



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE RISCO DO GENE
APOL1 E HEMOGLOBINAS VARIANTES COM PROGRESSÃO
DAS DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA**

DONA JEANNE ALLADAGBIN

Salvador - Bahia

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE RISCO DO GENE
APOL1 E HEMOGLOBINAS VARIANTES COM PROGRESSÃO
DAS DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA**

DONA JEANNE ALLADAGBIN

Orientador: Dr. Washington LC dos-Santos

Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Patologia Humana para
a obtenção do grau de Doutor.

Salvador - Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Alladagbin, Dona Jeanne.
A416a Associação entre variantes de risco do gene *APOLI* e hemoglobinas variantes com progressão das doenças glomerulares na Bahia. / Dona Jeanne Alladagbin. - 2020.

178 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular.

Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Doença renal. 2. Biópsia. 3. Traço Falciforme.
4. Hemoglobina. I. Título.

CDU 616.61

Título da Tese: "ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 E HEMOGLOBINAS VARIANTES COM PROGRESSÃO DAS DOENÇAS GLOMERULARES NA BAHIA"

DONA JEANNE ALLADAGBIN

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 23 de Março de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA




Dr Reinaldo Pessoa Martinelli
Professor
UFBA




Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Maria da Conceição Chagas de
Almeida
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador
IGM/Fiocruz

FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB (SUS0004/2013)
Instituto Gonçalo Moniz (IGM/Fiocruz-Ba) - Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM).

AGRADECIMENTOS

Louvor e honra a DEUS TRIUNO, pela sua maravilhosa e infinita graça e bondade na minha vida. A Ele seja a glória para sempre! Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. Obrigada Senhor, por tudo que tens feito por mim.

Aos meus amados pais, Victorin ALLADAGBIN e Noélie VIKPEAGOUNDJI, que me sustentaram com seu amor incondicional. Obrigada pelo incentivo, o apoio espiritual, moral e material que vocês nunca deixaram de me trazer apesar da distância. Deus vos abençoe e que na sua infinita graça lhes conceda saúde e muita paz.

Aos meus queridos irmãos Felicité, Pulchérie, Esther e Japhet por terem me cercado de carinho e amor, pela confiança e por sempre estarem em oração por mim. Que o Senhor conserve esse amor e essa união que há entre nós e vos abençoe.

Ao meu amado noivo Eugene MEDJIGBODO por me compreender e apoiar durante esse tempo estressante. Muito obrigada meu querido pelo seu amor e carinho e pela paciência e confiança durante todo esse tempo, mesmo vivendo longe um do outro. Que o Senhor nos ajude a cultivar esse sentimento sempre.

Ao meu orientador Dr. Washington Luis Conrado dos Santos, por ser exemplo de pessoa e profissional íntegro. Sou grata pela confiança e por ter aceitado em me orientar por mais quatro anos. Obrigada pelos ensinamentos e, principalmente, pela paciência. Que Deus te abençoe e te conceda mais sabedoria.

Ao Dr Geraldo Gileno de Sá Oliveira, por estar sempre disposto a me orientar quando eu precisei e pela excelente colaboração.

Ao Drs Guilherme de Sousa Ribeiro e Luciano Kalabric Silva, pela disposição em ajudar com as análises e pela excelente colaboração.

À Debora Leal, pela amizade e ajuda na coleta das amostras dos pacientes nos hospitais. Você desempenhou um papel muito importante na realização desse trabalho. Muito obrigada e que Deus te abençoe e te guarde.

À Professora. Marilda de Souza Gonçalves, coordenadora do projeto CNPQ/Brasil- África; pela iniciativa, a confiança e todas as medidas empreendidas para tornar o projeto uma realidade. Deus te abençoe!

Aos Professores Chérif Mohamed Rahimy, coordenador do projeto CNPQ/Brasil-Benin e Ambaliou Sanni, pela confiança e todas as medidas empreendidas para tornar o projeto realidade. Obrigada por nos permitir fazer parte deste projeto.

À Dra. Nadia de Andrade Khouri e equipe de Coordenação do Serviço de Nefrologia do Hospital Geral Roberto Santos pela colaboração. Obrigada Doutora pelo carinho e por tudo que fez e continua fazendo por mim e meus colegas. Que a graça de Deus abunde na sua vida.

Ao Dr Epitácio Rafael da Luz Neto e equipe de serviço de nefrologia do Hospital Ana Nery pela colaboração.

Aos pacientes do ambulatório de Nefrologia que aceitaram participar carinhosamente e possibilitaram a realização deste trabalho.

À Dra Camila A. Figueiredo pela colaboração

À Dra Tatiana Amorim, coordenadora do Núcleo de Pesquisa Científica de APAE Salvador pela colaboração.

Ao Jean Tadeu Brito, pela ajuda na análise do perfil das variantes de hemoglobina.

Ao pastor Diógenes e os membros da Igreja Batista Káris, pela ajuda, carinho, acolhimento e por me fazer sentir tão bem em meio de vocês. Que o Senhor nosso Deus continue sustentando e guardando a sua igreja. Agradeço a irmã Lúcia que abriu as portas da sua casa para me hospedar sem me conhecer. Que Deus continue te abençoando e cuidando de você.

Aos meus colegas do projeto CNPQ/ BENIN E NIGÉRIA. Obrigada a vocês pelo carinho, ajuda, amizade e a convivência apesar da personalidade de cada um de nós. Que Deus abençoe e sustenta cada um na sua jornada. Obrigada, Modeste por estar sempre disponível e prestativo.

Aos colegas do grupo WLCS e do Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM).

A Selma Mattos, Girlandia e Thaynara, pela amizade.

Aos Professores da banca: Meus agradecimentos por terem aceitado o convite de participar da minha banca e pelo tempo dedicado, para avaliar esta tese. Suas observações/sugestões, sem dúvida, contribuirão significativamente para melhorar este trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Patologia, que se disponibilizaram à transmissão das matérias, as quais foram muito importantes para aumentar nosso embasamento teórico e científico.

À Patrícia Ramos Rebouças Luz e Bruno Valença pelo apoio administrativo, pela gentileza, atenção e simpatia.

À secretária da Pós-Graduação, em nome de Ana Carolina Sodré Bitencourt e Ana Carolina de Menezes Costa pela ajuda e a competência nos serviços prestados.

A Elivani Sacramento de Jesus pela ajuda técnica.

À Plataforma de sequenciamento, em nome de Silvana Sousa da Paz e Samara.

Ao serviço de transporte e os motoristas assim como o serviço de tecnologia da informática.

À Biblioteca do IGM.

A todos os funcionários.

Ao SAME dos hospitais Ana Nery e Roberto Santos, e o laboratório do Ana Nery.

Aos colegas da Pós-graduação em Patologia.

Ao IGM, por abrir suas portas para mim e pela infraestrutura que possibilitou a execução deste trabalho.

A FAPESB e CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma, de perto ou de longe tornaram possível a realização deste trabalho.

ALLADAGBIN, Dona Jeanne. Associação entre variantes de risco do gene *APOLI* e hemoglobinas variantes com progressão das doenças glomerulares na Bahia. 178 f.il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Além daqueles tradicionalmente reconhecidos como principais fatores de risco da doença renal, uma ênfase crescente tem sido atribuída à constituição genética dos pacientes. **OBJETIVO:** Estimar a frequência das variantes de risco de *APOLI* e da hemoglobina em pacientes submetidos à biópsia renal na Bahia, e avaliar a associação entre essas variantes e a progressão das doenças glomerulares nesses pacientes. **MÉTODO:** Estudo de coorte prospectiva, incluindo 326 pacientes submetidos à biópsia renal. As variantes da hemoglobina foram definidas por cromatografia líquida de alta eficiência e os genótipos de *APOLI* foram determinados por sequenciamento do DNA de 304 pacientes. Os pacientes foram acompanhados durante cinco anos para avaliar os marcadores de progressão de doença. **RESULTADOS:** Dentre os pacientes, 22,7% têm um alelo de risco e 4,3% têm dois alelos de risco da *APOLI*. A idade mediana foi menor nos pacientes portadores de dois alelos de risco *APOLI*, $p = 0,04$. Entre os pacientes com dois alelos de risco, 61,5% apresentavam glomeruloesclerose segmentar focal (FSGS), $p < 0,001$. A proporção de inflamação intersticial, fibrose túbulo-intersticial, esclerose global e / ou segmentar e escore de atrofia tubular foi maior nos pacientes com dois alelos de risco, ($p < 0,05$ para cada um deles). Houve um declínio progressivo na taxa média de filtração glomerular em pacientes com dois alelos de risco durante os cinco anos de acompanhamento: (de 79 ± 51 mL / min / $1,73$ m² para 22 ± 13 mL / min / $1,73$ m², $p = 0,004$), comparado àqueles com um (de 77 ± 41 mL / min / $1,73$ m² para 194 ± 54 mL / min / $1,73$ m²), $p = 0,74$ ou nenhum (de 74 ± 47 mL / min / $1,73$ m² para 78 ± 45 mL / min / $1,73$ m², $p = 0,45$) alelo de risco do *APOLI*. A sobrevida renal é significativamente menor (69%) para pacientes com dois alelos de risco do *APOLI* em comparação com 94% e 91% entre os grupos com um e sem alelos de risco, respectivamente, $p = 0,024$. A proporção de pacientes diagnosticados com GESF que evoluíram para DRET foi significativamente maior em indivíduos com dois alelos de risco (33%) do que naqueles com um alelo de risco (0%) ou sem alelos de risco (3%), $p = 0,04$. A frequência do traço falciforme (HbAS, 4,3%) e do traço de hemoglobina C (HbAC, 3,7%) não foi diferente da encontrada na população em geral (4,5% e 2,2%, respectivamente). Cinco anos depois da biópsia renal, a taxa média de filtração glomerular foi de 35 mL / min / $1,73$ m² em pacientes com traço falciforme, enquanto nos grupos HbAA e HbAC, ela foi de 84 mL / min / $1,73$ m² e 103 mL / min / $1,73$ m² respectivamente, $p = 0,01$. Pacientes com traço falciforme desenvolveram DRET com mais frequência, necessitando de diálise (31%) do que aqueles com HbAA (8%) ($p = 0,02$). **CONCLUSÕES:** Pacientes com genótipo de alto risco do *APOLI* desenvolvem uma forma mais grave da GESF com evidências histológicas de prognóstico pior e progressão mais rápida para estágio terminal da doença. Não há diferença na frequência de HbAS ou HbAC entre os pacientes submetidos a biópsia renal e a população geral. Porém, pacientes com HbAS apresentam declínio mais rápido da taxa de filtração glomerular, menor sobrevida renal em comparação aos pacientes com HbAA.

Palavras-chave: Doenças glomerulares, Biópsia renal, Doença renal em estágio terminal, *APOLI*, Traço falciforme, Traço de hemoglobina C.

ALLADAGBIN, Dona Jeanne. Association between *APOLI* risk variants and hemoglobin variants with progression of glomerular diseases in Bahia. 178 f.il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In addition to those traditionally recognized as the main risk factors for kidney disease, increasing emphasis has been placed on the genetic makeup of patients. **OBJECTIVE:** To estimate the frequency of risk variants of *APOLI* and hemoglobin in patients undergoing renal biopsy in Bahia, and to evaluate the association between these variants and the progression of glomerular diseases in these patients. **METHODS:** Prospective cohort study, including 326 patients undergoing renal biopsy. Hemoglobin variants were defined by high performance liquid chromatography and *Apol1* genotypes were determined by DNA sequencing of 304 patients. Patients were followed up for five years to assess disease progression markers. **RESULTS:** Among the patients, 22.7% had one risk allele and 4.3% had two risk alleles of *APOLI*. The median age was lower in patients carrying two *APOLI* risk alleles, $p = 0.04$. Among the patients with two risk alleles, 61.5% had focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), $p < 0.001$. The proportion of Interstitial Inflammation, tubulointerstitial fibrosis, global and/or segmental sclerosis and tubular atrophy score was higher in patients with two *APOLI* risk alleles ($p < 0.05$ for each of them). There was a progressive decline in the mean glomerular filtration rate between patients with two risk alleles between the time of biopsy and after five years of follow-up: (from 79 ± 51 mL / min / 1.73 m² to 22 ± 13 mL / min / 1.73 m², $p = 0.004$), compared to those with one (from 77 ± 41 mL / min / 1.73 m² to 194 ± 54 mL / min / 1.73 m²), $p = 0.74$ or none (from 74 ± 47 mL / min / 1.73 m² to 78 ± 45 mL / min / 1.73 m², $p = 0.45$) *APOLI* risk allele. Renal survival is significantly lower (69%) for individuals with two *APOLI* risk alleles compared with 94% and 91% between groups with one and without *APOLI* risk alleles, respectively, $p = 0.024$. The proportion of patients diagnosed with FSGS who progressed to ESRD was significantly higher in individuals with two *APOLI* risk alleles (33%) than those with a risk allele (0%) or with no risk alleles (3%), $p = 0.04$. The frequency of sickle cell trait (HbAS, 4.3%) and hemoglobin C trait (HbAC, 3.7%) was not different from that found in the general population (4.5% and 2.2% respectively). Five years after renal biopsy, the estimated glomerular filtration rate mean was 35 mL / min / 1.73 m² in patients with sickle cell trait, while in the HbAA and HbAC groups, the estimated glomerular filtration rate mean was 84 mL / min / 1.73 m² and 103 mL / min / 1.73 m² respectively, $p = 0.01$. Patients with sickle cell trait more frequently developed ESRD needing dialysis (31%) compared to those with HbAA (8%) ($p = 0.02$). **CONCLUSIONS:** Patients with a high-risk genotype of *APOLI* develop a more severe form of FSGS with histological evidence of a worse prognosis and faster progression to the terminal stage of the disease. There is no difference in the frequency of HbAS or HbAC between patients undergoing renal biopsy and the general population. However, patients with HbAS show a faster decline in the glomerular filtration rate, lower renal survival compared to patients with HbAA.

Keywords: Glomerular diseases, Renal biopsy, End-stage kidney disease, *APOLI*, Sickle cell trait, Hemoglobin C trait.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do *APOLI* com os domínios funcionais e localização das variantes genéticas no domínio de interação com a proteína associada à resistência sérica (SRA) 23
- Figura 2.** Estrutura tetramérica da molécula de hemoglobina com duas cadeias α e duas β . 26
- Figura 3.** Troca de aminoácidos que altera a Hemoglobina 28
- Figura 4.** Distribuição geográfica do alelo β S nas diferentes regiões do Brasil. 31
- Figura 5.** Cromatograma de sequenciamento do exon 7 no gene *APOLI* 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APOLI: Apolipoproteína

FACFAR: Faculdade de Farmácia

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DRC: Doença Renal Crônica

DRET: Doença Renal em Estágio Terminal

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

G0/G1: Heterozigose para o haplótipo G1

G0/G2: Heterozigose para o haplótipo G2

G1: Haplótipo G1

G1/G1: Homozigose para o haplótipo G1

G1/G2: Heterozigose composta para os haplótipos G1 e G2

G2: Haplótipo G2

G2/G2: Homozigose para o haplótipo G2

GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

HAN: Hospital Ana Nery

Hb: Hemoglobina

HbS: Hemoglobina S

HbAA: Hemoglobina normal

HbAC: Heterozigoto para variante C

HbAS: Heterozigoto para variante S

HbSC: Heterozigoto composto para variante S e C

HGRS: Hospital Geral Roberto Santos

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HIVAN: Nefropatia por HIV

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

IGM-FIOCRUZ: Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz

LPA: Laboratório de Pesquisa em Anemias

LAPEM: Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular

NigA: Nefropatia por IgA

NL: Nefrite Lúpica

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SAME: Serviço de Arquivo Médico e Estatística

SN: Síndrome nefrótica

SRA: Proteína associada à resistência sérica

SUS: Sistema Único de Saúde

T.b: Trypanosoma brucei

TALE: Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFGe: Taxa de Filtração Glomerular estimada

TRS: Terapia Renal Substitutiva

UFBA: Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	FUNÇÕES DOS RINS.....	16
1.2	AS DOENÇAS GLOMERULARES.....	17
1.3	GENE APOL1 E AS VARIANTES G1 E G2.....	21
1.4	VARIANTES DE APOL1 E DOENÇA RENAL.....	24
1.5	HEMOGLOBINOPATIAS.....	26
1.6	TRAÇO FALCIFORME (HBAS) E O TRAÇO DA HEMOGLOBINA C (HBAC).....	30
1.7	HBAS E HBAC NA DOENÇA RENAL.....	33
2.	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	36
3.	OBJETIVOS	38
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4.	METODOLOGIA	39
4.1.	DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
5.	RESULTADOS	46
	CAPÍTULO I.....	47
	MANUSCRITO 1.....	47
	CAPÍTULO II.....	80
	MANUSCRITO 2.....	80
	CAPÍTULO III.....	110
	MANUSCRITO 3.....	110
6.	DISCUSSÃO	141
7	CONCLUSÕES	144
	REFERÊNCIAS	145
	APÊNDICES	164

RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	164
TERMOS DE CONSENTIMENTO E DE ASSENTIMENTO.....	168
QUESTIONÁRIOS.....	175

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNÇÕES DOS RINS

Os rins são um par de órgãos excretores localizados no espaço retroperitoneal e têm como unidade básica de funcionamento o néfron responsável pela filtração e formação da urina. Cada rim contém em média um milhão de néfrons. Esta estrutura complexa é formada por um corpúsculo renal, composto pelo glomérulo e pela cápsula de Bowman e por túbulos renais, que compreendem o túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e túbulo coletor. Os rins são fundamentais na manutenção da homeostasia do organismo bem como o bem-estar do ser humano. Eles são responsáveis pela manutenção constante do equilíbrio hídrico do organismo regulando o volume de líquido corporal, sua osmolaridade (conteúdo e concentração eletrólíticos) e sua acidez pela excreção de produtos resultantes do metabolismo e substâncias como a uréia, as toxinas e as drogas e a produção de urina. Além disso, desempenham papel fundamental na produção de hormônios como a eritropoietina produzida pelas células intersticiais corticais renais e que estimula a maturação dos eritrócitos na medula óssea; a vitamina D que auxilia na absorção do cálcio para fortalecer os ossos e a renina que contribui no equilíbrio de sal e na regulação da pressão arterial (DIENEMANN et al., 2016; GILBERT, SCOTT J. et al., 2014; XIE et al., 2016).

