A explicação provável reside no fato das patologias associadas às VAR não afetarem órgãos extra-renais, terem em geral rápida progressão para DRCT e que o grupo mais jovem têm menor número de comorbidades, caracterizando com isso um subgrupo de pacientes mais saudáveis(48).

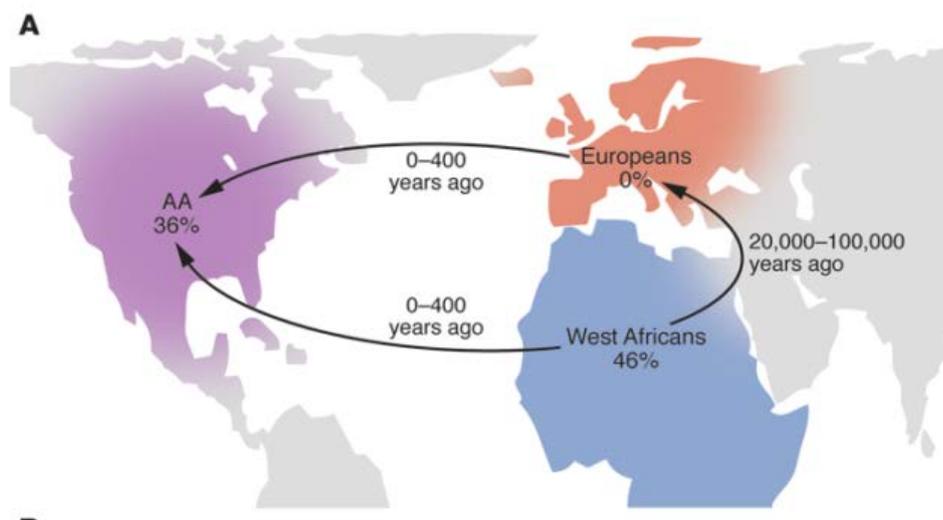
1.3 – ORIGEM DAS MUTAÇÕES

A população europeia se distanciou da africana há aproximadamente 40 mil anos e desde então surgiram diferenças de acometimento de variantes genéticas entre estas populações. Estas diferenças são explicadas por forças de seleção genética ocorridas ao longo dos milênios(49). Estima-se que as variantes *G1* e *G2* tenham surgido há aproximadamente 10 mil anos, portanto após a separação das linhagens europeia e africana(50), conforme mostra a Figura 3. As variantes se originaram na África e foram trazidas para o continente americano com o tráfego intercontinental de escravos. Estima-se que do século XVI ao século XIX foram trazidos para as Américas cerca de doze milhões de escravos africanos, principalmente da costa oeste subsaariana e em menor número do sudeste africano, regiões com alta prevalência das VAR(51)(23). É importante se fazer a genotipagem para as duas variantes, pois a ausência de uma delas não descarta que a outra esteja presente(23). A variante *G2* parece ser a mais antiga e é amplamente encontrada na África subsaariana. Sua prevalência na região é em torno de 10%(23), enquanto a variante *G1* parece ter sofrido pressão seletiva mais recente, tendo prevalência menos uniforme.

1.4 – FISILOGIA

Esta pressão seletiva sofrida pelas variantes provavelmente ocorreu pela proteção adicional que elas conferem a subespécies do *Trypanosoma brucei*(20), causador da tripanossomíase (também conhecida como doença do sono), doença endêmica na África(24). Para entender melhor este mecanismo, é preciso lembrar que *G1* e *G2* são variações genéticas de um gene chamado *APOL1* (sendo *G0* a variante *wild type*), presente somente no genoma humano e em determinados primatas, como gorilas e babuínos. O gene *APOL1* é membro de uma família composta por seis genes (*APOL1*, *APOL2*, *APOL3*, *APOL4*, *APOL5* e *APOL6*), agrupados no cromossomo 22(52). O gene *APOL1* codifica uma proteína chamada apolipoproteína L1 (*apol1*), a única da família das apolipoproteínas presente na circulação sanguínea, numa concentração de aproximadamente 0,3mg/dl(52). A *apol1* foi primeiramente descrita por Duchateau *et al.*(53) e circula numa partícula especializada de *high-density lipoprotein* (HDL), juntamente com a *haptoglobin-related protein*, que funciona como um receptor para sua entrada no tripanossoma. Esta relação entre a *apol1* e moléculas de HDL levou à suposição de que a principal fonte de *apol1* fosse o fígado(54). Estudos posteriores confirmaram esta hipótese(55), mas sabe-se que ao menos uma parcela é produzida no rim e em outros órgãos, como o pâncreas. A *apol1* também é encontrada em variados tipos de células, como fagócitos mononucleares, células da placenta, neurônios no córtex pré-frontal e células endoteliais(56)(52). Isto leva a uma questão interessante: por que o fígado é totalmente poupado dos efeitos nocivos das VAR, sendo ele o principal produtor? E por que justamente o rim é o maior prejudicado?

Figura 3 – Cronologia da mutação *APOL1*



Fonte: Friedman, D. J., & Pollak, M. R. (2011). Genetics of kidney failure and the evolving story of *APOL1*. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3367–3374.. Explicação no texto.

A *apol1* atua suprimindo a replicação e alastramento do *Trypanosoma brucei brucei* nos seres humanos, evitando com isso a tripanossomíase crônica(57)(58). Ou seja, os seres humanos apresentam um mecanismo de defesa específico contra o *Trypanosoma brucei brucei*. A partícula *apol1*-HDL também circula ligada à molécula de IgM(28). No rim, foram encontradas partículas de *apol1* expressas nas células endoteliais, no epitélio do túbulo contorcido proximal, nos podócitos e em artérias e arteríolas renais(59). Este achado pode explicar o padrão de glomeruloesclerose com acometimento vascular e fibrose intersticial, universalmente presente nas nefropatias associadas às variantes *APOL1*(60). Foi mostrado que além do acometimento vascular e fibrose intersticial, pacientes com as VAR têm significativamente mais atrofia tubular em biópsias(44). Sabe-se porém que a expressão fisiológica (ou seja, em concentrações normais) da *apol1* nos podócitos de rins normais não é citotóxica(60). Além da função tripanolítica, a *apol1* também está envolvida na morte celular programada de suas células hospedeiras, assim como numa função intracelular, causando morte por autofagia de células humanas, e envolvimento no metabolismo lipídico(61)(62). O gene *APOL1* também está envolvido em doenças diversas como esquizofrenia, câncer de mama, câncer de colo de útero e osteoartrite, porém o papel da *apol1* nestas doenças ainda não está determinado(52).

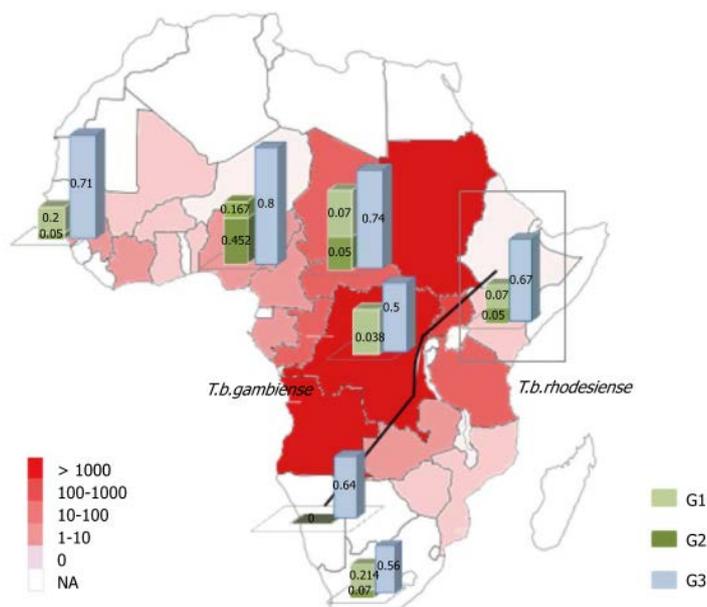
Tripanossomas são protozoários parasitas flagelados que crescem na corrente sanguínea de várias espécies de mamíferos, após a inoculação por mosquitos da espécie *Glossina* (também conhecidos como moscas tsé-tsé), infectados pelo parasita. Existem três espécies principais de *Trypanosoma*: *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense*. O *Trypanosoma brucei brucei* é incapaz de infectar humanos por causa do fator tripanolítico existente na apol1, presente no sangue humano. Esse fator atua levando à formação de poros aniônicos na membrana lipossomal do parasita, resultando em edema celular e morte do mesmo(63). Este sistema de proteção contra a doença do sono é encontrado também em outros primatas, como gorilas e babuínos. A ação tripanolítica da apol1 já era conhecida antes da descoberta das VAR, sendo a mais estudada e conhecida de suas funções. Existe ainda a possibilidade não confirmada das VAR fornecerem proteção contra outros microrganismos, além do *Trypanosoma rhodesiense*(37).

O *Trypanosoma rhodesiense* está presente no leste da África, sendo responsável pela forma aguda da doença. Já o *Trypanosoma gambiense* existe na região oeste e central da África, causando a forma crônica da doença, que é a mais frequente e pode ser fatal(23)(64)(65). O *Trypanosoma rhodesiense* desenvolveu um mecanismo para escapar da morte celular provocada pelo fator tripanolítico, voltando portanto a ter capacidade de provocar a doença do sono(66). Ele expressa uma proteína chamada *serum resistant-associated* (SRA), que se liga na porção C-terminal da apol1 (região gênica onde estão localizadas as mutações G1 e G2), neutralizando a ação do fator tripanolítico(67). A apol1 é composta por cinco regiões: secretora (que permite a expressão sérica da proteína), formadora de poros, *membrane adressing*, *leucine zipper* e a região que interage com o SRA. As três regiões responsáveis pela atividade tripanolítica são a formadora de poros, a *membrane adressing* (sensível a pH) e a região que interage com o SRA(23).

As variantes de risco se localizam na porção C-terminal e modificam a expressão da apol1, evitando que o SRA se ligue e neutralize a ação do fator tripanolítico(67). Com isto, a apol1 volta a exercer sua função tripanolítica, o que é uma vantagem evolutiva significativa nas regiões endêmicas de tripanossomíase, podendo explicar a alta prevalência das mutações G1 e G2

nestas regiões da África(20). A variante G2 é mais potente contra o *Trypanosoma rhodesiense* e também mais antiga do que a variante G1(23). Pela alta prevalência das variantes APOL1 no oeste da África, que são resistentes ao SRA e portanto conseguem matar o *Trypanosoma rhodesiense*, e a virtual ausência das variantes no leste da África (onde o mesmo *Trypanosoma rhodesiense* se encontra amplamente difundido), podemos concluir que o *Trypanosoma rhodesiense* foi eliminado em regiões onde as variantes estão presentes(68). A eliminação do *Trypanosoma rhodesiense* da África ocidental provavelmente deixou espaço para o domínio de outra espécie, o *Trypanosoma gambiense*, que resiste a apol1 por mecanismo diferente e, portanto, é imune ao efeito das variantes G1 e G2. Como as variantes surgiram há 10.000 anos, tempo relativamente curto em se tratando de frequência de alelos em populações, é possível que sua disseminação para o leste da África ainda não esteja completa(68). Na Figura 4, vemos como o *Trypanosoma rhodesiense* está restrito atualmente ao leste da África e a forte presença das variantes G1 e G2 no oeste da África. Percebemos também a alta incidência do *Trypanosossoma gambiense* (imune às variantes APOL1) no leste da África.

Figura 4 – Distribuição do *Trypanosossoma* e das variantes de risco



Fonte: World J Nephrol, 2015;4(2):295–306. Em colunas, a frequência de distribuição das variantes G1 e G2. A coloração dos países representa os números de casos de tripanossomíase (explicação no texto)

Resumindo, a batalha do hospedeiro (humanos) contra patógeno (*Trypanosoma*) resultou no desenvolvimento das mutações *G1* e *G2*, que proveram vantagem evolutiva aos seus portadores. Mas isto trouxe um incremento no risco de desenvolver DRC, conforme discutido a seguir.

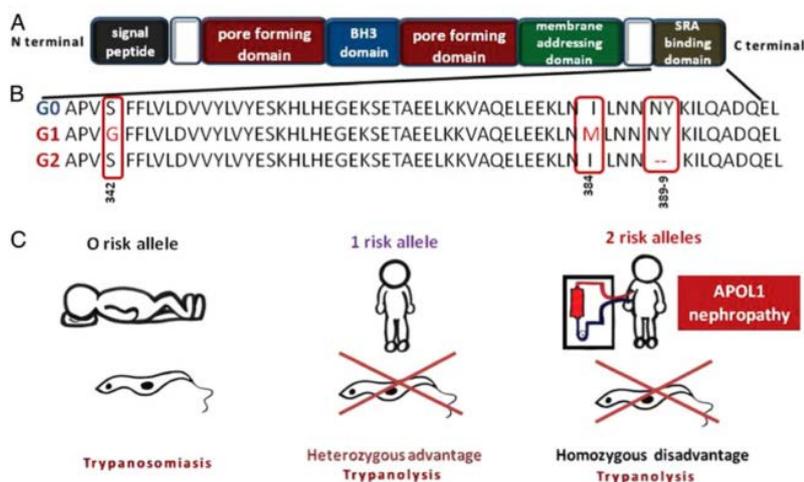
1.5 – TOXICIDADE DE *APOL1*, VARIANTES *G1* E *G2*

A função imune das variantes é dominante, ou seja, a presença de apenas um dos alelos (forma heterozigota, seja *G0/G1* ou *G0/G2*) é suficiente para conferir proteção contra o *Trypanosoma rhodesiense*. Já para o desenvolvimento da DRC é necessária a presença de dois alelos, na forma homozigota (*G1/G1* ou *G2/G2*) ou heterozigota composta (*G1/G2*)(28), conforme mostra a Figura 5. Isto é análogo à correlação existente entre a anemia falciforme e a proteção contra malária, outra doença endêmica africana: enquanto heterozigotos e homozigotos para a mutação da hemoglobina estão protegidos contra a malária, apenas homozigotos desenvolvem anemia falciforme(69). Este padrão de comportamento recessivo permite duas explicações possíveis: que a presença do *G0* protege contra a DRC (e que a mutação causa uma perda de função da proteína) ou que as variantes *G1* e *G2* causam DRC (por um ganho de função)(70). Contra a teoria da proteção fornecida pela variante *wild* (*G0*) está o fato do gene *APOL1* não parecer ser essencial para o funcionamento do rim, visto que foi identificado um humano homozigoto nulo para esse gene, que mantém função renal aparentemente normal, após vários anos de seguimento(71). Além disso, o gene *APOL1* não se encontra presente em todas as espécies de mamíferos, mas apenas em determinados primatas. Mesmo o animal com maior similaridade genética à espécie humana, o chimpanzé, não possui um alelo *APOL1* funcional(52), o que sugere que esse gene não é essencial em mamíferos(72). A segunda hipótese, o ganho de toxicidade pelas variantes, é a mais aceita atualmente, pois há evidência de efeitos citotóxicos das variantes *G1* e *G2* em vários modelos pesquisados(28). O entendimento da ação das variantes é dificultado pela ausência da proteína em modelos consagrados de estudo, como ratos, e pelo fato da própria *apol1* ser tóxica a células cultivadas, se estiver em concentrações suprafisiológicas, por diminuir viabilidade celular e aumentar morte celular(61)(73).

Três teorias foram propostas para explicar a discrepância entre este comportamento recessivo e o fato da *apol1* aparentemente não ser fundamental para o adequado funcionamento do rim de mamíferos. A primeira é que a dose-dependente exigida para as VAR terem efeito tóxico seja a presença de dois alelos mutantes, o que ocorre apenas na minoria dos casos. A segunda é que o risco para DRC em afrodescendentes pode na realidade ser outro gene ainda não descoberto, que não o *APOL1* (assim como no início se pensava ser o gene *MYH9*). Por fim, pode ser que um único alelo não mutante (G0) proteja do *second hit*, evitando que a doença seja desencadeada. Estudos recentes têm favorecido a primeira hipótese, ao mostrarem ganho de função (ou seja, toxicidade) pela presença das VAR(56)(72).

O risco para desenvolvimento de DRC não parece ter sido forte o suficiente para atuar como força contrária à seleção natural de ter proteção contra a doença do sono. Isto provavelmente é explicado pelo fato da DRC estar ligado à idade, quando geralmente já passou o período reprodutivo dos portadores, não exercendo mais desvantagem significativa para a seleção natural(68). Ambas variantes têm uma combinação incomum de alta prevalência e forte efeito, resultado da pressão seletiva ao longo dos séculos(74). As variantes *APOL1* são um exemplo incomum onde a mutação em um único gene é associada ao risco aumentado de uma doença complexa(14)(33).

Figura 5 – Padrão recessivo da nefropatia *APOL1*



Fonte: Kruzel-Davila, E., Wasser, W. G., Aviram, S., & Skorecki, K. (2016). *APOL1 nephropathy: From gene to mechanisms of kidney injury. Nephrology Dialysis Transplantation, 31*(3), 349–358.. Explicação no texto

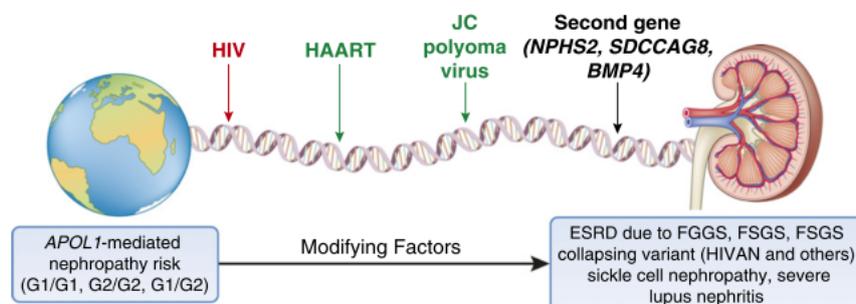
1.6 – “SECOND HIT”, UM FATOR ADICIONAL NECESSÁRIO PARA DESENVOLVIMENTO DA DRC

Comparadas com doenças de herança mendeliana, as nefropatias relacionadas às VAR têm relativamente baixa penetrância, ou seja, a maioria dos portadores dos alelos mutantes acaba não desenvolvendo o fenótipo da doença.(75) Isto leva a crer na necessidade de haver um fator de estresse adicional, um “*second hit*”. As variantes, portanto, são necessárias, porém insuficientes para desencadear a doença renal. As razões para essa penetrância incompleta ainda não são conhecidas e atualmente não é possível identificar os portadores das VAR com maior risco de desenvolver DRC. Parece haver relação com efeitos da imunidade inata, através de estímulos inflamatórios secundários a infecções, que podem ativar as variantes *APOL1* nos podócitos(72). Conforme explicado em detalhes mais adiante, o HIV é o fator ambiental de maior interação conhecida com as VAR(24), por induzir a produção de interferon. Isto estimularia a expressão do gene *APOL1* e a subsequente produção aumentada de suas variantes(56). Curiosamente, pesquisadores mostraram que afrodescendentes com as VAR e presença do poliomavírus JC na urina têm menor probabilidade de desenvolver doença renal do que aqueles sem a presença do mesmo(29). Por outro lado, conforme comentado anteriormente, o lúpus eritematoso sistêmico, doença crônica causadora de persistente estado inflamatório, também está fortemente associada às variantes *APOL1*(29). A Figura 6 faz um resumo.

Também foi visto nos portadores das VAR um aumento na expressão do gene *UBD*, responsável pela produção de proteínas envolvidas na degradação de proteínas celulares, através de um mecanismo independente da ubiquitina (44)(28). Este gene tem sua atividade aumentada através de altos níveis de fator de necrose tumoral-alfa e interferon-alfa. Com isto, as VAR podem servir como indutor de um estado pró-apoptótico e gerar um estado inflamatório exagerado em pacientes portadores das VAR com danos renais(76). Similar a outras proteínas do sistema imune, moléculas da *apol1* estão constantemente em circulação, porém sem efeito aparente, até o organismo se deparar com um patógeno que necessite da mesma para eliminação do agressor. Seguindo o mesmo raciocínio, a *apol1* expressa em podócitos e no túbulo contorcido

proximal pode não ter função aparente, até que um fator indutor a ative, provocando lesão induzida por ela(77).

Figura 6 – Possíveis *second hits* para nefropatia por *APOL1*



Fonte: Freedman BI, Skorecki K. Gene-gene and gene-environment interactions in apolipoprotein L1 gene-associated nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(11):2006–13. Explicação no texto.

1.7 – EFEITOS DA APOLIPROTEÍNA L1 NOS PODÓCITOS

O fato da apol1 ser a única proteína presente na circulação da família das apolipoproteínas confere a ela características únicas, como a proteção contra o SRA. Mas sua atuação em geral provavelmente está ligada à função das demais apolipoproteínas, que têm similaridades funcionais e estruturais com proteínas da família BCL2. Esta família de proteínas participa do controle de apoptose e autofagia celular(78). Em ratos, o *downregulation* (inibição) da autofagia em rins leva à esclerose senil dos podócitos, que é similar ao que ocorre em humanos com as VAR(79). Assim, é tentador propor que as variantes interfiram com a autofagia dos podócitos, levando com isso à glomeruloesclerose progressiva. Beckerman *et al.* mostraram que a expressão das VAR em podócitos de ratos causa doença renal, caracterizada por azotemia, albuminúria, glomeruloesclerose e apagamento podocitário(80). Já a expressão das variantes nos túbulos renais dos ratos não causou alterações renais, sugerindo o efeito tóxico das VAR ser específico nos podócitos, ao invés de uma toxicidade indiscriminada(80).

Estudos recentes mostraram também que em humanos ocorre uma redução na densidade podocitária associada ao envelhecimento. Em jovens, a densidade normal é acima de trezentos por $10^6 \mu\text{m}^3$, caindo para menos de

cem por $10^6 \mu\text{m}^3$ em indivíduos acima de setenta anos. Isso dá uma média de 0.9% de redução de densidade anual, semelhante à queda anual da função renal, que é de 0.8% por ano, após os cinquenta anos de idade(81). Isto explica por que a DRCT aumenta exponencialmente com a idade, sendo a idade o maior fator de risco para perda de função renal(82).

Para entender melhor os efeitos das variantes no rim, foram criados ratos geneticamente modificados com a presença da variante G2 (pela deleção de dois aminoácidos). Foi observado que os ratos com a mutação tinham podócitos com menor densidade(70). Para uma célula especializada como o podócito (responsável em manter a cobertura de toda superfície de filtração glomerular com seus processos podocitários), isso representa um importante desafio, que inevitavelmente ocasiona estresse em todo o sistema. Estes dados sugerem a hipótese de que afrodescendentes com as variantes tenham um inadequado número de podócitos para sua idade. Isto pode ser um fator de risco que predispõe a doenças glomerulares, caso ocorra uma nova injúria, que reduza a reserva de podócitos a ponto de comprometer sua função glomerular. Seguindo esse modelo, a sobrevivência de glomérulos em número suficiente ao longo da vida irá depender da perda cumulativa total de podócitos, do aumento do volume glomerular e da habilidade dos podócitos remanescentes de se adaptarem ao estresse resultante da queda da densidade de podócitos(82). Outro estudo em ratos foi conduzido recentemente por Beckerman *et al.*(80), no qual os autores mostraram que a doença renal (caracterizada por albuminúria, azotemia, glomeruloesclerose e apagamento dos processos podocitários) foi causada por expressão nos podócitos dos ratos das VAR (mas não da forma G0). O mesmo estudo também sugeriu que a toxicidade renal das VAR ocorre especificamente nos podócitos (ao invés de uma toxicidade difusa), ao mostrar que a expressão das VAR nos túbulos renais não resultou em doença renal, semelhante ao estudo de Beckerman(80).

Já em modelos humanos, Lan *et al.* mostraram em estudo recente que as VAR estão associadas a aumento na necrose podocitária, por falha na permeabilidade das membranas lisossomais(56). Estudos observacionais também têm mostrado relação entre diminuição na densidade podocitária e patologias renais, como nefropatia diabética, nefropatia do IgA, nefroesclerose hipertensiva e glomerulopatias do transplante(82). Modelos humanos

mostraram que, uma vez que ocorra perda acima de 40% da densidade dos podócitos, a doença glomerular se torna progressiva e irreversível, (independente da causa) por conta do estímulo à hipertrofia celular(83). Fica claro que há uma relação direta entre redução na densidade de podócitos (número por volume) e desenvolvimento de glomeruloesclerose(84).

Três mecanismos foram propostos para explicar essa redução de densidade. O primeiro deles é a hipertrofia dos glomérulos, que faz com que o mesmo número de podócitos seja responsável por uma superfície de filtração maior, até gerar um estresse que força os podócitos a se dividirem. Estudo morfológico realizado por Hoy *et al.* em afrodescendentes saudáveis com a presença das VAR mostrou que elas aumentaram a hipertrofia glomerular relacionada à idade nesses indivíduos, o que pode predispor a doenças renais(30). Mas para os podócitos realizarem essa divisão eles precisam alterar seu citoesqueleto de actina, o que impossibilita os mesmos de manterem sua função fisiológica, levando à ruptura dos podócitos, colapso do tufo glomerular e, por fim, GESF(85). O segundo mecanismo é a redução no número absoluto de podócitos, por morte ou ruptura celular. Já foi mostrado que podócitos de humanos e roedores podem se desprender do glomérulo sem morrer(86). Por fim, pode ocorrer a disfunção dos podócitos, quando os mesmos deixam de realizar sua função normal(82).

Pesquisa em humanos mostrou que os níveis de transcrição da apol1 foram significativamente mais elevados em glomérulos de pacientes com DRC quando comparados com os níveis de transcrição em glomérulos de indivíduos saudáveis(80). Apesar disto, há uma discrepância entre os níveis de moléculas apol1 encontradas em cortes histológicos de rins comparados com níveis de RNAm da apol1 nos mesmos podócitos. Freedman demonstrou ser possível uma absorção aumentada da apol1 por estes podócitos(87). Funcionalmente, as VAR mostraram prejudicar a respiração mitocondrial, comparados com a apol1 *wild type* (G0). Isso é compatível com a função tripanolítica da molécula, em que a apol1 causa despolarização nas mitocôndrias, resultando em fragmentação de DNA e ruptura endonuclear (marcadores de morte celular induzida)(88). Sabendo desta ligação extracelular da apol1 com moléculas HDL e que a mesma tem um domínio específico para ligação em membranas, Bruggeman *et al* sugeriram que uma vez intracelular, a apol1 também se ligue

a estruturas ou organelas contendo lipídios(77), podendo alterar seu funcionamento. E qualquer perturbação no tráfego endossomal pode se mostrar extremamente prejudicial para o adequado funcionamento dos podócitos, visto que para prevenir o entupimento da barreira de filtração é necessário que a regulação da fenda de filtração (através do citoesqueleto de actina, dependente desse tráfego endossomal) esteja em ordem(89)(90). Por fim, Lan *et al.* mostraram que as VAR parecem causar edema podocitário e redução da viabilidade celular em concentrações mais baixas comparadas com a forma *wild* (G0)(56).

1.8 – EFEITOS DA APOLIPOPROTEÍNA L1 CIRCULANTE

Pesquisadores mostraram que afrodescendentes têm níveis séricos mais elevados de apol1 comparados com outros grupos étnicos, podendo refletir uma produção aumentada ou depuração reduzida destas partículas. Foi provado também que a apol1 presente no rim pode ter origem tanto de síntese endógena quanto de fontes extracelulares, em rins saudáveis e doentes(60). Se altos níveis circulantes de apol1 fossem relacionados a maior risco de desenvolvimento de DRC, sua dosagem poderia ser utilizada como biomarcador para discriminar pacientes de alto risco entre portadores das variantes(28). Pesquisadores sugeriram então que a toxicidade das variantes genéticas poderia ser mais dependente da apol1 circulante do que da apol1 com expressão renal(28). Argumentos a favor desta hipótese incluem o fato da apol1 ser ligada a moléculas HDL, que são parcialmente filtradas pelos rins (sendo captadas inclusive pelos podócitos) e que moléculas de IgM (que também carregam apol1) podem contribuir para a fisiopatologia de algumas doenças glomerulares. Também pesa a favor desta teoria o fato da apol1 circulante ser a responsável pela destruição do tripanossoma, mostrando ter uma função sérica ativa(91).

Kozlitina *et al.* mostraram, porém, não haver relação entre níveis séricos de apol1 e desenvolvimento de DRC(28). Também não foi encontrada relação entre os níveis circulantes de apol1 e determinado fenótipo das VAR(59). Pelo contrário, estudos sugerem que a apol1 com expressão renal é mais importante para a patogênese renal do que a apol1 circulante. Ojo *et al.* mostraram que a sobrevida de um enxerto renal é menor em rins oriundos de pacientes com a

presença das variantes, independente do status *APOL1* do receptor(92). Juntos, esses dados fortemente sugerem a hipótese de que a *apol1* circulante não está envolvida na patogênese renal.

1.9 – *APOL1* E HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

O estudo MESA (*Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) mostrou não apenas que afrodescendentes têm maior risco de desenvolver hipertensão comparados com caucasianos (mesmo após ajustar os grupos para doenças clínicas, riscos socioeconômicos e fatores demográficos), como estão mais propensos a ter seus valores pressóricos acima da faixa terapêutica, quando tratados(93). Uma das possíveis explicações para esta discrepância racial está justamente na presença das VAR em afrodescendentes. Sabe-se que a *APOL1* está expressa não apenas em podócitos, mas também no endotélio vascular e nas células musculares lisas do rim(59). Outra evidência é a descrição de casos de pré-eclâmpsia e eclâmpsia em ratos transgênicos portadores das VAR(70). Existe ainda a possibilidade de efeito hipertensor direto através da piora de função renal, secundária por nefropatias associadas às VAR(94). Deve-se levar em conta também um estudo feito em participantes do estudo AASK (*African American Study of Kidney Disease and Hypertension*), mostrando haver um risco 42% menor de mortalidade em pacientes portadores das VAR recebendo controle rigoroso da pressão arterial, comparado com controle habitual(95), sugerindo haver uma associação entre HAS e as VAR. Chen, porém, discorda desta contribuição das VAR para a piora da hipertensão em afrodescendentes, sugerindo haver outros fatores ambientais ou genéticos responsáveis, ainda não descobertos(96).

1.10 – *APOL1* E O TRANSPLANTE RENAL

Análogo ao que ocorre no risco de desenvolvimento de DRCT, existe também uma disparidade racial na sobrevida de transplantes renais entre caucasianos e afrodescendentes(33)(91)(97). Estas diferenças foram atribuídas no passado a um maior risco imunológico (podendo levar a maiores taxas de rejeição aguda)(98), piores condições socioeconômicas(99), menor aderência terapêutica(100), reduzido acesso à Saúde(101) e maior número de comorbidades(102). Estudos recentes, porém, mostraram que as VAR podem

ser ao menos parte da explicação, tanto por aumentarem a prevalência de DCRT em afrodescendentes, quanto por diminuir a sobrevida do enxerto, conforme será visto a seguir.

Estudos em humanos e animais mostraram que hipertensão arterial e sensibilidade ao sal acompanham os enxertos renais e impactam diretamente o organismo do receptor(103). É possível com isso supor que alelos que aumentam o risco de nefropatia também acompanhem o enxerto no transplante renal. Reeves-Daniel *et al.* realizaram estudo com 136 enxertos de doadores cadáveres afrodescendentes e mostraram que o único fator a impactar a sobrevida dos enxertos após ajuste multivariável foi a presença das VAR. Eles também mostraram que a etnia do doador, desconsiderando a genotipagem *APOL1*, não teve impacto na sobrevida. Isso mostra que a pior evolução de enxertos oriundos de afrodescendentes se deve exclusivamente à presença das variantes *APOL1* e não à raça em si do doador. O mesmo estudo mostrou ainda que a histologia da maioria dos pacientes com as VAR que perderam a função do enxerto foi compatível com doenças associadas às variantes *APOL1* e que enxertos oriundos de portadores das VAR têm vinte meses menor sobrevida(91). Estudo subsequente, avaliando 675 enxertos de doadores afrodescendentes, novamente mostrou que a presença das VAR foi fator de risco independente para piora da sobrevida(97). Construindo em cima dessa linha de raciocínio, Freedman *et al.* mostraram que receptores afrodescendentes têm maior sobrevida do enxerto quando o doador não é afrodescendente(33). Enxertos com as VAR têm maior risco de perda precoce da função renal, porém estudos mostram que aqueles que funcionam acima de 3 anos tendem a funcionar adequadamente por períodos mais prolongados(33). Esta somatória de informações levou à sugestão de se genotipar os doadores afrodescendentes para melhor avaliação do potencial de sobrevida do enxerto e até trocar a variável “raça” por “status *APOL1*” no KDPI (*Kidney Donor Profile Index*), medida usada na alocação de órgãos nos EUA(104)(105). Além disso, uma mudança recente nos critérios de alocação de rins nos EUA pode contribuir para agravar ainda mais esta disparidade racial entre afrodescendentes e caucasianos, por aumentar a quantidade de receptores afrodescendentes recebendo enxertos de doadores da mesma raça (e concomitante reduzindo a quantidade de órgãos de doadores caucasianos

recebidos por este grupo), estando com isso mais expostos a rins de doadores com as VAR(106). Para piorar, além da menor sobrevida, estudos mostram que afrodescendentes também têm uma significativa disparidade no acesso ao transplante renal(107).

Mas ainda não existe um consenso sobre o assunto, até porque não se sabe o mecanismo da perda precoce desses enxertos. Poderia um monitoramento mais frequente das VAR em enxertos levar a uma melhor sobrevida desses enxertos e justificar o aumento de gastos com os testes genéticos? Além disso, saber da genotipagem do enxerto causaria de fato uma mudança na alocação desses órgãos, por serem eles de pior qualidade? Iriam essas medidas ao final melhorar o cuidado do paciente transplantado e a sobrevida do enxerto? Essas perguntas precisam ser discutidas adiante pela comunidade científica, já que uma decisão prematura de usar esses dados poderia levar a um tempo mais prolongado de espera na lista do transplante e diminuir as taxas de doação de enxertos vivos, como já acontece na população afrodescendente. Estudos realizados em outros países mostraram resultados conflitantes quanto à sobrevida do enxerto segundo a raça do doador, com Reino Unido e Brasil sugerindo piores resultados para doadores afrodescendentes(108) e Canadá e França mostrando não haver associação(109).

Para avaliar o impacto da genotipagem *APOL1* dos receptores na sobrevida do enxerto renal, Lee *et al.* estudaram 119 receptores afrodescendentes e mostraram que apesar de 49% terem as VAR, após cinco anos não houve diferença na função renal entre o grupo com as VAR e o grupo sem as VAR. Isso mostra que a genotipagem *APOL1* dos receptores não parece ter influência na sobrevida do enxerto(110). Chega-se à conclusão de que existe uma bem estabelecida pior sobrevida de enxertos oriundos de doadores afrodescendentes e que isto ocorre independente da etnia do receptor(92). Já no transplante hepático, por outro lado, estudo recente de Dorr *et al* mostrou não haver associação entre genotipagem *APOL1* do doador e sobrevida do enxerto(111).

Uma importante questão ainda não devidamente esclarecida é o impacto da genotipagem *APOL1* após nefrectomia em doadores vivos. Sabe-se que 0,10% dos caucasianos e 0,51% dos afrodescendentes doadores vivos

evoluem para DRCT com o passar dos anos(112) e supõe-se que este maior risco de evolução desfavorável em afrodescendentes reflita o maior risco de DRC que este grupo étnico apresenta na população em geral(113). Uma possibilidade seria então realizar a genotipagem *APOL1* pré-nefrectomia em potenciais doadores afrodescendentes. O bom senso sugere cuidado na doação vertical ascendente (filhos para pais) em afrodescendentes, já que estes filhos podem ter doença renal ainda não manifesta. Fato é que mais estudos clínicos são necessários para trazer clareza a este assunto. Interessante notar que se a genotipagem *APOL1* for o fator responsável pela pior sobrevida de enxertos oriundos de afrodescendentes (e não a etnia em si), as próprias fórmulas de avaliação de risco pré-transplante terão que ser refeitas(33). Já em relação a doadores cadáveres, sugere-se que a genotipagem *APOL1* seja realizada juntamente com os demais exames de rotina. A utilização dos enxertos com presença das variantes de risco seria indicada em situações onde doadores com critérios expandidos são adequados(33). Estas potenciais mudanças no *screening* devem ser analisadas com cuidado já que a causalidade com as VAR do *APOL1* não foi estabelecida, mas apenas que a presença das variantes é um fator de risco para determinadas doenças. Recomendar que doadores afrodescendentes com VAR não sejam doadores renais sem forte evidência de causalidade iria diminuir ainda mais o número de doadores vivos em indivíduos afrodescendentes.

Além disso, a relação entre doadores vivos e cadáveres entre a população afrodescendente e caucasiana é diferente. Cooper *et al.* avaliaram 1000 doadores e receptores renais, mostrando que afrodescendentes têm menor probabilidade de receber um rim de doadores não-relacionados (17% vs. 37%, $p=0.001$) e menor probabilidade de receber um rim do cônjuge (6% vs. 13%, $p=0.001$). Em contraste, doação de filhos para pais é mais frequente em afrodescendentes (33% vs. 15%, $p=0.0001$). Esses dados mostram haver chance aumentada de afrodescendentes receberem um órgão de familiares, possivelmente também carregadores das VAR(114).

1.11 – *APOL1* E RISCO CARDIOVASCULAR

Existe um bem estabelecido aumento de risco cardiovascular em pacientes com DRC, mesmo nas fases iniciais da doença(115), porém a explicação para este risco aumentado ainda é incerta. Há evidências de que o risco cardiovascular seja maior também na população afrodescendente em geral(116), o que poderia ser explicado por fatores socioeconômicos. Por outro lado, pacientes afrodescendentes em DRCT têm seu risco cardiovascular reduzido(117), fato que poderia ser explicado pelo efeito de sobrevivência, já que o risco de mortalidade elevada em fases anteriores da DRC acaba eliminando os indivíduos com risco cardiovascular mais elevado. Outra explicação plausível para este menor risco cardiovascular em afrodescendentes seria a influência das VAR, que são associadas a menores níveis de placas ateroscleróticas calcificadas em coronárias e carótidas (preditores de eventos cardiovasculares e de mortalidade)(47)(118). Corroborando esta hipótese, estudos mostram que afrodescendentes têm menores níveis destas placas ateroscleróticas calcificadas, apesar dos mais intensos fatores de risco tradicionais presentes nesta população (como hipertensão, albuminúria, níveis de LDL-colesterol e controle glicêmico em diabéticos)(119). As VAR também estão associadas a níveis mais elevados de HDL-colesterol, conhecido por seu fator protetor cardiovascular(120). A presença das VAR também parece ter um efeito protetor sobre a vasculatura cerebral, pois dados do estudo AA-DHS MIND, com 483 participantes, mostraram que a presença das VAR esteve associada com menor número de casos de doença de leucoencefalopatia(121).

O primeiro estudo a analisar diretamente o efeito das VAR sobre o risco cardiovascular não encontrou associação entre a presença das variantes e aumento de mortalidade, porém este estudo tinha baixo poder estatístico para conclusões, pela baixa taxa de mortalidade dos participantes(27). O estudo *Jackson Heart*, usando o mesmo modelo recessivo das variantes *APOL1*, mostrou haver aumento de duas vezes no risco de eventos cardiovasculares nos participantes com presença das VAR. O mesmo aumento de risco foi encontrado no estudo usando a população do *Women's Health Initiative*. Interessante notar neste estudo o fato de não haver associação entre as variantes e precursores de eventos cardiovasculares, como hipertrofia

ventricular esquerda, além de uma paradoxal diminuição na calcificação coronariana(47).

Dois novos estudos abordando o assunto chegaram a conclusões diferentes. O primeiro foi com dados do estudo SPRINT (*Systolic Blood Pressure Intervention Trial*), mostrando não haver relação entre o genótipo *APOL1* e história de revascularização coronariana, revascularização de carótidas ou infarto agudo do miocárdio. Este estudo confirmou apenas a relação das VAR com albuminúria e DRC(122). O segundo estudo fez análise dos dados do estudo AA-DHS (*African American-Diabetes Heart Study*) e mostrou que as VAR estão associadas a surpreendente redução do risco de mortalidade(118). Estas conclusões antagônicas em relação aos estudos iniciais podem ser explicadas por metodologias diferentes, porém mostram que mais dados são necessários sobre o tema. Também oferecendo evidências contra a associação das variantes *APOL1* e risco cardiovascular, numerosos estudos genômicos e de *admixture linkage mapping* não identificaram o cromossomo 22 (onde o gene *APOL1* se localiza) como locus para mecanismos de controle da pressão arterial. Isto sugere que as VAR provavelmente não contribuem para a hipertensão primária(30).

Será importante determinar uma possível associação entre a presença das variantes com aumento ou diminuição de risco cardiovascular pois isto influenciará diretamente na conduta clínica. Caso as VAR contribuam para o risco, o mesmo tratamento usado para retardar progressão da DRC ajudaria também a proteger o paciente do ponto de vista cardiovascular. Por outro lado, caso as variantes ofereçam diminuição de risco cardiovascular, existiria um conflito ao retardar a progressão da DRC e com isso indiretamente aumentar a incidência de eventos cardiovasculares. Fica clara a necessidade de novos estudos direcionados para esse tema, além de melhor entendimento dos mecanismos de ação da *APOL1*.

1.12 – *APOL1* E HIVAN

Em 2013 existiam em torno de 35 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo, sendo quase 25 milhões de pessoas apenas na África subsaariana. Desde o começo da epidemia do HIV, quase quarenta milhões de pessoas morreram pela doença. Em números

absolutos, é a segunda maior causa de mortalidade na era moderna (desde 1900), perdendo apenas da gripe de 1918 (que causou entre 50-100 milhões de mortes). A incidência vem diminuindo nos últimos anos e se concentrando em algumas áreas específicas, principalmente na África subsaariana, responsável por 70% dos novos casos. Pouco mais de 35% das pessoas infectadas pelo HIV recebem a terapia tríplice viral regularmente e a taxa de tratamento na África subsaariana é semelhante ao resto do mundo(123).

A HIVAN foi a primeira doença renal a ser descrita no paciente com HIV (em 1984) e também a primeira doença glomerular colapsante a ser descrita(124). Outras doenças renais associadas ao HIV incluem o complexo imune-HIV, a microangiopatia trombótica e desordens causadas pela toxicidade dos tratamentos antirretrovirais. A HIVAN se apresenta clinicamente com proteinúria e disfunção renal e patologicamente com GESF colapsante, dilatação microcística tubular e inflamação intersticial. Antes da vinda da terapia tríplice de alta potência (HAART), em 1995, a HIVAN ocorria entre 3-10% dos infectados pelo HIV, com predomínio na população afrodescendente. Sem a HAART, HIVAN costuma avançar rapidamente para DRCT. Nos EUA, após introdução do esquema HAART, ocorreu redução de 60% no risco de evolução para DRCT em pacientes com HIVAN(123). Lescure *et al.* mostraram inclusive mudança no predomínio de nefropatia após a introdução do esquema HAART, deixando de ser a forma GESF colapsante e passando para formas de GESF não-colapsantes(125). Já a nefropatia induzida pela nefrotoxicidade medicamentosa contra o HIV é um problema cada vez mais sério, podendo ocorrer mesmo em pacientes com a função previamente normal(126).

Desde o início da descrição da HIVAN ficou claro que pacientes afrodescendentes eram mais acometidos do que pacientes de outras etnias. Sabe-se agora que esta predisposição genética ocorre por associação com as mutações *G1* e *G2* do gene *APOL1*(20). Esta relação entre HIVAN e as VAR é tão direta que países como a Etiópia, onde as variantes praticamente não são encontradas, têm baixíssima prevalência de HIVAN(127). Em pacientes com HIV da África subsaariana, a HIVAN representa a patologia renal mais frequente e também a principal causa de mortalidade em pacientes sem tratamento antirretroviral(128). Kopp *et al.* mostraram que, sem tratamento, 50% dos afrodescendentes soropositivos com as VAR desenvolvem

HIVAN(24), fazendo do HIV o fator ambiental de maior interação com as variantes de risco. Uma explicação possível é que o HIV induza a produção de interferon, estimulando com isto a expressão do gene *APOL1* e a subsequente produção aumentada de suas variantes(56). Para fortalecer esta hipótese, Nichols *et al.* mostraram que pacientes afrodescendentes portadores das VAR, quando submetidos a tratamento com interferon, desenvolveram GESF colapsante(72). Foi visto também que a molécula Toll-like receptor 3 (TLR3), que funciona como agonista do interferon, aumenta a expressão de *apol1* em podócitos e células endoteliais(72). Uma questão a ser elucidada é o fato de 10% dos pacientes afrodescendentes com HIVAN não terem nenhum alelo de risco, além de 20% carregarem apenas um alelo(24). É preciso entender quais fatores protegem indivíduos infectados pelo HIV e portadores das VAR de evoluírem para HIVAN.

Outra questão em aberto é como as VAR aumentam a frequência de GESF colapsante, visto que essa doença é conhecida por sua característica de lesão proliferativa com aumento de células glomerulares, enquanto o esperado efeito das VAR seria uma lesão citopênica por causarem morte celular(129). Três possíveis explicações: a) as variantes *APOL1* estão aumentadas em células parietais glomerulares ou outros potenciais predecessores dos podócitos, resultando em hipertrofia dessas linhagens e interferindo na sua habilidade de substituir podócitos doentes; b) ocorrem efeitos parácrinos secundários à expressão *APOL1* entre as células endoteliais glomerulares e os podócitos(130); c) citocinas Th1 que estimulam secreção de *APOL1* têm efeitos independentes em podócitos e células endoteliais.

1.13 – UTILIDADE FUTURA

Percebe-se uma importância cada vez maior das VAR no desenvolvimento de nefropatias na população afrodescendente, ficando claro que uma miríade de doenças antes desconexas é na realidade um espectro da mesma doença. A descoberta das VAR sugere que a era da “Medicina Precisa” também chegou à Nefrologia, com a identificação de mutações genéticas específicas causando doenças com alta prevalência, como as VAR. Um dos objetivos dessa nova fase na Nefrologia será determinar biomarcadores para prever com mais acurácia o prognóstico da função renal do que os

atualmente utilizados, como creatinina e albuminúria(131). Um exemplo é a menor mortalidade nos pacientes com as VAR submetidos a controle pressórico rigoroso(95). A Organização Mundial de Saúde inclusive mudou seu foco recentemente de doenças contagiosas para doenças com suscetibilidade genética, tendo como alvo descobrir terapêuticas que possam evitar gatilhos ambientais desencadeadores em indivíduos suscetíveis(132).

Também está claro que a categorização genérica de um indivíduo dentro de determinada raça tem menor valor do que a determinação de sua ancestralidade genética(104), como mostram os estudos no Transplante Renal. Nesta área também há a expectativa da cada vez melhor alocação e estimativa de sobrevida de órgãos(133). Porém é importante frisar que realizar *screening* de rotina em pacientes negros com DRC ainda não é recomendado, por não haver terapêutica eficaz para o grupo de risco(134). Mas certamente deverá se prestar cada vez mais atenção na menor sobrevida de rins oriundos de doadores com as VAR.

Uma área com grande crescimento na pesquisa sobre o assunto são possibilidades terapêuticas para os portadores das variantes genéticas. Um possível recurso terapêutico foi descrito por Beckerman *et al.*, que mostraram haver diminuição da citotoxicidade induzida pelas VAR com inibidores específicos da caspase 1. Eles concluíram haver possibilidade de outros inibidores de interleucina-1, ou inibidores de morte celular, também funcionarem de maneira similar(80). Certo é que novas pesquisas são necessárias nesta área para determinar não apenas a melhor utilidade clínica para a pesquisa das VAR, mas também possibilitar uma abordagem terapêutica em relação ao risco que as VAR oferecem aos portadores. Chave nesse processo será o melhor entendimento de quais *second hits* desencadeiam a nefropatia nos portadores, visto que apenas uma minoria deles desenvolve nefropatias.

2 – JUSTIFICATIVA

Estudos sugerem que as variantes do gene *APOL1* estão implicadas na maior prevalência de afrodescendentes na população dialítica, comparados com caucasianos. Pelo nosso conhecimento, não existem estudos mostrando presença das VAR do gene *APOL1* no Brasil.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a prevalência de variantes do gene *APOL1* em uma amostra de pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil.

3.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Verificar a associação entre a presença de variantes do gene *APOL1* e o tempo entre o diagnóstico da doença renal crônica e o início do tratamento dialítico.
- Verificar se há associação entre a presença de variantes do gene *APOL1* e a nefropatia diabética.
- Verificar a prevalência de variantes do gene *APOL1* em familiares de pacientes afrodescendentes com DRCT.

4. MÉTODOS

4.1 – DESENHO DO ESTUDO

Nosso estudo foi realizado em dois estados do Brasil: Paraná e Alagoas. Foram incluídos no estudo pacientes que se autodenominaram negros, pardos (sendo então classificados como afrodescendentes) ou que indicaram terem pais ou avós afrodescendentes, em tratamento dialítico crônico nas seguintes clínicas de diálise: Clínica Evangélico SC Ltda., Clínica de Doenças Renais SC Ltda., Clínica de Diálise Cajuru Ltda e Clínica de Diálise Campo Largo Ltda. (no Paraná); e Instituto de Nefrologia Ribamar Vaz (localizado no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Maceió), Clínica de Doenças Renais Sanatório e Clínica de Doenças Renais Palmeira dos Índios (em Alagoas). Os pacientes dialíticos foram abordados dentro das clínicas de diálise, sendo coletada história clínica direcionada e realizado exame físico, com determinação da pressão arterial, peso e altura. Foram acessados dados do prontuário médico nas respectivas clínicas de diálise para complementação de informações, como valor da altura e do peso de cada participante. Esse acesso foi realizado apenas pelo pesquisador ou por sua enfermeira assistente, garantindo com isso o sigilo e a confidencialidade da identidade do participante. Foram excluídos do estudo pacientes com menos de 18 anos de idade, pacientes que se autodenominaram outra raça que não parda ou negra ou caucasianos que não indicaram serem afrodescendentes por parte de pais ou avós ou ainda que relataram serem descendentes de indígenas. Com isto praticamente não houve participação no estudo de pessoas de outras raças, como indígena e asiática. Também foram excluídos do estudo pacientes que se recusaram a assinar o termo de consentimento, pacientes com DRCT por doenças congênitas, por doenças monogênicas (como Doença Autossômica Policística Renal ou doença de Alport), por uropatias obstrutivas, portadores de hipertensão acelerada maligna e casos suspeitos de hipertensão secundária. Todos participantes do estudo estavam em programa de diálise crônica, ou seja, já tinham recebido o diagnóstico de falência renal e necessidade de terapia substitutiva renal pelos respectivos médicos assistentes. Critérios clássicos para indicação de hemodiálise são hipercalemia ou acidose refratárias, sintomas urêmicos ou sobrecarga volêmica sem resposta a diureticoterapia. Mas a indicação para cada participante ter iniciado a diálise crônica não foi

avaliada neste estudo. Dos pacientes recrutados para o estudo, foi coletada amostra de aproximadamente sete mililitros (7ml) de sangue durante a sessão de hemodiálise para análise genética e determinação da presença ou não da variante do gene *APOL1*. O motivo de incluirmos apenas pacientes com DRCT foi a forte associação estatística entre as variantes genéticas e doenças altamente prevalentes nesta população, como GESF, nefrosclerose hipertensiva, nefrite lúpica e HIVAN. Foi coletado também o valor da pressão arterial do paciente participante do estudo, utilizando sempre a primeira medida realizada durante a sessão de hemodiálise.

Foi incluído no estudo um grupo controle composto por familiares dos pacientes dialíticos das clínicas participantes da pesquisa, alcançados por contato telefônico ou convites entregues nas clínicas. Esses familiares foram convidados para realizar a coleta de amostra de sangue numa data específica, sendo também coletada história clínica direcionada e realizado exame físico, com determinação de pressão arterial, peso e altura. Nesse grupo também foram excluídos os familiares com menos de dezoito anos de idade ou que se recusaram a assinar o termo de consentimento. Foi coletada então uma amostra de aproximadamente dez mililitros (10ml) de sangue, pois além da amostra para análise genética para determinar a presença ou não da variante do gene *APOL1*, foi determinado também o valor da creatinina sérica (pelo método JAFÉ, para cálculo da taxa de função glomerular do participante, através da fórmula do MDRD) e determinação da hemoglobina glicada (método HPLC, para determinação de possível diabetes mellitus). Foi coletada nesse grupo ainda amostra urinária para determinar relação albumina/creatinina (método turbidimetria, para diagnóstico de lesão renal).

Todos exames genéticos foram realizados no Beth Israel Deaconess Medical Center em Boston (EUA) pelo pesquisador principal e pelo Dr. Cristian Riella, da equipe do Dr. Martin Pollak. Os participantes foram avisados sobre o período de espera de alguns meses entre a coleta das amostras e o resultado final da análise genética, visto que estes exames foram realizado no exterior. As amostras foram enviadas ao exterior através de agência especializada, seguindo protocolos específicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em temperatura congelada, para preservação do material biológico. Os demais exames (hemoglobina glicada, creatinina sérica e relação

albumina/creatinina urinária) foram realizados no Laboratório Scribner (amostras do Paraná) e no laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Maceió (amostras de Alagoas). Nenhuma amostra sanguínea foi armazenada após a conclusão da pesquisa, tanto no Brasil quanto no exterior, sendo, portanto, todas amostras descartadas.

4.2 – CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

Conforme descrito acima, até onde temos conhecimento, não existem estudos mostrando a presença das VAR no Brasil (ou mesmo na América Latina). O único especificamente realizado para a pesquisa das mesmas foi feito em duas tribos indígenas (24), com 49 participantes, sem resultados positivos. Isso é condizente com a literatura, que relata as VAR serem encontradas apenas em afrodescendentes. Nosso objetivo então foi recrutar o maior número possível de participantes com alta probabilidade de serem portadores das VAR (afrodescendentes com doença renal crônica estabelecida, excluindo participantes com doenças sem relação com o gene *APOL1*). Dividimos o estudo em duas fases, Curitiba e Maceió. Na 1ª fase coletamos amostras de 95 pacientes e 96 familiares, enquanto na 2ª fase foram coletadas amostras de 179 pacientes e de 73 familiares. Ao todo no estudo foram incluídos 274 pacientes e 169 familiares, somando 443 amostras. Como comparação, foram analisadas amostras de 49 participantes no estudo em tribos indígenas brasileiras, 234 no estudo em aborígenes australianos e 159 no estudo com portadores de DRC na Índia.