Quando, por alguma razão, essa estrutura é alterada, pode levar à insuficiência renal que pode ser aguda ou crônica com funcionamento limitado dos rins. A doença renal crônica (DRC) consiste em lesão estrutural ou perda progressiva e irreversível da função dos rins por pelo menos três meses. Em sua fase mais avançada, os rins são incapazes de manter a homeostasia do organismo do paciente e o processo de filtração fica tão comprometido com a necessidade de terapia renal substitutiva (TRS). A DRC é uma doença silenciosa e a prevalência dos pacientes em TRS vem aumentando progressivamente com alta mortalidade e elevados custos para os sistemas de saúde no mundo. A DRC é um importante problema de saúde pública no mundo e afeta entre 10 e 16% da população adulta em muitos países no mundo (DIENEMANN et al., 2016; LIYANAGE et al., 2015). Ela piora devido ao diagnóstico tardio e acesso limitado à TRS (LIYANAGE et al., 2015). As principais causas de doença renal em estágio terminal (DRET) são diabetes mellitus, hipertensão arterial e as doenças glomerulares (OKPECHI et al., 2016; WEBSTER et al., 2017).

1.2 AS DOENÇAS GLOMERULARES

As doenças glomerulares referem-se a um grupo de doenças que acometem os glomérulos renais. As lesões renais com envolvimento único ou predominante dos glomérulos são conhecidas como as doenças glomerulares primárias enquanto outras surgem como consequências de um processo de doenças sistêmicas bem definidas como doenças autoimunes, diabetes, hepatites, dentre outras, com envolvimento secundário do glomérulo denominadas por doenças glomerulares secundárias (ROSENBERG, 1986). As principais doenças glomerulares primárias são glomeruloesclerose segmentar focal, doença por lesão mínima, glomerulonefrite membranosa, Glomerulonefrite membranoproliferativa e Nefropatia por IgA dentre outras. A prevalência dessas doenças com base no diagnóstico histológico, varia amplamente de acordo com a região geográfica, a etnia, a faixa etária. A indicação de biópsia renal e a maioria dos estudos realizados, nos diversos países, foram feitos de maneira retrospectiva com amostras de tamanho variado, usando metodologias e classificações diferentes.

De acordo com diversos estudos epidemiológicos, a doença glomerular primária mais comum na maioria das populações asiáticas, na Austrália e em alguns países europeus é a nefropatia por IgA (NIgA), prevalecendo em países como a China com uma prevalência de 24,3% a 50%; no Japão (30,4% a 32,9%), Taiwan (26%); Itália (36,9%); Hungria (15%); na República Tcheca (34,5% a 37,4%) em biópsias (CHIU et al., 2018; MAIXNEROVA et al., 2015; RYCHLIK et al., 2004; SCHENA, 1997; SIPICZKI et al., 2004; SUGIYAMA et al., 2011, 2013; XU et al., 2016; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2018). A prevalência estimada para Austrália é de 10,5 e uma incidência de 1,41 por 100.000 da população geral por ano; no oeste da França a prevalência estimada é de 2,4 por 1.000 da população (BRIGANTI et al., 2001; JEGATHEESAN et al., 2016; SIMON et al., 2004). Na Espanha, a doença de lesão mínima é a doença glomerular mais frequente (39,5%) em crianças com síndrome nefrótica (SN), em adultos e idosos, a nefropatia membranosa é a mais prevalente (24,2% e 28,0%, respectivamente), enquanto em pacientes com anormalidades urinárias assintomáticas a NIgA é mais comum em qualquer idade (RIVERA; LÓPEZ-GÓMEZ; PÉREZ-GARCÍA, 2004). Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que a NIgA é a doença glomerular primária mais prevalente em jovens adultos caucasianos (NAIR; WALKER, 2006).

Por outro lado, a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) permanece a doença glomerular primária mais frequente em outras regiões do mundo como na África Subsaariana (16,4%), norte da Índia (18,2%); Uruguai (23,7% a 29,3%), Colômbia (22%); Estados Unidos (25,3% a

38,9%) (BARRERA-HERRERA et al., 2017; GARAU et al., 2018; MAZZUCHI et al., 2005; MITTAL et al., 2020; OKPECHI et al., 2016; O'SHAUGHNESSY et al., 2017; SIM et al., 2016). No Brasil, a doença glomerular primária mais frequente é a GESF (19% - 29,7%) seguida pela nefropatia membranosa em alguns estados e a NIgA em outros (COSTA et al., 2017; DOS-SANTOS et al., 2017; FERRAZ et al., 2010; MALAFRONTTE et al., 2006; POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). Nesses trabalhos, foram observadas variações em períodos de tempo com uma tendência de aumento ou diminuição das taxas de algumas doenças glomerulares em muitos países (GARAU et al., 2018; WOO et al., 2010). Também alguns grupos étnicos têm sido mais comumente afetados por doenças glomerulares específicas, como a NIgA entre asiáticos e GESF entre negros (SIM et al., 2016).

O segundo grupo mais frequente de doenças glomerulares são as doenças glomerulares secundárias. Embora a nefropatia diabética seja a doença glomerular secundária mais frequente do mundo, a nefrite lúpica (NL) é a mais comum em séries de biópsias renais com uma frequência de 7% na Hungria; 12,5% nos Estados Unidos; 18,3% no Uruguai em pacientes entre 15 e 35 anos; 8,8% na Espanha; 15,32% na Índia, 17% na Colômbia; 13,9% na Austrália; 6,1% na África Subsaariana e 13,9% na África do Norte, na amostra total (BARRERA-HERRERA et al., 2017; BRIGANTI et al., 2001; GARAU et al., 2018; GOLAY et al., 2013; OKPECHI et al., 2016; O'SHAUGHNESSY et al., 2017; RIVERA; LÓPEZ-GÓMEZ; PÉREZ-GARCÍA, 2004; SIPCZKI et al., 2004). Na África do Sul; Itália; República Checa e na China, a NL representam respectivamente entre 39%; 51,6%; 23%-25,4% e 26,5%-47,35% das doenças glomerulares secundárias (MAIXNEROVA et al., 2015; OKPECHI et al., 2011; RYCHLIK et al., 2004; SCHENA, 1997; SUGIYAMA et al., 2011, 2013; XU et al., 2016; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2014; ZHOU et al., 2018). A nefropatia diabética predomina no Japão (4,8% a 5,1%) (SUGIYAMA et al., 2011, 2013). No Brasil a frequência da NL no diagnóstico geral varia entre 9,27% e 29%; e varia entre 42,3% e 91,2% das doenças glomerulares secundárias (COSTA et al., 2017; DOS-SANTOS et al., 2017; FERRAZ et al., 2010; MALAFRONTTE et al., 2006; POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). O diagnóstico da nefrite tubulointersticial foi relatado com uma porcentagem variando entre 1,01% a 11% do diagnóstico geral (FIORENTINO et al., 2016; XU et al., 2016).

Independentemente da forma da doença, as lesões nos glomérulos resultam em diversas manifestações clínicas da doença. As mais comuns são: a proteinúria e a hematuria causadas pela ruptura da barreira de filtração glomerular, a oligúria ou a anúria causada pela redução da produção de urina, o edema causado por retenção de sal e água e a hipertensão causada pela

retenção de líquidos. A combinação de manifestações clínicas leva a uma variedade de síndromes clínicas. As principais síndromes clínicas que podem se manifestar nas doenças glomerulares são as anormalidades urinárias assintomáticas (hematúria ou proteinúria assintomática), a SN e/ou síndrome nefrítica, a glomerulonefrite rapidamente progressiva e a insuficiência renal crônica (GILBERT, SCOTT J. et al., 2014). Geralmente, a SN é a principal indicação clínica de biópsia renal, principalmente em adultos, seguida por anormalidades urinárias assintomáticas (DOS-SANTOS et al., 2017; POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). Os padrões de diagnósticos histológicos mais frequentes relacionados à SN em adultos são nefropatia membranosa, GESF e a doença de lesão mínima (FIORENTINO et al., 2016). Entretanto nos países onde a NIgA é a doença glomerular primária mais frequente, anormalidades urinárias assintomáticas são a principal indicação clínica de biópsia renal (FIORENTINO et al., 2016; SCHENA, 1997; XU et al., 2016).

No Brasil, na Europa e nos Estados Unidos, as doenças glomerulares são consideradas a terceira causa de DRET, representando respectivamente 11%, 12,4% e 20 - 30% dos pacientes admitidos em TRS; enquanto na Austrália e na Nova Zelândia, elas são a causa mais comum de insuficiência renal e representam 35 % dos casos (COSTA et al., 2017; MAISONNEUVE et al., 2000; SIM et al., 2018; THOMÉ et al., 2019). Na China as doenças glomerulares são consideradas como a causa mais comum de DRET representando 57,4% dos pacientes. Já na África e no Canadá elas são responsáveis por 10,2% a 52% e 16% a 22% respectivamente dos pacientes com DRET em TRS (BARBOUR et al., 2018; LIU, 2013; OKPECHI et al., 2016). A DRET constitui um dos mais importantes problemas de saúde pública no mundo por sua crescente incidência e prevalência e o alto custo de tratamento associado (OKPECHI et al., 2016). Nos Estados Unidos, em 2013, o custo anual estimado tratamento de pacientes com doença renal terminal causada por doenças glomerulares é de quase três bilhões de dólares e a mortalidade entre as cinco doenças glomerulares mais comuns é de 8,3% (O'SHAUGHNESSY et al., 2017; SIM et al., 2018). No Brasil, o número estimado de pacientes em tratamento dialítico é de 610/milhão da população. Segundo o Censo Brasileiro de Diálise Crônica, o número de pacientes em TRS por ano cresceu de 91.314 em 2011 para 126.583 em 2017, correspondendo a um crescimento anual de 6,4% nos últimos 6 anos e a taxa anual de mortalidade de 19,9%. Esse tratamento implica em cerca de 12 h de hemodiálise por semana, suporte médico e de enfermagem e uma variedade de medicamentos. Dessa forma o tratamento da DRET constitui um dos tratamentos de mais alto custo e consome mais de 5% de todos os recursos gastos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) com tratamento de média e alta

complexidade (ALCALDE; KIRSZTAJN, 2018; SESSO et al., 2012; THOMÉ et al., 2019). Além disso, há restrições nutricionais, da mobilidade para lugares distantes das clínicas onde os pacientes são tratados, gastos suplementares com medicamentos, perda sistemática de horas de trabalho e estudo em serviços de hemodiálise em fase produtiva da vida. Em alguns casos, os pacientes têm de se deslocar por longas distancias até as unidades de tratamento e requerem acompanhamento de familiares gerando perdas adicionais e importante impacto socioeconômico e sobre a qualidade de vida dos pacientes e dos familiares (AVRAMOVIC; STEFANOVIC, 2012; KUO et al., 2012).

Vários fatores são relacionados com a progressão da DRC como a hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus não controlados, proteinúria persistente, uso a longo prazo de drogas nefrotóxicas, obstrução do trato urinário, infecção urinária, obesidade, dislipidemia, anemia crônica, dentre outros. As principais doenças glomerulares associadas a maior taxa de incidência da progressão da doença renal são a GESF, NIgA, NL e nefropatia membranosa (CHOI et al., 2019; SIM et al., 2018; WETMORE et al., 2016). O tratamento das doenças glomerulares tem como objetivo, melhorar a qualidade de vida dos pacientes e retardar a progressão para DRT. Como a maioria das doenças glomerulares primárias ou secundárias cursam com a SN, o tratamento se baseia geralmente no uso de drogas imunossupressoras, como corticoides e outros. Embora muitos desses pacientes possam se beneficiar de terapias imunossupressoras específicas, uma proporção significativa é resistente ao tratamento e, eventualmente progridem mais rapidamente para a DRT como no caso da GESF. Por outro lado, o tratamento por imunossupressores pode levar a toxicidades significativas, infecções (principal causa de morte em pacientes com tratamento imunossupressor) e efeitos colaterais irreversíveis (LIU; CHUN, 2018). Outras estratégias terapêuticas geralmente aplicadas incluem o controle adequado da pressão arterial, redução da proteinúria por inibidores da enzima conversora de angiotensina ou bloqueadores dos receptores da angiotensina, restrição moderada de proteínas na dieta e controle da glicemia em pacientes com diabetes mellitus (NATH; FERVENZA, 2018). A progressão da DRC para estágio terminal, depende do tipo histológico da doença renal e da resposta ao tratamento.

A SN primária ou idiopática é a manifestação clínica mais comum das doenças glomerulares primárias tanto em adultos quanto em crianças e é caracterizada pela presença de proteinúria maciça (acima de 3,5 g), edema, hipoalbuminemia e a hiperlipidemia. Durante o tratamento com corticoides, alguns pacientes se encontram resistentes e persistem com a proteinúria superior a 3,5 g. O prognóstico desses pacientes é ruim e 30-40% podem progredir rapidamente

para estágio final da doença renal necessitando da TRS (JOSHI et al., 2013; SEN et al., 2017). Segundo os últimos estudos, várias mutações genéticas estão envolvidas na patogênese da SN resistente aos esteroides em diversos genes que codificam proteínas importantes para a manutenção da estrutura e da função da barreira de filtração glomerular. Estas proteínas são expressas principalmente nos podócitos e estão envolvidas diretamente ou indiretamente na organização do diafragma da fenda e do citoesqueleto de actina e são importantes para o bom funcionamento da filtração no rim (CHIANG; INAGI, 2010). Os principais genes envolvidos na forma autossômica recessiva da SN, são os genes *NPHS1* que codificada a nefrina; *NPHS2* que codificada a podocina e o gene *PLCE1*; enquanto aqueles cujas mutações causam a SN autossômica dominante, incluem *WT1*, *INF2*, *TRPC6* e *ACTN4* (ANIGILAJE; OLUTOLA, 2019; BOYER et al., 2010; GUARAGNA et al., 2016; LOVRIC et al., 2016; WAREJKO et al., 2018). Além desses fatores genéticos, outras mutações não diretamente relacionadas ao aparecimento da SN têm importância significativa na progressão da doença para o estágio final.

A população afrodescendente tem um risco maior de progressão para DRC terminal, cujas taxas são de duas a quatro vezes superiores à população caucasiana (BARRETO et al., 2016; CHOI et al., 2009; LIPWORTH et al., 2012). Embora o status socioeconômico, o pouco acesso aos serviços de saúde, níveis de pressão arterial mais elevado, controle inadequado da glicemia e o estilo de vida explicam parcialmente essa disparidade na ocorrência de DRC, estudos recentes têm demonstrados uma importante contribuição genética na progressão de doenças renais e principalmente as variantes genéticas identificadas no gene *Apol1* que codifica a apolipoproteína L1 e no gene da hemoglobina.

1.3 GENE APOL1 E AS VARIANTES G1 E G2

O gene *APOLI* é um dos seis membros dos genes *APOL* (*APOL1-6*) localizados no cromossomo 22 que surgiram através da duplicação gênica. O *APOLI* é expresso e funcional apenas em humanos e algumas espécies na linhagem de primatas superiores (FRIEDMAN; POLLAK, 2016; LIMOU et al., 2014; SHARMA et al., 2016). O *APOLI* contém 14,5 kb com sete exons e codifica a apolipoproteína L1, uma proteína sérica humana de 398 aminoácidos, com 3 domínios funcionais e estruturais que são, o domínio de formação de poros, o domínio de adesão à membrana sensível ao pH e o domínio de interação com a proteína associada à resistência sérica (SRA) (LIMOU et al., 2015; M. MADHAVAN; O'TOOLE, 2013), figura 1. A apolipoproteína L1 (*Apol1*) é um componente menor de partículas da lipoproteína de alta densidade (HDL) no sangue e desempenha um papel no transporte e no metabolismo lipídico.

Apoll é expressa em vários órgãos, incluindo o rim. Nos rins saudáveis, a Apoll está localizada em podócitos, células endoteliais e células epiteliais tubulares proximais (FRIEDMAN; POLLAK, 2016; HENEGHAN et al., 2015; KUMAR et al., 2018; M. MADHAVAN; O'TOOLE, 2013; MADHAVAN et al., 2011; VANHOLLEBEKE; PAYS, 2006).

A Apoll desempenha importantes papéis extra e intracelulares na defesa do hospedeiro e nos mecanismos de homeostasia celular, como o transporte e metabolismo lipídico, a apoptose, a autofagia celular e a imunidade inata (HU; KLOPFER; RAY, 2012; TZUR et al., 2010). A função da Apoll na imunidade inata consiste na sua atividade tripanolítica que confere uma resistência contra a infecção por *Trypanosoma brucei* (T.brucei), um parasita transmitido pela mosca tsé-tsé e responsável pela tripanossomíase africana que se manifesta como doença do sono em humanos (COOPER et al., 2017; THOMSON et al., 2014). A atividade tripanolítica de Apoll é mediada por domínios proteicos codificados pelo último exon. Apoll despolariza a membrana lisossômica do parasita formando poros iônicos após endocitose e inserção nas membranas, o que causa o influxo irreversível do cloreto e água do citoplasma para o lisossoma e morte do tripanosoma (BRUGGEMAN; O'TOOLE; SEDOR, 2017; LECORDIER et al., 2009; LIMOU et al., 2014). No entanto, duas subespécies desse parasito denominadas *T. brucei. rhodesiense* e *T. brucei. gambiense* desenvolveram mecanismos diferentes para se tornarem resistentes à atividade lítica da Apoll e podem infectar os humanos, causando respectivamente a forma aguda e crônica da doença do sono. O *T. brucei. rhodesiense* predomina na África Oriental, e o *T. brucei. gambiense* é mais comum na África Ocidental. O *T. brucei. rhodesiense* produz a SRA, uma glicoproteína variável de superfície que se liga à região C-terminal da Apoll. Essa interação impede a formação de poros e neutraliza a atividade lítica da Apoll com consequência a prevenção da morte do parasito. O mecanismo usado pelo *T. brucei. gambiense* para resistir ao soro humano não envolve a inativação direta da Apoll. O *T. brucei. gambiense* expressa uma glicoproteína específica que impede a formação de poros por endurecimento da membrana lisossômica do parasito e o bloqueio da inserção da Apoll (CUYPERS et al., 2016; DUMMER et al., 2015; LECORDIER et al., 2009).