4.3 – TERMO DE CONSENTIMENTO E QUESTIONÁRIO

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi entregue a todos os participantes do estudo, explicando o objetivo da pesquisa, os procedimentos a serem realizados e seus potenciais riscos. Constam no TCLE também os benefícios resultantes do projeto aos participantes da pesquisa, como a possível identificação de uma predisposição a uma doença renal grave, assim como a determinação do estado atual da função renal dos familiares, além de contribuir com a pesquisa clínica em andamento. Possíveis riscos da pesquisa incluem o desconforto do participante em preencher o questionário proposto e o TCLE, o que foi minimizado através da explicação cuidadosa por

parte do pesquisador sobre o significado desses documentos e a disposição do mesmo em esclarecer quaisquer dúvidas que surgissem no processo. Também existem riscos inerentes à coleta de sangue, como dor durante a coleta e hematomas após. Para amenizar este risco foi coletado sangue dos pacientes dialíticos durante a sessão de hemodiálise, evitando uma picada adicional àquela que o paciente já se submeteria na sessão de diálise. Para amenizar os riscos relacionados à coleta nos familiares, a mesma foi feita por profissional da área de saúde experiente, em local apropriado, com amplo e irrestrito acesso a atendimento médico, caso algum dos sintomas aparecesse. Seria possível ainda que familiares sem doença prévia conhecida descubram através da pesquisa serem portadores de doença renal e que isso cause desconforto psicológico nos mesmos. Para amenizar isto, o pesquisador esteve à disposição dos participantes durante toda a extensão da pesquisa para responder perguntas e dar orientações médicas de acordo com a literatura médica vigente. Quando detectadas alterações importantes nos exames laboratoriais, foi feito encaminhamento dos participantes para acompanhamento em ambulatório específico. Como houve coleta de sangue de dois grupos de participantes diferentes, foram elaboradas duas versões do TCLE, uma para o paciente dialítico e outra para seu familiar. No TCLE constou a quantidade de sangue coletado em medidas caseiras para facilitar entendimento do participante. O TCLE foi preenchido em duas vias igualmente válidas, rubricadas em todas as páginas e assinadas no final, sendo retida uma via com o pesquisador responsável e outra entregue ao participante da pesquisa. Foi também garantida indenização ao participante da pesquisa em caso de danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios em decorrência de sua participação no estudo. Consta no TCLE que os resultados do estudo serão divulgados para os participantes da pesquisa nas instituições onde os dados foram obtidos. Consta ainda que, ao final da pesquisa, os resultados da pesquisa serão encaminhados para publicação, com os devidos créditos aos autores da pesquisa. Naqueles pacientes que não sabiam ou não podiam assinar, foi coletada a digital.

Todos os participantes preencheram um questionário sobre dados pessoais como nome, idade, gênero, cidade de moradia, grau de escolaridade, renda familiar estimada e raça (autodenominada); dados clínicos

como causa da DRCT, idade do diagnóstico, idade do início da hemodiálise e possíveis comorbidades; e dados do exame físico, como pressão arterial, peso e altura (para cálculo do índice de massa corporal).

4.4 – ANÁLISE GENÉTICA

Transporte

Para manter a viabilidade da amostra, foi necessário manter controle térmico durante todas as etapas da pesquisa, da coleta até a chegada ao destino final. Logo após a coleta, o sangue do participante foi colocado em local refrigerado e mantido em congeladores dos laboratórios Scribner e da Santa Casa de Misericórdia de Maceió. Quando todas as coletas foram realizadas e a aprovação para transporte emitida pela ANVISA, as amostras foram transportadas por empresa especializada (WorldCourier®), em recipientes adequados (com termômetro e cubos de gelo para assegurar a adequada refrigeração) e seguindo normas estabelecidas pela ANVISA. Considerando que o destino final das amostras foi Boston, cidade sem conexões aéreas diretas do Brasil, foi necessária atenção redobrada da equipe para assegurar a viabilidade das amostras durante o percurso. As amostras permanecem viáveis por semanas em temperatura de -20 graus, mas até anos se mantidas congeladas a -80 graus.

Para possibilitar adequado funcionamento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizada na leitura das amostras, é necessário evitar o uso de heparina como anticoagulante nas amostras de sangue, pois ela apresenta propriedades inibitórias sobre o método. Em nosso estudo, utilizamos como anticoagulante o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). A técnica da PCR tem sido amplamente empregada em estudos moleculares, por permitir amplificar *in vitro* regiões específicas do genoma de qualquer organismo com relativa facilidade, amplificar sequências de DNA e analisar a diversidade genética de populações (como em nosso estudo). Para tanto, é necessário seguir um protocolo pré-definido em todas as fases do processo, para aproveitamento correto das amostras biológicas e evitar contaminações ou falsas leituras no final. Estes protocolos são disponibilizados junto com os kits comerciais, comprados para nosso estudo na Alemanha (empresa Quiagen®).

Extração do DNA

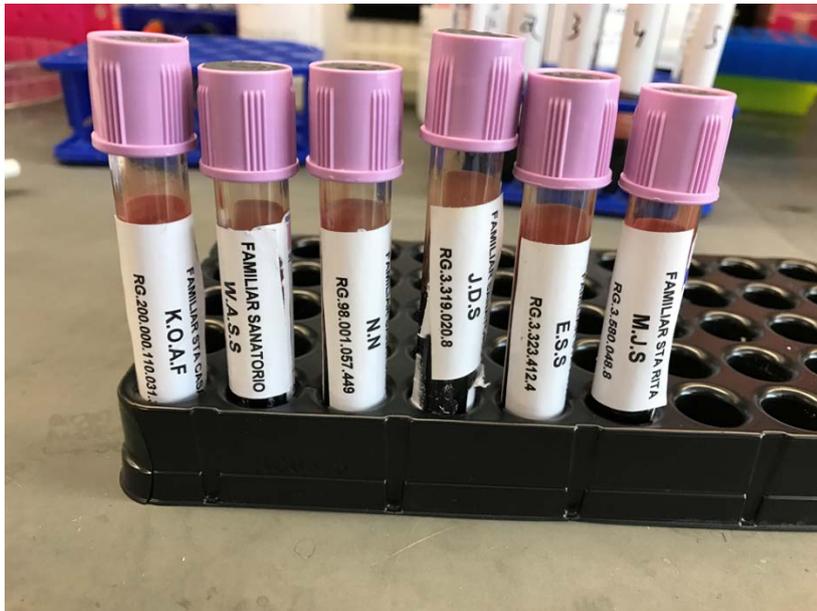
O DNA se apresenta em nosso organismo como dupla fita, sendo muito resistente e se mantendo sem alterações em várias condições físicas, devido à ligação entre as duas cadeias de nucleotídeos por pontes de nucleotídeos. Para extrair o DNA das células sanguíneas e purificar o material genético obtido dos restos celulares e das demais proteínas da amostra, são utilizados uma série de passos com enzimas, soluções-tampões e centrifugadoras, conforme descrito a seguir. A composição exata dos tampões inclusos no kit não é fornecida pela empresa, portanto, mais do que entender especificamente a função de cada etapa do processo, é necessário seguir estritamente o protocolo sugerido, a fim de se obter o resultado final esperado.

Antes de iniciar o processamento das amostras, alguns cuidados são importantes para diminuir riscos de contaminação das amostras no momento da análise, como: utilizar sala de laboratório, bancada e materiais específicos para este fim; limpar a bancada e todo o material utilizado repetidamente com soluções que degradem possível material genético contaminante (em nosso estudo, utilizamos a solução *DNA ZAP*®); utilizar sempre luvas (para evitar degradação por nucleases, enzimas presentes em fluidos corporais e que podem estar presentes nas mãos), avental e jaleco. Também é necessário trazer as amostras que serão processadas da temperatura congelada para temperatura ambiente. Isto pode ser feito por simples retirada da amostra do freezer e exposição a temperatura ambiente ou acelerado através de 10 minutos de banho-maria a 37 graus. Durante o processo também é necessário checar repetidas vezes se há correta vedação dos frascos, visto que há um contínuo abrir e fechar dos mesmos para acrescentar reagentes e os mesmos são colocados em misturadores e banhos em água quente.

A sequência das amostras a serem processadas foi escolhida de maneira aleatória entre o *pool* de amostras do freezer, sem distinção entre pacientes ou familiares (Figura 7). Uma vez retirada do freezer, a amostra recebia uma numeração, que foi anotada num livro-controle com o nome completo e número de identidade do respectivo paciente (Figuras 8 e 9). Esta numeração serviu como substituto ao nome por extenso durante todas as etapas do processamento, sendo ao final da leitura novamente convertida no nome do participante, através de conferência com o livro-controle. Isto serviu

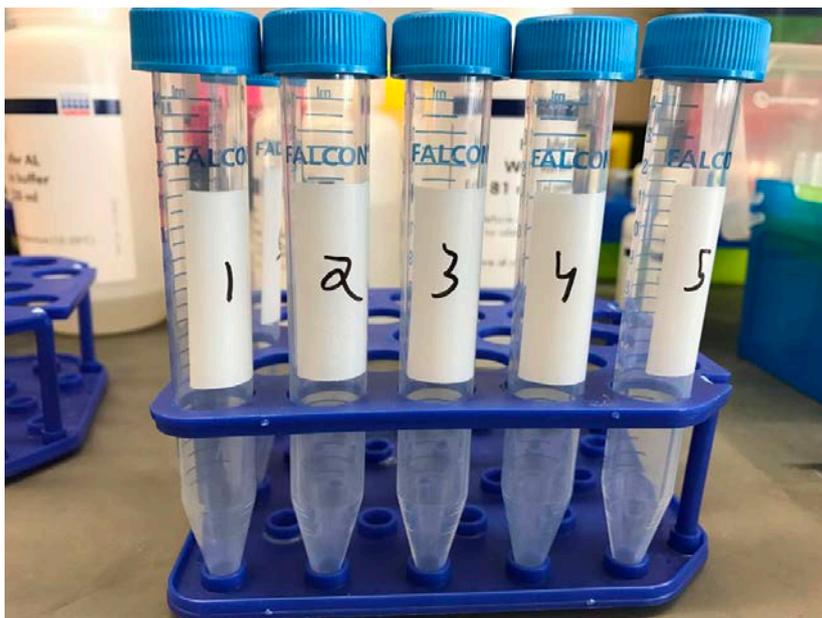
para facilitar a logística com os tubos (por dispensar a escrita por extenso do nome do participante em cada etapa) e também para garantir a cegueira do pesquisador em relação à amostra que estava sendo processada, garantindo o mesmo cuidado e atenção dispensados às amostras de todos os participantes.

Figura 7 – Escolha aleatória das amostras a serem processadas



Fonte: o autor

Figura 8 – Numeração substituindo os nomes dos participantes



Fonte: o autor

Figura 9 – Livro-controle das amostras

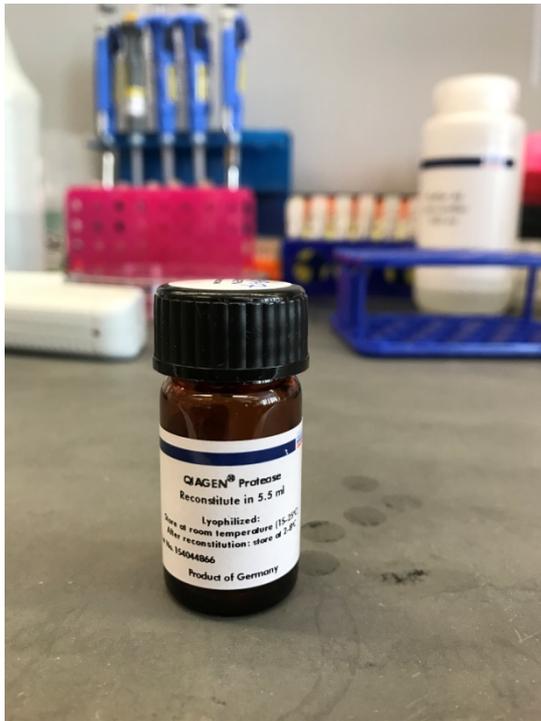
98	DNA TUBE	INITIALS	ID# (BRAZIL)	SAMPLE	CC
	103 BR 328	3	MMSL	980137289-1	
	100 BR 329	4	SMRM	122137-4	
	101 BR 330	5	JGC	246229	
	102 BR 331	6	JEB5	445355	
	103 BR 332	7	QSS	550776-9	
	104 BR 333	8	FMS	164481-7	
	105 BR 334	9	DBS	5377170	
	106 BR 335	10	JVS	60678	
	107 BR 336	11	JLB	208221	
	108 BR 337	12	LIS	234005	
	109 BR 338	1	HCO	98001012755	
	110 BR 339	2	AUS	229043	
	111 BR 340	3	FRCS	1758491	
	112 BR 341	4	JACL	823432	
	113 BR 342	5	JMS	98001342725	
	114 BR 343	6	ALMA	123384-0	
	115 BR 344	7	RS	183418-6	
	116 BR 345	8	MCS	1022030	
	117 BR 346	9	GFC	2001001301050	
	118 BR 347	10	JTOS	3840886-4	
	119 BR 348	11	JSG	47157	
	120 BR 349	12	DAS	1798248	
	121 BR 350	1	DBS	1721197	
	122 BR 351	2	PSGM	1240430247	
	123 BR 352	3	EAT	1640435	
	124 BR 353	4	EMB	1602897	
	125 BR 354	5	JLBS	2003001145210	
	126 BR 355	6	JGCA	31771978	
	127 BR 356	7	JJS	1702071	
	128 BR 357	8	FMA	308026	
	129 BR 358	9	JVL	126934	
	130 BR 359	10	JRS	1324981	
	131 BR 360	11	MCSG	1956567	
	132 BR 361	12	JS	1533449	
	133 BR 362	13	JMR	34210237	
	134 BR 363	14	SMS	278908	
	135 BR 364	1	VSL	1522032	
	136 BR 365	2	SESS	783758	
	137 BR 366	3	JFM	30464188	
	138 BR 367	4	MCS	973828	
	139 BR 368	5	MASR	446605	
	140 BR 369	6			

Fonte: o autor

A primeira etapa na extração do DNA foi a **lise das proteínas**, através de proteases, enzimas responsáveis por quebrar ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. O objetivo é eliminar todas as proteínas das amostras, deixando apenas o material genético a ser analisado. A protease utilizada em nosso estudo foi a proteinase K (QIAGEN protease®, Figura 10), comprada separadamente e, uma vez aberta, mantida em temperatura refrigerada, com tempo de validade limitado, para garantir sua eficácia. Esta enzima é completamente livre de qualquer atividade lítica no DNA. Pipetamos 200ul da protease em um tubo FALCON® de 15ml, para em seguida acrescentar 2ml da amostra sanguínea do paciente. Tomamos o cuidado de ter apenas um tubo FALCON® aberto por vez, para não correr o risco de ocorrer contaminações de material genético entre os tubos. A mistura protease com o sangue foi misturada manualmente. Na sequência acrescentamos o buffer AL (Figura 10), que ajuda na lise celular, fazendo nova mistura manual (através de

15 inversões de cada tubo) e em seguida colocando o tubo em um agitador de tubos (Vortex®, Figura 11), por 1 minuto, na potência máxima. Para otimizar a ação de digestão da amostra pelas proteases, colocamos a mistura então em banho-maria a 70 graus, por 10 minutos (Figura 11).

Figura 10 – Proteinase K e buffer AL (para lise das proteínas da amostra)



Fonte: o autor

Figura 11 – Misturador de tubos e banho-maria digital



Fonte: o autor e www.prolab.com.br, acessado em 10/11/2017

A segunda etapa foi a **depuração da amostra**, que consiste em lisar as hemácias (que não têm DNA por serem anucleadas) e lavagem da amostra. O etanol absoluto (100%) induz as moléculas de DNA dos glóbulos brancos e das plaquetas a se agregarem e precipitarem, além de ter função purificadora, por remover resíduos da amostra. Acrescentamos 2ml de etanol em cada tubo (após retirada do banho-maria), invertemos manualmente 10 vezes e colocamos no agitador de tubos novamente por 1 minuto.

A terceira etapa foi a **ligação do material genético** na coluna de sílica de rotação. Para isso transferimos primeiro metade do conteúdo de cada tubo FALCON® para uma coluna de rotação, cuidando para não sujar as bordas do mesmo. Mesmo pequenas quantidades da amostra fora do local determinado podem sujar a centrifugadora de maneira importante, pela alta quantidade de rotações por minuto (rpm) por ela realizada. Utilizamos em nosso estudo a centrífuga da marca Eppendorf®, modelo 5804 R (Figura 12). Rodamos as amostras por 3 minutos, em velocidade de 3000rpm, em temperatura ambiente. Sempre que colocamos tubos na centrífuga o fizemos de modo pareado e simétrico, para que haja um equilíbrio de forças entre os tubos. Isso diminuiu o risco de acidentes durante as rotações em altas velocidades. Descartamos então o filtrado resultante (mantendo a coluna de rotação) e acrescentamos a outra metade da amostra, repetindo a centrifugação por mais 3 minutos, nas mesmas condições. O material genético é proveniente das plaquetas e leucócitos, já que o plasma e hemácias não têm núcleo.

Figura 12 – Centrifugadora e colunas de rotação



Fonte: o autor

A quarta etapa foi a **remoção das impurezas residuais** do material genético, que indesejavelmente tenha se ligado à coluna de sílica, através de dois buffers do tipo *wash-out* (AW1 e AW2, Figura 13). Acrescentamos primeiro 2ml do buffer AW1 na coluna de rotação, levando à centrifugadora por 1 minuto a 5000rpm. Em seguida, sem remover o filtrado, acrescentamos 2ml do buffer AW2, levando para centrifugar novamente a 5000rpm, porém desta vez por 15 minutos. Estes melhoram significativamente a pureza do DNA obtido,

garantindo completa eliminação de qualquer contaminante residual, sem afetar o DNA. Passamos então a coluna de sílica, com o material genético e sem impurezas, para um tubo limpo (Figura 14).

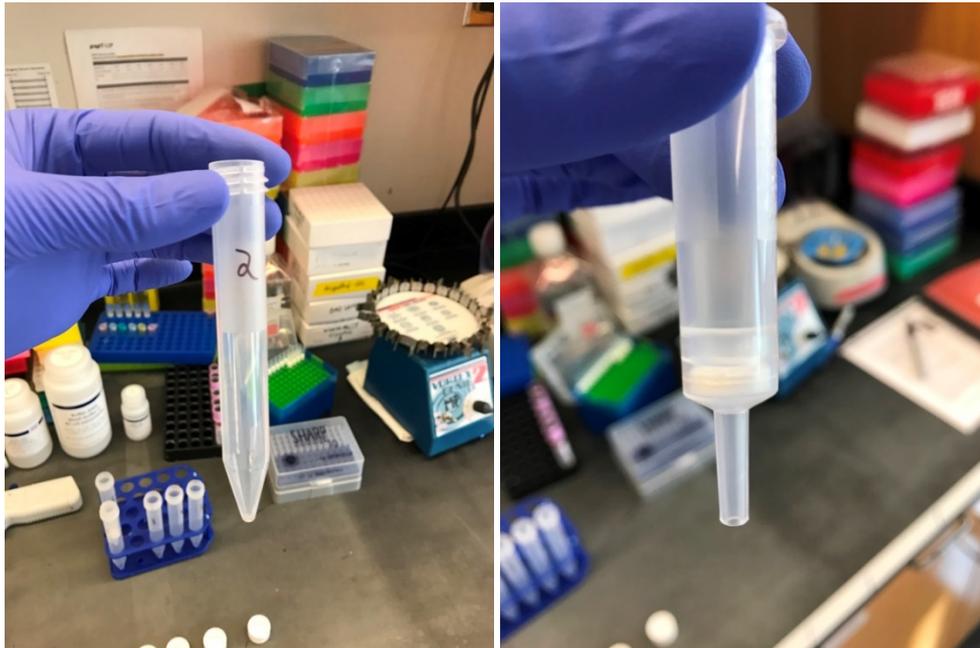
A quinta etapa foi a **eluição do DNA purificado** da coluna de rotação para uma forma concentrada passível de ser armazenada. Para esta etapa pode-se utilizar água ou, no nosso caso, 300ul do buffer AE (Figura 15). Acrescentamos o buffer na coluna de rotação, deixando incubar a mistura por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida levamos para a centrifugadora por mais 5 minutos a 5000rpm. O filtrado resultante foi então colocado em novo frasco, numerado de acordo com a codificação utilizada no livro-controle.

Figura 13 – *Wash-outs* para remoção das impurezas residuais



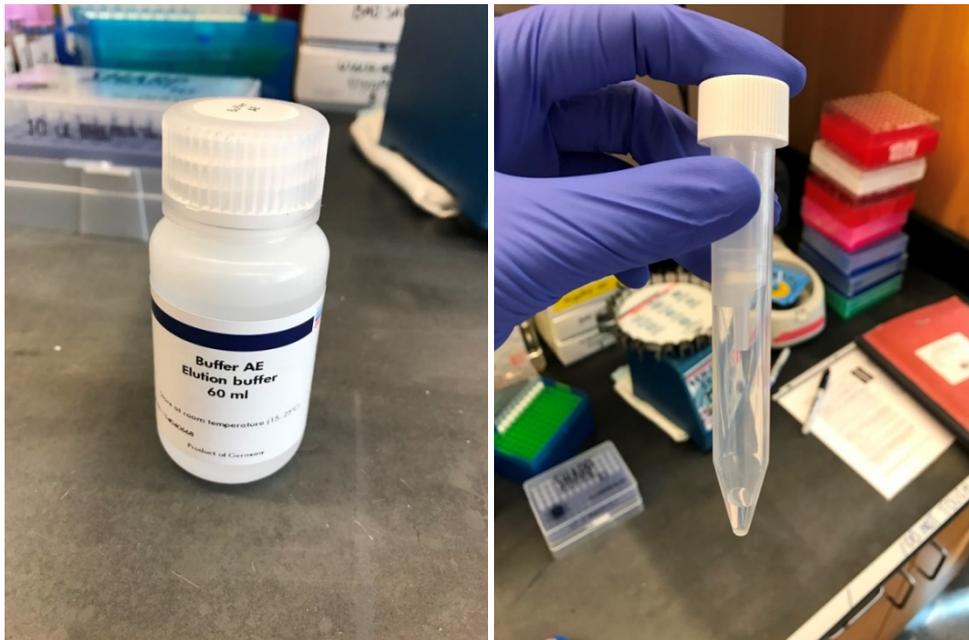
Fonte: o autor

Figura 14 – Transferência das colunas de rotação para tubos limpos



Fonte: o autor

Figura 15 – Eluição do DNA purificado

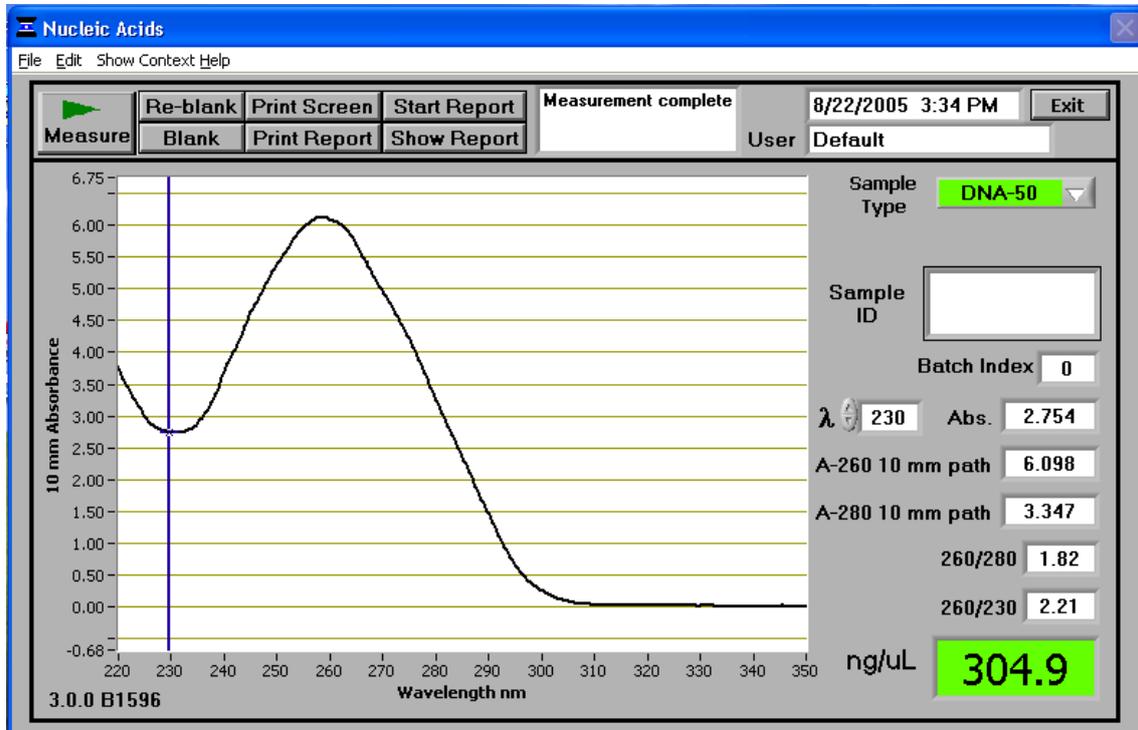


Fonte: o autor

A sexta etapa foi o **controle de qualidade da extração do material genético**, para confirmar a correta execução do método e extração adequada de DNA. Para isso, medimos a concentração de material genético através de espectrofotometria no NanoDrop®, aparelho que necessita de ínfimas

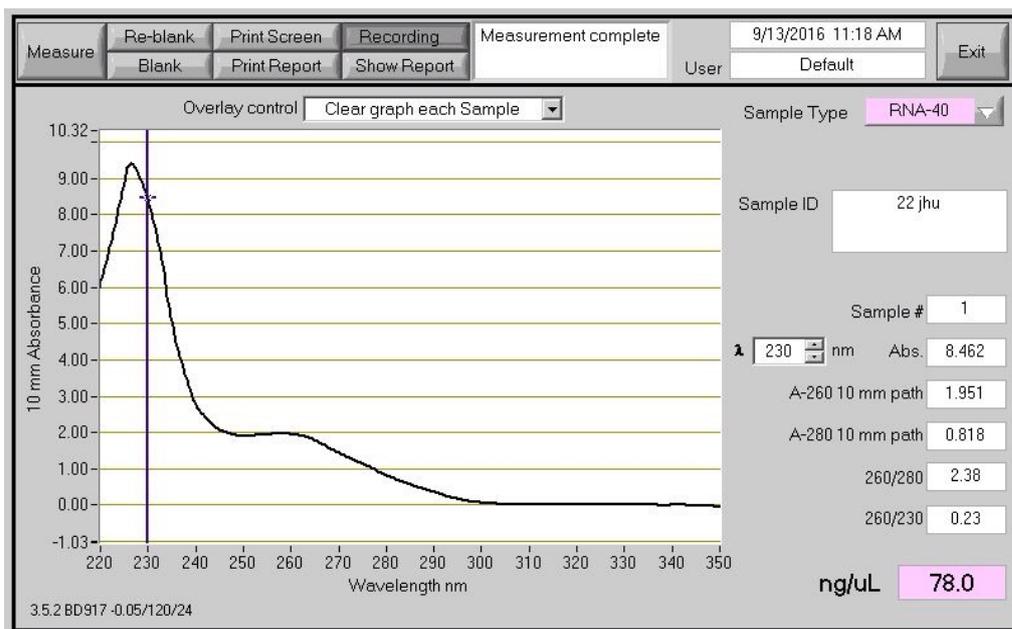
quantidades do material para leitura correta (entre 1-2ug). A concentração do ácido nucleico na amostra se dará na leitura em 260nm e, portanto, neste valor deverá estar o pico da leitura da amostra, para mostrar que a maior parte da amostra é composta por DNA (Figura 16 e 17). Picos em 280nm significam presença de proteínas e picos de 330nm ou mais significam a presença de matéria particulada na amostra (oriunda de um ambiente poluído). Já picos em leituras mais baixas, como 230nm, significam contaminação por íon fenolato, tiocianato e outros compostos orgânicos. É também possível medir uma estimativa da pureza do ácido nucleico através da divisão das leituras 260 e 280nm. Amostras puras de DNA e RNA têm, respectivamente, relação de 1.8 e 2.0. Mas essa relação é muito mais sensível para determinar contaminação de preparações de proteínas por ácidos nucleicos do que o contrário, isto é, detectar contaminações de preparações de ácidos nucleicos por proteínas. A relação cai para menos de 1.8 apenas se mais de 60% da amostra for proteína.

Figura 16 – Análise do material genético (técnica correta)



Fonte: www.openwetware.org/wiki/Nanodrop, acessado em 10/11/2017

Figura 17 – Análise do material genético (técnica incorreta)



Fonte: www.researchgate.net, acessado em 10/11/2017

A sétima etapa foi a **normatização as amostras**, para que todas tivessem a mesma quantidade de DNA por ml. Isto é necessário para que se possa otimizar as etapas sequenciais, usando a mesma quantidade de reagentes químicos em todas as amostras. Fizemos isto diluindo as amostras muito concentradas com água pura, de modo que todas ficassem com 40ug/ml de DNA extraído (Figura 18).