As mutações genéticas que ocorrem no domínio C terminal no último exon do gene *APOLI*, impedem a ligação direta da SRA a essa região e restauram a atividade tripanolítica da Apoll contra *T. brucei. rhodesiense* a fim de prevenir a tripanossomíase aguda em humanos (LIMOU et al., 2015; UZUREAU et al., 2013). Duas dessas mutações restritas ao cromossomo de origem africana que surgiram, independentemente, em cromossomos separados foram descobertas em 2010 por Genovese e colaboradores (GENOVESE et al., 2010). O primeiro haplótipo,

denominado G1 corresponde a uma mutação nucleotídica que resulta numa substituição do aminoácido Serina pela Glicina na posição 342 (S342G) com a variante rs73885319 e a substituição da Isoleucina pela Metionina na posição 384 (I384M) com a variante rs60910145. O segundo haplótipo G2 é caracterizado pela perda de seis nucleotídeos resultando na deleção de dois aminoácidos (Asparagina na posição 388 e a Tirosina na posição 389), (HU; KLOPFER; RAY, 2012), figura 1.

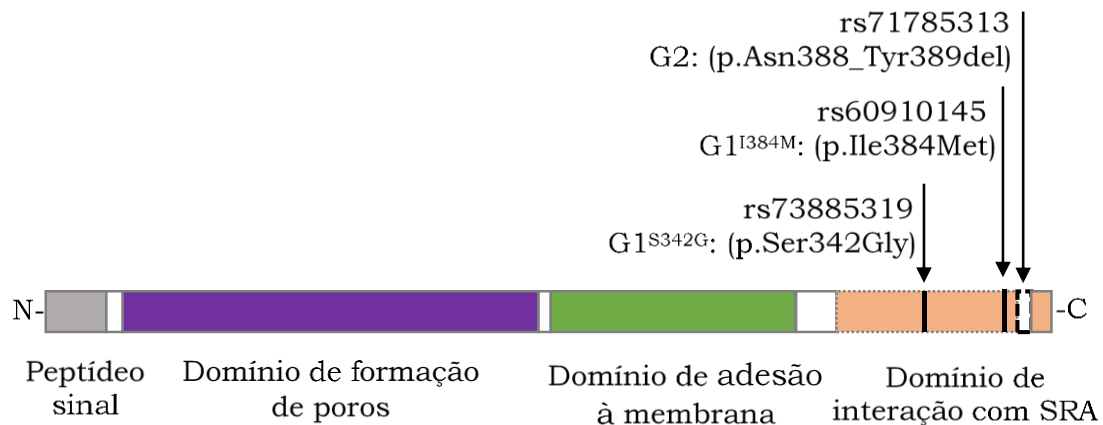


Figura 1. Estrutura da Apol1 com os domínios funcionais e localização das variantes genéticas no domínio de interação com a proteína associada à resistência sérica (SRA). Adaptado de: (COOPER et al., 2017).

A distribuição dos haplótipos G1 e G2 e dos números de alelos varia de uma região a outra com frequências mais altas em algumas regiões da África Ocidental, onde a frequência de G1 varia entre 2,4% e 45% e o G2 entre 6% e 24%, com as maiores frequências na Nigéria e Gana. Entre os afro-americanos a frequência do haplótipo G1 varia entre 20% e 22% e o G2 entre 13% e 15%. A frequência do genótipo de alto risco, ou seja, indivíduos homocigotos (G1/G1 e G2/G2) ou heterocigotos compostos (G1/G2) é de 13%. Essas mutações não foram encontradas em nativos americanos e euro-descendentes (KOPP et al., 2011; LIMOU et al., 2014). No Brasil, trabalhos realizados na população de descendência africana mostraram frequência de 4,7 a 6,1% para o G1, 1,4 a 3,4% para o G2 e de 0,4 a 0,9% são portadores do genótipo de alto risco (RIELLA et al., 2019; VAJGEL et al., 2019).

1.4 VARIANTES DE APOL1 E DOENÇA RENAL

A diferença entre a incidência da DRC e da DRET com uma taxa de duas a quatro vezes superiores na população afrodescendente em comparação à população caucasiana, foi o motivo de várias investigações sobre os fatores determinantes dessa disparidade (BARRETO et al., 2016; CHOI et al., 2009; HENEGHAN et al., 2015; LIPWORTH et al., 2012). Embora, os fatores socioeconômicos, clínicos (níveis mais elevados de pressão arterial, controle inadequado da glicemia) e de estilo de vida possam explicar parcialmente essa disparidade, estudos recentes têm demonstrados também que a constituição genética desempenha um papel importante (AINSWORTH; LANGEFELD; FREEDMAN, 2017; FRIEDMAN, 2019; GEORGE et al., 2018). Inicialmente, a associação entre mutação genética no cromossomo 22 e a doença renal crônica não-diabética, bem como a associação com a glomeruloesclerose segmentar focal foi identificada em 2008 por dois grupos de pesquisa independentes (KAO et al., 2008; KOPP et al., 2008). Ambos os grupos atribuíram essa associação ao gene *MYH9* que codifica a cadeia pesada da miosina não muscular 9, localizado muito próximo ao *APOL1*. Estudos subsequentes, entretanto, mostraram evidências mais fortes de associação significativa entre a doença renal crônica em afrodescendentes e o gene *APOL1* (GENOVESE et al., 2010). Os indivíduos homocigotos (G1/G1 ou G2/G2) ou heterocigotos compostos (G1/G2) chamados de portadores de dois alelos de risco ou de genótipo de alto risco para a DRC, além de ter um risco maior de um amplo espectro de doenças glomerulares incluindo a GESF e principalmente do tipo colapsante, a nefropatia associada ao vírus da imunodeficiência humana HIV (HIVAN) L, têm também um risco de progressão mais rápida do comprometimento renal para doença renal terminal como DRET associada à hipertensão arterial DRET não diabética, comparado com os portadores heterocigotos (G0G1 ou G0G2) e indivíduos sem mutações (G0G0), chamados de portadores de genótipos de menor risco para DRC (CHEN et al., 2017; FREEDMAN et al., 2010, 2014; KASEMBELI et al., 2015; KOPP et al., 2011; LIPKOWITZ et al., 2013; PARSAN et al., 2013). Estudos de caso-controle mostraram que os indivíduos com genótipos de alto risco têm 29 a 89 vezes mais chances de HIVAN, 10 a 17 vezes mais chances para GESF, 20 vezes mais chances de DRCT associada a hipertensão arterial e 2,57 vezes mais chance de DRCT associada a NL (ANYAEGBU et al., 2015; FREEDMAN et al., 2014; KASEMBELI et al., 2015; KOPP et al., 2011). Nesses indivíduos com genótipos de alto risco, o risco estimado para o desenvolvimento de GESF é de 4% na população geral e de 50% entre os indivíduos infectados pelo HIV e não tratados (KOPP et al., 2011). A associação entre HIVAN e as variantes de APOL1 é tão relevante que a prevalência de HIVAN é muito baixa

em populações onde essas variantes genéticas não são praticamente encontradas (BEHAR et al., 2011). Além disso, nos indivíduos portadores de genótipos de alto risco, a idade de diagnóstico de doença renal é mais precoce e a progressão para DRCT é mais rápida em comparação com pessoas com genótipos de menor risco (KANJI et al., 2011; POLLAK; GENOVESE; FRIEDMAN, 2012; RIELLA et al., 2019).

Também foi observado nos transplantes renais, que as variantes de risco podem contribuir para a redução significativa da sobrevida do enxerto renal de doadores afro-africanos portadores de genótipos de alto risco de *APOLI* em comparação aos indivíduos com genótipos de menor risco, independentemente do tempo da isquemia fria, da incompatibilidade de HLA, como também da raça do receptor (FREEDMAN et al., 2015, 2016). Os doadores vivos portadores de genótipos de alto risco de *APOLI*, têm uma baixa taxa de filtração glomerular estimada e uma perda mais rápida da função renal anos depois a doação em comparação aos doadores com genótipos de menor risco (DOSHI et al., 2018).

Apesar da forte associação com a DRC e DRCT, os mecanismos pelos quais as variantes de risco do *APOL1* levam à doença renal e aceleram sua progressão para DRCT, ainda não são totalmente compreendidos. Vários mecanismos de lesão celular induzida por variantes de risco de *APOL1* têm sido sugeridos, entre outros, a autofagia podocitária comprometida, metabolismo mitocondrial prejudicado e a depleção intracelular do potássio e subsequente sinalização via proteínas quinases ativadas por estresse contribuem para a lesão dos podócitos (MA et al., 2017; MA; DIVERS; FREEDMAN, 2019; OLABISI et al., 2016; WAITZMAN; LIN, 2019). Além desses mecanismos, pode haver outros pelos quais as variantes de risco de *APOLI* levam a redução da densidade de podócitos que representa um fator de risco predisponente para doenças glomerulares e a DRCT devido à perda cumulativa total de podócitos, do aumento do volume de filtração glomerular e o estresse celular resultante da redução da densidade de podócitos.

Além das variantes de risco do *APOLI*, algumas evidências recentes sugerem que as hemoglobinas variantes, incluindo o traço falciforme (HbAS) e o traço da hemoglobina C (HbAC), podem também desempenhar um papel em conjunto com as principais causas na progressão de doença renal (DEREBAIL et al., 2010; NAIK et al., 2017).

1.5 HEMOGLOBINOPATIAS

A hemoglobina (Hb) é a principal proteína globular presente nas hemácias. A molécula da Hb tem uma estrutura quaternária heterotetramérica composta de quatro subunidades e cada uma dessas subunidades é formada por uma porção proteica (globina) e um grupo prostético (heme). As globinas são cadeias polipeptídicas e na Hb adulta, são encontradas duas cadeias alfa (141 resíduos de aminoácidos) e duas cadeias beta (146 resíduos de aminoácidos); figura 2. Cada globina é ligada de maneira estável ao heme situado na superfície externa da proteína. O grupo heme é constituído por uma parte orgânica e um átomo de ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) capaz de se ligar à molécula de oxigênio de maneira reversível, permitindo o desempenho da principal função fisiológica da Hb que consiste em transportar o oxigênio dos pulmões, e subsequentemente, liberá-lo nos tecidos periféricos e facilitando o transporte de retorno do dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões, além de auxiliar na manutenção no equilíbrio acidobásico. As ligações não covalentes são necessárias entre as diferentes subunidades da Hb para facilitar a sua ligação e liberação ao oxigênio de maneira adequada, garantindo assim o suprimento melhor para o metabolismo das células do organismo (BRINGAS et al., 2017; FORGET; BUNN, 2013; HELMS; KIM-SHAPIO, 2013; NAGAI et al., 2018; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

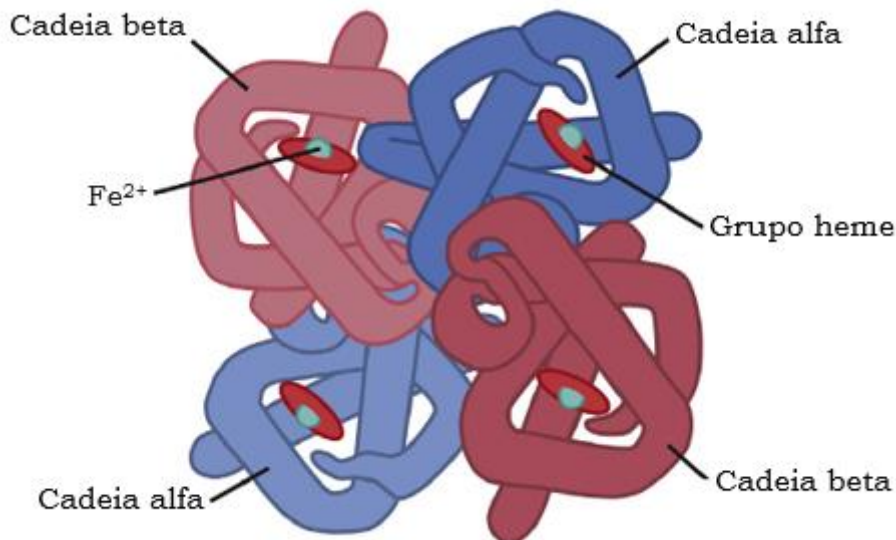


Figura 2: Estrutura tetrâmerica da molécula de hemoglobina com duas cadeias α e duas β . Adaptado de: (DIEPSTRATEN; HART, 2019).

As hemoglobinopatias são uma série de distúrbios genéticos autossômicos recessivos decorrentes de mutações nos genes responsáveis pela síntese das cadeias polipeptídicas da Hb. São as doenças hereditárias mais comuns no mundo (BADEJO et al., 2019; GALADANCI; DEBAUN; GALADANCI, 2019). Podem ser resultantes de mutações que afetam os genes da globina e / ou elementos regulatórios levando a uma deficiência parcial ou total na síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas α ou β chamados as síndromes de talassemias. Também podem ser originadas de alterações estruturais nos produtos gênicos envolvendo uma ou mais cadeias que promovem a formação da molécula da Hb com características físico-químicas bastante diferentes da Hb normal, denominadas Hb variantes (BADEJO et al., 2019; FORGET; BUNN, 2013). As hemoglobinopatias estruturais são geralmente causadas por mutações pontuais que afetam as regiões codificantes dos genes levando à troca de um aminoácido por outro nas cadeias polipeptídicas. Essas mutações ocorrem naturalmente e dependendo do tipo de aminoácido, alterações na estrutura, estabilidade, solubilidade e função da molécula da Hb podem ocorrer com conseqüentes manifestações clínicas significativas.

As variantes mais frequentes e clinicamente relevantes são: HbS (β_6 Glu \rightarrow Val), HbC (β_6 Glu \rightarrow Lis), HbD (β_{121} Glu \rightarrow Gln) e HbE (β_{26} Glu \rightarrow Lis) (MCGANN et al., 2018; PIEL et al., 2014, 2016; RAHIMI, 2013; VELASCO-RODRÍGUEZ et al., 2016). Um indivíduo afetado pode herdar duas variantes idênticas chamado de homocigoto (HbSS, HbCC); duas variantes diferentes denominado de heterocigoto composto (HbSC, HbSD) ou de uma variante conhecido como heterocigoto (HbAS, HbAC) (LEE et al., 2019). A distribuição dos distúrbios da Hb é heterogênea e varia muito de uma região ou país a outro. Em alguns países, ela é baixa, enquanto em outros elas são tão comuns que a maioria da população carrega pelo menos uma anormalidade genética que afeta a estrutura ou a síntese da molécula da Hb (VELASCO-RODRÍGUEZ et al., 2016). No Brasil as variantes estruturais mais comuns são a HbS e a HbC (DE CASTRO LOBO et al., 2014; SANTIAGO et al., 2017; SILVA et al., 2015). A variante HbS ocorre pela substituição de um único nucleotídeo adenina (A) pela timina (T) no códon seis da região codificante do gene da globina β , levando a substituição do ácido glutâmico pela valina na sexta posição da cadeia polipeptídica (β_6 Glu \rightarrow Val) no cromossomo 11, figura 3. A variante HbC por sua vez resulta da substituição do ácido glutâmico pela lisina na mesma posição (BADEJO et al., 2019; GHANSAH et al., 2012; PIEL et al., 2013), figura 3.

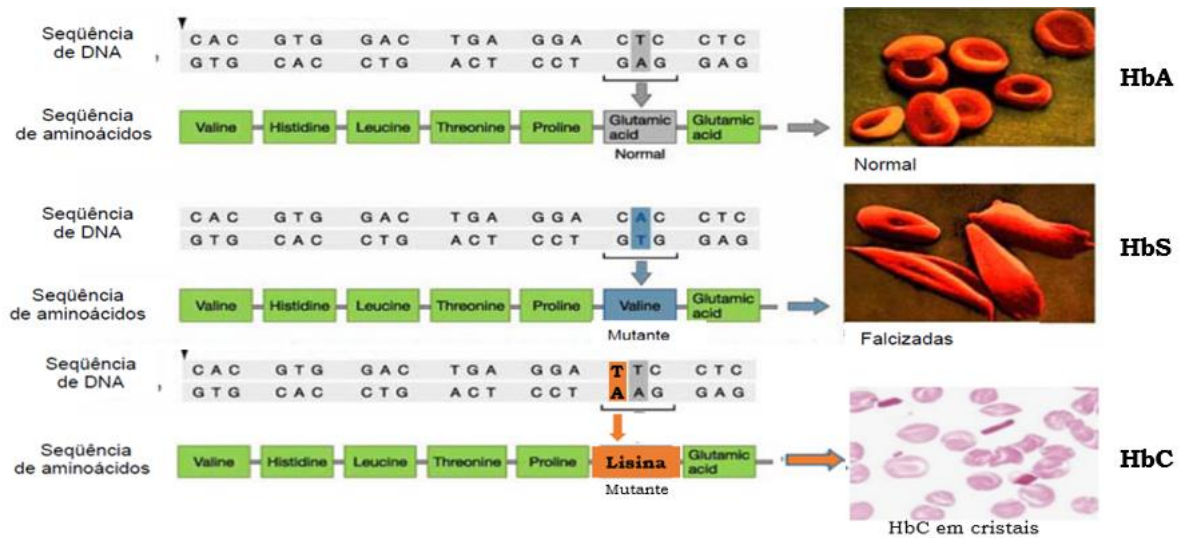


Figura 3: Troca de aminoácidos que altera a Hemoglobina

Fonte Adaptado de: <https://www.slideshare.net/rohinisane/sickle-cell-anemia-final-64192209>.

As hemoglobinopatias são as doenças monogênicas mais comuns e um dos principais problemas de saúde pública com uma larga distribuição pelo mundo inteiro. Elas são comuns em pessoas de descendência africana, mas afeta também as pessoas de origem mediterrânea, do Oriente Médio, de certas regiões da Índia e da Arábia Saudita com a maior frequência na África Subsaariana devido à alta endemia de malária (MACHARIA et al., 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). Aproximadamente 7% da população mundial são portadores. A cada ano, cerca de 300 a 500 mil crianças nascem com hemoglobinopatias, 83% com Hb variantes de maior significância clínica (HbSS, HbSC e HbS/β talassemia) das quais cerca de 85% dos afetados se encontram na África. Cerca de 17% dos indivíduos com síndromes de talassemia são responsáveis pela mortalidade de cerca de 3,4% de crianças com menos de 5 anos de idade (MODELL, 2008; WEATHERALL, 2008).