Figura 18 – Cálculo realizado para normatização das amostras

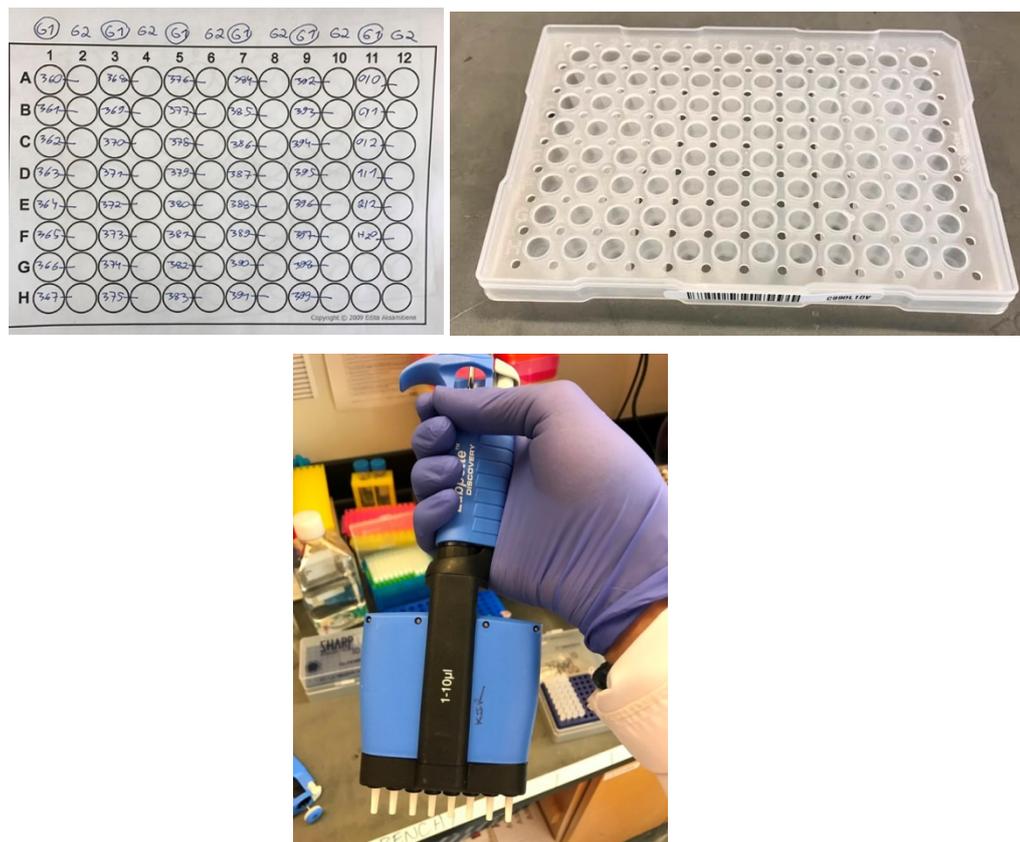
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230
36	BR234	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:25:50 PM	86.3	11	ng/ul 1.726	0.902	1.91	2.81
37	BR235	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:26:30 PM	72.1	8	ng/ul 1.442	0.754	1.91	2.78
38	BR236	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:27:17 PM	92.3	13	ng/ul 1.845	0.962	1.92	2.81
39	BR237	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:28:34 PM	99.9	14	ng/ul 1.787	0.938	1.91	2.82
40	BR238	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:27:59 PM	94.9	14	ng/ul 1.898	1.026	1.85	2.13
41	BR238	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:29:04 PM	133.1	23	ng/ul 2.662	1.407	1.89	2.42
42	BR239	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:29:50 PM	135.2	24	ng/ul 2.705	1.422	1.90	2.67
43	BR240	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:30:29 PM	91.7	13	ng/ul 1.835	0.972	1.89	2.78
44	BR241	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/8/2017 5:31:02 PM	122.8	21	ng/ul 2.456	1.285	1.91	2.68
46	BR243	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:14:07 PM	123.9	21	ng/ul 2.479	1.340	1.85	2.28
47	BR244	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:14:54 PM	55.1	4	ng/ul 1.102	0.583	1.89	3.18
48	BR245	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:15:34 PM	192.7	38	ng/ul 3.854	2.046	1.88	2.52
49	BR246	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:16:12 PM	89.5	12	ng/ul 1.790	0.942	1.90	2.78
50	BR247	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:16:46 PM	71.4	8	ng/ul 1.428	0.742	1.93	2.94
51	BR249	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:17:20 PM	86.7	12	ng/ul 1.735	0.956	1.81	1.92
52	BR248	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:17:58 PM	108.3	18	ng/ul 2.165	1.148	1.89	2.62
53	BR250	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:19:03 PM	77.8	9	ng/ul 1.556	0.824	1.89	2.85
54	BR251	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:19:35 PM	103.7	16	ng/ul 2.074	1.098	1.89	2.63
55	BR252	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:20:07 PM	144.8	28	ng/ul 2.897	1.532	1.89	2.45
56	BR253	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 12:20:58 PM	94.1	13	ng/ul 1.882	0.997	1.89	2.67
57	BR254	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:48:24 PM	113.9	19	ng/ul 2.278	1.182	1.93	2.60
58	BR258	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:49:53 PM	98.7	15	ng/ul 1.973	1.025	1.92	2.66
59	BR255	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:48:46 PM	63.5	6	ng/ul 1.270	0.644	1.97	2.79
60	BR256	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:49:03 PM	36.7	3	ng/ul 0.733	0.376	1.95	3.26
61	BR257	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:49:33 PM	226.0	46	ng/ul 4.519	2.385	1.89	2.47
62	BR260	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:50:30 PM	67.2	7	ng/ul 1.344	0.688	1.95	2.81
63	BR259	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:50:12 PM	54.5	3	ng/ul 1.090	0.559	1.95	3.13
64	BR261	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:50:47 PM	68.1	7	ng/ul 1.361	0.784	1.74	1.34
65	BR262	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:51:04 PM	122.9	21	ng/ul 2.457	1.273	1.93	2.62
67	BR263	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:51:49 PM	80.0	10	ng/ul 1.601	0.842	1.90	2.64
67	BR264	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:52:05 PM	80.6	10	ng/ul 1.613	0.834	1.93	2.77
68	BR265	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/9/2017 7:52:22 PM	63.0	6	ng/ul 1.259	0.643	1.96	2.82
69	BR266	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/10/2017 1:53:02 PM	140.0	25	ng/ul 2.801	1.472	1.90	2.53
70	BR267	Riella,Cristian (BIDMC - Medicine)	3/10/2017 1:53:47 PM	83.2	11	ng/ul 1.665	0.856	1.95	2.94

Fonte: o autor

A oitava etapa foi a **genotipagem das amostras**, identificando a presença ou ausência das mutações genéticas em estudo (G1 e G2). Para isto, foram colocados reagentes capazes de identificar cada uma das variantes em locais predefinidos e acrescentadas pequenas quantidades de cada amostra de DNA (Figura 19). Deste modo, testamos separadamente cada amostra para presença de G1 e de G2, já que a presença de uma mutação não exclui a outra. A leitura foi feita na QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System, da ThermoFisher®, capaz de identificar em tempo real os resultados da análise genética (Figura 20). Isto significa que os dados são coletados durante cada ciclo do PCR, ao invés de apenas ao final (como nos modelos antigos). O método do PCR tem inúmeras aplicações, mas no nosso estudo foi utilizado para amplificar uma região específica do DNA, no caso o cromossomo 22, onde fica o gene *APOL1*. A máquina utiliza uma prova fluorogênica, comparando a quantidade de luz emitida pelas amostras da pesquisa com a luz emitida por amostras sabidamente portadoras das variantes genéticas. Esta prova é composta de pares de *primers* que amplificam a região de interesse. Dois diferentes pares são usados, um para a região de G1 e outro para a região de G2, mais distal. Os pares são usados separadamente e misturados no *master mix* com *probes*, pequenos fragmentos de oligonucleotídeos complementares a *region*. Cada *master mix* possui 2 *probes*, o primeiro é complementar ao genótipo *wild type* (controle) e o segundo é complementar ao genótipo mutante. Cada *probe* está ligado a um fluoróforo que emite um comprimento de onda diferente. Os *probes* também possuem ligados em sua outra extremidade um *quencher*, o qual absorve a fluorescência do fluoróforo quando em proximidade. Quando ocorre a amplificação do *amplicon* de PCR, a DNA polimerase rompe o *quencher-probe-fluoroforo*, causando a emissão de sinal. Portanto, o sinal só é emitido se a amplificação ocorrer com o *probe* específico ligado. Este tipo de prova, chamada TaqMan®, é mais específica do que outras técnicas como SYBr Green®. A diferença no sinal de amplificação entre *wild type* e mutante permite a genotipagem. Outra particularidade da genotipagem de *APOL1* é a presença de dois alelos mutantes, o que exige no mínimo 2 reações de Real-Time PCR (um com *probe* para a mutação G1 e outro para a mutação G2).

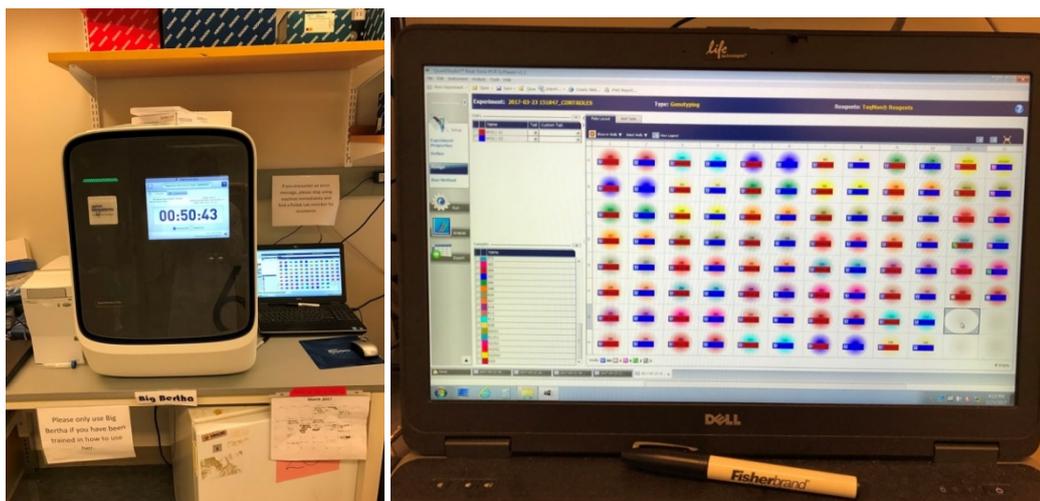
A nona e última etapa foi a **confirmação dos resultados**, através da repetição aleatória de 40 amostras, escolhidas através de randomização fornecida por algoritmo na internet. Isto foi importante pelo fato da PCR ser um método muito preciso, mas também facilmente propenso a contaminações por mínimas quantidades de material externo ao objeto da pesquisa. Foram coletados 2 tubos com 4ml de sangue de cada participante do estudo para a análise genética, mas conforme descrito acima, apenas um tubo foi suficiente para a pesquisa da presença ou ausência da variante genética. Utilizamos o segundo tubo então como exame de contraprova. Todas as amostras repetidas apresentaram o mesmo resultado do primeiro processamento, mostrando que a chance de erros sistemáticos terem ocorrido é muito pequena.

Figura 19 – Preparação da placa com os reagentes G1 e G2



Fonte: o autor

Figura 20 – Máquina de PCR real-time utilizada para leitura das amostras



Fonte: o autor

4.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis contínuas foram expressas por média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil conforme a distribuição da variável. Variáveis categóricas foram expressas em porcentagem ou em números absolutos. Na investigação dos fatores de risco para doença renal crônica terminal, utilizamos regressão logística multivariável. Para inclusão no modelo multivariável testamos todos os potenciais fatores de confusão em uma análise univariada e se o valor de alfa fosse inferior a 0.05 então a variável era incluída no modelo final. O valor de alfa inferior a 0.05 foi considerado como significativo em todas as análises. Finalmente, toda análise do estudo foi realizado no software STATA 13.

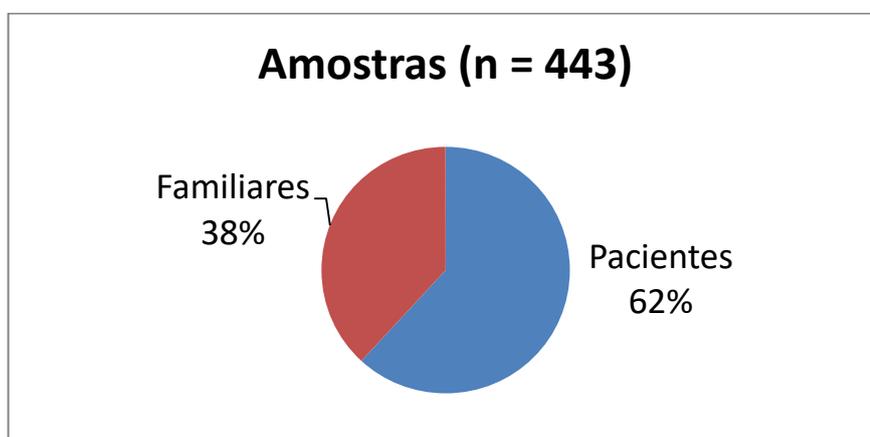
5 – RESULTADOS

5.1 – FLUXOGRAMA DE ENTRADA DOS PARTICIPANTES NO ESTUDO

Nosso trabalho foi dividido em duas fases, sendo a primeira realizada com participantes do Paraná e a segunda com participantes de Alagoas. Em ambas foram recrutados pacientes em hemodiálise crônica e seus respectivos familiares. No Paraná, de um total de 620 pacientes cadastrados nas quatro clínicas participantes do estudo no início do projeto, 87 não foram localizados, 86 referiram ser descendentes indígenas, 97 tiveram doenças que os encaixavam nos critérios de exclusão (como uropatias obstrutivas), dez se recusaram a participar do projeto e três acabaram não entrando no projeto por outros motivos. Restaram 109 pacientes elegíveis, dos quais foi efetivamente coletada amostra sanguínea de 95 participantes. Foi feito contato então com os familiares destes 95 pacientes, sendo recrutado um total de 94 familiares para a pesquisa.

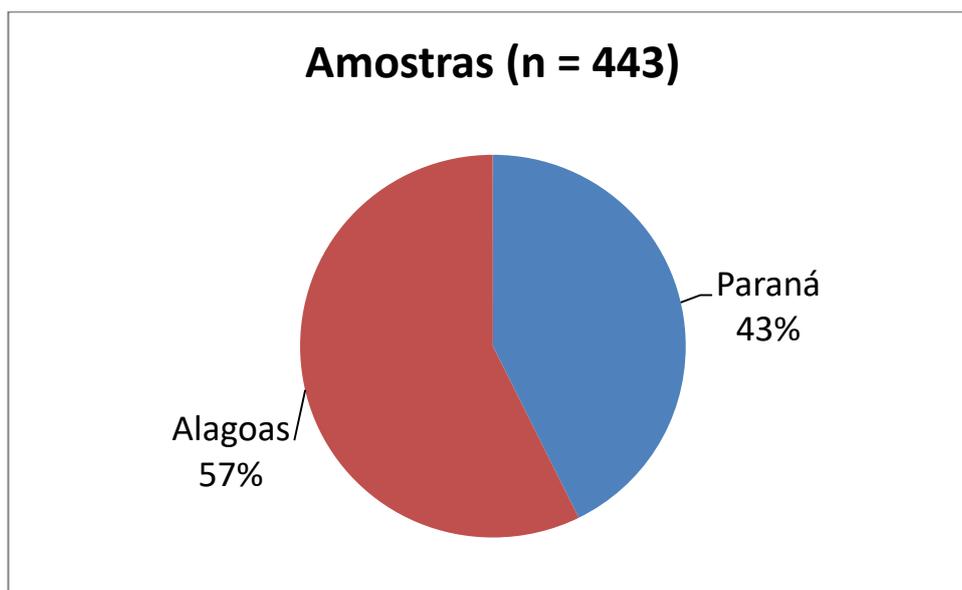
Em Alagoas, 184 pacientes foram pré-selecionados para entrar no estudo, sendo cinco destes excluídos por doenças que constam nos critérios de exclusão e de fato coletadas amostras de 179 pacientes, das três clínicas participantes. Foi feito contato então com os familiares destes pacientes, sendo recrutados 75 participantes, resultando ao todo em 254 amostras coletadas nesta segunda fase (contra 189 amostras na primeira fase). Somando as duas fases do projeto, coletamos amostras de 274 pacientes e 169 familiares. As Figuras 21 e 22 mostram a distribuição do total de participantes entre Pacientes e Familiares e por Estado.

Figura 21 – Distribuição dos participantes por grupo



Fonte: o autor

Figura 22 – Distribuição dos participantes por estado



Fonte: o autor

5.2 – DESCRIÇÃO GERAL DA POPULAÇÃO

A tabela 2 resume as características dos participantes no estudo, divididos entre Pacientes (n=274) e Familiares (n=169). Não foi a intenção desde o início da pesquisa que os grupos fossem parecidos entre si, visto que em um deles os participantes apresentam DRCT e no outro não. O objetivo principal da inclusão do grupo Familiares foi verificar se neste grupo há prevalência aumentada das VAR. Entre as principais diferenças, destaca-se a idade em média onze anos mais velha do grupo Pacientes, assim como o predomínio de homens nesse grupo, enquanto o grupo Familiares apresenta predomínio de mulheres e é composto por participantes mais jovens. Interessante notar também que a pressão arterial sistólica é significativamente mais elevada no grupo Pacientes, condizente com o fato de quase 90% deles apresentar hipertensão arterial sistêmica como comorbidade.

Tabela 2 – Características gerais da população

	Pacientes (n = 274)	Familiares (n = 169)
Idade (anos) – média (±DP)	52 (14.5)	41 (12.7)
Mulheres – n (%)	116 (42,1%)	112 (66,6%)
PAS (mmHg) média (±DP)	141.3 (26.2)	125.3 (22.6)
PAD (mmHg) média (±DP)	79.4 (11)	80.4 (12.4)
IMC		
< 18,5	15 (6%)	3 (2%)
18,5-25	142 (54%)	36 (21%)
25-30	70 (27%)	56 (34%)
>30	34 (13%)	72 (43%)
Raça		
Caucasianos	9 (3%)	7 (4%)
Afrodescendentes	261 (95%)	159 (95%)
Amarelos	0	2 (1%)
Não informado	4 (2%)	1
Renda familiar ¹ (%)		
< 1	110 (40%)	40 (24%)
1-3	109 (40%)	91 (54%)
3-5	38 (14%)	17 (10%)
> 5	9 (3%)	6 (4%)
Não informado	8 (3%)	15 (8%)
Escolaridade ²		
Analfabeto	35 (13%)	2 (1%)
Ens. Fundamental	152 (55%)	58 (35%)
Ens. Médio	75 (27%)	75 (45%)
Ens. Superior	12 (4%)	28 (17%)
Não informado		6 (2%)
HAS – n (%)	240 (87%)	40 (23%)
DM – n (%)	86 (31%)	17 (10%)
HIV – n (%)	3 (1%)	1 (0,6%)
DAC – n (%)	21(7,6%)	2 (1,2%)
ICC – n (%)	10 (8,4%)	3 (2,9%)
Cr soro ³ - mg/dl (percentil 25-75%)		0,83 (0,7-0,94)
MDRD ³ - ml/min (percentil 25-75)		104 (75-118)
RAC ⁴ - mg/g (percentil 25-75%)		49,8 (2-21)
HbA1c ⁵ (percentil 25-75%)		5,6 (4,9-5,7)
Idade início HD – anos (DP)	44,5 (16,2)	

1 = renda familiar em salários mínimos

2 = completo ou incompleto

3 = baseado em dados de 122 familiares (72%)

4 = baseado em dados de 118 familiares (70%)

5 = baseado em dados de 93 familiares (55%)

Em termos de raça autodenominada, percebe-se predomínio absoluto de afrodescendentes nos dois grupos, com mais de 90%. O fato da quase totalidade dos participantes ser afrodescendente era esperado, visto que um dos critérios de inclusão no estudo era justamente ser afrodescendente. A presença de alguns participantes caucasianos explica-se por ter sido permitida a inclusão de participantes que, embora de fenótipo caucasiano, tenham antepassados (pais ou avós) afrodescendentes.

A renda familiar foi calculada com base na soma da renda de todos os moradores do lar. Não foi calculada a renda *per capita* por não termos a informação do número de habitantes por lar. Nota-se em ambos os grupos o predomínio de participantes com renda familiar estimada em até três salários mínimos, mas uma porcentagem muito maior de famílias vivendo com menos de um salário mínimo no grupo Pacientes. No quesito escolaridade foi levado em conta até qual etapa do currículo escolar o participante tenha chegado, mesmo não tendo completado a mesma (por exemplo, um participante que tenha parado seus estudos no Ensino Médio, mesmo sem completar, foi colocado nesse grupo). Percebe-se a maior presença de analfabetos no grupo Pacientes, assim como a menor porcentagem de participantes deste grupo em estágios mais avançados da Educação, como Ensino Médio ou Ensino Superior, em comparação com o grupo Familiares.

Quase 90% dos Pacientes têm hipertensão arterial sistêmica, número expressivamente maior que os pouco mais de 20% dos Familiares com a mesma doença. Diabetes mellitus (insulinodependente ou não) está presente em 31% dos Pacientes, contra apenas 10% dos Familiares. Não foi encontrado um número significativo de pacientes portadores do HIV, doença arterial coronariana ou insuficiência cardíaca congestiva.

No grupo Familiares foram realizados exames para rastreamento de DRC através da dosagem da creatinina sérica e da determinação da relação albumina creatinina (RAC) em amostra isolada de urina, e rastreamento do diabetes mellitus, através da dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c). O plano inicial foi realizar estes exames em todos os Familiares do estudo, até como forma de fornecer uma avaliação parcial do estado atual de saúde do participante. No Paraná foi possível realizar estes três exames em todos os Familiares, porém em Alagoas, por um problema logístico associado à falta de

recursos para pagar os exames, apenas parte dos Familiares teve amostras coletadas para dosagem de creatinina sérica e RAC e nenhum Familiar teve amostras coletadas de HbA1c. Do total de 169 familiares do estudo, isto representou em torno de 30% dos participantes sem amostras de creatinina sérica e RAC e em torno de 50% dos participantes sem amostras de HbA1c. Dos familiares com amostras coletadas, detectou-se uma creatinina sérica média de 0.83 mg/dl, com taxa de filtração glomerular média de 115,9ml/min, calculada através da fórmula do MDRD com 4 variáveis (raça, creatinina sérica, gênero e idade). A RAC mostrou um valor médio surpreendentemente alto, de 49,8mg/g, portanto já na faixa de microalbuminúria (30-300mg/g). Isto se explica pela presença de 2 familiares com RAC pouco acima de 1000mg/g, o que elevou consideravelmente a média. Analisando os resultados através dos percentis 25-75%, percebemos que 75% dos participantes tiveram RAC abaixo de 25mg/g, valor considerado normal. A HbA1c média foi de 5,6%, o que corresponde a uma glicemia sérica média nos últimos três meses de 95mg/dl, valor dentro da faixa da normalidade. Os participantes com valores acima disso já tinham sido, quase na totalidade, diagnosticados como diabéticos. Aqueles com valores alterados de creatinina sérica foram orientados a realizar acompanhamento clínico.

5.3 – ANÁLISE GENÉTICA

Foram enviadas ao todo 443 amostras para análise genética, sendo 274 do grupo Pacientes e 169 do grupo Familiares. Estas análises foram feitas pelo Dr. Cristian V. Riella (da equipe do Dr. Martin Pollak) e pelo pesquisador principal. Todos os exames foram realizados no laboratório de Nefrologia do Beth Israel Deaconess Medical Center, parte do Harvard Medical School, seguindo os passos descritos na seção Metodologia. A tabela 3 mostra o resultado dessa análise quanto à presença das variantes *APOL1* (em números absolutos), enquanto a Figura 23 mostra os mesmos resultados, porém agora em porcentagem.

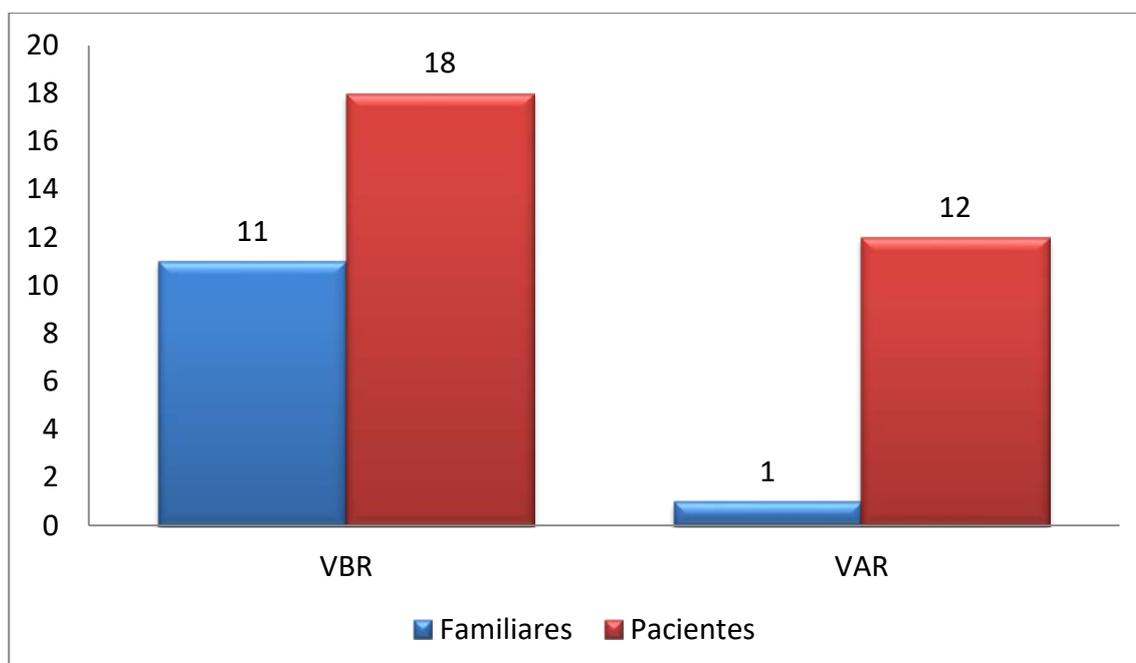
Tabela 3 – Genótipo das amostras

	Pacientes (n=274)	Familiares (n=169)	p
G0/G0	192	149	<0.001
VBR	48	18	0.048
VAR	34	2	<0.001
VBR+VAR	82	20	<0.001

VBR = variantes de baixo risco; VAR = variantes de alto risco

Fonte: o autor

Figura 23 – Número de participantes com variantes *APOL1* (em %)

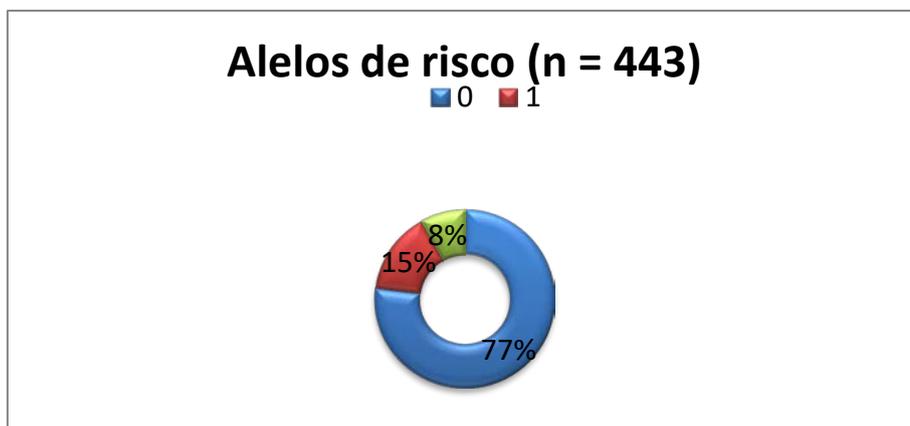


Fonte: o autor

Foi encontrada presença de um ou dois alelos das variantes de risco em 102 das 443 amostras processadas (23%), sendo 82 destas no grupo Pacientes e vinte no grupo Familiares. Analisando separadamente os tipos de variantes, encontramos a variante de alto risco (VAR), formada por dois alelos na forma homozigota ($G1/G1$ ou $G2/G2$) ou heterozigota composta ($G1/G2$), em 34 participantes do grupo Pacientes e em dois participantes do grupo Familiares. Já a variante de baixo risco (VBR), formada por apenas um alelo

G1 ou G2, associado a G0 (genótipo *wild*), foi detectada em 48 participantes do grupo Pacientes e 18 do grupo Familiares. A Figura 24 mostra a distribuição dos participantes conforme o número de alelos *APOL1* encontrados em nossa pesquisa.