No Brasil, a doença falciforme é a doença hereditária monogênica mais comum. A frequência da doença falciforme varia muito conforme as características étnicas da população estudada com predominância na população afrodescendente. Estima-se que mais de dois milhões de brasileiros são portadores da HbS, entre 25 e 30 mil indivíduos têm anemia falciforme (HbSS) e a cada ano aproximadamente 3500 crianças nascem com a doença. A frequência do genótipo SC é de 0,02%. No estado da Bahia 1 indivíduo para cada 650 recém-nascidos vivos tem a doença falciforme e na região do Recôncavo Baiano foi encontrado 1 indivíduo para cada 314 (CANÇADO; JESUS, 2007; CARLOS et al., 2015; SILVA et al., 2016).

A principal característica responsável pelos principais aspectos fisiopatológicos das manifestações clínicas da doença falciforme é a polimerização intracelular da HbS nas hemácias devido ao baixo teor de oxigênio (SCHNOG et al., 2004; WALLEN et al., 2014). Em condições de desoxigenação contínua, a polimerização da HbS provoca alteração da forma da hemácia, fazendo com que a célula perca o seu formato bicôncavo flexível normal, adquirindo uma forma rígida alongada chamada de hemácia em foice ou hemácia falcizada. Este fenômeno é reversível com a oxigenação das hemácias e antes que ocorra a alteração definitiva da membrana eritrocitária e a falcização irreversível das hemácias (FREITAS et al., 2018; WARE et al., 2017). Essas hemácias apresentam alterações nas proteínas de membrana, interação ativada com o endotélio vascular, plaquetas, leucócitos, fatores de coagulação e citocinas; fatores que contribuem para a obstrução de pequenos vasos sanguíneos, o que pode produzir dor aguda intensa devido à hipóxia tecidual secundária à redução do fluxo sanguíneo (ANSARI; GAVINS, 2019; WARE et al., 2017). Os episódios vaso-oclusivos que ocorrem na microcirculação, podem levar ao infarto e dano tecidual por isquemia e reperfusão, consequências dos processos inflamatórios (CONRAN; BELCHER, 2018; KATO; STEINBERG; GLADWIN, 2017; QUINN, 2016). As complicações da anemia falciforme podem envolver a maioria dos órgãos e sistemas orgânicos durante a vida dos indivíduos portadores. Elas se apresentam em diversas manifestações clínicas agudas e crônicas, infecções, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, priapismo, osteonecrose, insuficiência renal, lesões hepáticas, acidente vascular cerebral, úlceras de perna, retinopatia e doenças cardíacas (CONRAN; BELCHER, 2018; PIEL; STEINBERG; REES, 2017). As alterações da estrutura da membrana eritrocitária causadas pelas hemácias falcizadas levam à destruição precoce das hemácias pelos monócitos e macrófagos na microcirculação. A hemólise pode resultar em anemia, que é uma manifestação clínica comum da doença falciforme (DAVID et al., 2018; SCHNOG et al., 2004).

Além dessas complicações, a anemia falciforme afeta outros aspectos da vida dos portadores como o bem-estar físico, psicológico, social e ocupacional. Em crianças e adolescentes com anemia falciforme, o atraso no crescimento físico quando comparado a seus pares saudáveis, as hospitalizações frequentes devido aos episódios de dor crônica e a dependência dos analgésicos podem resultar em sofrimento emocional, psicológico, depressão e pior qualidade de vida (ADEYEMO et al., 2015; WALLEN et al., 2014). A mortalidade precoce e com maior frequência foi também associada a anemia falciforme em crianças menores de cinco anos de idade devido a infecção e as complicações crônicas em adultos (ARDUINI; RODRIGUES;

TROVÓ DE MARQUI, 2017; FITZHUGH et al., 2009; MAKANI; WILLIAMS; MARSH, 2007; USMANI; MACHADO, 2018).

1.6 TRAÇO FALCIFORME (HBAS) E O TRAÇO DA HEMOGLOBINA C (HBAC)

A HbAS, heterozigose para HbS, é uma das formas heterozigotas das síndromes falciformes. Ela é definida pela herança do alelo anormal S do gene da beta-globina da Hb de um dos pais e do alelo normal A do outro genitor, manifestando-se assim como o genótipo AS da Hb. No mundo, aproximadamente 300 milhões de pessoas são portadores da HbAS com a maior parte concentrada na África, Oriente Médio e algumas regiões do Mediterrâneo. A frequência da HbAS é mais alta nas regiões onde a malária é endêmica e pode variar entre 10 e 45%, principalmente na África Subsaariana. Essa frequência varia entre 1 e 2% no norte da África e inferior à 1% na África do Sul. Nos Estados Unidos a HbAS está presente entre 6 e 9 % da população afro-americana, ou seja, cerca de 2,5 a 3 milhões de indivíduos afro-americanos com a HbAS (AKINBODEWA AA et al., 2019; NAIK et al., 2018). Nos estudos populacionais, a frequência estimada da HbAS em recém-nascidos foi de 64,4% na África Subsaariana, 22,7% na região árabe-indiana, 7,4% nas Américas, 5,4% na Eurásia e 0,1% no sudeste da Ásia (PIEL et al., 2013).

No Brasil, a distribuição do HbAS é bastante heterogênea e varia de acordo com o grupo de população estudada e com o grau de miscigenação racial nas diferentes regiões do país. Aproximadamente 4% da população geral são portadores da HbAS e cerca de 200 mil crianças nascem a cada ano com a HbAS. Essa frequência é alta nas regiões Norte e Nordeste variando entre 6% e 10%, enquanto nas regiões Sul e Sudeste a frequência é menor e varia entre 2% e 3%. Foi observada uma frequência de 5,3% na Bahia, 4% no Rio de Janeiro e Pernambuco, 3% em Minas Gerais, 2,6% em São Paulo e 2% no Rio Grande do Sul (CANÇADO; JESUS, 2007; SILVA et al., 2015), figura 4. Outros estudos realizados evidenciaram uma frequência de 5,7% em comunidades quilombolas do estado do Tocantins, 4,58% na região sul do Triângulo Mineiro, 1,50% em uma população da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, 6,5% nas comunidades de povos de Terreiros na cidade de Teresina no Piauí, 3,23% em recém-nascidos no Distrito Federal entre 2004 e 2006, 0,8% em recém-nascidos no Estado de Santa Catarina entre 2003 e 2012, 4,96% em recém-nascidos no Maranhão em 2008 e no Centro de Hemoterapia de Sergipe foi descrita uma frequência de 4,1% em doadores de sangue (ARAÚJO

et al., 2004; CARLOS et al., 2015; DINIZ et al., 2009; ELLER; DA SILVA, 2016; TELES et al., 2017; VIVAS et al., 2006). Na região do recôncavo baiano, a frequência em recém-nascidos entre 2006 e 2009 foi de 5,8% e varia entre 2,6% e 9,2% (SILVA et al., 2016). Um outro estudo realizado numa maternidade de Salvador mostrou uma frequência de 9,8% de HbAS em recém-nascidos (ADORNO et al., 2005).

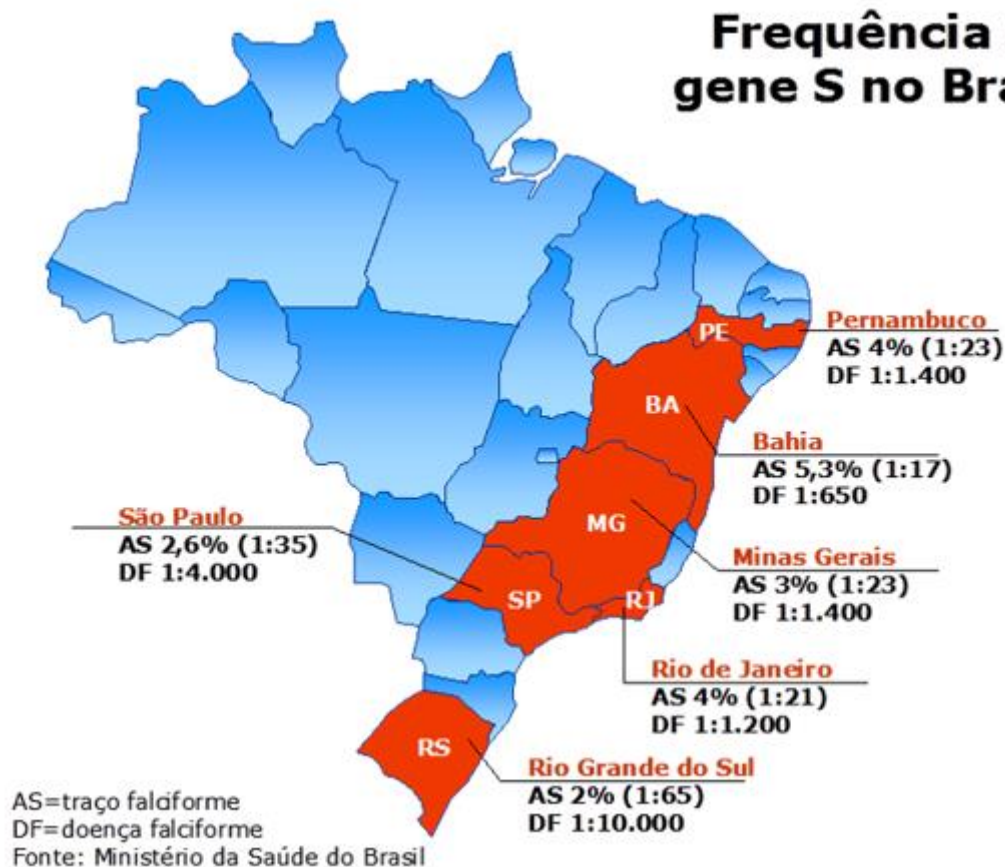


Figura 4: Distribuição geográfica da HbS nas diferentes regiões do Brasil. Fonte: Sickle cell disease in Brazil, 2007 (CANÇADO; JESUS, 2007).

O traço falciforme, geralmente não é considerado como uma doença porque apresenta complicações incomuns ou leves. Os portadores são assintomáticos, não apresentam anormalidades física e hematológica relevantes em condições normais e têm uma expectativa de vida semelhante as pessoas com o genótipo AA, sem graves consequências à saúde relacionadas ao seu status falciforme. Embora a HbAS seja considerada benigna, os portadores têm uma concentração de 30% a 40% de HbS que pode conferir um risco em certas condições como hipóxia, acidose, desidratação, hiperosmolaridade e hipotermia. Essas condições promovem o processo de falcização e o acúmulo de hemácias deformáveis na microcirculação.

Esse fenômeno pode transformar a HbAS em uma síndrome semelhante à HbSS associada à crise vaso-oclusiva com diversas manifestações clínicas (AKINBODEWA AA et al., 2019; TSARAS et al., 2009). Essas complicações incluem anormalidades renais como alterações na concentração urinária, microalbuminúria e proteinúria, hematúria macroscópica, necrose papilar renal e carcinoma medular renal, o infarto esplênico com baixa tensão de oxigênio favorecido pelo exercício ou em repouso em altas altitudes ou durante o exercício no nível do mar. O tromboembolismo venoso (trombose venosa profunda ou embolia pulmonar) também foi observado em indivíduos portadores do traço falciforme.

Estudos populacionais ou controlados não demonstraram aumento da mortalidade associada à HbAS e nem a existência de causas específicas de mortalidade decorrentes exclusivamente da HbAS, entretanto, a rabdomiólise induzida por exercícios, especialmente em situações de calor extremo, esforço físico intenso e desidratação pode levar à morte súbita nesses indivíduos (AKINBODEWA AA et al., 2019; EL ARISS et al., 2016; FOLSOM et al., 2015; HARRISON; WALCOTT; WARNER, 2017; TSARAS et al., 2009).

A hemoglobina C (HbC) é uma das hemoglobinopatias estruturais mais prevalentes no mundo e a segunda variante mais comuns das hemoglobinopatias e resulta pela substituição do nucleotídeo glicina (G) pela adenina (A) no sexto códon da região codificante do gene da globina β , levando a substituição do ácido glutâmico pela lisina na sexta posição da cadeia polipeptídica (β_6 Glu \rightarrow Lis) no cromossomo 11 (PIEL et al., 2013, 2016). A HbC é mais prevalente na África Ocidental com uma frequência acima de 15% (KREUELS et al., 2010; PIEL et al., 2013) . A HbAC é um estado heterozigótico caracterizado pela presença de Hb normal (HbA) e a variante C (HbC). Aproximadamente 2 a 3% dos afro-americanos são portadores do HbAC (TITA et al., 2007).

No Brasil, estudos mostraram uma distribuição heterogênea da variante C com a frequência de 4,9% em comunidades quilombolas do estado do Tocantins; 0,9% na região sul do Triângulo Mineiro; 0,31% em uma população da cidade de Natal, Rio Grande do Norte; 4,8% nas comunidades de povos de Terreiros na cidade de Teresina no Piauí; 0,19% em recém-nascidos no Rio Grande do Sul; 0,66% em recém-nascidos no Maranhão em 2008; 1,4% em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe (ARAÚJO et al., 2004; CARLOS et al., 2015; SOMMER et al., 2006; TELES et al., 2017; VIVAS et al., 2006). Na região do recôncavo baiano, a frequência em recém-nascidos entre 2006 e 2009 foi de 3,8% e varia entre 0% e 6,6%

(SILVA et al., 2016). Um outro estudo realizado numa maternidade de Salvador mostrou a frequência de 6,5% de HbAC em recém-nascidos (ADORNO et al., 2005).

A HbC em alta concentração induz a desidratação dos eritrócitos e a formação de cristais intracelulares o que pode causar a anemia hemolítica leve em indivíduos homozigotos. Embora as complicações clínicas da HbC não sejam graves, a herança com outras hemoglobinopatias, como a HbS, pode ter consequências significativas manifestadas por anemia hemolítica moderada, esplenomegalia e podem apresentar oclusões vasculares como as observadas na anemia falciforme, mas menos graves ou frequentes (NAGEL; FABRY; STEINBERG, 2003; PIEL et al., 2013). Os portadores heterozigotos são geralmente assintomáticos, não apresentam limitações ou sintomas clinicamente evidentes e sua expectativa de vida é semelhante à dos indivíduos com o genótipo A (DALIBALTA et al., 2010). Alguns estudos mostraram que os indivíduos heterozigotos podem sofrer de hematúria, priapismo, alterações na retina e têm um risco aumentado de doença pneumocócica invasiva (POEHLING et al., 2010; SPENCER; SANDERS; AULT, 2009). A maioria desses eventos é rara e não existe uma base consistente de evidências.

1.7 HBAS E HBAC NA DOENÇA RENAL

A nefropatia associada a doença falciforme já foi provada na literatura e várias alterações renais funcionais e estruturais são observadas em indivíduos portadores. Elas são geralmente mais graves e frequentes na anemia falciforme (HbSS) do que em outros tipos de doença falciforme e, especificamente, menos graves no HbAS e no HbAC.

Uma das lesões glomerulares mais comuns observadas em pacientes com anemia falciforme é a GESF associada à proteinúria e conseqüentemente a perda progressiva da função renal (GUASCH et al., 2006). A disfunção tubular, hiperfiltração glomerular, albuminúria e o declínio da taxa de filtração glomerular contribuem para a progressão da doença renal. A taxa de filtração glomerular de um néfron aumenta com a perda de outros néfrons, levando a danos progressivos nos glomérulos que pode se manifestar como GESF, fibrose intersticial e atrofia tubular (MAIGNE et al., 2010; NASR et al., 2006). As alterações vasculares observadas na anemia falciforme podem afetar mais intensamente a medula renal, que apresenta baixa saturação de oxigênio, fluxo sanguíneo lento e hiperosmolaridade intersticial, uma condição que favorece a polimerização da HbS e resulta em aumento da viscosidade sanguínea nos

capilares medulares renais levando à perda da capacidade de concentração urinária, hematúria assintomática e macroscópica e necrose papilar (NASR et al., 2006; SASONGKO; NAGALLA; BALLAS, 2015). Essas lesões podem também ser evidenciadas nos portadores de HbAS em condições que facilitam o processo de falcização episódica das hemácias levando à isquemia parenquimatosa crônica e infarto, com perda gradual da função glomerular e tubular.

Uma das alterações renais mais comuns em indivíduos portadores de HbAS é a hematúria assintomática causada por eventos vaso-oclusivos, microinfarto e lesão isquêmica do parênquima. A manifestação mais profunda desses eventos isquêmicos é a necrose papilar renal, com microinfartos locais das papilas renais levando a hematúria macroscópica indolor e pode ser complicada por infecção e obstrução do trato urinário. O envolvimento do rim esquerdo é mais frequente por causa do seu tamanho ligeiramente maior e a maior pressão venosa resultante da compressão da veia renal esquerda pela aorta e veia mesentérica superior. Os eventos de microinfartos repetitivos na medula renal e alterações no fluxo sanguíneo renal podem resultar em perda da capacidade de concentração da urina nesses indivíduos e progressiva com a idade. A concentração da urina é ainda mais prejudicada com o aumento da concentração da HbS, e com desidratação, pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento de rabdomiólise e morte súbita no momento de esforço físico (BISSONNETTE et al., 2016; DEREBAIL et al., 2010; KEY; DEREBAIL, 2010; SHARPE; THEIN, 2014; TSARAS et al., 2009). Outra complicação renal do HbAS é o carcinoma medular renal, uma neoplasia maligna e muito agressivo que ocorre quase exclusivamente em indivíduos jovens com HbAS, mas raro. O carcinoma medular renal resulta da regeneração crônica e degeneração induzida por lesões isquêmicas recorrente do epitélio do ducto coletor distal (ALVAREZ et al., 2015). Outros estudos relataram também uma progressão mais rápida da DRC para a fase terminal nos indivíduos portadores da doença renal policística autossômica dominante com HbAS coexistente do que aqueles sem HbAS (PECES, R. et al., 2011). No entanto, a presença de HbAS pode não ser suficiente para causar a DRC, mas pode atuar em sinergia ao coexistir com os principais fatores de risco (hipertensão ou diabetes), que afetam também a microvasculatura renal para acelerar o dano renal levando a fase terminal da doença renal (AKINBODEWA AA et al., 2019; DEREBAIL et al., 2010).

Embora a hematúria seja uma complicação frequente das hemoglobinopatias falciformes, estudos mostraram casos da hematúria nos indivíduos portadores da HbC, mas extremamente incomuns (SPENCER; SANDERS; AULT, 2009). A desidratação das hemácias pode causar a diminuição da solubilidade promovendo a cristalização da HbC e a perda da flexibilidade das

hemácias. Essa perda de flexibilidade pode impedir a passagem das hemácias resultando na obstrução dos vasos retos e isquemia e infarto medular (SPENCER; SANDERS; AULT, 2009). As lesões renais como a deficiência na concentração urinária, necrose papilar aguda e microalbuminúria foram também observadas nos indivíduos com o genótipo SC. Elas são menos comuns e ocorrem mais tardiamente (PECKER; SCHAEFER; LUCHTMAN-JONES, 2017). Geralmente os indivíduos portadores do HbAC são assintomáticos e não apresentam complicações clínicas significativas em condições fisiológicas normais. A maior frequência do HbAC nos pacientes em hemodiálise, indica talvez que a HbAC pode ter um efeito semelhante à HbAS e pode ser um cofator na progressão da doença renal para o estágio terminal (ALLADAGBIN et al., 2018; DEREBAİL et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A DRC consiste em lesão estrutural ou perda progressiva e irreversível da função dos rins por pelo menos de 3 meses. Em sua fase mais avançada, os rins são incapazes de manter a homeostasia do organismo do paciente necessitando de TRS. A prevalência de pacientes com DRC vem aumentando progressivamente em todo o mundo, inclusive no Brasil. As doenças glomerulares constituem a terceira causa de DRET no Brasil, responsável por uma considerável quantidade de pacientes em TRS. Segundo o Censo Brasileiro de Diálise Crônica de 2017, o número estimativo de pacientes em tratamento dialítico triplicou entre 2000 e 2017 (de 42.695 em 2000 para 126.583 em 2017) com um aumento de 22,2% da prevalência global estimada em cinco anos, chegando a 610 por milhão da população e uma taxa anual de mortalidade de 19,9% em 2017 em comparação a 18,2% em 2016 (GEORGE et al., 2018; SESSO et al., 2017; THOMÉ et al., 2019). Esse tratamento implica em cerca de 12 h de hemodiálise por semana, suporte médico e de enfermagem e uma variedade de medicamentos. Dessa forma o tratamento da DRC constitui um dos tratamentos de mais alto custo para o SUS e substancial perda de qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias. Há restrições nutricionais, da mobilidade para lugares distantes das clínicas onde são tratados, gastos suplementares com medicamentos, perda sistemática de horas de trabalho e estudo em serviços de hemodiálise em fase produtiva da vida (ALCALDE; KIRSZTAJN, 2018; AVRAMOVIC; STEFANOVIC, 2012; KUO et al., 2012). O rim pode ser agredido por diversos fatores endógenos ou adquiridos, como infecções, resposta imune, doenças degenerativas e metabólicas. Além disso, o perfil de resposta do hospedeiro à agressão renal é afetado por diversos fatores constitutivos como variantes genéticas no gene *APOL1* que codifica a Apolipoproteína L1 e no gene da Hb.

O gene *APOL1* está localizado no cromossomo 22. Duas de suas variantes, denominadas G1 e G2, desempenham um papel protetor contra a infecção causada pelos tripanosomas africanos, responsáveis pela forma mais letal de doença do sono. Entretanto, essas variantes também são fatores de risco para a progressão de várias doenças renais, levando a DRET em indivíduos de descendência africana (KOPP et al., 2011; PARSÁ et al., 2013). Há relativamente pouca variação entre as taxas de prevalência das variantes de alto risco para as DRC na população de ascendência africana nos Estados Unidos da América, em contraste, há um alto grau de variação entre as populações em toda a África (GRAMS et al., 2016; LIMOU et al., 2014). Não sabemos qual é a prevalência dessas variantes de risco do gene da *APOL1* na Bahia, nem sobre a sua contribuição para a prevalência de DRC no país.

A ocorrência de doença renal em indivíduos com anemia falciforme tem sido bem caracterizada e inclui a alteração na concentração urinária, hematúria, declínio da taxa de filtração glomerular, DRC e DRET, embora a frequência da DRC e DRET seja menor (BUKAR et al., 2019; DEREBAİL et al., 2019; NAIK; DEREBAİL, 2017). Embora a HbAS seja considerada como uma condição benigna, em condições de hipóxia tecidual, pode ocorrer falcização de hemácias e obstrução vascular, o que leva à isquemia tecidual e microinfarto, como observado em alguns casos de necrose de papilas renais. Fenômenos isquêmicos semelhantes poderiam se reproduzir em condições inflamatórias que resultem em congestão, trombose e necrose de capilares renais, como em algumas glomerulonefrites. Esses fenômenos poderiam ampliar o dano tecidual contribuindo para a progressão da insuficiência renal a longo prazo (KOTILA, 2016; NAIK et al., 2014). O HbAC é também um estado benigno, mas a maior frequência nos pacientes em hemodiálise em comparação a população geral, indica talvez que o HbAC pode ter um efeito semelhante à HbAS e pode ser um cofator na progressão da doença renal para estágio terminal (ALLADAGBIN et al., 2018). Apesar de Salvador possuir um dos maiores agrupamentos populacionais afrodescendentes fora da África e tem um perfil particular de miscigenação, há uma grande carência de estudos levando em conta o perfil genético da população no Estado na progressão de doenças crônicas. Considerando a alta densidade da população afrodescendente no estado da Bahia e a contribuição dessas variantes na progressão da doença renal nessa população, a hipótese do trabalho é que as variantes genéticas de risco do gene *APOLI* e as hemoglobinas variantes constituem variáveis de risco medido antes do desfecho para a progressão da doença renal.

A investigação do potencial impacto das variantes do gene *APOLI* e da hemoglobina na progressão de doenças crônicas é relevante para o desenvolvimento científico, por ser uma pesquisa que envolve a doença renal crônica, uma condição que hoje se constitui um problema de saúde pública com tratamentos de alto custo para os sistemas de saúde, em uma população cujo perfil não foi ainda devidamente estudado. Também, esse trabalho poderá contribuir para sugerir a introdução dos métodos moleculares, além dos parâmetros clínicos e morfológicos já estabelecidos, para um melhor diagnóstico e compreensão dos mecanismos pelos quais esses genes contribuem para progressão de doenças renais. Além disso, pode possibilitar melhorias nas estratégias de tratamento desses pacientes com vista a nefroproteção mais eficiente e o retardo da progressão da doença renal com impacto nos custos econômicos e sociais da DRC.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

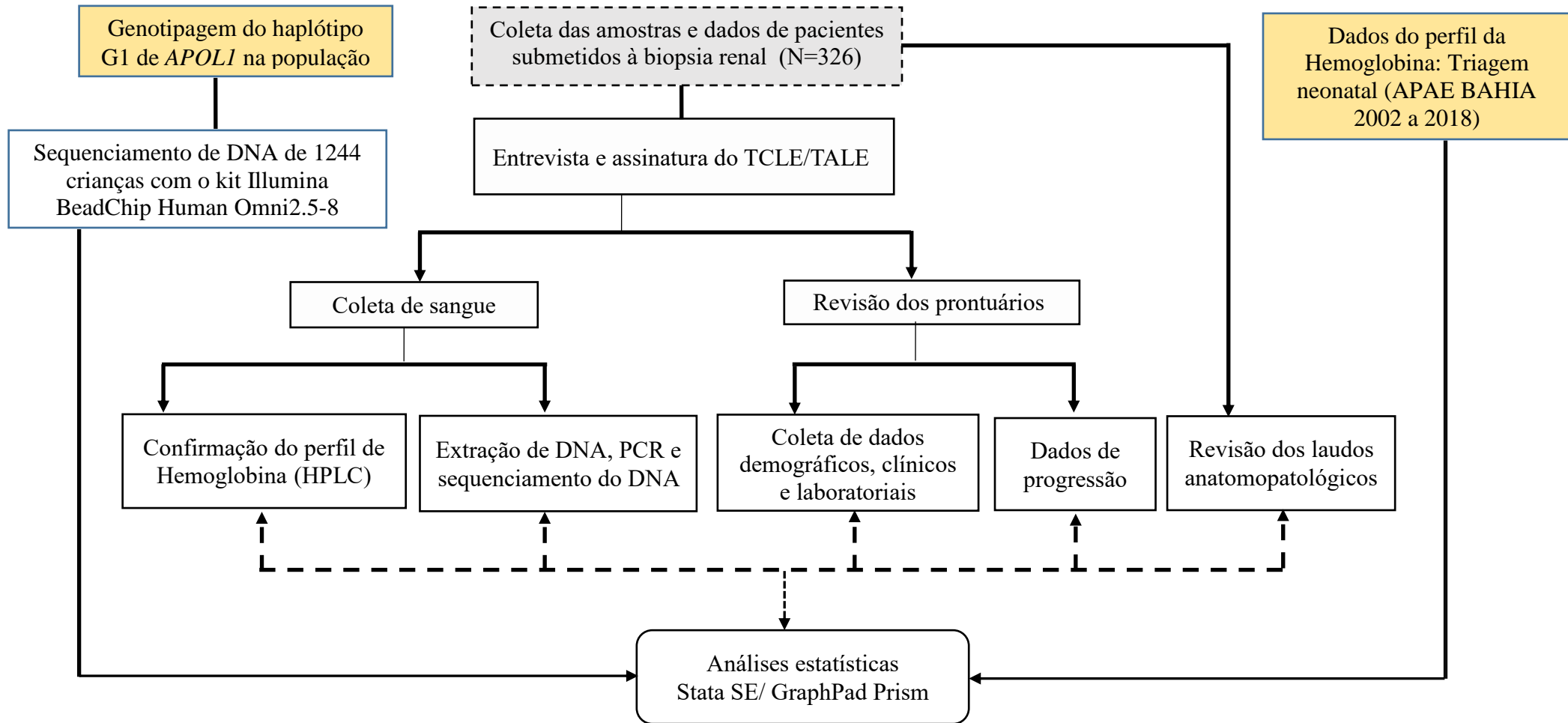
Estimar a frequência das variantes de risco do gene *APOLI* e das hemoglobinas variantes e definir o seu impacto na progressão das doenças glomerulares na Bahia.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estimar a frequência das variantes de risco do gene *APOLI* e das hemoglobinas variantes nos pacientes submetidos a biópsias renais para diagnóstico de doenças glomerulares.
- 2) Comparar os achados histopatológicos de biópsia renal nos pacientes portadores ou não das variantes de risco do gene *APOLI* e entre os genótipos AA, AS e AC.
- 3) Comparar os dados demográficos e clínico-laboratoriais em pacientes portadores ou não de variantes de risco do gene *APOLI* e entre os genótipos AA, AS e AC.
- 4) Avaliar os marcadores de progressão, a prevalência da doença renal em estágio terminal e a sobrevida renal entre pacientes portadores de hemoglobinas variantes e do genótipo AA durante cinco anos após a biópsia renal
- 5) Comparar a frequência do haplótipo G1 do gene *APOLI* entre pacientes submetidos à biópsia renal e a população em geral.
- 6) Avaliar os marcadores de progressão, a prevalência da doença renal em estágio terminal e a sobrevida renal em pacientes portadores ou não das variantes de risco do gene *APOLI* durante cinco anos após biópsia renal.

4. METODOLOGIA

4.1. DESENHO EXPERIMENTAL



4.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

Desenho do estudo e pacientes: Utilizamos um modelo de estudo de corte transversal para estimar a prevalência de traço falciforme na população de Salvador e um estudo de coorte prospectiva para a comparação do curso das doenças glomerulares em pacientes portadores ou não de variantes de risco do gene *APOLI* e das hemoglobinas variantes. Foram incluídos entre junho de 2016 e dezembro de 2018, 326 pacientes de ambos os sexos com idade entre 10 e 79 anos submetidos a biópsia renal para o diagnóstico de glomerulopatias nas unidades de nefrologia dos hospitais públicos de referência tais como Hospital Ana Nery (HAN) e Hospital Geral Roberto Santos (HGRS).

As biópsias renais foram examinadas nos serviços de Microscopia Eletrônica e de Histotecnologia pelo Programa de apoio ao desenvolvimento diagnóstico em patologia hepática e renal no Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/Bahia (IGM-FIOCRUZ).

Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes portadores de rins nativos submetidos a biópsia renal com diagnóstico de doença glomerular confirmado que aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento ou Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE/TALE) ANEXOS 1 e 2.

Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes com material insuficiente para o diagnóstico de nefropatias, pacientes sem amostra para extração de DNA e aqueles sem dados para as análises estatísticas.

4.3. COLETA DE DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS

As informações referentes aos pacientes tais como os dados clínicos e laboratoriais foram coletadas através da revisão do prontuário médico dos pacientes no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) dos hospitais, enquanto os dados demográficos foram obtidos dos pacientes no momento da entrevista para coleta de amostra. O diagnóstico de hipertensão arterial ou diabetes foi confirmado nos pacientes em uso de anti-hipertensivos ou medicamentos antidiabéticos

Os dados demográficos foram a idade, sexo, cor da pele, nível de escolaridade, renda familiar e a procedência do paciente. Os dados clínicos incluíram a história de hipertensão arterial sistêmica e de diabetes mellitus, peso e síndromes clínicas. Os dados laboratoriais colhidos foram: hemograma, albumina, colesterol total, creatinina, ureia e proteinúria de 24h.

Foi realizado um estudo de acompanhamento durante cinco anos para avaliar a progressão dos pacientes depois da biópsia renal. Foi realizada a revisão dos prontuários médicos para a coleta dos dados como: óbito; terapia renal substitutiva; aumento da creatinina de 50% ou 100% depois de seis meses, um e cinco anos; taxa de filtração glomerular estimada (calculada usando a equação de Cockcroft-Gault) e os dados laboratoriais a cada período.

4.4. COLETA DE AMOSTRAS

Foi realizada a coleta de 5 mililitros de sangue periférico em cada paciente em tubo estéril contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O material foi coletado após a explicação dos objetivos do projeto aos pacientes ou familiares e assinatura do TCLE ou TALE (Anexos 1, 2 e 3). Após a coleta das amostras, uma parte foi encaminhada ao Laboratório de Pesquisa em Anemias (LPA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (FACFAR/UFBA) para a caracterização do perfil das hemoglobinas variantes e o resto foi processado no Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM) no Instituto Gonçalo Moniz – IGM/FIOCRUZ Bahia para a genotipagem do gene *APOL1*.

4.5. ANÁLISE DAS HEMOGLOBINAS VARIANTES

O perfil das hemoglobinas variantes foi confirmado a partir de uma amostra de sangue pelo método automatizado de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando o equipamento Variant I - Bio-Rad (USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6. EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE DNA

O DNA genômico foi purificado a partir de amostras de 200 µL de sangue periférico, utilizando reagentes e materiais do kit QIAamp® DNA mini kit, seguindo as instruções do fabricante (Qiagen, Hilden, GERMANY). Em cada tubo contendo 200 µL de sangue foram adicionados 20 µl de proteinase K e 200 µl de Tampão de Lise (AL). Após homogeneização, as amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, durante 10 minutos. Após a incubação, 200 µl de etanol absoluto foram adicionados, agitando-se durante 15 segundos e centrifugando brevemente. A solução resultante foi transferida para o dispositivo da coluna do kit e centrifugada a 8.000 rpm por um minuto. O dispositivo com a coluna foi removido do tubo e recolocado em um tubo limpo. Foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 (Wash Buffer 1) ao dispositivo com a coluna, que foram centrifugados a 8.000 rpm por um minuto. O procedimento de lavagem foi repetido com 500 µl de Buffer AW2 (Wash Buffer 2), seguido de centrifugação a 14.000 rpm durante três minutos. O DNA extraído da coluna foi ressuspensionado em 50 µL de tampão AE (fornecido pelo fabricante), aguardando-se cinco minutos e centrifugando-se a 8.000 rpm por um minuto, após as amostras terem sido transferidas do dispositivo para tubo de recuperação.

Para avaliar a quantidade e a pureza do DNA genômico extraído, foi realizada a quantificação por densidade óptica em espectrofotometria NanoDrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer). Foi feita a leitura de absorvância em um comprimento de onda na faixa de 260nm com uma relação A260 / A280. Os microtubos contendo o DNA extraído foram armazenados a -70°C até o momento de análise.

4.7. ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS DO GENE *APOL1* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E SEQUENCIAMENTO DE DNA PELO MÉTODO DE SANGER.

A região de *APOL1* que contém o último exon e que carrega os haplótipos G1 e G2 foi amplificada através da PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram APOL1 6del seq 5'-ACCAACTCACACGAGGCATT e APOL1 6del seq 5'-CTGCCAGGCATATCTCTCCT (IDT, EUA). A reação com um volume total de 25 µl foi preparada com: 0,1 µl de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity; 2,5 µL de

10X High Fidelity PCR Buffer; 1 µL de 50mM MgSO₄; 0,5 µl de 10 mM dNTP Mix (Invitrogen); 0,5 µL de 10 mM cada primer; 2,5 µL de solução de DNA purificado e H₂O ultra pura necessária para obter um volume final de 25 µL. A PCR foi realizada em seguintes condições: 1 ciclo de pré-incubação (94oC por 1 min); 36 ciclos de amplificação (94oC por 30 s, 60oC por 30 s e 72oC por 45 s) e um ciclo de extensão (72°C por 7 min). Após a realização do PCR, o produto amplificado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com Brometo de etídeo e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. Em seguida, os produtos de PCR foram purificados com o reagente ExoSAP-IT (ThermoFisher Scientific, EUA) seguindo-se as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento de DNA usando os oligonucleotídeos iniciadores 5'-CACGAGGCATTGGGAAGGACATC e 5'-AGGCATATCTCTCCTGGTGGCT em um sequenciador automático ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, EUA) na plataforma de sequenciamento do IGM, FIOCRUZ.