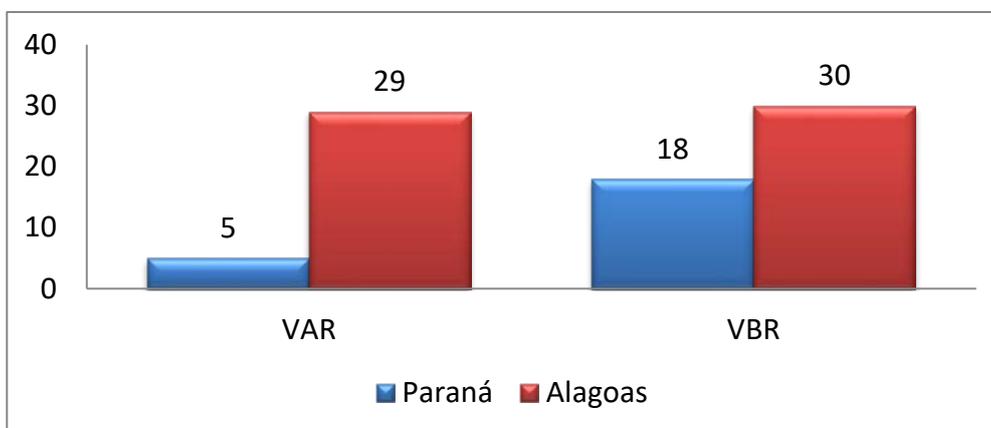
Figura 24 – Distribuição dos participantes conforme mutações *APOL1*



Fonte: o autor

Analisando dados comparativos entre as duas fases da pesquisa (Paraná e Alagoas), percebe-se um aumento expressivo no número de alelos de riscos encontrados na população estudada na segunda fase, tanto nos casos de VBR quanto de VAR. Enquanto no Paraná foram encontrados cinco participantes com as VBR e 29 com as VAR, em Alagoas esses números foram de 18 e 30, respectivamente (Figura 25 e Tabela 4).

Figura 25 – Número de casos da variante *APOL1* por Estado



Fonte: o autor

Tabela 4 – Número de casos da variante *APOL1* por Estado

	Paraná (n=95)	Alagoas (n=179)	p
VBR	18 (19%)	30 (17%)	0.12
VAR	5 (5%)	29 (16%)	0.01

Fonte: o autor

Do total de 274 amostras processadas do grupo Pacientes, 261 se autodenominaram afrodescendentes e apenas nove caucasianos, além de quatro que não autodenominaram sua raça. O grupo de caucasianos é significativamente menor do que o de afrodescendentes pois pacientes caucasianos entraram no estudo apenas se tivessem antepassados afrodescendentes (pais ou avós). Das VBR encontradas no grupo Pacientes, uma foi em caucasianos e 47 em afrodescendentes. Já no subgrupo das VAR, nenhuma foi encontrada em caucasianos, enquanto 33 foram detectadas em afrodescendentes.

No grupo Familiares foram processadas ao todo 169 amostras, sendo 159 de participantes que se autodenominaram afrodescendentes e apenas sete caucasianos, além de um familiar que se identificou como indígena e 3 que não autodenominaram sua raça. Nos familiares foram detectadas 18 amostras com VBR, sendo 17 em afrodescendentes e apenas uma em caucasianos. Apenas duas amostras apresentaram VAR neste grupo, ambas em afrodescendentes. A seguir mostramos a distribuição das variantes de acordo com a raça do participante (tabela 5).

Tabela 5 – Distribuição da genotipagem conforme raça

	Pacientes (n = 274) ^a		Familiares (n = 169) ^b		Total
	AD	Caucasianos	AD	Caucasianos	
G0/G0	181	8	140	6	335
VBR	47	1	17	1	66
VAR	33	0	2	0	35
Total	261	9	159	7	436
VBR+VAR	80	1	19	1	101

AD = afrodescendentes

a = 4 pacientes não inferiram a raça

b = 3 familiares não inferiram a raça e 1 inferiu raça indígena

Fonte: o autor

Foi analisada também a distribuição das variantes encontradas de acordo com a presença ou ausência de diabetes como comorbidade (tabela 6). Do total de 274 participantes do grupo Pacientes, 86 referiram ter diabetes e 186 não. No subgrupo dos diabéticos, foram detectados 13 participantes com VBR e cinco com VAR, enquanto no subgrupo sem DM foram encontradas 35 amostras com VBR e 29 com VAR. Percentualmente, 79% das variantes encontradas (alto ou baixo risco) no grupo dos Pacientes foi naqueles sem DM. Analisando o grupo Familiares, dezessete participantes relataram ter diabetes e 150 não. Das dezenove variantes encontradas no grupo Familiares (alto ou baixo risco), apenas uma foi no subgrupo dos pacientes com diabetes.

Tabela 6 - Distribuição da genotipagem conforme presença ou ausência de DM

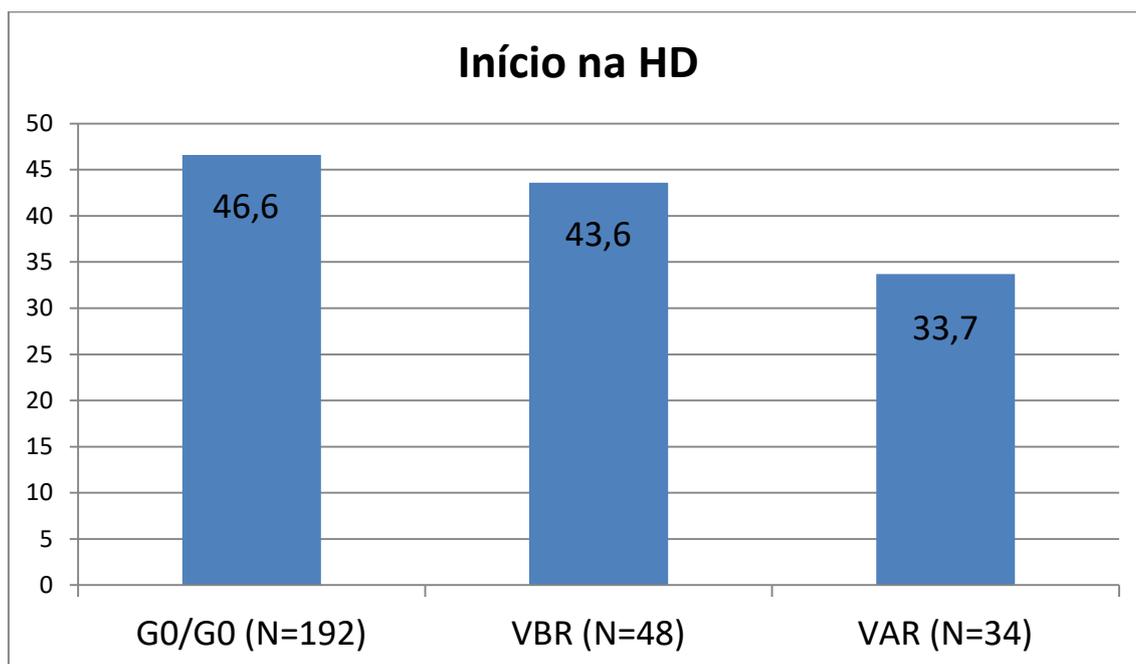
	Pacientes (n=274) ^c		Familiares (n=169) ^c	
	Com DM	Sem DM	Com DM	Sem DM
G0/G0	68	122	16	132
VBR	13	35	1	16
VAR	5	29	0	2
VBR+VAR	18	64	1	18
Total	86	186	17	150

C = não há dados sobre 2 Pacientes e 2 Familiares quanto à presença ou não de DM

Fonte: o autor

Do prontuário médico foi coletada a idade na qual cada participante iniciou a hemodiálise. A Figura 26 mostra a correlação entre os diferentes genótipos e a idade média de início da hemodiálise dos respectivos pacientes. Analisando o grupo Pacientes, vemos que os 192 participantes que não tiveram variantes *APOL1* detectadas tiveram na média um início mais tardio de hemodiálise do que os 48 participantes com presença das VBR. Estes, por sua vez, tiveram início mais tardio do que os 34 participantes com a presença das VAR.

Figura 26 – Idade de início na HD por genótipo



Fonte: o autor

Analisando todos os participantes do estudo (pacientes e familiares), fizemos ainda uma regressão logística com as variáveis pesquisadas em nosso estudo, para verificar qual delas se comportou como fator de risco para o desenvolvimento de DRCT (Tabela 7). Vimos que a presença das VAR esteve associada a um aumento de 21 vezes no risco de desenvolvimento de DRCT na população estudada (OR 21, $p < 0,001$, 95% IC 4.1-1341). Surpreendentemente, apesar de menor em comparação com a presença da VAR, a presença de apenas um alelo de risco (VBR) também se comportou como fator de risco para desenvolvimento da DRCT (OR 3.95, $p 0.002$, 95% IC 1.6-10.9). Conforme discutido anteriormente, na literatura a maioria absoluta dos estudos mostrou risco aumentado de nefropatia apenas aos portadores das VAR. Um dos poucos estudos que temos conhecimento que demonstrou aumento de risco renal pela presença de apenas um alelo de risco foi feito numa população de sul-africanos, mostrando que a presença da VBR se comportou como fator de risco para desenvolvimento de HIVAN (OR 5.49, 95% IC 0.87-61.14, $p = 0.05$), porém com um IC que passa a unidade, mostrando a fragilidade da associação(31). Genenove *et. al*, em seu estudo pioneiro sobre *APOL1*, também mostraram fraca associação de risco para nefropatia pela presença da VBR (OR 1.26, IC 95% 1.01-1.56), também

praticamente incorporando a unidade do IC. Outras variáveis que se comportaram como fatores de risco em nosso estudo foram a presença de HAS (OR 20, $p < 0.001$, 95% IC 9.9-40.4) e DM (OR 2.7, $p 0.045$, IC 95% 1.02-7.07), fatores notoriamente associados com desenvolvimento da DRC(10). Já o gênero feminino se mostrou como fator protetor.

Tabela 7 – Regressão logística para DRCT¹

	Odds ratio	Desvio-padrão	p	95% IC
VBR	3.95	2.05	0.002	1.6-10.9
VAR	21.66	20.8	<0.001	4.1-134.1
Gênero feminino	0.4	0.13	0.008	0.2-0.79
HAS	20	7.17	<0.001	9.9-40.4
DM	2.7	1.74	0.045	1.02-7.07

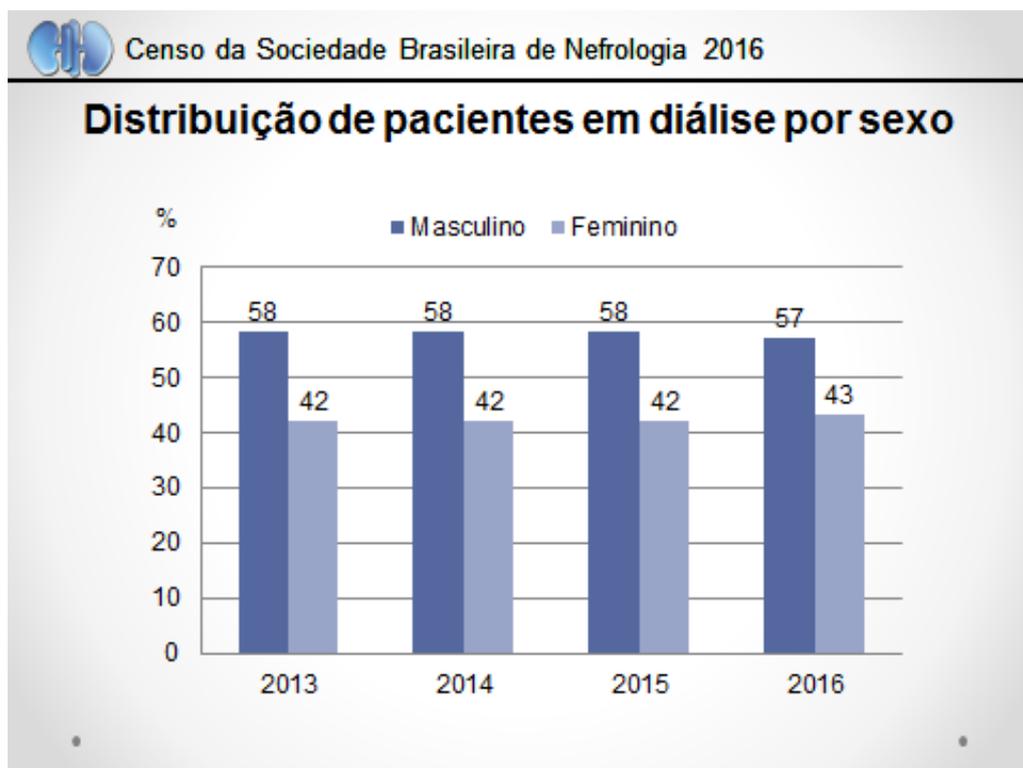
1 = foram computados para esta análise dados de 271 pacientes e 169 familiares

Fonte: o autor

6 – DISCUSSÃO

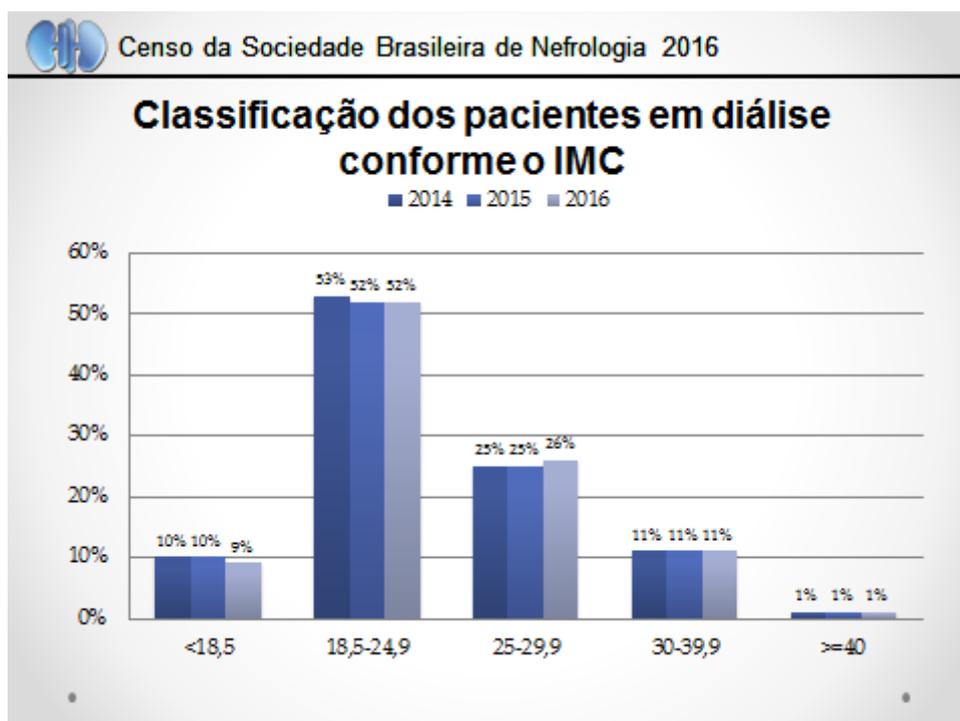
Foram recrutados pacientes de quatro clínicas de diálise do Estado do Paraná e três clínicas do Estado de Alagoas para participar do estudo. A escolha destas clínicas foi feita baseada em contatos profissionais do pesquisador e também na facilidade logística em realizar a coleta das amostras sanguíneas. Analisando a demografia dos participantes do nosso estudo, vemos um predomínio de homens, assim como ocorre na população dialítica em geral no Brasil (Figura 27). A Figura 28 mostra a classificação dos pacientes em diálise conforme o índice de massa corporal (IMC), mostrando a maioria dos pacientes dialíticos se encontrar na faixa considerada normal. No nosso estudo, a média foi ligeiramente acima do considerado normal (IMC 25,5).

Figura 27 – Distribuição de pacientes em diálise por gênero



Fonte: Censo Brasileiro de Diálise 2016

Figura 28 – Classificação dos pacientes em diálise por IMC (no Brasil)



Fonte: Censo Brasileiro de Diálise 2016

Apesar do IBGE classificar a população brasileira atualmente em cinco tipos (branco, preto, pardo, amarelo ou indígena)(135), optamos por juntar as raças preto e pardo como “Afrodescendentes” em nosso estudo, por vários motivos. Primeiro, para facilitar a comparação com estudos anteriores (37)(24)(38), que separaram os participantes em apenas dois grupos (“Caucasianos” e “Afrodescendentes”). O único outro grupo racial encontrado em estudos na literatura é o de hispânicos(22)(136), que não se encaixa em nosso caso. Segundo, pelo fato de se valorizar no Brasil mais a cor da pele e traços faciais do que a ancestralidade em si, conforme Degler relata em seu livro *Neither Black nor White: Slavery and Race Relations in Brazil and the United States*(137). O autor, ganhador do prêmio Pulitzer de História por este livro, também afirma que as estruturas sociais existentes no Brasil não são tão rígidas quanto nos EUA, favorecendo a miscigenação entre imigrantes europeus e escravos africanos. Terceiro, pelo grande número de subdivisões entre os Afrodescendentes no Brasil, abrangendo descrições como mulato, mameluco, mestiço, caboclo e cafuz(138). Diferenciar estas classes entre os participantes do estudo certamente teria sido um desafio. Por último, pelo

crescente desconforto da comunidade científica em aceitar estas separações entre raças baseado unicamente no fenótipo do indivíduo(104). Estudo recente publicado na revista *Science*(139) mostrou que o gene responsável pela pigmentação da pele está presente em todos os seres humanos, tanto negros quanto brancos. O estudo mostra que o gene surgiu na África há cerca de 900 mil anos atrás, ou seja, muito antes da separação entre as “raças” caucasiana e negra, que ocorreu entre 20 e 100 mil anos atrás(74) e que portanto não há diferença genética entre negros e brancos, apenas a ativação do gene em certos indivíduos (“negros”). Artigo recente publicado na revista *Science* inclusive incentiva os pesquisadores a priorizarem a ancestralidade dos participantes em estudos científicos, em vez de seu fenótipo, para descrever e classificar grupos humanos(104).

Tivemos em nosso estudo altas taxas de prevalência de HAS (87% dos participantes), seguida de DM (31% dos participantes). Estes dados são condizentes com o fato destas doenças serem as principais causas de DRC no Brasil(140). O fato de não termos encontrado um número significativo de pacientes portadores de HIV em nosso estudo também é condizente com dados de literatura nacional, que mostram a prevalência desta comorbidade na população em diálise crônica no Brasil ser menor que 1%(140). Já a baixa prevalência de pacientes com doença arterial coronariana ou insuficiência cardíaca congestiva pode ter sido devido à metodologia empregada (foram conduzidas anamnese e checagem em prontuário médico, sem realização de exames diagnósticos).

Analisando os dados sobre escolaridade e renda familiar dos participantes, mostrando 40% dos pacientes tendo renda familiar menor que um salário mínimo e mais da metade não tendo mais do que o Ensino Fundamental de escolaridade, é tentador traçar uma relação entre baixa renda e baixa escolaridade com a doença renal crônica, relação esta já confirmada por estudos anteriores(6)(10). Precisamos lembrar, porém, que nosso trabalho não nos permite tal conclusão, por não ter sido desenhado para responder a esta pergunta.

6.1 – OBJETIVO PRINCIPAL: *Determinar a prevalência de variantes do gene APOL1 em uma amostra de pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil.*

Sabe-se que as variantes do gene *APOL1* estão fortemente associadas a certos tipos de nefropatias em afrodescendentes, como GESF(37), HIVAN(24), nefrite lúpica(141) e nefrosclerose hipertensiva(22) e que a população afrodescendente é desproporcionalmente atingida pela DRCT(1)(2). A prevalência parece estar aumentada em afrodescendentes com DRCT por causas não diabéticas e em seus familiares diretos(28)(56)(142). As variantes não são encontradas em outras etnias, como europeus, asiáticos e hispânicos(33). Apesar desta forte associação estatística, pesquisas não conseguiram demonstrar até o momento a presença das variantes dos alelos *G1* e *G2* em nenhum país fora do continente africano (local do seu surgimento) e dos EUA(23)(143).

Nos países onde a presença das VAR do gene *APOL1* foi demonstrada, sua prevalência varia grandemente. Local de origem das mutações, o Oeste da África, tem países como a Nigéria que chega a ter uma prevalência de ao menos um alelo das variantes de 40%(37), enquanto em um grupo de sul-africanos com HIV este número chega a impressionantes 79%(31). Já afrodescendentes sem nefropatias residentes nos Estados Unidos (um dos locais de destino do tráfico intercontinental de escravos) apresentam prevalência de 13-22% das VAR(24). Outros países, por outro lado, tiveram estudos mostrando ausência das variantes *APOL1* em suas populações, como a Austrália(144) e a Índia(145). A Tabela 8 e a Figura 29 mostram um resumo dos principais estudos de prevalência das variantes do gene *APOL1* em diversos países.

Pelo que temos conhecimento, foram realizados até o momento apenas dois estudos sobre o tema no Brasil. No primeiro, utilizando dados do *International HapMap Project*, Kopp *et al.* analisaram 49 indivíduos de duas tribos indígenas (Karitiana e Surui), não encontrando a mutação em nenhum dos participantes(24). Já Colares *et al.* analisaram 196 pacientes com nefrite lúpica (condição sabidamente associada com as VAR), pesquisando se determinados polimorfismos genéticos apresentam associação estatisticamente significativa com a doença. Os pesquisadores não encontraram relação com as

VAR G1 e G2, talvez pelo fato de menos da metade dos participantes do estudo ter descendência africana(146).

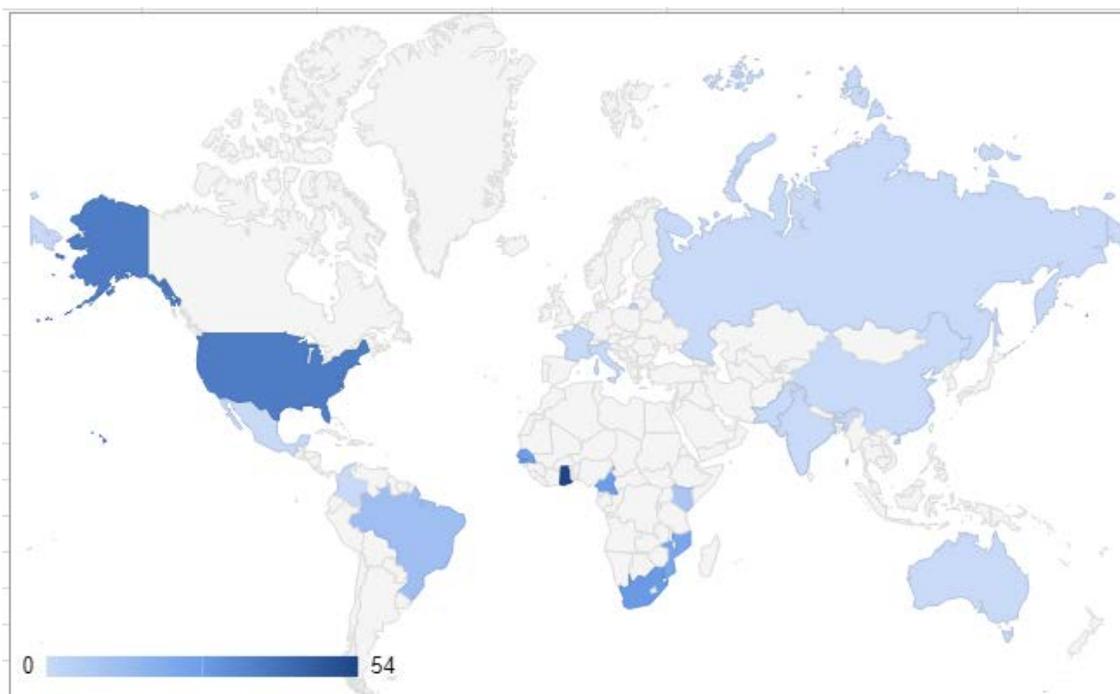
Tabela 8 – Prevalência mundial das variantes *APOL1*¹

País	Prevalência (%)	País	Prevalência (%)
Nigéria	61	França	0
Gana	54	Colômbia	0
EUA	37	México	0
África do Sul	28	Paquistão	0
Senegal	27	Austrália	0
Camarões	27	Índia	0
Moçambique	23	China	0
Brasil	23	Itália	0
Congo	16	Inglaterra	0
República Centro-Africana	15	Rússia	0
Quênia	9	Israel	0

1 = ao menos um alelo das variantes

Fontes: J Am Soc Nephrol 2011;22(11):2129–37; Kidney Int 2016;90(4):906–7; Kidney Int 2017;91(4):990.

Figura 29 – Prevalência mundial das variantes *APOL1*¹



1 = ao menos um alelo das variantes

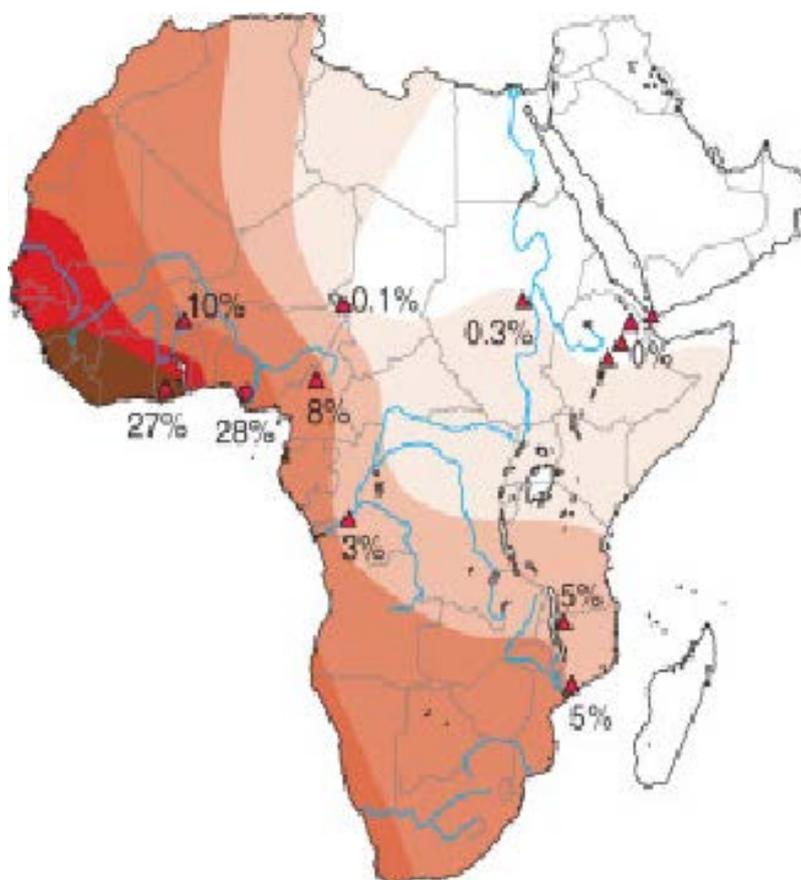
Fontes: J Am Soc Nephrol 2011;22(11):2129–37; Kidney Int 2016;90(4):906–7; Kidney Int 2017;91(4):990.

Os resultados da nossa pesquisa mostram que no grupo dos Pacientes afrodescendentes em diálise crônica há presença de um alelo das variantes em 18% das amostras e dois alelos em 12% das amostras. Muitos estudos realizados com afrodescendentes nos EUA apresentaram prevalências maiores das variantes na população afrodescendente com DRC por causas não diabéticas, mostrando em torno de 37% dos participantes carregando um alelo e 18% carregando dois alelos das variantes(22)(28)(56)(142). Mas a maioria destes estudos foi realizada em populações de afrodescendentes ainda não em DRCT, que sabidamente têm características diferentes da população do nosso estudo. Optamos então por comparar nossos resultados com um estudo da literatura também realizado com afrodescendentes em diálise crônica, que assim como o nosso também incluiu participantes diabéticos(32). Neste estudo, Lijun et al analisaram 725 pacientes e também separaram os resultados entre presença de dois alelos das variantes (VAR) ou presença de nenhum/um alelo das variantes (VBR). Eles mostraram que 29% dos indivíduos apresentaram as VAR, ou seja, a prevalência das VAR neste estudo foi maior que a encontrada na população afrodescendente americana saudável em geral (29% contra 18%). Isto foi uma das razões de incluirmos participantes unicamente com DRCT em nossa pesquisa, objetivando encontrar o maior número possível das VAR.

Chama atenção, porém, a menor prevalência de participantes com dois alelos das variantes (29% contra 12%) encontrada em nosso estudo. Três são as possíveis explicações para essa diferença entre os resultados nos EUA e nosso estudo no Brasil. Primeiro: que um subgrupo diferente de afrodescendentes teria vindo para o Brasil, de uma região sem alta prevalência das variantes. Os estudos genéticos(24)(42) mostraram forte presença das variantes genéticas apenas na região subsaariana africana, principalmente na costa Oeste e não nas regiões Norte, Sul e Leste, conforme mostra a Figura 30. Sabe-se que em torno de doze milhões de escravos foram trazidos da África para as Américas(51)(23), sendo o Brasil o principal destino, com quase 40% do total, conforme mostra a Figura 31. Analisando relatos históricos, percebe-se que a maior parte dos escravos trazidos para os EUA vieram de Senegal, Gâmbia, Nigéria e Camarões (157), países da costa oeste subsaariana africana. Estudos de ancestralidade dos afrodescendentes no

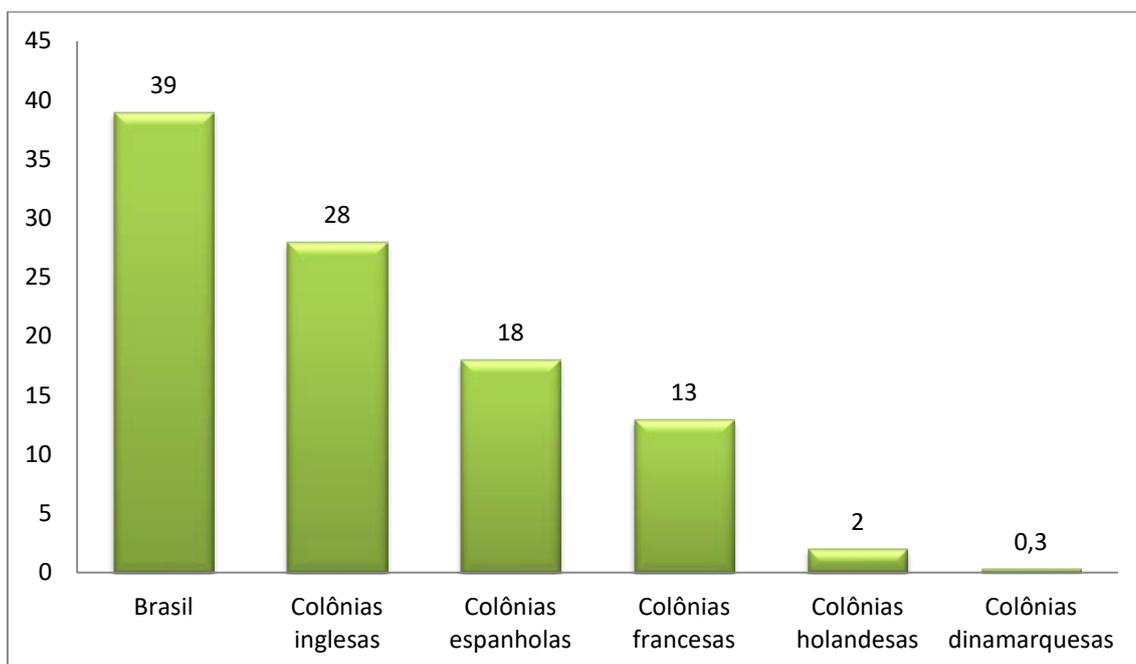
Brasil determinaram recentemente que o maior material genético desta população veio dos países Camarões, Gana e Senegal, também regiões com alta prevalência das variantes(147). Ou seja, conforme ilustrado na Figura 32, a teoria de que outros subgrupos de afrodescendentes teriam vindo para o Brasil não se sustenta, já que os dois países receberam escravos dos mesmos locais de origem, justamente áreas de alta prevalência das variantes de risco(89). É preciso atentar ao fato que uma vez trazidas ao Brasil, as variantes genéticas não sofreram mais seleção seletiva, por não haver a endemia de tripanossomíase em nosso território, ao contrário do que ocorre no continente africano.

Figura 30 – Distribuição das variantes *APOL1* no continente africano (em % da população acometida)



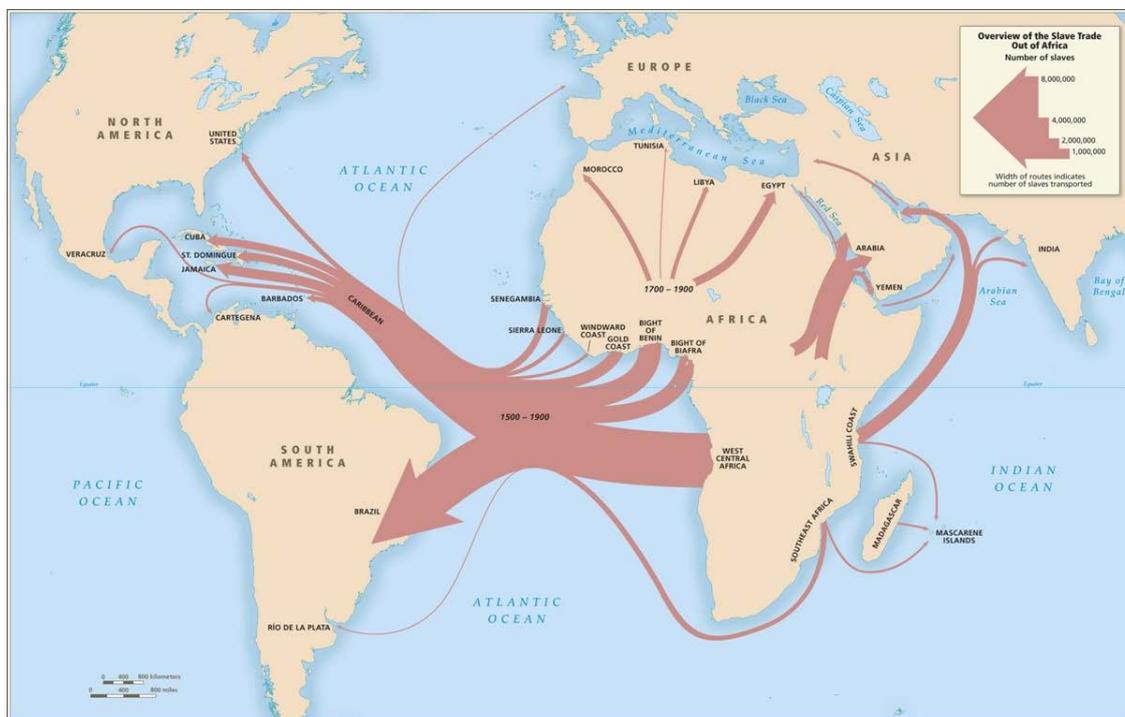
Fonte: Kidney Int, 2013;83(1):6–9.

Figura 31 – Distribuição do tráfico de escravos para a América (em milhões)



Fonte: Stephen D. Behrendt, David Richardson e David Eltis, W.E.B. Du Bois Institute, para "African and African American Research", Harvard University

Figura 32 – Fluxo dos escravos oriundos da África



Fonte: *Atlas of the Transatlantic Slave Trade*, de David Eltis e David Richardson (157)

A segunda possível explicação para esta diferença é o fato da raça ter sido autodenominada pelos participantes e não diagnosticada por estudo genético. Isto certamente levou a erros na classificação dos participantes entre as etnias caucasiana e afrodescendente, por ser um critério subjetivo e sujeito a concepções pré-adquiridas dos participantes. Sabe-se que a identificação de raça baseada em fenótipos ignora grandes partes do genoma do indivíduo, já que características como cor de pele, olhos e cabelos são determinados por relativamente pequeno número de genes, podendo por exemplo um paciente com fenótipo afrodescendente na verdade ser predominantemente de descendência caucasiana e com isso ter entrado erroneamente no estudo(148). Esta dificuldade na determinação da raça baseando-se unicamente no fenótipo de um indivíduo é bem representada pelo caso de dois irmãos gêmeos univitelinos, filhos de pai negro e mãe branca, que se inscreveram em 2007 para disputar uma vaga na Universidade Brasília através do sistema de cotas raciais. Ao serem avaliados por uma banca examinadora, porém, um foi considerado branco e o outro não, conforme noticiado pela imprensa na época (Figura 33).

Figura 33 – Dificuldade na determinação da raça unicamente por fenótipos



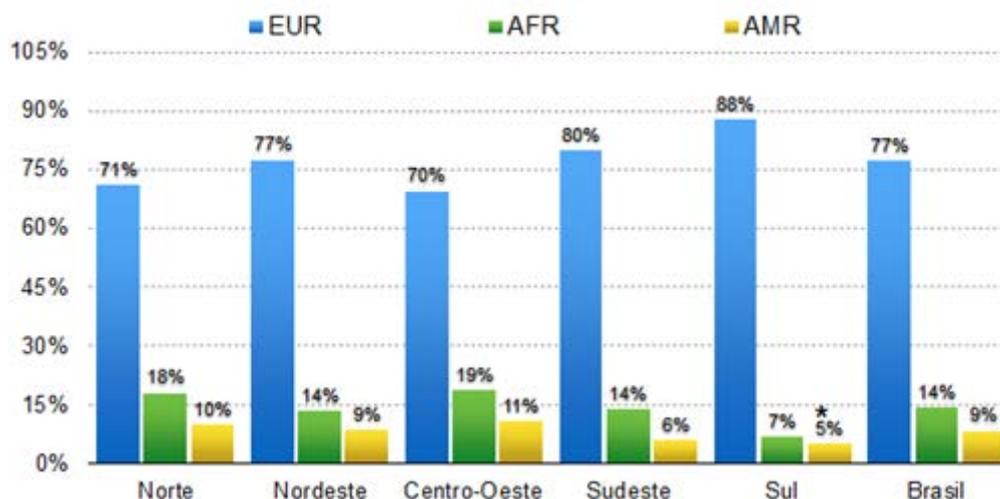
Fonte: Revista VEJA, 06/06/2011

Terceiro, e no nosso entender a explicação mais plausível, o Brasil é reconhecidamente um país onde ocorreu grande miscigenação, fruto da mistura genética entre povos de três continentes distintos (sul-americano, africano e europeu). Conforme citado acima, cerca de 40% dos escravos trazidos da África para as Américas foram trazidos ao Brasil (em torno de 5 milhões de pessoas). Com o passar dos anos, estes escravos se reproduziram com a população indígena local e com os colonizadores europeus, formando uma população miscigenada. Além dessa mistura entre colonizadores, índios e escravos, houve ainda a vinda de imigrantes europeus nos séculos XIX e XX, da Espanha, Itália e Alemanha, entre outros, estimados em torno de seis milhões ao todo(6). Esta mistura racial se reflete até hoje, já que a distribuição de grupos étnicos baseado em raça auto-denominada é heterogênea em todo o Brasil, segundo o IBGE. Da população brasileira em geral, 40% atualmente se autodenominam “pardos”(158), grupo que segundo o IBGE inclui pessoas geradas com algum grau de miscigenação, seja “mulata, cabocla, cafuza, mameluca ou mestiça”(88), ou seja, pessoas mestiças nascidas de relacionamentos sexuais entre indivíduos de etnias diferentes. Conclui-se que a extensa miscigenação ocorrida ao longo dos séculos dissipou em parte a associação entre cor de pele e ancestralidade no Brasil.

Corroborando esta hipótese, apesar de quase metade da população brasileira se autodenominar afrodescendente, estudos de ancestralidade recentes demonstraram existir um elevado componente caucasiano no Brasil. Esta elevada ancestralidade europeia é especialmente acentuada no Sul do Brasil, local de coleta das amostras da primeira fase deste estudo. Segundo dados do IBGE, 48% da população brasileira se autodenominam brancos, 43% se dizem pardos e apenas 6% referem ser negros(148), mas analisando estudos genéticos, percebemos que a ancestralidade europeia em nossa população é bem maior. Estudo publicado por Lins et al. em 2010 (Figura 34) mostrou que a média de ancestralidade europeia em nossa população chega a impressionantes 77%, enquanto a ancestralidade africana é de apenas 14%, oriunda principalmente dos países Camarões, Gana e Senegal. O estudo também mostrou, conforme esperado, que a região Sul contém a maior proporção de ancestralidade europeia (87%) e que as demais regiões (Norte,

Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) apresentam pouca variação de ancestralidade entre si(147).

Figura 34 – Composição genética da população brasileira 1

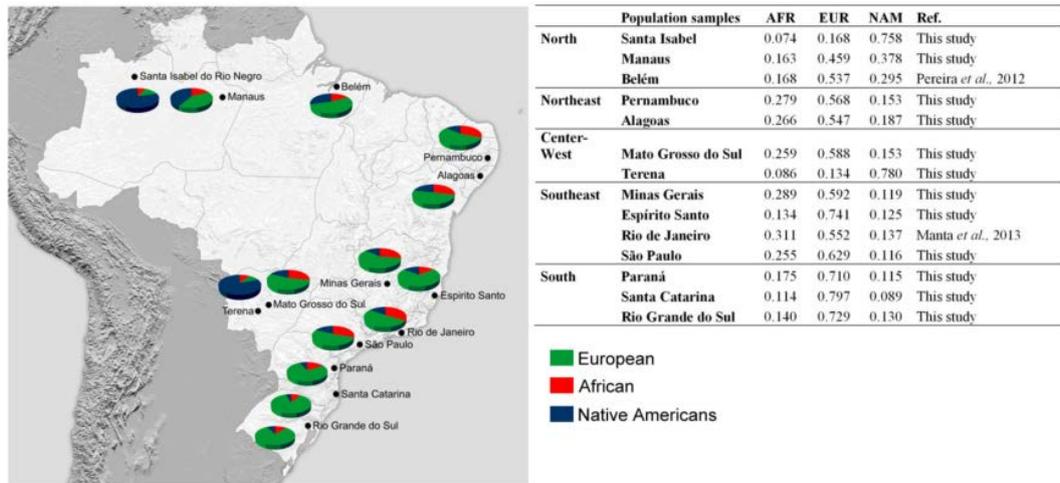


EUR = europeia; AFR = africana; AMR = americana (indígena)

Fonte: Am J Hum Biol. 2010;22(2):187–92.

Outro estudo sobre o assunto, publicado por Saloum de Neves Manta *et al.* em 2013, também mostrou a ancestralidade europeia ser a principal no Brasil (em torno de 75%) e que a segunda mais comum depende da região, sendo a indígena no Norte e a africana no Nordeste (Figura 35). Esta alta taxa de ancestralidade europeia em nossa população pode ter resultado na diluição da prevalência das variantes G1 e G2 em nosso estudo. Este estudo ainda mostrou que a taxa de ancestralidade africana em Alagoas é significativamente maior que a taxa registrada no Paraná (26% contra 17%)(149). Isto é compatível com os dados obtidos em nossa pesquisa. Comparando os resultados obtidos por estado, percebemos um aumento expressivo de variantes encontradas em Alagoas, com significância estatística. Este aumento ocorreu especialmente nas VAR (seis vezes), conforme mostra a Tabela 4. Acreditamos que esta maior prevalência ocorreu principalmente devido à maior porcentagem de ancestralidade africana nesta população.

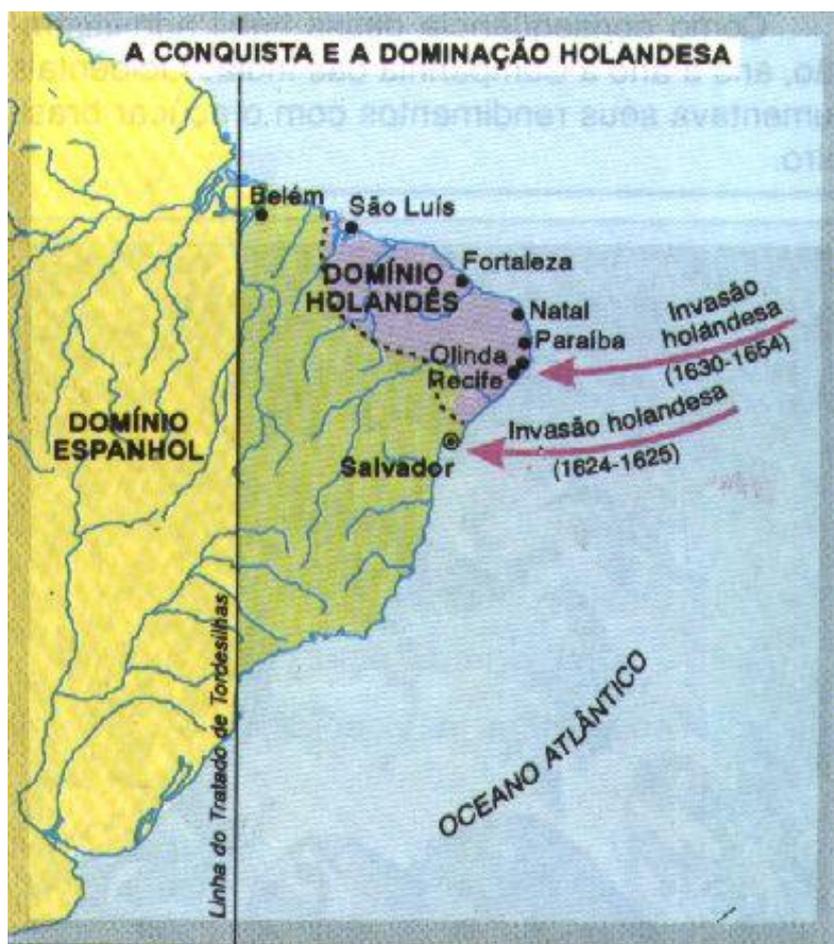
Figura 35 – Composição genética da população brasileira 2



Fonte: Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. PLoS One. 2013;8(9):1–11.

O fato de haver altas taxas de ancestralidade europeia mesmo em regiões como o Nordeste, local de destino da maior parte dos escravos trazidos ao Brasil, talvez possa ser explicado pelas invasões holandesas nesta região. A primeira delas ocorreu em 1624, mas durou apenas um ano e foi restrita ao estado da Bahia. Já a segunda, iniciada em 1630, durou vários anos e foi bem mais abrangente, atingindo os estados de Pernambuco, Paraíba, Ceará e Maranhão(150). Conforme mostra a Figura 37, percebe-se que o Estado de Alagoas, local de coleta da 2ª fase da nossa pesquisa, também esteve ocupado pelos holandeses neste período.

Figura 36 – Invasões holandesas no Brasil



Fonte: www.filosofandoehistoriando.blogspot.com.br, acessado em 28/10/2017

A proporção de ancestralidade genética da população brasileira foi amplamente estudada usando marcadores de herança como DNA mitocondrial, polimorfismos do cromossomo Y e marcadores autossomais *short tandem repeats*. Outros pesquisadores usaram polimorfismos de nucleotídeo único ou polimorfismos de deleção ou inserção. A conclusão é de que a ancestralidade genética na população brasileira é altamente heterogênea, mesclando descendentes de três continentes diferentes (sul-americano, europeu e africano), fato corroborado por conhecimentos históricos amplamente documentados e que deve ser levada em conta quando se propuserem novos estudos nessa área(147). Isto é diferente do que aconteceu nos EUA, onde existe forte segregação racial, o que dificultou a mistura genética entre as raças caucasiana e africana, conforme relatado no livro *Neither Black Nor White*, de Degler. Tanto que não encontramos em estudos norte-americanos a descrição da população parda, mas unicamente das raças caucasiana e negra. E

enquanto a taxa de ancestralidade caucasiana em nossa população é de mais de 70%, conforme anteriormente citado, estudos mostram que a taxa de ancestralidade africana da população negra dos EUA chega a ser de 80%(23)(143).

Apesar de tentador do ponto de vista estatístico, não buscamos provar significância estatística entre a prevalência das variantes de pacientes caucasianos e afrodescendentes, pois nosso estudo não foi desenhado para isto. Excluímos do estudo pacientes caucasianos sem antecedentes africanos, pois já é sabido por estudos anteriores, previamente citados, que as variantes são inexistentes na população não afrodescendente.

6.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

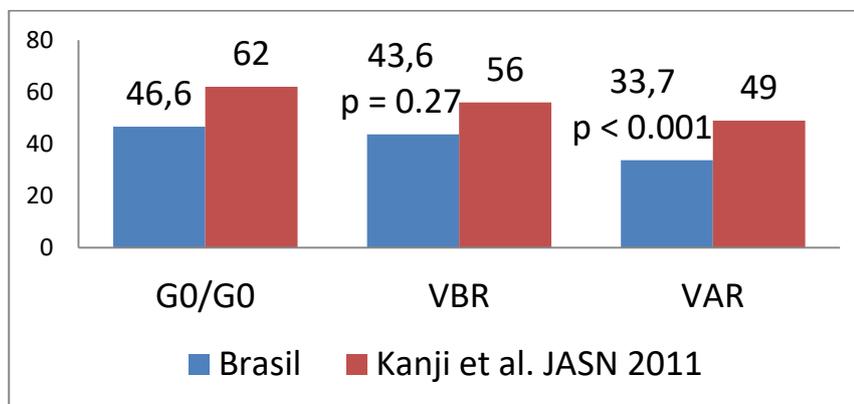
6.2.1 – Verificar a associação entre a presença de variantes do gene APOL1 e o tempo entre o diagnóstico da doença renal crônica e o início do tratamento dialítico.

Para identificar se a presença das variantes *APOL1* encurta o tempo entre o diagnóstico e o início do tratamento dialítico, foi proposto perguntar a data de cada um destes dois eventos aos participantes, conforme consta no questionário em anexo, e com isso calcular a diferença de tempo entre eles na sequência. Dois fatores prejudicaram essa estratégia. Primeiro, o acompanhamento irregular com nefrologistas por boa parte dos participantes do estudo, podendo gerar um viés nos resultados, já que nestes casos não se poderia diferenciar com precisão se a perda acelerada de função renal foi pela presença da variante genética ou simplesmente por falta de cuidado clínico. Segundo, grande parte dos participantes do estudo recebeu o diagnóstico de doença renal crônica no momento em que estavam iniciando a terapia substitutiva renal, impossibilitando a análise do possível efeito de aceleração da perda de função renal das variantes nestes indivíduos. Ambas situações ilustram quanto o Brasil ainda precisa melhorar na assistência à Saúde de sua população.

Optamos então por analisar a idade na qual os participantes do estudo iniciaram a hemodiálise, com o raciocínio de que a presença das variantes de risco teria antecipado esse evento. Dividimos os pacientes em três grupos: sem

variantes (G0), presença de um alelo (VBR) e presença de dois alelos (VAR). Comparamos esses resultados com dados da literatura na Figura 38.

Figura 37 – Início na HD por genótipo (em anos)



Fonte: o autor e JASN 22:2091-2097, 2011

Nossos resultados mostram que o grupo dos pacientes sem a presença das variantes iniciou a HD em média aos 46 anos, enquanto pacientes com presença de um alelo das variantes (VBR) iniciaram a HD em média aos 43 anos e pacientes com presença de dois alelos (VAR) iniciaram a HD aos 33 anos. Percebe-se que o grupo das VAR iniciou a TSR em média treze anos antes do grupo sem as variantes ($p < 0.001$). Esses dados se assemelham aos mostrados no estudo de Kanji *et al.*(151), em que o grupo sem as variantes também teve início de HD mais tardiamente do que os grupos com VBR ou VAR. A presença de apenas um alelo de risco não teve significância estatística na comparação com a ausência das variantes ($p 0.27$), resultado compatível com estudos anteriores(26)(27)(28), mostrando novamente que apenas os portadores das VAR (dois alelos) estão sujeitos a risco renal aumentado.

6.2.2 – Verificar se há associação entre as variantes do gene *APOL1* e a nefropatia diabética

Não encontramos associação entre a presença das variantes *APOL1* e a nefropatia diabética em nosso estudo, visto que 34% dos pacientes sem DM apresentaram algum alelo das variantes, enquanto apenas 21% dos pacientes com DM tiveram a variante *G1* ou *G2* detectadas em seu estudo genético. Já no grupo dos familiares, apenas um alelo foi detectado no subgrupo de familiares diabéticos (6%), enquanto 18 (12%) foram encontradas no grupo dos

familiares não-diabéticos. A análise estatística mostrou que a presença de dois alelos das variantes foi fator de proteção contra a presença do DM no grupo Pacientes (OR 0.30, IC 0.11-0.83, p 0.02). A presença de apenas um alelo não foi estatisticamente significativa (OR 0.66, IC 0.33-1.34, p 0.25) neste grupo, enquanto no grupo Familiares não houve número de participantes suficiente com as variantes para poder se realizar o cálculo estatístico. Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Lijun *et al.* citado anteriormente(32), que analisou a prevalência das VAR em pacientes afrodescendentes também em diálise crônica e também incluiu pacientes diabéticos. Nele, os autores detectaram uma prevalência expressiva de 47% das VAR no grupo de pacientes não diabéticos, mas de apenas 18% no grupo com DM.

Apesar da falta de relação entre as variantes *APOL1* e a nefropatia diabética ser atualmente bem estabelecida, optamos por incluir os pacientes com esta nefropatia no estudo por dois motivos. Primeiro, para facilitar comparações de prevalência das variantes entre nossa população e populações de estudos anteriores(27)(39)(120), que também incluíram pacientes diabéticos. Segundo, o desenho do nosso projeto foi realizado em novembro de 2013, quando ainda existia certa dúvida sobre um possível vínculo entre as variantes *APOL1* e a nefropatia diabética. Estudos publicados sobre o tema na época eram inconsistentes nos resultados(152)(43) ou tinham baixo poder estatístico para afastar em definitivo a associação entre a nefropatia diabética e as variantes *APOL1*(39). Mas sabemos que a prevalência das variantes poderia ter sido mais alta se os pacientes diabéticos tivessem sido excluídos da amostra.

O fato das variantes *APOL1* não serem fatores de risco para desenvolvimento de nefropatia diabética é digno de reflexão, pois esta nefropatia ocorre com muito mais frequência em afrodescendentes do que em caucasianos(142). Os estudos iniciais que mostraram associação entre variantes *APOL1* e nefropatia diabética provavelmente incluíram pacientes com GESF erroneamente classificados como nefropatia diabética por falta de biópsia renal.