Análise de dados de sequenciamento e genotipagem do *APOLI*: A genotipagem do gene APOL1 foi realizada a partir da montagem das sequências de DNA obtidas nas duas direções usando-se a referência BC143038 do Genbank e o programa de computador CLC Main Workbench v.8.0 (Qiagen). Os pontos de identificação de nucleotídeos conflitantes foram definidos pela inspeção visual dos eletroferogramas. Três marcadores foram avaliados: rs73885319, rs60910145 para o haplótipo G1 e rs71785313 para o G2. Os SNPs dialélicos rs73885319 [A / G] e rs60910145 [T / G] foram genotipados homozigotos na presença de um único pico, e heterozigotos quando um duplo pico foi identificado em ambas as sequências. O marcador rs71785313 insdel [- / ATAATT / TTATAA] foi genotipado homozigoto quando ambas as sequências diretas e reversa alinharam-se perfeitamente e heterozigóticas sempre que a sequência direta foi aparada na região insdel e o sequenciamento inverso falhou devido à sobreposição de diferentes sequências com e sem o putativo alelo de deleção; figura 5. O genótipo de cada paciente por marcador foi registrado em uma planilha Excel e os haplótipos de risco foram deduzidos sempre que possível, como G0 [A-T-Ins], G1GM [G-G-Ins], G1GI [G-T-Ins] e G2 [A-T-Del] (Limou et al., 2014), e suas frequências foram calculadas.

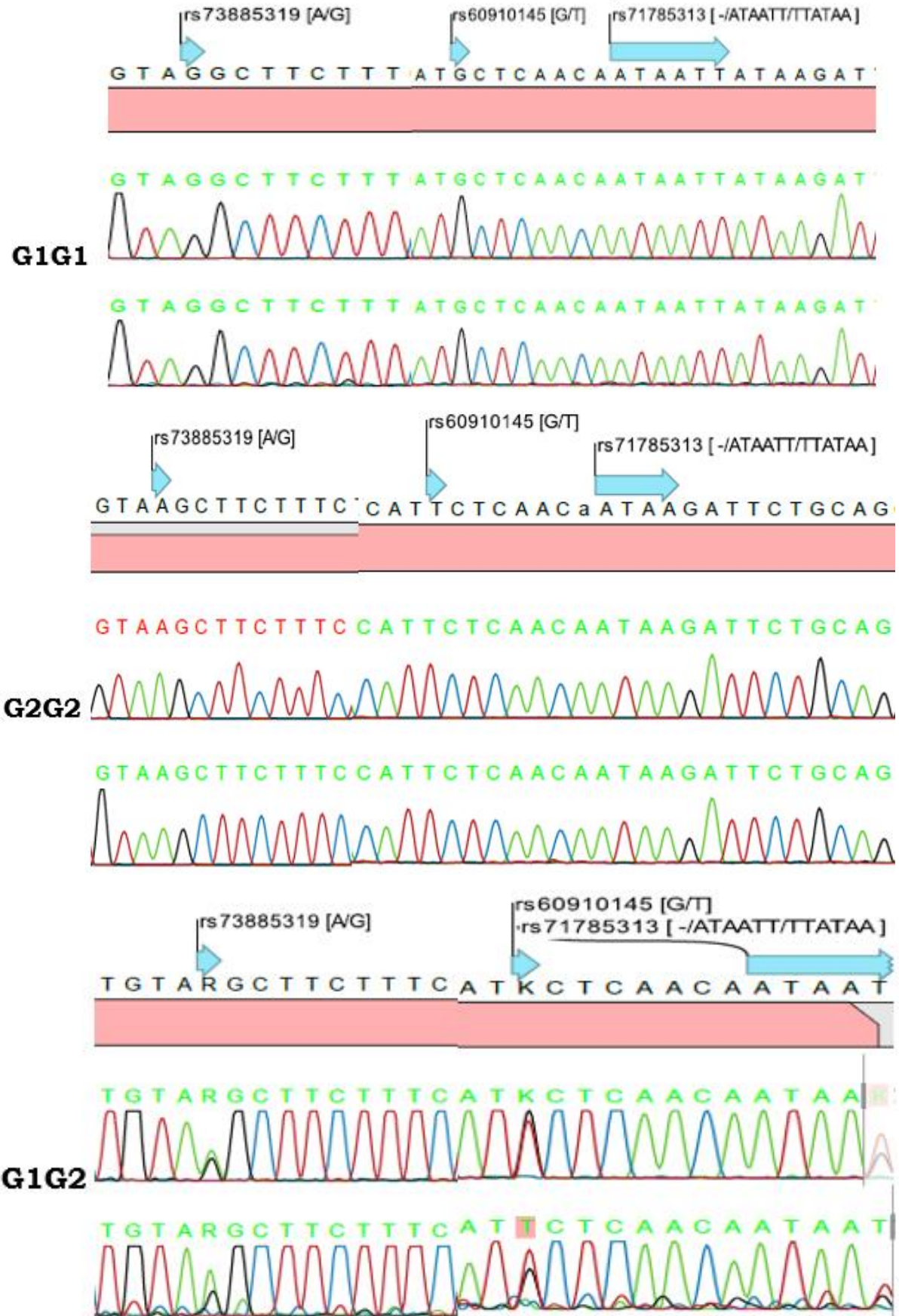


Figura 5. Cromatograma de sequenciamento do exon 7 no gene APOL1. G1G1 representa a homozygose para o haplótipo G1 com a substituição da adenina pela guanina e da timina pela guanina e a presença de um único pico. G2G2 representa a homozygose para o haplótipo G2 com a deleção de dois aminoácidos. G1G2 representa a heterozygose composto para o dois haplótipos com a presença de um duplo pico identificado em ambas as sequências para o G1 e a sobreposição dos picos nas sequências a partir do ponto em que ocorre a deleção de G2.

As análises histopatológicas das biópsias renais e análises estatísticas dos resultados foram descritas nos manuscritos

4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo está em conformidade com a resolução nº466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi conduzido de acordo com o protocolo nº 409/2013 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz (IGM/FIOCRUZ), parecer Nº 382.273. De acordo com essas resoluções, o Termo de Consentimento ou de Assentimento Livre e Esclarecido (TCLE/TALE) escrito foi obtido de todos os pacientes envolvidos no estudo, e estão armazenados no Laboratório de Patologia Estrutural e Molecular (LAPEM), FIOCRUZ-Bahia.

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos em três capítulos apresentados no formato de manuscritos. O primeiro artigo, “The impact of APOL1 and hemoglobin variants on renal disease in a highly admixed African-Brazilian population: Clinical presentation and histological lesions at the time of biopsy”, mostra a frequência dos haplótipos do gene *APOL1* e das variantes da hemoglobina e compara o perfil clínico-patológico desses pacientes no momento da biópsia renal. O segundo artigo, “Sickle cell trait increases risk of glomerular disease progression a biopsy based study” demonstra que o traço falciforme, frequentemente considerada uma condição benigna, na realidade, associa-se com maior risco de progressão de doença renal em pacientes com nefropatias. O terceiro artigo “*APOL1* renal risk alleles and renal disease progression in Brazil” mostra que a presença de alelos de risco do *APOL1* tem um forte impacto negativo em termos de progressão de doenças renais, especialmente a GESF entre os pacientes de estado que possui uma das maiores concentrações de indivíduos afrodescendentes de fora da África, com forte miscigenação.

CAPÍTULO I

MANUSCRITO 1

Título:

The impact of *APOLI* and hemoglobin variants on renal disease in a highly admixed African-Brazilian population: Clinical presentation and histological lesions at the time of biopsy

Autores: Dona J. Alladagbin, Debora L. Viana, Geraldo G. S. Oliveira, Luciano K. Silva, Nadia A. Khouri, Epitácio R. da Luz Neto, Tatiana Amorim, Guilherme S. Ribeiro, Washington L.C. dos-Santos.

Situação: A ser submetido

Objetivo: (referente aos objetivos específicos 1, 2 e 3 da tese)

Estimar a frequência das variantes de risco do *APOLI* e das hemoglobinopatias em pacientes submetidos à biópsia renal na Bahia (Brasil) e comparar marcadores de cronicidade renal e dados clínico-laboratoriais entre pacientes com e sem variantes do gene *APOLI* ou hemoglobinopatias.

Resumo do capítulo:

Introdução: Uma ênfase crescente tem sido colocada nos determinantes genéticos da progressão da doença renal. A literatura carece de estudos sobre afro-latino-americanos.

Objetivo: Estudar as frequências e o impacto das variantes de risco da apolipoproteína L1 (*APOLI*) e variantes da hemoglobina na apresentação da doença renal no momento da biópsia em uma população afro-brasileira altamente misturada. **Métodos:** Foram recrutados pacientes (n = 326) com doença glomerular submetidos à biópsia renal. Os perfis de hemoglobina foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência. Amostras de sangue de 304 desses pacientes foram obtidas para sequenciamento de DNA e genotipagem de variantes e haplótipos de risco para APOL1. **Resultados:** As frequências dos haplótipos G1 e G2 APOL1 foram de 9,2% e 6,4%, respectivamente, entre os pacientes submetidos a biópsias renais. A frequência do haplótipo G1 foi de 8%

na população em geral. A idade mediana foi menor nos pacientes portadores de dois alelos de risco *APOLI*, $p = 0,04$. Entre os pacientes com dois alelos de risco, 61,5% apresentavam glomerulosclerose segmentar focal (FSGS), $p < 0,001$. Em pacientes com FSGS, foi encontrada uma prevalência mais alta de marcadores de cronicidade de doença renal, esclerose glomerular e fibrose tubulointerstitial naqueles com dois alelos de risco de *APOLI* ($p < 0,05$ para cada) do que nos pacientes sem alelos de risco. A frequência do traço falciforme (HbAS, 4,3%) e do traço de hemoglobina C (HbAC, 3,7%) não foram significativamente diferentes da população geral (4,5% e 2,2%, respectivamente). Em pacientes com nefrite lúpica, foram encontradas proporções mais elevadas de esclerose glomerular global e escores de atrofia tubular aumentados em pacientes com traço falciforme ($p < 0,05$ para cada) do que naqueles com hemoglobina AA. **Conclusões:** As frequências das variantes HbAS, HbAC e do haplótipo G1 do *APOLI* foram semelhantes entre os pacientes submetidos a biópsias renais e a população em geral. Os genótipos de alto risco de *APOLI* foram associados a uma forma mais precoce e progressiva de GESF. Traços das hemoglobinas S ou C não mostraram associação com nefropatia específica, embora ambos também possam contribuir para a cronicidade da doença renal.

Title:

The impact of APOL1 and hemoglobin variants on renal disease in a highly admixed African-Brazilian population: Clinical presentation and histological lesions at the time of biopsy **Authors:**

Dona J. Alladagbin¹, Debora L. Viana¹, Geraldo G. S. Oliveira¹, Luciano K. Silva¹, Nadia A. Khouri², Epitácio R. da Luz Neto³, Tatiana Amorim⁴, Guilherme S. Ribeiro^{1,5}, Washington L.C. dos-Santos^{1,5*}

1. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil
2. Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Brazil
3. Hospital Ana Nery, Salvador, Brazil
4. Serviço de Referência em Triagem Neonatal - SRTN, Salvador, Brazil
5. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: wluis@bahia.fiocruz.br (WLCS)

ABSTRACT

Background: A growing emphasis has been placed on the genetic determinants of renal disease progression. The literature lacks studies on African-Latin Americans. **Aim:** To study the frequencies and impact of apolipoprotein L1 (*APOLI*) risk variants and hemoglobin variants in renal disease presentation at time of biopsy in a highly admixed African-Brazilian population. **Methods:** Patients (n=326) with glomerular disease who underwent renal biopsy were recruited. Hemoglobin profiles were characterized by high-performance liquid chromatography. Blood samples from 304 patients were obtained for DNA sequencing and genotyping of *APOLI* risk variants and haplotypes. **Results:** G1 and G2 *APOLI* haplotype frequencies were 9.2% and 6.4%, respectively, among the patients subjected to renal biopsy. The frequency of the G1 haplotype was 8% in the general population. Patients carrying two *APOLI* risk alleles presented a lower median age ($p = 0.04$). Among these patients, 61.5% had focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), $p < 0.001$. In patients with FSGS, a higher prevalence of markers of chronicity of renal disease, glomerular sclerosis and tubulointerstitial fibrosis was found those with two *APOLI* risk alleles ($p < 0.05$ for each) than in patients without risk alleles. The frequencies of the sickle cell trait (HbAS, 4.3%) and hemoglobin C trait (HbAC, 3.7%) were not significantly different from the general population (4.5% and 2.2% respectively). In patients with lupus nephritis, higher proportions of global glomerular sclerosis and increased tubular atrophy scores were found in patients with the sickle cell trait ($p < 0.05$ for each) than in those with hemoglobin AA. **Conclusions:** The frequencies of HbAS or HbAC variants and G1 *APOLI* haplotype were found to be similar between patients submitted to renal biopsy and the general population. High-risk *APOLI* genotypes were associated with a more severe and progressive form of FSGS earlier in life. Hemoglobin S and C traits showed no association with specific nephropathy, although both may contribute to the chronicity of kidney disease.

Key words: glomerular diseases, Biopsy, *APOLI* risk alleles, HbAS, HbAC

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD), a major public health problem affecting millions of people, places a high economic burden on health systems worldwide (1). Although lifestyle, high blood pressure, inadequate glycemic control and socioeconomic status can partly explain the increased incidence of end-stage renal disease in Afro-descendants compared to Caucasians, recent studies have demonstrated the importance of genetics in the progression of kidney disease.

The *APOLI* gene is located on chromosome 22 and encodes the apolipoprotein L1. In normal human kidneys, the APOL1 protein localizes to the podocyte, the proximal tubule and the endothelium of extraglomerular arterioles and small arteries (2,3). Two encoding alleles in *APOLI*, termed G1 and G2, are restricted to chromosomes of African origin, and are located in the last exon of the gene (4). The *APOLI* G1 allele is comprised of two missense variants: rs73885319 (S342G) and rs60910145 (I384M), while the G2 allele variant presents a six–base pair deletion that removes two amino acids (N388-Y389); both are found at elevated frequencies in people of African ancestry (5). According to studies carried out in recent years, African Americans who were homozygous for G1 or G2, or were compound heterozygotes carrying two risk alleles (RA), were found to be at higher risk for focal global glomerulosclerosis (FGGS), HIV-associated nephropathy (HIVAN), hypertension-attributed CKD, end-stage renal disease (ESRD) due to lupus nephritis, and non-diabetic nephropathy (6–11). However, these studies were performed in populations of African descent with low levels of miscegenation.

The sickle cell trait (HbAS) is defined as the heterozygous state of sickle cell disease, resulting from the substitution of glutamic acid for valine in the β -globin chain of hemoglobin encoded by the *HBB* gene in chromosome 11, which results in an abnormal hemoglobin, denominated hemoglobin S (HbS). Nearly 300 million people worldwide carry HbAS (12). Although this trait has been considered benign, under hypoxic, acidotic and hyperosmolar conditions, it can promote erythrocyte sickling and vascular obstruction, leading to impaired urinary concentration, asymptomatic hematuria and papillary necrosis. While HbAS alone may not lead to the development of CKD, it may contribute towards the progression to ESRD in association with other risk factors, such as diabetes, hypertension, and autosomal dominant polycystic kidney disease (13–16). A

recent study by our group showed that the frequency of individuals with HbAS undergoing hemodialysis was almost twice that observed in the general population (17).

The present study estimated the prevalence of *APOLI* gene variants G1 and G2, HbAS, and hemoglobin C trait (HbAC) in patients submitted to renal biopsy for glomerulopathy diagnosis. We further compared renal markers of chronicity and clinical-laboratory data among subjects with and without *APOLI* risk variants or hemoglobinopathies. This study was performed in Salvador, Bahia-Brazil, a city with a highly admixed population, considered one of the largest of African descent outside Africa.

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement: This study was carried out in accordance with the recommendations established in directive 466/2012, issued by the Brazilian National Health Council, and was approved by the Institutional Review Board for Research involving Human Subjects of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ), protocol number 382.273.

Study design and patients: A prospective cohort study conducted between June 2016 and December 2018 included 326 patients with native kidneys submitted to biopsy for glomerular disease diagnosis. Patients were referred to a nephrology service at Ana Nery Hospital (HAN) or Roberto Santos General Hospital (HGRS), both located in the city of Salvador, and biopsy samples were then analyzed at the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ). To estimate the prevalence of hemoglobin variants in the general population of Salvador, data (2002-2018) was obtained from the Association of Parents and Friends of Exceptional Children (APAE) laboratory, which is responsible for the Bahia Neonatal Screening Program. Information on the distribution of risk variants of *APOLI* gene in the general population of Salvador, Brazil was recovered from the Consortium EPIGEN gene database (18).

Data and sample collection: Demographic, clinical, and laboratorial data were collected through interviews and the review of patient medical records. Skin color was self-reported. After being briefed on the study, patients who agreed to participate provided written consent, and a whole blood sample (5 mL) was collected.

PCR, DNA sequencing and *APOLI* genotyping: Molecular characterization of the DNA segment encoding part of the *APOLI* serum-resistance-associated (SRA) domain was performed. *APOLI* G1 single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs73885319 and rs60910145) and G2 indel (rs717185313) were genotyped. Human DNA was purified from 200 μ L of blood using reagents and materials from the QIAamp DNA mini kit in accordance with the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, GERMANY), and then resuspended in 50 μ L AE buffer (Qiagen). PCR reactions were performed using oligonucleotide primers *APOLI* 6del seq F 5'-ACCAACTCACACGAGGCATT and *APOLI* 6del seq R 5'-CTGCCAGGCATATCTCTCCT (19). Briefly, a total reaction mixture volume of 25 μ l was prepared with: 0.2 μ M of each primer, 0.2 mM dNTP (Invitrogen), 2 mM MgSO₄ and 0.1 μ l of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). PCR products were treated with ExoSAP-IT Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed using the Sanger method in both directions using the inner primers 5'-CACGAGGCATTGGGAAGGACATC and 5'-AGGCATATCTCTCCTGGTGGCT on an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Hemoglobin characterization: The patterns of hemoglobin distribution were measured by high-performance liquid chromatography. Hemoglobin was characterized using a VARIANT β -Thalassemia Short Program Reorder Pack - Bio-Rad, USA) in accordance with supplier recommendations.

Histopathological analysis of renal biopsies and kidney disease classification: Data on histological changes in renal biopsies were collected from pathologist reports. Renal tissue samples were fixed in formalin/acetic acid/alcohol and immersed in paraffin. Sections (2 μ -thick) were stained with eosin, PAS, Azan's trichrome, and Jones' silver methenamine. Semiquantitative scores were attributed to each renal lesion. Renal disease classification was based on the Atlas of Renal Pathology and the ISN criteria of renal disease. The histological markers of chronicity defined for Lupus Nephritis by Bajema et al. (2018) were used (20,21).