6.2.3 – Verificar a prevalência das variantes do gene *APOL1* em familiares de pacientes afrodescendentes com DRCT

Familiares de afrodescendentes com formas não-diabéticas de DRCT têm risco aumentado de desenvolver doenças renais(9)(153), tanto que mais de 20% dos pacientes que iniciam a terapia substitutiva renal apresentam ao menos um familiar próximo já em diálise(154). Variantes do gene *APOL1* parecem ser cada vez mais a causa para esta relação familiar(155). Simultaneamente, familiares de afrodescendentes em TSR são frequentemente considerados como potenciais doadores renais, podendo na realidade ser carreadores ainda assintomáticos das VAR e no futuro ter nefropatia manifesta. Freedman *et al.*(155), analisando amostras sanguíneas de 786 familiares saudáveis de afrodescendentes com DRCT não-diabética, mostraram haver uma prevalência aumentada das VAR nesta população. Enquanto na população afrodescendente em geral a prevalência varia entre 21-39% com um alelo e 3-12% com dois alelos(37)(39), os familiares no estudo citado apresentaram um alelo em 46% dos casos e dois alelos em 23%. Sabendo disso, coletamos amostras de 169 familiares de pacientes em hemodiálise para verificar se esse aumento de prevalência em familiares (comparados com a população em geral) também se repetiria em nosso estudo. Encontramos, porém, a presença de um alelo em apenas 11% dos familiares e dois alelos em 1% dos mesmos (Figura 23).

Comparando o grupo dos Pacientes com o grupo Familiares em nosso estudo, percebemos uma maior prevalência das variantes *APOL1* no grupo Pacientes, tanto das VBR (18% contra 11%), quanto das VAR (12% contra 1%). Chama atenção o fato de termos encontrado em nosso estudo apenas dois participantes do grupo Familiares com as VAR e que a maior prevalência da variante *G0* ocorreu no grupo Familiares. Todos estes resultados tiveram significância estatística na comparação, conforme mostrou a Tabela 3.

Semelhante ao ocorrido no grupo Pacientes, a prevalência de variantes encontrada em nossa pesquisa no grupo Familiares também foi menor em comparação com dados da literatura. Freedman *et al.* analisaram 786 familiares de afrodescendentes em DCRT, encontrando um alelo das variantes (VBR) em 46% dos participantes e dois alelos (VAR) em 23% dos participantes

(155). Acreditamos que os mesmos fatores listados acima para explicar a menor frequência das variantes *APOL1* no grupo Pacientes ajudam a explicar esta menor prevalência também no grupo Familiares, como o fato da raça ter sido inferida pelos próprios participantes (e não determinada por estudo genético) e a alta taxa de miscigenação da população brasileira. É preciso destacar que a baixa ocorrência das variantes no grupo Familiares não permite conclusões sobre a penetrância das mesmas neste grupo. Convém lembrar também que o fato de terem sido selecionados para entrar no estudo apenas familiares diretos dos pacientes já participantes pode resultar num fenômeno denominado de deriva genética. Ele ocorre quando a frequência de determinada mutação genética numa população é alterada (para mais ou para menos) não por critérios de adaptação, mas sim por eventos aleatórios, como desastres ecológicos ou grupos que permaneceram isolados por muitos anos. Também é possível termos selecionado em nossa amostra unicamente familiares dos mesmos patriarcas (com ou sem a mutação), o que teria influenciado grandemente na frequência das variantes encontradas em nosso estudo, num fenômeno denominado de princípio do fundador. Fala contra esta hipótese o fato da população em questão ser de um grande centro do Nordeste (Maceió) e não de uma cidade no interior, menos sujeita à miscigenações.

Analisando o grupo Familiares como um todo, vimos que a média da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe, calculada pela fórmula MDRD) foi de 104 ml/min. Não tivemos presença de variantes suficientes neste grupo para calcular se houve diferença estatisticamente significativa na TFGe entre o subgrupo dos familiares com a presença das variantes, comparado com familiares sem a presença das mesmas. Pelo mesmo motivo, também não pudemos verificar se houve diferença estatisticamente relevante na albuminúria em amostra isolada nos familiares portadores das variantes genéticas. Freedman *et al.*, no estudo anteriormente citado sobre familiares de afrodescendentes em DRCT, mostraram que a presença das VAR foi fator de risco para albuminúria e discreta queda na TFG(155).

7 – LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de ser o primeiro estudo a mostrar a presença das variantes do gene *APOL1* fora da África ou da América do Norte, sabemos que nosso estudo apresenta limitações. Uma delas foi termos incluído unicamente pacientes afrodescendentes já com DRCT em hemodiálise crônica. Ou seja, estamos tratando de uma população altamente selecionada, com óbitos de grande parcela dos nefropatas nos estágios pré-DRCT, visto que a DRC, mesmo em seus estágios iniciais, é fator conhecido de risco cardiovascular(156). Até mesmo pacientes com a função renal ainda normal, mas com critérios para lesão renal, como proteinúria ou microalbuminúria, já apresentam aumento de risco cardiovascular. Fatores que explicam isso são a toxicidade urêmica, o estresse oxidativo, alterações lipídicas e a hipervolemica, que atuam com sinergismo no surgimento da aterosclerose e consequente doença aterosclerótica isquêmica do coração, importante causa de óbito nesta população(156). Langerdorf e Pirani descreveram já em 1945, quando a hemodiálise ainda nem estava disponível rotineiramente, alterações macroscópicas ocorridas em miocárdios de pacientes com DRC, mostrando acentuada hipertrofia ventricular, fibrose e edema intersticial(157). Estes fatores podem levar a arritmias, outra causa frequente de morte em pacientes com DRC.

Outro fator limitante do nosso estudo foi a inclusão de participantes de clínicas selecionadas de apenas dois estados do Brasil (Paraná e Alagoas), não sendo possível, portanto, extrapolar os resultados a nível nacional. Acreditamos por isso haver espaço para novos estudos no futuro próximo que se proponham a analisar a população afrodescendente brasileira de maneira mais homogênea, talvez através de amostras de biobancos com representatividade nacional, que incluam também amostras de pacientes tanto saudáveis quanto com DRC ainda em fase não terminal.

8 – CONCLUSÃO

Pelo que temos conhecimento, este é o primeiro estudo sobre a presença das variantes *APOL1* em afrodescendentes no Brasil, tanto em pacientes dialíticos quanto na população em geral. Apesar da menor frequência encontrada comparado com estudos anteriores, nosso trabalho indica que a vinda de milhões de escravos da África para o Brasil trouxe as mesmas variantes genéticas originalmente estudadas nos EUA. Traçar paralelos com estudos prévios sobre o assunto publicados em outros países é interessante do ponto de vista acadêmico, mas as diferenças regionais, como a miscigenação e o alto componente genético de descendência europeia da nossa população afrodescendente, devem ser levadas em consideração na análise dos resultados.

Nosso trabalho mostrou também que, assim como em estudos anteriores, as variantes estão associadas ao desenvolvimento de DRCT e que não houve prejuízo de função renal em familiares com presença de apenas um alelo das variantes. Isto reforça a hipótese de que as variantes *APOL* são tóxicas apenas quando presentes em estado homozigoto ou heterozigoto composto. Ao contrário de estudos anteriores, nossa pesquisa não mostrou que estes familiares apresentem frequência aumentada das variantes em comparação com a população em geral. Por fim, mostramos que a presença das variantes foi fator de risco para início mais precoce de HD e não detectamos associação entre as variantes *APOL1* e a nefropatia diabética, fato atualmente bem estabelecido pela literatura.

Tivemos avanços importantes na evolução para a 2ª fase da nossa pesquisa, como: o aumento significativo do número de amostras genotipadas (de 189 para 443 ao todo), que contribuiu para um aumento importante no número total de indivíduos com as VAR encontrados (de 5 para 34); a oportunidade de fazer nova ampla revisão da literatura, que se encontra em rápida expansão pela grande quantidade de estudos sendo publicados anualmente sobre o assunto; e a possibilidade de aprendizado da técnica de genotipagem das amostras pelo pesquisador, que se deslocou até Boston e pôde operar a máquina de *PCR* e realizar todas as etapas do processo.

9 – PESQUISAS FUTURAS

Acreditamos haver um importante campo para futuras pesquisas sobre as mutações do gene *APOL1* e seu envolvimento com as diversas formas de nefropatias. Este estudo foi o primeiro a mostrar a presença destas variantes no território brasileiro, mas conforme citado anteriormente, ele não pode ser considerado representativo, já que utilizamos amostras apenas de pacientes afrodescendentes já em diálise crônica, de apenas duas capitais (Curitiba e Maceió). Acreditamos haver espaço para a pesquisa da presença da mutação a nível nacional, talvez utilizando algum biobanco, que já tenha as amostras coletadas e armazenadas. Sugerimos futuros pesquisadores averiguarem também a presença das mutações em outras raças no Brasil, como índios e caucasianos. Apesar de isto ir contra a literatura mundial, cremos ser de valia em nossa população pois, conforme discutido no texto, temos grande miscigenação em nosso meio. Com isto, um paciente de fenótipo predominantemente caucasiano pode ter na realidade grande porcentagem de ancestralidade africana e, deste modo, estar sob risco de ter as variantes genéticas. Também acreditamos haver espaço para análise de desfechos secundários dos participantes com a presença das VAR, como por exemplo: grau de anemia e necessidade de reposição de eritropoetina humana; metabolismo de cálcio e fósforo, incluindo níveis de paratormônio: tipo e qualidade do acesso vascular; internamentos e mortalidade. Para alguns destes desfechos bastaria acesso a dados do prontuário eletrônicos dos participantes do estudos, já outros desfechos como mortalidade exigiriam um acompanhamento longitudinal.

10 – BIBLIOGRAFIA

1. Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M, Naicker S. African origins and chronic kidney disease susceptibility in the human immunodeficiency virus era. *World J Nephrol* [Internet]. 2015;4(2):295–306. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4419140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Rostand SG. Racial differences in the incidence of treatment for end-stage renal disease. *N Engl J Med*. 1982;2010–3.
3. Peralta C a, Katz R, DeBoer I, Ix J, Sarnak M, Kramer H, et al. Racial and ethnic differences in kidney function decline among persons without chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(7):1327–34.
4. Coresh J, Selvin E, Stevens L a, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *J Am Med Assoc*. 2007;298(17):2038–47.
5. Grams ME, Chow EKH, Segev DL, Coresh J. Lifetime Incidence of CKD stages 3-5 in the United States. *Am J Kidney Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;62(2):245–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.03.009>
6. Volkova N, McClellan W, Klein M, Flanders D, Kleinbaum D, Soucie JM, et al. Neighborhood poverty and racial differences in ESRD incidence. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2008;19(2):356–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2396744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Easterling RE. RACIAL FACTORS IN THE INCIDENCE AND CAUSATION OF END-STAGE RENAL DISEASE (ESRD). 1977. p. 28–32.
8. Kramer HJ, Stilp AM, Laurie CC, Reiner AP, Lash J, Daviglius ML, et al. African Ancestry–Specific Alleles and Kidney Disease Risk in Hispanics/Latinos. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017;28(3):915–22. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2016030357>
9. Freedman BI, Spray BJ, Tuttle AB, Buckalew VM. The familial risk of end-stage renal disease in African Americans. *Am J Kidney Dis* [Internet]. National Kidney Foundation, Inc.; 1993;21(4):387–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8465818>
10. Klag MJ, Michael J, Neaton JD, Brancati FL, Stamler J. End-Stage Renal Disease in African-American and White Men. *JAMA*. 1997;
11. Brenner BM, Garcia DL. Glomeruli and Blood Pressure. 1988;335–47.
12. Charlton JR, Abitbol CL. Can renal biopsy be used to estimate total nephron number? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(4):553–5.

13. Hoy WE, Hughson MD, Bertram JF, Douglas-Denton R, Amann K. Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005;16(9):2557–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2005020172>
14. Ainsworth HC, Langefeld CD, Freedman BI. Genetic epidemiology in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2017;(February):159–69. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article/2989975/Genetic>
15. Hu J-R, Coresh J. The public health dimension of chronic kidney disease: what we have learnt over the past decade. *Nephrol Dial Transplant* [Internet]. 2017;32(suppl_2):ii113-ii120. Available from: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfw416>
16. Hoggart CJ, Shriver MD, Kittles RA, Clayton DG, McKeigue PM. Design and analysis of admixture mapping studies. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004;74(5):965–78. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1181989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
17. Kao WHL, Klag MJ, Meoni L a, Reich D, Berthier-Schaad Y, Li M, et al. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. *Nat Genet*. 2008;40(10):1185–92.
18. Winkler CA, Nelson G, Oleksyk TK, Nava MB, Kopp JB. Genetics of focal segmental glomerulosclerosis and human immunodeficiency virus-associated collapsing glomerulopathy: The Role of MYH9 Genetic Variation. *Semin Nephrol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;30(2):111–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semnephrol.2010.01.003>
19. Kopp JB, Smith MW, Nelson GW, Johnson RC, Freedman BI, Bowden DW, et al. MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* [Internet]. 2008;40(10):1175–84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2827354&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, et al. Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African-Americans. *Science* (80-). 2010;329(5993):841–5.
21. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, Bentley DR, Chakravarti A, Clark AG, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* [Internet]. 2010;467(7319):1061–73. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09534>
22. Tzur S, Rosset S, Shemer R, Yudkovsky G, Selig S, Tarekegn A, et al. Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. *Hum Genet*. 2010;128(3):345–50.

23. Limou S, Nelson GW, Kopp JB, Winkler CA. APOL1 Kidney Risk Alleles: Population Genetics and Disease Associations. *Adv Chronic Kidney Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;21(5):426–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ackd.2014.06.005>
24. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011;22(11):2129–37. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3231787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Limou S, Nelson GW, Lecordier L, An P, O'hUigin CS, David VA, et al. Sequencing rare and common APOL1 coding variants to determine kidney disease risk. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;88(4):754–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2015.151>
26. Freedman BI, Skorecki K. Gene-gene and gene-environment interactions in apolipoprotein L1 gene-associated nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(11):2006–13.
27. Parsa A, Kao WHL, Xie D, Astor BC, Li M, Hsu C, et al. APOL1 Risk Variants, Race, and Progression of Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2013;369(23):2183–96. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1310345>
28. Kozlitina J, Zhou H, Brown PN, Rohm RJ, Pan Y, Ayanoglu G, et al. Plasma Levels of Risk-Variant APOL1 Do Not Associate with Renal Disease in a Population-Based Cohort. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016;1–16. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2015101121>
29. Divers J, Núñez M, High KP, Murea M, Rocco M V, Ma L, et al. JC polyoma virus interacts with APOL1 in African Americans with nondiabetic nephropathy. *Kidney Int* [Internet]. 2013;84(6):1207–13. Available from: http://www.nature.com/ki/journal/v84/n6/abs/ki2013173a.html?WT.ec_id=KI-201312
30. Hoy WE, Hughson MD, Kopp JB, Mott SA, Bertram JF, Winkler CA. APOL1 Risk Alleles Are Associated with Exaggerated Age-Related Changes in Glomerular Number and Volume in African-American Adults : An Autopsy Study. *J Am Soc Nephrol*. 2015;i:1–11.
31. Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M, Mosiane P, Dickens C, Dix-Peek T, et al. APOL1 Risk Variants Are Strongly Associated with HIV-Associated Nephropathy in Black South Africans. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;(January 2016):ASN.2014050469-. Available from: <http://jasn.asnjournals.org.beckerproxy.wustl.edu/content/early/2015/03/17/ASN.2014050469.abstract>

32. Ma L, Langefeld CD, Comeau ME, Bonomo JA, Rocco M V., Burkart JM, et al. APOL1 renal-risk genotypes associate with longer hemodialysis survival in prevalent nondiabetic African American patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;1–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253816300126>
33. Freedman BI, Julian BA. Should kidney donors be genotyped for APOL1 risk alleles? *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;87(4):671–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815301861>
34. Kruzel-Davila E, Wasser WG, Aviram S, Skorecki K. APOL1 nephropathy: From gene to mechanisms of kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(3):349–58.
35. Grams ME, Rebholz CM, Chen Y, Rawlings AM, Estrella MM, Selvin E, et al. Race, APOL1 Risk, and eGFR Decline in the General Population. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016;1–9. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2015070763>
36. Peralta CA, Bibbins-Domingo K, Vittinghoff E, Lin F, Fornage M, Kopp JB, et al. APOL1 Genotype and Race Differences in Incident Albuminuria and Renal Function Decline. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;887–93. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/content/early/2015/07/14/ASN.2015020124.abstract>
37. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, et al. Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans. *Science* (80-) [Internet]. 2010;329(5993):841–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1193032>
38. Papeta N, Kiryluk K, Patel A, Sterken R, Kacak N, Snyder HJ, et al. APOL1 Variants Increase Risk for FSGS and HIVAN but Not IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2011;22(11):1991–6. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2011040434>
39. Friedman DJ, Kozlitina J, Genovese G, Jog P, Pollak MR. Population-Based Risk Assessment of APOL1 on Renal Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(11):2098–105.
40. Fine DM, Wasser WG, Estrella MM, Atta MG, Kuperman M, Shemer R, et al. APOL1 Risk Variants Predict Histopathology and Progression to ESRD in HIV-Related Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2012;23(2):343–50. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2011060562>

41. Lipkowitz MS, Freedman BI, Langefeld CD, Comeau ME, Bowden DW, Kao WHL, et al. Apolipoprotein L1 gene variants associate with hypertension-attributed nephropathy and the rate of kidney function decline in African Americans. *Kidney Int* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;83(1):114–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484228&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Ulasi II, Tzur S, Wasser WG, Shemer R, Kruzel E, Feigin E, et al. High population frequencies of apol1 risk variants are associated with increased prevalence of non-diabetic chronic kidney disease in the igbo people from south-eastern nigeria. *Nephron - Clin Pract.* 2013;123(1–2):123–8.
43. Foster MC, Coresh J, Fornage M, Astor BC, Grams M, Franceschini N, et al. APOL1 variants associate with increased risk of CKD among African Americans. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013;24(9):1484–91. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3752955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
44. Sampson MG, Robertson CC, Martini S, Mariani LH, Lemley K V., Gillies CE, et al. Integrative Genomics Identifies Novel Associations with APOL1 Risk Genotypes in Black NEPTUNE Subjects. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;1–10. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2014111131>
45. Freedman BI, Cohen AH. Hypertension-attributed nephropathy: what's in a name? *Nat Rev Nephrol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;12(1):27–36. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrneph.2015.172>
46. Skorecki K, Wasser WG. Editorial Beyond APOL1 : Genetic Inroads into Understanding Population Disparities in Diabetic Kidney Disease. 2016;1–4.
47. Ito K, Bick AG, Flannick J, Friedman DJ, Genovese G, Parfenov MG, et al. Increased burden of cardiovascular disease in carriers of APOL1 genetic variants. *Circ Res.* 2014;114(5):845–50.
48. Chen TK, Estrella MM. APOL1 risk variants and death among African American hemodialysis patients: survival of the fittest? *Kidney Int* [Internet]. International Society of Nephrology; 2016;90(2):249–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.03.024>
49. Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W, et al. Single , Rapid Coastal Settlement of Asia Revealed Single , Rapid Coastal Settlement of Asia Revealed by Analysis of Complete Mitochondrial Genomes. *Science* (80-). 2005;308(2005):1034–6.

50. Freedman BI, Kopp JB, Langefeld CD, Genovese G, Friedman DJ, Nelson GW, et al. The apolipoprotein L1 (APOL1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(9):1422–6.
51. Salas A, Carracedo A, Richards M, Macaulay V. Charting the ancestry of African Americans. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2005;77(4):676–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=16175514
52. Smith EE, Malik HS. The apolipoprotein L family of programmed cell death and immunity genes rapidly evolved in primates at discrete sites of host-pathogen interactions. *Genome Res*. 2009;19(5):850–8.
53. Duchateau PN, Pullinger CR, Cho MH, Eng C, Kane JP. Apolipoprotein L gene family: tissue-specific expression, splicing, promoter regions; discovery of a new gene. *J Lipid Res* [Internet]. 2001;42(4):620–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11290834>
54. Cheng D, Weckerle A, Yu Y, Ma L, Zhu X, Murea M, et al. Biogenesis and cytotoxicity of APOL1 renal risk variant proteins in hepatocytes and hepatoma cells. *J Lipid Res* [Internet]. 2015;56(8):1583–93. Available from: <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M059733>
55. Shukha K, Mueller JL, Chung RT, Curry MP, Friedman DJ, Pollak MR, et al. Most ApoL1 Is Secreted by the Liver. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017;28(4):1079–83. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2016040441>
56. Lan X, Jhaveri A, Cheng K, Wen H, Saleem M a, Mathieson PW, et al. APOL1 risk variants enhance podocyte necrosis through compromising lysosomal membrane permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2014;307(3):F326–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899058>
57. Namangala B. Contribution of innate immune responses towards resistance to african trypanosome infections. *Scand J Immunol*. 2012;75(1):5–15.
58. Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Abbeele J Van Den, et al. Apolipoprotein L-1 is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature*. 2003;422(March):83–7.
59. Madhavan SM, O 'toole JF, Konieczkowski M, Ganesan S, Bruggeman LA, Sedor JR. APOL1 Localization in Normal Kidney and Nondiabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:2119–28.
60. Ma L, Shelness GS, Snipes JA, Murea M, Antinozzi PA, Cheng D, et al. Localization of APOL1 protein and mRNA in the human kidney: nondiseased tissue, primary cells, and immortalized cell lines. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;26(2):339–48. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/content/26/2/339.full>

61. Wan G, Zhaorigetu S, Liu Z, Kaini R, Jiang Z, Hu CAA. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J Biol Chem*. 2008;283(31):21540–9.
62. Monajemi H, Fontijn RD, Pannekoek H, Horrevoets AJG. The Apolipoprotein L Gene Cluster Has Emerged Recently in Evolution and Is Expressed in Human Vascular Tissue. *Genomics* [Internet]. 2002;79(4):539–46. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754302967297>
63. Rosset S, Tzur S, Behar DM, Wasser WG, Skorecki K. The population genetics of chronic kidney disease: insights from the MYH9-APOL1 locus. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;7(6):313–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2011.52>
64. Simarro PP, Diarra A, Postigo JAR, Franco JR, Jannin JG. The human african trypanosomiasis control and surveillance programme of the world health organization 2000-2009: The way forward. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(2).
65. Simarro PP, Cecchi G, Paone M, Franco JR, Diarra A, Ruiz JA, et al. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr*. 2010;9(57):(1 November 2010).
66. Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;375(9709):148–59. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1)
67. Lecordier L, Vanhollebeke B, Poelvoorde P, Tebabi P, Paturiaux-Hanocq F, Andris F, et al. C-terminal mutants of apolipoprotein L-I efficiently kill both *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Pathog*. 2009;5(12).
68. Pays E, Vanhollebeke B, Uzureau P, Lecordier L, Pérez-Morga D. The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;12(8):575–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24975321> <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro3298>
69. Rougemont A, Bouvier M, Perrin L. Hypohaptoglobinaemia As an Epidemiological and Clinical Indicator for Malaria. *Lancet*. 1988;709–12.
70. Bruggeman LA, Wu Z, Luo L, Madhavan SM, Konieczkowski M, Drawz PE, et al. APOL1-G0 or APOL1-G2 Transgenic Models Develop Preeclampsia but Not Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016;1–11. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2015111220>
71. Johnstone DB, Shegokar V, Nihalani D, Rathore YS, Mallik L, Ashish, et al. APOL1 Null Alleles from a Rural Village in India Do Not Correlate with Glomerulosclerosis. *PLoS One*. 2012;7(12).

72. Nichols B, Jog P, Lee JH, Blackler D, Wilmot M, D'Agati V, et al. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014;87(2):332–42. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ki.2014.270>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100047>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4312530>
73. Zhaorigetu S, Wan G, Kaini R, Jiang Z, Hu CAA. ApoL1, a BH3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Autophagy*. 2008;4(8):1079–82.
74. Friedman DJ, Pollak MR. Genetics of kidney failure and the evolving story of APOL1. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3367–74.
75. Kruzel-Davila E, Shemer R, Ofir A, Bavli-Kertselli I, Darlyuk-Saadon I, Oren-Giladi P, et al. APOL1–Mediated Cell Injury Involves Disruption of Conserved Trafficking Processes. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2016;28. Available from: www.jasn.org
76. Hipp MS, Kalveram B, Raasi S, Groettrup M, Schmidtke G. FAT10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(9):3483–91.
77. Bruggeman LA, O'Toole JF, Sedor JR. Identifying the Intracellular Function of APOL1. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2017;28(4):1008–11. Available from: <http://www.jasn.org/lookup/doi/10.1681/ASN.2016111262>
78. Vanhollebeke B, Pays E. The function of apolipoproteins L. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(17):1937–44.
79. Hartleben B, G??del M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, K??bler S, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1084–96.
80. Beckerman P, Bi-Karchin J, Park ASD, Qiu C, Dummer PD, Soomro I, et al. Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. *Nat Med* [Internet]. 2017;23(4):429–38. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4287>
81. Glasscock RJ, Rule AD. The implications of anatomical and functional changes of the aging kidney: with an emphasis on the glomeruli. *Kidney Int* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;82(3):270–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3513938&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
82. Hodgin JB, Bitzer M, Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, O'Connor C, et al. Glomerular aging and focal global glomerulosclerosis: A podometric perspective. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;26(12):3162–78. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L608484378>
<http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2014080752>

83. Wharram BL. Podocyte Depletion Causes Glomerulosclerosis: Diphtheria Toxin-Induced Podocyte Depletion in Rats Expressing Human Diphtheria Toxin Receptor Transgene. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005;16(10):2941–52. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2005010055>
84. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int*. 2001;60(3):957–68.
85. Lasagni L, Lazzeri E, Shankland SJ, Anders H-J, Romagnani P. Podocyte mitosis - a catastrophe. *Curr Mol Med* [Internet]. 2013;13(1):13–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3624791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
86. Oliveira Arcolino F, Tort Piella A, Papadimitriou E, Bussolati B, Antonie DJ, Murray P, et al. Human Urine as a Noninvasive Source of Kidney Cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2015;2015:362562. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4451513&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, Croker JA, Williams AH, Garner NE, et al. End-Stage Renal Disease in African Americans With Lupus Nephritis Is Associated With *APOL1*. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2014;66(2):390–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.38220>
88. Vanwalleghem G, Fontaine F, Lecordier L, Tebabi P, Klewe K, Nolan DP, et al. Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by *APOL1*. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(Cmmi):8078. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms9078>
89. Akilesh S, Huber TB, Wu H, Wang G, Hartleben B, Kopp JB, et al. Podocytes use FcRn to clear IgG from the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008;105(3):967–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2242706&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
90. Sampogna R V., Al-Awqati Q. Taking a bite: Endocytosis in the maintenance of the slit diaphragm. *J Clin Invest*. 2012;122(12):4330–3.
91. Reeves-Daniel AM, Depalma JA, Bleyer AJ, Rocco M V., Murea M, Adams PL, et al. The *APOL1* gene and allograft survival after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(5):1025–30.
92. Ojo A, Knoll GA. *APOL1* genotyping of African American deceased organ donors: Not just yet. *Am J Transplant*. 2015;15(6):1457–8.

93. Kramer H, Han C, Post W, Goff D, Diez-Roux A, Cooper R, et al. Racial/ethnic differences in hypertension and hypertension treatment and control in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Hypertens*. 2004;17(10):963–70.
94. Kestenbaum B, Rudser KD, de I B, Peralta CA, Fried LF, Shlipak MG, et al. Differences in kidney function and incident hypertension: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *AnnInternMed*. 2008;148(1539–3704 (Electronic)):501–8.
95. Ku E, Lipkowitz MS, Appel LJ, Parsa A, Gassman J, Glidden D V., et al. Strict blood pressure control associates with decreased mortality risk by APOL1 genotype. *Kidney Int [Internet]*. Elsevier Inc; 2016;1–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381630566X>
96. Chen TK, Estrella MM, Vittinghoff E, Lin F, Gutierrez OM, Kramer H, et al. APOL1 genetic variants are not associated with longitudinal blood pressure in young black adults. *Kidney Int [Internet]*. Elsevier Inc; 2017;1–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253817302314>
97. Freedman BI, Julian BA, Pastan SO, Israni AK, Schladt D, Gautreaux MD, et al. Apolipoprotein L1 gene variants in deceased organ donors are associated with renal allograft failure. *Am J Transplant*. 2015;15(6):1615–22.
98. Ciancio G, Burke GW, Suzart K, Mattiazzi A, Vaidya A, Roth D, et al. The use of daclizumab, tacrolimus and mycophenolate mofetil in African-American and Hispanic first renal transplant recipients. *Am J Transplant [Internet]*. 2003;3(8):1010–6. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-12444319387&partnerID=40&md5=1b58aa18da7a28b831930cd0673c3362>
99. Christman BW. Fowler, Karen B. ; Stagno, Sergio; Pass, Robert F.; Britt, William J.; Boll, Thomas J.; Alford CA. *The New England Journal of Medicine* Downloaded from nejm.org at ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE on June 21, 2014. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1992 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 1992;
100. Schweizer RT. NONCOMPLIANCE_IN_ORGAN_TRANSPLANT_RECIPIENTS_.29.pdf. *Transplantation*; 1990. p. 374–7.
101. Young CJ, Kew C. Health disparities in transplantation: Focus on the complexity and challenge of renal transplantation in African Americans. *Med Clin North Am*. 2005;89(5):1003–31.

102. Cosio FG, Dillon JJ, Falkenhain ME, Tesi RJ, Henry ML, Elkhammas EA, et al. Racial differences in renal allograft survival: the role of systemic hypertension. *Kidney Int* [Internet]. 1995;47(4):1136–41. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7783411
103. Curtis J. Remission of essential hypertension after renal transplantation. *N Engl J Med*. 1983;
104. Yudell M, Roberts D, DeSalle R, Tishkoff S. Taking race out of human genetics. *Science* (80-) [Internet]. 2016;351(6273):564–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aac4951>
105. Julian BA, Gaston RS, Brown WM, Reeves-Daniel AM, Israni AK, Schladt DP, et al. Effect of Replacing Race With Apolipoprotein L1 Genotype in Calculation of Kidney Donor Risk Index. *Am J Transplant*. 2016;
106. Taber DJ, Gebregziabher M, Hunt KJ, Srinivas T, Chavin KD, Baliga PK, et al. Twenty years of evolving trends in racial disparities for adult kidney transplant recipients. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;90(4):878–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.029>
107. Callender CO, Cherikh WS, Traverso P, Hernandez A, Oyetunji T, Chang D. Effect of Donor Ethnicity on Kidney Survival in Different Recipient Pairs: An Analysis of the OPTN/UNOS Database. *Transplant Proc* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;41(10):4125–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.182>
108. Medina-Pestana JO, Galante NZ, Tedesco-Silva Jr. H, Harada KM, Garcia VD, Abbud-Filho M, et al. O contexto do transplante renal no Brasil e sua disparidade geográfica. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2011;33(4):472–84. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002011000400014&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
109. Pallet N, Thervet E, Alberti C, Emal-Aglaé V, Bedrossian J, Martinez F, et al. Kidney transplant in black recipients: Are African Europeans different from African Americans? *Am J Transplant*. 2005;5(11):2682–7.
110. Lee BT, Kumar V, Williams TA, Abdi R, Bernhardt A, Dyer C, et al. The APOL1 genotype of African American kidney transplant recipients does not impact 5-year allograft survival. *Am J Transplant*. 2012;12(7):1924–8.
111. Dorr CR, Freedman BI, Hicks PJ, Brown WM, Russell GB, Julian BA, et al. Deceased-donor apolipoprotein L1 renal-risk variants have minimal effects on liver transplant outcomes. *PLoS One*. 2016;11(4):1–9.
112. Gibney EM, King AL, Maluf DG, Garg AX, Parikh CR. Living kidney donors requiring transplantation: focus on African Americans. *Transplantation*. 2007;84(5):647–9.

113. Lentine K. Racial variation in medical outcomes among medicare and privately-insured living kidney donors. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;13:190. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=71057096>
114. Cooper M, Kramer A, Barth R, Phelan M. Living kidney donor relationship in caucasian and African American populations and implications for targeted donor education programs. *Clin Transplant*. 2013;27(1):32–6.
115. Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;375(9731):2073–81. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60674-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60674-5)
116. Mehrotra R, Kermah D, Fried L, Adler S, Norris K. Racial differences in mortality among those with CKD. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2008;19(7):1403–10. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18385428
117. Lipkowitz MS. Apolipoprotein L1: from obscurity to consistency to controversy. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;87(1):14–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815300314>
118. Freedman BI, Langefeld CD, Lu L, Palmer ND, Carrie Smith S, Bagwell BM, et al. APOL1 associations with nephropathy, atherosclerosis, and all-cause mortality in African Americans with type 2 diabetes. *Kidney Int* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;87(1):176–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2014.255>
119. Bild DE, Detrano R, Peterson D, Guerci A, Liu K, Shahar E, et al. Ethnic differences in coronary calcification: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Circulation*. 2005;111(10):1313–20.
120. Gutierrez OM, Judd SE, Irvin MR, Zhi D, Limdi N, Palmer ND, et al. APOL1 nephropathy risk variants are associated with altered high-density lipoprotein profiles in African Americans. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(4):602–8.
121. Freedman BI, Gadegbeku CA, Bryan RN, Palmer ND, Hicks PJ, Ma L, et al. APOL1 renal-risk variants associate with reduced cerebral white matter lesion volume and increased gray matter volume. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Inc; 2016;90(2):440–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.04.027>

122. Langefeld CD, Divers J, Pajewski NM, Hawfield AT, Reboussin DM, Bild DE, et al. Apolipoprotein L1 gene variants associate with prevalent kidney but not prevalent cardiovascular disease in the Systolic Blood Pressure Intervention Trial. *Kidney Int* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;87(1):169–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2014.254><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029429><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4281289><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S008525381530020X>
123. Rosenberg AZ, Naicker S, Winkler CA, Kopp JB. HIV-associated nephropathies: epidemiology, pathology, mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;11(3):150–60. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrneph.2015.9>
124. Mao. Associated focal and segmental glomerulosclerosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 1984;2014.
125. Lescure FX, Fleteau C, Pacanowski J, Brocheriou I, Rondeau E, Girard PM, et al. HIV-associated kidney glomerular diseases: Changes with time and HAART. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(6):2349–55.
126. Fine DM, Gallant JE. Nephrotoxicity of antiretroviral agents: Is the list getting longer? *J Infect Dis*. 2013;207(9):1349–51.
127. Behar DM, Kedem E, Rosset S, Haileselassie Y, Tzur S, Kra-Oz Z, et al. Absence of APOL1 Risk Variants Protects against HIV-Associated Nephropathy in the Ethiopian Population. *Am J Nephrol*. 2011;34(5):452–9.
128. Han TM, Naicker S, Ramdial PK, Assounga a G. A cross-sectional study of HIV-seropositive patients with varying degrees of proteinuria in South Africa. *Kidney Int*. 2006;69(12):2243–50.
129. Albuqumi M. Collapsing Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006;17(10):2854–63. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2006030225>
130. McNicholas B a, Nelson PJ. Immunity unmask APOL1 in collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;87(2):270–2. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ki.2014.325>
131. Wyatt CM, Schlondorff D. Precision medicine comes of age in nephrology: Identification of novel biomarkers and therapeutic targets for chronic kidney disease. *Kidney Int* [Internet]. International Society of Nephrology; 2016;89(4):734–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.02.009>
132. Trivedi B. Chronic Disease Vaccines Need Shot in the Arm. *Science* (80-) [Internet]. 2012;337(6101):1479–81. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/337/6101/1479.short><http://www.sciencemag.org/content/337/6101/1479.full.pdf>

133. Nadkarni GN, Wyatt CM, Murphy B, Ross MJ. APOL1: a case in point for replacing race with genetics. *Kidney Int* [Internet]. International Society of Nephrology; 2017;91(4):768–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.002>
134. Larsen CP, Freedman BI. Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy and the Future of Renal Diagnostics. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2015;26(6):1232–5. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2014101052>
135. Osorio RG. O sistema classificatório de “cor ou raça” do IBGE. *Sociologia*. 2003;53.
136. Ricardo AC, Flessner MF, Eckfeldt JH, Eggers PW, Franceschini N, Go AS, et al. Prevalence and correlates of CKD in hispanics/latinos in the United States. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;
137. Heringer R. Desigualdades raciais no Brasil: síntese de indicadores e desafios no campo das políticas públicas. *Cad Saude Publica*. 2002;18:S57–65.
138. Reis PP dos. A miscigenação e a etnia brasileira (*) . *Rev Hist (Costa Rica)*. 1961;23(48).
139. Crawford, Nicholas; Kelly, Derek; Hansen M. Loci associated with skin pigmentation identified in African populations. *Science* (80-). 2017;8433(October).
140. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR dos. Report of the Brazilian Chronic Dialysis Census 2012. *J Bras Nefrol* [Internet]. 2014;36(1):48–53. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0101-2800.20140009>
141. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Walker PD. Apolipoprotein L1 Risk Variants Associate with Systemic Lupus Erythematosus-Associated Collapsing Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013;24(5):722–5. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2012121180>
142. Palmer ND, Freedman BI. APOL1 and progression of nondiabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2013;24(9):1344–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3752959&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
143. Zakharia F, Basu A, Absher D, Assimes TL, Go AS, Hlatky M a, et al. Characterizing the admixed African ancestry of African Americans. *Genome Biol*. 2009;10(12):R141.
144. Hoy WE, Kopp JB, Mott SA, Winkler CA. Absence of APOL1 risk alleles in a remote living Australian Aboriginal group with high rates of CKD, hypertension, diabetes, and cardiovascular disease. *Kidney Int* [Internet]. International Society of Nephrology; 2017;91(4):990. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.11.031>

145. Yadav AK, Kumar V, Sinha N, Jha V. APOL1 risk allele variants are absent in Indian patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* [Internet]. International Society of Nephrology; 2016;90(4):906–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2016.07.026>
146. Colares VS, Titan SM de O, Pereira A da C, Malafronte P, Cardena MM, Santos S, et al. MYH9 and APOL1 Gene Polymorphisms and the Risk of CKD in Patients with Lupus Nephritis from an Admixture Population. Assassi S, editor. *PLoS One* [Internet]. Public Library of Science; 2014 Mar 21 [cited 2017 Sep 16];9(3):e87716. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0087716>
147. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol.* 2010;22(2):187–92.
148. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One.* 2011;6(2).
149. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Gênes Gita D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *PLoS One.* 2013;8(9):1–11.
150. Rodrigues S, Caarden P Van. Texto integrante dos Anais do XIX Encontro Regional de História: Poder Violência e Exclusão. ANPUH/SP – USP. São Paulo, 8 a 12 de setembro de 2008. 2008;1–10.
151. Kanji Z, Powe CE, Wenger JB, Huang C, Ankers E, Sullivan D a., et al. Genetic Variation in APOL1 Associates with Younger Age at Hemodialysis Initiation. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(11):2091–7.
152. Pollak MR, Genovese G, Friedman DJ. APOL1 and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(2):179–82.
153. Ferguson R, Grim CE, Opgenorth TJ. A familial risk of chronic renal failure among blacks on dialysis? *J Clin Epidemiol* [Internet]. 1988;41(12):1189–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3210065>
154. Freedman BI, Volkova N V., Satko SG, Krisher J, Jurkovitz C, Soucie JM, et al. Population-based screening for family history of end-stage renal disease among incident dialysis patients. *Am J Nephrol.* 2005;25(6):529–35.
155. Freedman BI, Langefeld CD, Turner J, Núñez M, High KP, Spainhour M, et al. Association of APOL1 variants with mild kidney disease in the first-degree relatives of African American patients with non-diabetic end-stage renal disease. *Kidney Int* [Internet]. 2012;82(7):805–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

156. Cuadrado L, Jorge R. Ponto de Vista A Doença Renal Como Fator de Risco. 2005;85:432–6.
157. Oram S, Stokes W. The heart in. 1960;(1924):1–11.
157. Eltis, David and Richardson, David (2010) "Atlas of the Transatlantic Slave Trade," African Diaspora Archaeology Newsletter: Vol. 13 : Iss. 4 , Article 17.
158. IBGE, ed. (2010). <http://www2.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela>, consultado em 03 de novembro de 2017.

10 – ANEXOS

10.1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Familiares

Eu, Tobias August Siemens, responsável pela pesquisa *Prevalência de variantes do gene APOL1 numa amostra de pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil*, estou fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa pretende identificar e determinar a prevalência de alterações genéticas que facilitam o aparecimento de doenças renais crônicas em descendentes de africanos. Acreditamos que nossa pesquisa seja importante porque justamente essa população é a mais atingida pela insuficiência renal crônica.

Serão incluídos na pesquisa participantes que se autodenominarem negros ou pardos, ou que indiquem terem alguma descendência africana, e que estejam em tratamento dialítico em centros brasileiros. Os participantes serão abordados dentro das próprias clínicas de diálise. Todos os participantes terão que necessariamente ter mais de 18 anos, independentemente do gênero. Serão excluídos os participantes que se autodenominarem de outra raça que não negra ou parda, que se recusarem a assinar este termo de consentimento livre e esclarecido ou participantes portadores de doenças monogênicas (como Doença Autossômica Policística Renal), de uropatias obstrutivas, de hipertensão acelerada maligna e participantes com suspeita de hipertensão secundária. Serão ainda incluídos na pesquisa familiares de pacientes afrodescendentes e que não apresentem evidência de doença renal crônica. O objetivo desta pesquisa é recrutar ao todo 764 participantes, entre pacientes dialíticos e familiares. Nosso objetivo principal com o estudo é identificar a presença de polimorfismos no gene APOL1 em pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil. Polimorfismos são variações genéticas que surgem como consequências de mutações e podem ser responsáveis por doenças. O gene APOL1 é responsável pela codificação da proteína apolipoproteína 1, que circula no sangue e tem várias funções, como proteção contra doenças.

Além disso queremos verificar também a associação entre a presença de variantes do gene APOL1 e o tempo de diagnóstico da doença renal crônica, verificar a associação entre a presença de variantes do gene APOL1 e a nefropatia diabética e verificar se há prevalência aumentada de variantes do gene APOL1 em familiares de pacientes afrodescendentes com doença renal crônica terminal. A importância da identificação desses polimorfismos (ou variações genéticas) é a alta prevalência de doenças causadas por essas alterações genéticas em pacientes com doença renal crônica, além de ser uma pesquisa inédita aqui no Brasil.

Nos familiares dos participantes em diálise será realizada uma coleta de sangue de aproximadamente 10ml (aproximadamente 2 colheres de chá), para análise do DNA (essa análise de DNA servirá para determinar a presença ou ausência da variação genética em estudo), dosagem de creatinina sérica (através do método JAFÉ, um dos exames utilizados para determinar a função renal) e hemoglobina glicosilada (através do método HPLC, um dos exames utilizados para determinar a presença ou ausência de diabetes mellitus), além de coleta de uma amostra de urina matinal para determinar a relação albumina/creatinina (através do método turbidimetria, um dos exames utilizados para determinar a função renal). Será ainda realizado uma ecografia renal, quando necessário. A ecografia é um exame complementar para ajudar na definição de presença ou ausência de doença renal crônica nestes familiares. A ecografia não oferece riscos ao participante, podendo gerar no máximo um desconforto pela utilização de gel úmido e frio. Os exames genéticos de DNA serão realizados em laboratório no exterior (Boston, EUA), pela equipe do Dr. Martin Pollak, onde o projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética local. As amostras serão enviadas ao exterior de maneira numerada, mas sem identificação pelo nome, de modo que o nome do participante não ficará exposto na amostra. Apenas o pesquisador terá acesso aos nomes correspondentes a cada número, ficando dessa maneira assegurado a confidencialidade, privacidade e direito de imagem dos participantes. Essas amostras enviadas ao exterior servirão unicamente para a detecção das variantes do gene APOL1, sendo em seguida descartadas. Seu material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão exclusivos para a finalidade prevista no presente protocolo de pesquisa e o material biológico será destruído ao final do presente estudo. A análise genética será feita usando um sistema chamado PureGene (da Gentra Systems), através da tecnologia Sequenom e será feito a genotipagem para variações genéticas do APOL1 (no caso, as variantes G1 e G2). A análise de hemoglobina glicosilada, creatinina sérica e relação albumina/creatinina em urina matinal serão realizados pelo Laboratório Scribner, em Curitiba. Para realização desta pesquisa, não haverá armazenamento de amostras, seja no Brasil ou no exterior.

Iremos ainda solicitar sua colaboração para preencher um questionário, no qual constarão dados como nome, idade, gênero e outras doenças que você possua (caso seja seu caso). Iremos também pedir para você nos dizer sua raça, assim como a raça dos seus pais e avós. Além disso, iremos medir e anotar seu peso, sua altura e sua pressão arterial.

Possíveis riscos da pesquisa incluem o desconforto do participante em preencher o questionário proposto e o termo de consentimento livre e esclarecido, o que será minimizado através da explicação cuidadosa por parte do pesquisador sobre o significado desses documentos e a disposição do pesquisador em esclarecer qualquer dúvida que possa surgir

no processo. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido do participante pelo pesquisador responsável e elaborado em duas vias igualmente válidas, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas no final, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa. Também existem riscos inerentes à coleta de sangue, como dor durante a coleta e hematomas após a coleta. Para amenizar isso, o sangue será coletado por profissionais qualificados e com experiência na área. Garantimos ao participante a indenização por parte do pesquisador responsável em caso de danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, decorrentes da participação desta pesquisa.

Os benefícios que esperamos com o estudo são identificar a presença de alterações genéticas na população afrodescendente brasileira que aumentem o risco de desenvolvimento de doença renal crônica. É importante esclarecer que, caso você decida não participar, não existe nenhum tipo de prejuízo à sua saúde, visto que o exame genético que desejamos realizar é de caráter experimental e ainda não é um teste clínico padronizado. Durante todo o período da pesquisa, você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato com algum dos pesquisadores. Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, assim como para os participantes do estudo, nas instituições onde os dados foram coletados. Não haverá identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Os gastos necessários para a realização dos exames serão assumidos pelos pesquisadores, não havendo cobrança alguma do participante, nem do sistema de saúde público ou complementar. Será feito encaminhamento dos participantes para acompanhamento em ambulatório específico, quando forem detectadas alterações importantes nos exames.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____
após a leitura deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado. Ficou claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou

ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Declaro também autorizar o descarte das amostras, tanto das coletadas e analisadas pelo Laboratório Scribner, quanto as amostras enviadas ao exterior (Boston, EUA), sendo portanto todo o material biológico destruído ao final do estudo. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura testemunha

Data: _____/_____/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção do termo de consentimento

DADOS DO PESQUISADOR

Nome: Tobias August Siemens Endereço: Av. Vicente Machado, 2190

Telefone: (41) 3312-5400

Endereço eletrônico: contato@pro-renal.org.br

DADOS DO CEP RESPONSÁVEL

NOME: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PUCPR

Endereço: PUCPR - Câmpus Curitiba – Prédio Administrativo – 3º andar

Telefone: (41) 3271-2103

Endereço eletrônico: nep@pucpr.br

Pacientes

Eu, Tobias August Siemens, responsável pela pesquisa *Prevalência de variantes do gene APOL1 numa amostra de pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil*, estou fazendo um convite para você participar como voluntário deste nosso estudo. Esta pesquisa pretende identificar e determinar a prevalência de alterações genéticas que facilitam o aparecimento de doenças renais crônicas em descendentes de africanos. Acreditamos que nossa pesquisa seja importante porque justamente essa população é a mais atingida pela insuficiência renal crônica.

Serão incluídos na pesquisa participantes que se autodenominarem negros ou pardos, ou que indiquem terem alguma descendência africana, e que estejam em tratamento dialítico em centros brasileiros. Os participantes serão abordados dentro das próprias clínicas de diálise. Todos os participantes terão que necessariamente ter mais de 18 anos, independentemente do gênero. Serão excluídos os participantes que se autodenominarem de outra raça que não negra ou parda, que se recusarem a assinar este termo de consentimento livre e esclarecido ou participantes portadores de doenças monogênicas (como Doença Autossômica Policística Renal), de uropatias obstrutivas, de hipertensão acelerada maligna e participantes com suspeita de hipertensão secundária. Serão ainda incluídos na pesquisa familiares de pacientes afrodescendentes e que não apresentem evidência de doença renal crônica. O objetivo desta pesquisa é recrutar ao todo 764 participantes, entre pacientes dialíticos e familiares. Nosso objetivo principal com o estudo é identificar a presença de polimorfismos no gene APOL1 em pacientes afrodescendentes em diálise crônica no Brasil. Polimorfismos são variações genéticas que surgem como consequências de mutações e podem ser responsáveis por doenças. O gene APOL1 é responsável pela codificação da proteína apolipoproteína 1, que circula no sangue e tem várias funções, como proteção contra doenças.

Além disso queremos verificar também a associação entre a presença de variantes do gene APOL1 e o tempo de diagnóstico da doença renal crônica, verificar a associação entre a presença de variantes do gene APOL1 e a nefropatia diabética e verificar se há prevalência aumentada de variantes do gene APOL1 em familiares de pacientes afrodescendentes com doença renal crônica terminal. A importância da identificação desses polimorfismos (ou variações genéticas) é a alta prevalência de doenças causadas por essas alterações genéticas em pacientes com doença renal crônica, além de ser uma pesquisa inédita aqui no Brasil.

Nos participantes em diálise será realizada uma coleta de sangue durante uma sessão de hemodiálise, para análise do DNA. Essa análise de DNA servirá para determinar a presença ou ausência da variação genética em estudo. Essa amostra será de aproximadamente 7ml (aproximadamente meia colher de sopa). Os exames genéticos de DNA serão realizados em

laboratório no exterior (Boston, EUA), pela equipe do Dr. Martin Pollak, onde o projeto também foi aprovado pelo Comitê de Ética local. As amostras serão enviadas ao exterior de maneira numerada, mas sem identificação pelo nome, de modo que o nome do participante não ficará exposto na amostra. Apenas o pesquisador terá acesso aos nomes correspondentes a cada número, ficando dessa maneira assegurado a confidencialidade, privacidade e direito de imagem dos participantes. Essas amostras enviadas ao exterior servirão unicamente para a detecção das variantes do gene APOL1, portanto seu material biológico e os dados obtidos na pesquisa serão exclusivos para a finalidade prevista no presente protocolo de pesquisa e o material biológico será destruído ao final do presente estudo. A análise genética será feita usando um sistema chamado PureGene (da Gentra Systems), através da tecnologia Sequenom e será feito a genotipagem para variações genéticas do APOL1 (no caso, as variantes G1 e G2). Para realização desta pesquisa, não haverá armazenamento de amostras, seja no Brasil ou no exterior.

Iremos ainda solicitar sua colaboração para preencher um questionário, no qual constarão dados como nome, idade, gênero, outras doenças que você possua (caso seja seu caso), idade de início da doença renal e idade de início da diálise. Iremos também pedir para você nos dizer sua raça, assim como a raça dos seus pais e avós. Além disso, iremos medir e anotar seu peso, sua altura e sua pressão arterial. Serão também acessados dados do seu prontuário médico na Clínica de Diálise para complementação de informações, porém garantimos que esse acesso será realizado apenas pelo pesquisador e que o sigilo e a confidencialidade da identidade do participante serão garantidos.

Possíveis riscos da pesquisa incluem o desconforto do participante em preencher o questionário proposto e o termo de consentimento livre e esclarecido, o que será minimizado através da explicação cuidadosa por parte do pesquisador sobre o significado desses documentos e a disposição do pesquisador em esclarecer qualquer dúvida que possa surgir no processo. Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido do participante pelo pesquisador responsável e elaborado em duas vias igualmente válidas, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas no final, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa. Também existem riscos inerentes à coleta de sangue, como dor durante a coleta e hematomas após a coleta. Para amenizar isso o sangue será coletado durante a sessão de hemodiálise, evitando uma picada com agulha adicional àquela que o paciente já se submeteria pela diálise. Garantimos ao participante a indenização por parte do pesquisador responsável em caso de danos diretos ou indiretos, imediatos ou tardios, decorrentes da participação desta pesquisa.

Os benefícios que esperamos com o estudo são identificar a presença de alterações

genéticas na população afrodescendente brasileira que aumentem o risco de desenvolvimento de doença renal crônica. É importante esclarecer que, caso você decida não participar, não existe nenhum tipo de prejuízo à sua saúde, visto que o exame genético que desejamos realizar é de caráter experimental e ainda não é um teste clínico padronizado. Durante todo o período da pesquisa, você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando para isso entrar em contato com algum dos pesquisadores. Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, assim como para os participantes do estudo, nas instituições onde os dados foram coletados. Não haverá identificação dos participantes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Os gastos necessários para a realização dos exames serão assumidos pelos pesquisadores, não havendo cobrança alguma do participante, nem do sistema de saúde público ou complementar. Será feito encaminhamento dos participantes para acompanhamento em ambulatório específico, quando forem detectadas alterações importantes nos exames.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____,

após a leitura deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado. Ficou claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar. Declaro também autorizar o descarte das amostras enviadas ao exterior (Boston, EUA), assim como declaro estar ciente de que não haverá armazenamento de amostras biológicas minhas no Brasil, sendo todo material biológico destruído ao final do estudo, seja no Brasil ou no exterior. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

Assinatura de uma testemunha Data: _____/_____/_____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pela obtenção do termo de consentimento

DADOS DO PESQUISADOR

Nome: Tobias August Siemens Endereço: Av. Vicente Machado, 2190

Telefone: (41) 3312-5400

Endereço eletrônico: contato@pro-renal.org.br

DADOS DO CEP RESPONSÁVEL

Nome: Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR

Endereço: PUCPR - Câmpus Curitiba – Prédio Administrativo – 3º andar

Telefone: (41) 3271-2103 / Endereço eletrônico: nep@pucpr.br

10.2 – QUESTIONÁRIO

Nome: _____

Participante: dialítico / IRC / família

Nascimento: ____/____/____

Cidade de moradia: _____ Estado: _____ Renda familiar estimada (em salários mínimos) _____

- a) pai: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração
- b) mãe: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração
- c) avó materna: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração
- d) avô materna: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração
- e) avó paterna: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração
- f) avô paterna: branca / preta / amarela / parda / indígena / sem declaração

CAUSA(S) DA NEFROPATIA CRÔNICA

() Diabetes

() Hipertensão

()

Glomerulonefrite

crônica () Outras:

Idade do diagnóstico: _____ anos Idade de início na diálise: _____ anos

Acompanhamento com nefrologista: sim / não

COMORBIDADES RELEVANTES

() Diabetes – tempo de diagnóstico:

() Hipertensão – tempo de diagnóstico:

() Insuficiência Cardíaca Congestiva

documentada () Insuficiência

Coronariana documentada

() DPOC

() Tabagismo

() Colagenose – qual:

() Insuficiência Cerebrovascular (história de AVE documentada) () Neoplasia maligna – sítio:

() Dislipidemia

() outras:

Peso_____kg altura_____cm IMC _____ Pressão arterial_____mmHg

Glicemia de jejum_____mg/dl Creatinina sérica_mg/dl

Colesterol total_____Triglicerídeos_____HDL_____LDL_____Relação albumina /
creatinina:_____mg/g

Assinatura _____

Apoio: Fundação Pró-Renal Brasil

Instituto Scribner de Ensino e Pesquisa

10.3 – APROVAÇÃO CONEP