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using Stata/SE software (StataCorp LP, College Station, TX, USA) version 13.1, and GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) version 6.01. Demographic, clinical, and laboratory data were expressed as absolute numbers and summarized as median and interquartile range, or as

frequency percentages where appropriate. The Kruskal-Wallis test was used to compare non-parametric variables between groups. Differences between proportions were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test where appropriate. Multivariate logistic regression models were used to examine the independence of effects related to *APOLI*, with adjustments made for systemic arterial hypertension, age, sex, skin color and FSGS. Frequencies of haplotypes G0, G1 and G2, as well as the frequency of patients with no, one, or two *APOLI* RAs, were expressed as the percentage of the total number of patients genotyped. The presently employed genotyping strategy was validated and published elsewhere (17). Results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

General study population characteristics: The median patient age was 33 years, with a predominance of females (62%). Self-reported skin color was 34% black, 59% mixed-race, and 7% white. Approximately 45% of the patients had graduated from high school, 69% earned up to one minimum wage, and 60% resided in the rural interior of the state of Bahia. Hypertension was the most prevalent comorbidity present in 64% of the participants, and 48% were diagnosed with nephrotic syndrome. Concerning the diagnosis of nephropathies, primary glomerular diseases were more common (60%). Serum total cholesterol and 24h proteinuria were higher than reference values in more than half of the patients (see Supplementary Table 1).

Distribution of glomerular disease: The most prevalent nephropathies found in the sample studied were lupus nephritis (33%), focal segmental glomerulosclerosis (21%), and membranous glomerulonephritis (11%) (Supplementary Table 2).

Distribution of *APOLI* variants, haplotypes and number *APOLI* risk alleles

Due to technical problems, DNA sequencing and *APOLI* marker genotyping was successful in only 304 of the 326 patient samples. All *APOLI* marker genotypes were found to be in H-W equilibrium. The *APOLI* haplotype frequencies were 9.2% for G1 and 6.4% for G2, while the allelic *APOLI* frequencies related to risk of chronic kidney disease were 22.7% (G1 or G2) and 4.3% for two RA (Table 1). The frequency of the G1

haplotype in the general population recovered from the Consortium EPIGEN database was 8.3%. The database contained no information regarding the G2 haplotype.

Table 1. Distribution of *APOLI* variants, haplotypes and number of *APOLI* risk alleles in 304 patients subjected to renal biopsy at referral nephrology services in Salvador, Brazil (June 2016 to December 2018)

Patients (N=304)			
Haplotypes	Variants	N	%
G0	A-T-Ins	513	84.4%
G1	G-G-Ins, G-T-Ins	56	9.2%
G2	A-T-Del	37	6.1% %
	A-G-Del	2	0.3%
Total		608	100%
Genotypes	RA	N	%
G0G0	0	222	73%
G0G1, G0G2	1	69	22.7%
G1G1, G1G2, G2G2	2	13	4.3%
Total		304	100%

RA - number of *APOLI* risk alleles.

Clinical, laboratory and histological parameters in patients with *APOLI* RAs: The median age at time of renal disease diagnosis was lower in patients carrying two RAs (21 [18 - 39] years) than in patients with one RA (30 [21 - 36] years) or in those with no RAs (33 [24 - 44] years) ($p=0.04$). Total serum cholesterol levels were higher in patients with two RAs (median: 366 [230-416] mg/dL) than in those with one RA (224 [178-314] mg/dL) or no RAs (253 [196-335] mg/dL) ($p=0.02$). Although no statistically significant associations between self-reported skin color and the frequency of *APOLI* risk alleles were found, none of the patients who reported white skin color had a high-risk *APOLI* genotype (Table 2).

Table 2. Demographic, clinical, histological and laboratory parameters stratified according to number of *APOL1* risk alleles in 304 patients subjected to renal biopsy at referral nephrology services in Salvador, Brazil (June 2016 to December 2018)

PARAMETER	NUMBER OF APOL1 RISK ALLELES						p value
	0 (N = 222)		1 (N = 69)		2 (N = 13)		
	N*	Value	N*	Value	N*	Value	
Age in years, median (1st, 3rd quartile,) ^a	222	33 [25 - 45]	69	30 [22 - 36]	13	21 [18 - 40] ^d	0.04
Female, n (%) ^b	222	138 (62%)	69	45 (65%)	13	8 (62%)	0.89
Self-declared skin color, n (%) ^b	219		69		12		0.19
Black		69 (32%)		28 (41%)		6 (50%)	
Mixed-race		132 (60%)		38 (55%)		6 (50%)	
White		18 (8%)		3 (4%)		0 (0%)	
Education, n (%) ^b	187		59		10		0.09
None		10 (5%)		2 (3%)		0 (0%)	
Primary		64 (34%)		31 (53%)		2 (20%)	
Secondary		88 (47%)		19 (32%)		7 (70%)	
Some college or university degree		24 (13%)		7 (12%)		1 (10%)	
Postgraduate degree		1 (<1%)		0 (0%)		0 (0%)	
Monthly income, n (%) ^b	183		58				0.41

No income		18 (10%)		7 (12%)	9	0 (0%)	
Up to 1 minimum wage		124 (68%)		42 (72%)		8 (89%)	
Up to 2 minimum wages		26 (14%)		8 (14%)		1 (11%)	
Up to 3 minimum wages		13 (7%)		0 (0%)		0 (0%)	
Above 3 minimum wages		2 (1%)		1 (2%)		0 (0%)	
Clinical data, n (%)							
Diabetes Mellitus ^c	222	16 (7%)	69	5 (7%)	13	0 (0%)	0.79
Systemic Arterial Hypertension ^b	222	139 (63%)	69	44 (64%)	13	8 (62%)	0.99
Nephrotic Syndrome ^b	222	109 (49%)	69	28 (40.5%)	13	9 (69%)	0.13
Weight in Kg, median (1st, 3rd quartile) ^a	185	64 [55 - 73]	53	66 [54 - 75]	12	62 [52 - 74]	0.89
Laboratory results, median (1st, 3rd quartile) ^a							
Hemoglobin (g/dL)	220	12 [10 - 13]	68	12 [10 - 13]	13	13 [11 - 14]	0.90
Hematocrit (%)	214	36 [30 - 40]	66	35 [30 - 40]	13	37 [30 - 41]	0.92
Albumin (g/dL)	215	3 [2 - 3.5]	67	3 [2 - 4]	12	2 [2 - 3]	0.27
Creatinine (mg/dL)	220	1 [1 - 2]	68	1 [1 - 2]	12	2 [1 - 2]	0.55
Urea (mg/dL)	220	49 [28 - 95]	68	43 [29 - 69]	12	38 [34 - 67]	0.74
Total cholesterol (mg/dL)	201	253 [196 - 335]	64	224 [178 - 314]	12	366 [230 - 416]^d	0.02
24-hour proteinuria (g/24h)	208	4 [1 - 7]	62	3.5 [1 - 8]	13	6 [2 - 16]	0.18

^a Kruskal-Wallis test; ^b Chi-square test; ^c Fisher's exact test; ^d statistically different from the control group; RA - number of *APOLI* risk alleles;

N*: Total number of participants for which data was available

APOLI RAs and renal disease diagnosis and chronicity: Table 3 delineates that 8 (61.5%) patients with high-risk genotypes (G1G1, G1G2, G2G2) were diagnosed with FSGS; of these, 4 (50%) had collapsing FSGS, 2 (25%) had unspecified FSGS, 1 (12.5%) had cellular FSGS and 1 (12.5%) was unclassified. By contrast, just 54 (18.5%) of the patients with *APOLI* alleles linked to low CKD risk (G0G0, G0G1, G0G2) had FSGS ($p < 0.001$). In patients diagnosed with FSGS, the frequency of glomeruli with global or focal segmental sclerosis was significantly higher in the group with two risk alleles: 47% [41-88%] versus 32% [14-43%] in the group with one risk allele and 22% [10-47%] in those with no risk alleles ($p = 0.03$). Cortical tubulointerstitial fibrosis was more extensive in patients with two risk alleles (median 25% [20-52%]) compared to groups with one risk allele (median = 15% [5-25%]) or with no risk alleles (median = 10% [5-15%]) ($p = 0.02$). No statistically significant differences were found among groups of patients with lupus nephritis, despite a trend in patients with two RA towards a higher degree of global and/or focal segmental glomerular sclerosis, as well as increased tubular atrophy scores.

Table 3. Distribution of histological diagnosis and markers of chronicity according to *APOLI* RAs in patients with FSGS, Lupus nephritis or other diseases.

PARAMETER	NUMBER OF <i>APOLI</i> RISK ALLELES						P VALUE
	0 risk alleles		1 risk alleles		2 risk alleles		
Main histological diagnosis^a – N (%):							
FSGS	40	18%	14	20.3%	8	61.5% ^b	<0.001
Lupus nephritis	78	35.1%	20	29%	4	30.8%	0.9
Other diseases	104	46.9%	35	50.7%	1	7.7%	
Total	222		69		13		
Chronicity markers - Median [quartiles]^c:							
Patients w/FSGS (N = 60):							
Glomerular sclerosis (%)	38	22[10-47]	14	32[14-43]	8	47[41-88]	0.03
Interstitial fibrosis (%)	37	10[5-15]	14	15[5-25]	8	25[20-52] ^b	0.02
Tubular atrophy score	38	1[0-2]	13	0[0-2]	8	2[1-3]	0.09

Patients w/Lupus nephritis (N = 90)

Glomerular sclerosis (%)	66	11[0-30]	19	25[0-78]	4	31[3-79]	0.3
Interstitial fibrosis (%)	64	10[5-20]	19	10[5-50]	3	10[5-90]	0.5
Tubular atrophy score	67	1[0-2]	19	1[0-3]	4	2[1-3]	0.6
Fibrous crescents (%)	66	0[0-6]	19	0[0-0]	4	0[0-2]	0.1

^a tested groups, Chi-square test, ^c Kruskal-Wallis test; ^d statistically different from the control group; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis.

Multivariate logistic regression analysis revealed associations between markers of CKD chronicity (interstitial fibrosis, $p = 0.01$; global or segmental glomerulosclerosis, $p = 0.005$; tubular atrophy, $p = 0.03$) and the number of *APOL1* RAs. After adjusting for systemic arterial hypertension, age, sex, skin color and focal segmental glomerulosclerosis, these associations remained statistically significant (interstitial fibrosis, $p = 0.009$; global or segmental sclerosis, $p = 0.02$; tubular atrophy, $p = 0.01$) (Table 4).

Table 4. Associations between CKD chronicity markers and number of *APOL1* RAs after adjusting for arterial hypertension, focal segmental glomerulosclerosis and sociodemographic factors* (N = 304)

Recessive Model (2 vs. 1 or 0 <i>APOL1</i> RAs)	OR	95% CI	P Value
Tubulointerstitial fibrosis (>25%)			
Unadjusted	4.3	1.4 - 13.3	0.01
Adjusted for FSGS	4.6	1.4 - 15.1	0.01
Adjusted for FSGS, systemic arterial hypertension and sociodemographic factors*	5.3	1.5 -19.1	0.009
Global and/or segmental glomerulosclerosis (>25%)			
Unadjusted	6.7	1.7- 25.3	0.005
Adjusted for FSGS	4.4	1.3 – 21.6	0.03
Adjusted for FSGS, systemic arterial hypertension and sociodemographic factors*	5.3	2.1 - 33.1	0.02
Tubular atrophy (>25%)			
Unadjusted	3.8	1.1 – 13.1	0.03
Adjusted for FSGS	4.2	1.1 – 15.4	0.03
Adjusted for FSGS, systemic arterial hypertension and sociodemographic factors*	6.1	1.5 – 24.2	0.01

*: age, sex and skin color; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis.

Electrophoretic hemoglobin patterns: Among the 326 patients recruited for hemoglobin analysis, 14 (4.3%) were HbAS, while 12 (3.7%) were HbAC (Table 5). Data from 3,047,337 newborns surveyed between 2002 and 2018 in Bahia (Brazil) revealed that 136,970 (4.5%) were HbAS and 66,553 (2.2%) were HbAC (Table 5). Accordingly, the frequency of HbAS among patients subjected to renal biopsy was not different from that found in the general population of newborns (OR = 0.95; 95% CI = 0.56 – 1.63; p=0.97). Although a tendency towards a higher frequency of HbAC was seen in the present sample, no significance was detected (OR = 1.71; 95% CI = 0.96 – 3.04; p=0.09). The frequency of HbAS and HbAC was found to remain constant between 2002-2018, (Supplementary table 3).

Table 5: Hemoglobinopathy frequencies in patients with glomerular disease (N = 326) and in a general population of newborns from Bahia, Brazil (2002-2018).

	HbAS, N(%)		HbAC, N(%)		HbSS, N(%)		HbSC, N(%)	
PATIENTS (N=326)	14	(4.3%)	12	(3.7%)	1	(0.3%)	0	(0%)
NEWBORNS (N=3,047,337)	136,970	(4.5%)	66,553	(2.2%)	2,199	(0.07%)	1,819	(0.06%)

HbAS = Heterozygote AS, HbAC = Heterozygote AC, HbSS = Homozygote SS, HbSC = Heterozygous compound SC.

Clinical, laboratory and histological parameters in patients with hemoglobin variants: No statistically significant differences were observed in the sociodemographic or clinical parameters among the studied patients with different hemoglobin genotypes (Table 6).

Table 6. Sociodemographic, clinical, histological and laboratory variables stratified according to hemoglobin genotype (N = 325)†

Variable	HbAA (n = 299)		HbAS (n = 14)		HbAC (n = 12)		p value
	N*	Value	N*	Value	N*	Value	
Age in years, median (1st, 3rd quartile)^a	299	33 [22 – 42]	14	33 [22 – 37]	12	32 [26 – 48]	0.93
Female, n (%)^b	299	185 (62%)	14	12 (86%)	12	5 (42%)	0.06
Self-declared skin color, n (%)^b	291		13		11		0.18
Black		93 (32%)		6 (46%)		6 (54%)	
Mixed-race		176 (60.5%)		7 (54%)		5 (45%)	
White		22 (7.5%)		0 (00%)		0 (00%)	
Education, n (%)^b	235		12				0.15
None		11 (5%)		0 (00%)	10	1 (10%)	
Primary		87 (37%)		4 (33%)		5 (50%)	
Secondary		108 (46%)		4 (33%)		4 (40%)	
Some college or university degree		28 (12%)		4 (33%)		0 (00%)	
Postgraduate degree		1 (0.4%)		0 (00%)		0 (00%)	
Monthly income, n (%)^b	231		11		8		0.35
No income		24 (10%)		0 (00%)		2 (25%)	
Up to 1 minimum wage		161 (70%)		7 (64%)		5 (62.5%)	
Up to 2 minimum wages		31 (13%)		3(27%)		1 (12.5%)	

Up to 3 minimum wages		12 (5%)		1 (9%)		0 (00%)	
Above 3 minimum wages		3 (1%)		0 (00%)		0 (00%)	
Clinical and laboratory data:							
Diabetes Mellitus, n (%)^c	299	19 (6%)	13	2 (15%)	12	0 (00%)	0.21
Systemic Arterial Hypertension, n(%)^b	299	195 (65%)	14	7 (50%)	12	7 (58%)	0.47
Weight in Kg, median (1st, 3rd quartile)^a	248	64 [54 - 74]	6	60 [48 - 64]	8	65 [54 - 70]	0.44
Laboratory results, median (1st, 3rd quartile)^a							
Hemoglobin (g/dL)	296	12 [10 - 13]	14	11 [8 - 13]	12	11 [10 - 14]	0.50
Hematocrit (%)	287	36 [30 - 40]	14	33 [27 - 39]	12	31 [30 - 42]	0.68
Albumin (g/dL)	290	3 [2 - 4]	14	3 [2 - 4]	11	3 [2 - 3.5]	0.52
Creatinine (mg/dL),	295	1 [0.8 - 2]	14	1 [0.7 - 2]	12	1 [0.8 - 2]	0.75
Urea (mg/dL)	295	46 [28 - 91]	14	45 [31 - 75]	12	41 [30 - 89]	0.97
Total cholesterol (mg/dL)	275	248 [185 - 329]	10	281 [225 - 353]	11	220 [184 - 395]	0.73
24-hour proteinuria (g/24h)	277	4 [1 - 8]	12	3 [2 - 7]	12	3 [1 - 6]	0.70

† The HbSS case was not presented. N*: Total number of participants for which data was available; a: Kruskal-Wallis test; b: Chi-square test; c: Fisher's exact test.

Distribution of histological diagnosis and chronicity markers among patients with different hemoglobin genotypes: In patients with lupus nephritis, the frequency of glomeruli with segmental or global sclerosis was significantly higher in the group with the sickle cell trait (median = 45[21-68]%) than in those with genotypes HbAC (median = 2[0-27]%) or HbAA (median = 13[0-35]%), $p=0.04$. In addition, tubular atrophy scores were higher in patients with the sickle cell trait 2[2-3] or HbAC 2[1-3] compared to the HbAA group 1[0-2], $p=0.01$, (Table 7).

Table 7. Distribution of histological diagnosis and chronicity markers among patients with Lupus Nephritis according to hemoglobin genotype (N=325)

PARAMETER	HEMOGLOBIN GENOTYPES						p VALUE
	AA	AS	AS	AS	AC		
Main histological diagnosis^a – N (%):							
FSGS	63	21.1%	1	7.1%	2	16.7%	0.4
Lupus nephritis	97	32.4%	8	57.1%	4	33.3%	0.1
Membranous glomerulopathy	33	11%	1	7.1%	2	16.7%	0.7
Focal and segmental glomerulonephritis	3	1%	0	0%	1	8.3%	-
Thrombotic microangiopathy	3	1%	0	0%	1	8.3%	-
Other diseases	100	33.4%	4	28.6%	2	16.7%	
Total	299		14		12		
Chronicity markers - Median [quartiles]^b:							
Patients w/Lupus nephritis (N = 97)							
Glomerular sclerosis (%)	85	13[0-35]	8	45[21-68]	4	2[0-27]	0.04
Interstitial fibrosis (%)	83	10[5-25]	8	20[7-57]	4	32[10-47]	0.2

Tubular atrophy score	85	1[0-2]	8	2[2-3]	4	2[1-3]	0.01
Fibrous crescents	85	0[0-0]	8	3[0-8]	4	2[0-8]	0.2

a:Chi-square test, b: Kruskal-Wallis test;, FSGS: focal segmental glomerulosclerosis

Discussion

The frequency of high-risk *APOLI* genotypes (4.3%) observed in this study was higher than that previously reported in Brazil by Vajgel *et al* (2019) in patients with lupus and CKD, and also that by Araújo *et al* (2019) in patients with collapsing FSGS (22,23). One reason for these differences could be lower proportions of people of African ancestry in the Southeast and South regions of the country. In contrast, studies in African Americans with FSGS and hypertension-associated CKD reported higher frequencies than those found herein (24,25). It is, however, important to note that these authors considered only patients with diseases whose progression is strongly associated with *APOLI* variants, while the present study included all patients submitted to kidney biopsy (5,24). In addition, the sample studied herein reflects a highly admixed population formed by three ancestral groups: European, African and Amerindian (26,27), which differs substantially from the African American population, of whom approximately 14% carry two *APOLI* risk alleles (28).

Unfortunately, the Consortium EPIGEN database only contained frequencies for the G1 *APOLI* allele in the general population of Salvador. Interestingly, the *APOLI* G1 haplotype frequency was 8.3% in this population, which is similar to that observed in our patients submitted to renal biopsy (9.6%), suggesting that the frequency of the *APOLI* G1 haplotype in nephropathic patients from Salvador who require renal biopsy is not significantly different from that of the general population. This is similar to a study involving subjects from two states in Brazil (Pernambuco and São Paulo), which found no difference in the frequency of the G1 haplotype between patients with lupus nephritis and a general population of healthy, non-white adult blood donors (VAJGEL *et al.*, 2019). Furthermore, the frequency of the G1 *APOLI* haplotype found in the population of Salvador was shown to exceed that observed in the general populations of Pernambuco (4.7%) and São Paulo (6.1%) (22,29).

The median age at time of kidney disease diagnosis was lower in patients with high-risk *APOLI* genotypes, similar to data published in 2015 on patients undergoing renal biopsy, in which high-risk patients (i.e. those with two *APOLI* RAs) were younger than those who carried one or no RAs (25). Our findings further suggest that these high-risk individuals develop kidney disease earlier and may require renal replacement therapy sooner than those with fewer RAs. Riella and colleagues (2019) found a lower age of

dialysis onset in carriers of high-risk *APOLI* genotypes compared to individuals with low-risk *APOLI* genotypes (29). This was similarly observed in a study by Kanji and colleagues (2011), who found an association between *APOLI* RAs and age of onset of chronic hemodialysis, which remained significant even after adjusting for sociodemographic factors and other potential confounders (30). In 2011, Kopp and colleagues showed that FSGS, the most common glomerulopathy found in all ethnic groups in the United States, occurs earlier in individuals with *APOLI* high-risk genotypes and progresses more rapidly to ESRD (6).

In patients with FSGS, more intense global and/or segmental glomerulosclerosis, as well as renal tubulointerstitial fibrosis, was found. In addition, tubular atrophy tended to be more intense in patients with *APOLI* high-risk genotypes. These findings confirm that patients with high-risk *APOLI* genotypes have a more aggressive disease phenotype and may progress more rapidly to ESRD, thus necessitating renal replacement therapy, in comparison to patients with low-risk *APOLI* genotypes. Similar findings were reported by Kopp and colleagues among patients with primary FSGS, by Larsen and colleagues (2015) in patients with arterionephrosclerosis or putative ‘hypertension-associated’ nephropathy, and also by Sampson and colleagues (2016) in patients with nephrotic syndrome (24, 25,31).

The proportion of patients diagnosed with FSGS was significantly higher in the group with two *APOLI* risk alleles. In fact, it has been demonstrated that the *APOLI* G1 and G2 haplotypes increase the risk of developing FSGS by 10–17 fold in African Americans who are either homozygous or compound heterozygous for *APOLI* risk alleles (5,6). Herein, even after adjusting for systemic arterial hypertension, age, sex, skin color and focal segmental glomerulosclerosis in the recessive model, *APOLI* risk alleles continued to significantly influence the severity of kidney disease as evaluated by chronicity markers. These parameters are considered to be confounding variables in association with kidney disease in black populations worldwide. However, the fact that these factors do not cancel out the effects of *APOLI* haplotypes suggests that this gene’s influence occurs independently of these factors.

The frequencies of HbAS and HbAC did not differ significantly between patients undergoing renal biopsy and the general population of newborns in Salvador. These

findings are similar to those reported in a population of the African Congo (2015), in which the frequency of the sickle cell trait was not different between individuals with chronic kidney disease and those without disease (32). Another study in Nigeria (2019) showed similar glomerular filtration rates between patients with the sickle cell trait and those with a normal genotype (33). Our findings also indicate that the sickle cell trait may not be directly associated with reduced renal function. Studies performed by our group (Alladagbin et al 2018) and by Derebail et al (2010) reported a frequency of HbAS almost twice as high in hemodialysis patients than in the general population (14,17), suggesting that HbAS may contribute to the progression of renal failure in the presence of other risk factors. Recently, a multicentric observational study by Olaniran and colleagues showed that the sickle cell trait is associated with a more rapid decline in glomerular filtration rates in black patients; these authors collected data from patients between January 2005 and June 2018 who did not undergo renal biopsy (16). Here we show that patients with the sickle cell trait also exhibit a tendency towards a more chronic stage of disease at the time of biopsy. Since the median age of these patients was not different from that of HbAA patients, it is possible that this was not due to delayed access to health care. Despite gaps in our knowledge surrounding the mechanisms linking renal disease progression with the sickle cell trait, the higher intensity of tubular atrophy and global and/or segmental sclerosis seen in the patients with HbAS compared to those with HbAA suggests the occurrence of ischemic and inflammatory events similar to those observed in sickle cell nephropathy, albeit at a lower intensity in patients with the sickle cell trait and nephropathy. Unfortunately, our study suffers from limitations due to its relatively small sample size. Although this is a frequent limitation in biopsy-based studies, our analysis of interactions between *APOLI* risk variants and hemoglobin variants was impaired as a result. Nonetheless, the data presented herein may serve to encourage cooperative multicentric studies in the future.

Finally, our results call attention to the fact that genetic *APOLI* risk variants and hemoglobin S variants may constitute risk factors for glomerular disease progression in approximately 10% of patients undergoing renal biopsy in a population of African-Latin Americans. Both of these gene variants have been preserved due to their role in the immune-inflammatory response against infections by *T. rhodesiensis* and *P. falciparum*, and may play a detrimental role in the context of renal inflammation. The present findings

may warrant further investigation into the impacts of immune-inflammatory mechanisms associated with these gene variants on glomerular disease progression.

Conclusion

The frequencies of *APOLI* high-risk alleles in African-Latin American patients subjected to renal biopsy may be similar to the general population and are lower than those reported in the African American population. African-Latin American patients tend to develop a more severe form of FSGS earlier in life and present more pronounced histological evidence of rapid progression to terminal CKD. The frequency of hemoglobin variants in patients from Salvador who underwent renal biopsy was found to be similar to the general population. However, tubular atrophy and global or segmental glomerular sclerosis were found to be more prevalent in patients with HbAS compared to those with the normal genotype. Our findings regarding glomerular sclerosis may indicate potential mechanisms of disease progression in these patients.

Acknowledgments:

We thank Drs. Fernanda Bacelar, Márcia Carneiro and Maurício Teixeira, in addition to the Nephology staff at the Roberto Santos General Hospital and Ana Nery Hospital for their support during sample and data collection. We thank Jean Tadeu Brito, Elivani Sacramento de Jesus and Paula Neves Fernandes for technical assistance and participation in data collection. We are also grateful to Bruno Valença and Patricia Luz for administrative support. We also would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

References

1. Dienemann T, Fujii N, Orlandi P, Nessel L, Furth SL, Hoy WE, et al. International Network of Chronic Kidney Disease cohort studies (iNET-CKD): a global network of chronic kidney disease cohorts. *BMC Nephrol.* dezembro de 2016;17(1):121.

2. Madhavan SM, O'Toole JF, Konieczkowski M, Ganesan S, Bruggeman LA, Sedor JR. APOL1 Localization in Normal Kidney and Nondiabetic Kidney Disease. *JASN*. novembro de 2011;22(11):2119–28.
3. O'Toole JF, Bruggeman LA, Madhavan S, Sedor JR. The Cell Biology of APOL1. *Seminars in Nephrology*. novembro de 2017;37(6):538–45.
4. 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 International*. outubro de 2015;88(4):754–63.
5. 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*. 13 de agosto de 2010;329(5993):841–5.
6. 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. *JASN*. novembro de 2011;22(11):2129–37.
7. 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. *JASN*. novembro de 2015;26(11):2882–90.
8. Lipkowitz MS, Freedman BI, Langefeld CD, Comeau ME, Bowden DW, Linda Kao WH, et al. Apolipoprotein L1 gene variants associate with hypertension-attributed nephropathy and the rate of kidney function decline in African Americans. *Kidney International*. janeiro de 2013;83(1):114–20.
9. Chen TK, Tin A, Peralta CA, Appel LJ, Choi MJ, Lipkowitz MS, et al. APOL1 Risk Variants, Incident Proteinuria, and Subsequent eGFR Decline in Blacks with Hypertension-Attributed CKD. *CJASN*. 7 de novembro de 2017;12(11):1771–7.
10. 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 & Rheumatology (Hoboken, NJ)*. fevereiro de 2014;66(2):390–6.

11. 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. *JASN*. setembro de 2010;21(9):1422–6.
12. Naik RP, Derebail VK, Grams ME, Franceschini N, Auer PL, Peloso GM, et al. Association of Sickle Cell Trait With Chronic Kidney Disease and Albuminuria in African Americans. *JAMA*. 26 de novembro de 2014;312(20):2115.
13. Key NS, Derebail VK. Sickle-Cell Trait: Novel Clinical Significance. *Hematology*. 4 de dezembro de 2010;2010(1):418–22.
14. Derebail VK, Nachman PH, Key NS, Ansedo H, Falk RJ, Kshirsagar AV. High Prevalence of Sickle Cell Trait in African Americans with ESRD. *JASN*. março de 2010;21(3):413–7.
15. Naik RP, Irvin MR, Judd S, Gutiérrez OM, Zakai NA, Derebail VK, et al. Sickle Cell Trait and the Risk of ESRD in Blacks. *JASN*. julho de 2017;28(7):2180–7.
16. Olaniran KO, Allegretti AS, Zhao SH, Achebe MM, Eneanya ND, Thadhani RI, et al. Kidney Function Decline among Black Patients with Sickle Cell Trait and Sickle Cell Disease: An Observational Cohort Study. *JASN*. 6 de dezembro de 2019;ASN.2019050502.
17. Alladagbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, Brito JT, Oliveira GGS, Silva LK, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. *Lebensburger J*, organizador. *PLoS ONE*. 17 de dezembro de 2018;13(12):e0209036.
18. Barreto ML, Cunha SS, Alcântara-Neves N, Carvalho LP, Cruz AA, Stein RT, et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). *BMC Pulm Med*. dezembro de 2006;6(1):15.
19. Ko W-Y, Rajan P, Gomez F, Scheinfeldt L, An P, Winkler CA, et al. Identifying Darwinian Selection Acting on Different Human APOL1 Variants among Diverse African Populations. *The American Journal of Human Genetics*. julho de 2013;93(1):54–66.

20. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney International*. abril de 2018;93(4):789–96.
21. Fogo AB, Gilbert SJ, Levey AS. Introducing the AJKD Atlas of Renal Pathology II. *American Journal of Kidney Diseases*. agosto de 2015;66(2):179–80.
22. Vajgel G, Lima SC, Santana DJS, Oliveira CBL, Costa DMN, Hicks PJ, et al. A single APOL1 nephropathy variant increases risk of advanced lupus nephritis in Brazilians. *J Rheumatol*. 15 de novembro de 2019;jrheum.190684.
23. Araújo S de A, Cordeiro TM e, Belisário AR, Araújo RF de A, Marinho PES, Kroon EG, et al. First report of collapsing variant of focal segmental glomerulosclerosis triggered by arbovirus: dengue and Zika virus infection. *Clinical Kidney Journal*. 1º de junho de 2019;12(3):355–61.
24. Kopp JB, Winkler CA, Zhao X, Radeva MK, Gassman JJ, D'Agati VD, et al. Clinical Features and Histology of Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy in the FSGS Clinical Trial. *JASN*. junho de 2015;26(6):1443–8.
25. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Ambruzs JM, Cossey LN, Messias NC, et al. Histopathologic findings associated with APOL1 risk variants in chronic kidney disease. *Mod Pathol*. janeiro de 2015;28(1):95–102.
26. 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*. 2009;NA-NA.
27. Queiroz EM, Santos AM, Castro IM, Machado-Coelho GLL, Cândido APC, Leite TM, et al. Genetic composition of a Brazilian population: the footprint of the Gold Cycle. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):5124–33.
28. Limou S, Nelson GW, Kopp JB, Winkler CA. APOL1 Kidney Risk Alleles: Population Genetics and Disease Associations. *Advances in Chronic Kidney Disease*. setembro de 2014;21(5):426–33.

29. Riella C, Siemens TA, Wang M, Campos RP, Moraes TP, Riella LV, et al. APOL1-Associated Kidney Disease in Brazil. *Kidney International Reports*. julho de 2019;4(7):923–9.
30. Kanji Z, Powe CE, Wenger JB, Huang C, Ankers E, Sullivan DA, et al. Genetic Variation in APOL1 Associates with Younger Age at Hemodialysis Initiation. *JASN*. novembro de 2011;22(11):2091–7.
31. Sampson MG, Robertson CC, Martini S, Mariani LH, Lemley KV, Gillies CE, et al. Integrative Genomics Identifies Novel Associations with APOL1 Risk Genotypes in Black NEPTUNE Subjects. *JASN*. março de 2016;27(3):814–23.
32. Mukendi K, Lepira F, Makulo J, Sumaili K, Kayembe P, Nseka M. Sick cell trait is not associated with chronic kidney disease in adult Congolese patients: a clinic-based, cross-sectional study: cardiovascular topic. *CVJA*. 29 de junho de 2015;26(3):125–9.
33. Akinbodewa AA, Ogunleye A, Adejumo OA, Daomi VO, Okunola O, Oluwafemi TT, et al. Study of association between sickle cell trait and renal dysfunction among young adults in South-west Nigeria. 2019;22(2):201–7.

Supplementary table 1: General characteristics of the patients subjected to renal biopsy in referral nephrology services of Salvador, Brazil, from 2016 to 2018

Variable	Value
Total number of patients involved	326 ^a

Age in years, median [1st - 3rd quartile]	33 [22 - 42]
Female, n (%)	202/326 (62%)
Self-declared skin color, n (%):	
Black	106/316 (34%)
Mixed-race	188/316 (59%)
White	22/316 (7%)
Education level, n (%):	
None	12/258 (5%)
Primary	97/258 (38%)
Secondary	116/258 (45%)
Some college or university degree	32/258 (12%)
Postgraduate degree	1/258 (0.4%)
Monthly income, n (%):	
No income	26/251 (10%)
Up to 1 minimum wage	174/251 (69%)
Up to 2 minimum wages	35/251 (14%)
Up to 3 minimum wages	13/251 (5%)
Above 3 minimum wages	3/251 (1%)
Place of residence, n (%):	
Salvador	105/261 (40%)
Other (in Bahia)	156/261 (60%)
Comorbidities, n (%)	
Diabetes Mellitus	21/325 (6%)
Systemic Arterial Hypertension	208/326 (64%)

Weight in Kg, median [1st - 3rd quartile]	63 [54 - 74]
Renal disease-associated syndromes, n (%)	
Nephrotic syndrome	157/326 (48%)
Nephritic syndrome	41/326 (12.5%)
Nephritic syndrome with nephrotic proteinuria	8/326 (2.5%)
Non-nephrotic proteinuria	29/326 (9%)
Hematuria	11/326 (3%)
Chronic glomerulonephritis	6/326 (2%)
Undefined/other	74/326 (23%)
Diagnosis of nephropathy, n (%)	
Primary glomerular disease	197/326 (60%)
Secondary glomerular disease	113/326 (35%)
Other	16/326 (5%)
Laboratory results, median [1st - 3rd quartile]	
Hemoglobin (g/dL)	12 [10 - 13]
Hematocrit	36% [30 - 40%]
Albumin (g/dL)	2.9 [2 - 4]
Creatinine (mg/dL)	1.1 [1 - 2]
Urea (mg/dL)	46 [28 - 86]
Total cholesterol (mg/dL)	248 [187 - 329]
24-h proteinuria (g/24h)	4 [1 - 8]

^a The total number of subjects varied according to availability of data as shown in the table.

Supplementary table 2. Main histopathological diagnosis of renal biopsy from the patients involved in the study

HAN	249	4	(1.6)	8	(3.2)	1	(0.4)	0	(0)
HGRS	77	10	(13.0)	4	(5.2)	0	(0)	0	(0)
TOTAL	326	14	(4.3)	12	(3.7)	1	(0.3)	0	(0)
YEAR	NEWBORNS	HbAS		HbAC		HbSS		HbSC	
		No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
2002	136,801	6,058	(4.4)	3,052	(2.2)	94	(0.07)	92	(0.07)
2003	168,443	7,421	(4.4)	3,597	(2.1)	119	(0.07)	111	(0.06)
2004	177,343	7,831	(4.4)	3,755	(2.1)	126	(0.07)	103	(0.06)
2005	187,854	8,574	(4.5)	4,045	(2.1)	123	(0.06)	116	(0.06)
2006	188,312	8,401	(4.4)	4,062	(2.1)	138	(0.07)	104	(0.05)
2007	189,177	8,535	(4.5)	4,005	(2.1)	130	(0.07)	118	(0.06)
2008	190,333	8,662	(4.5)	4,190	(2.2)	150	(0.08)	115	(0.06)
2009	193,814	8,749	(4.5)	4,238	(2.2)	124	(0.06)	102	(0.05)
2010	209,110	8,560	(4.1)	4,172	(2.0)	170	(0.08)	125	(0.06)
2011	187,234	8,490	(4.5)	4,254	(2.2)	110	(0.06)	123	(0.06)
2012	176,263	7,942	(4.5)	3,953	(2.2)	114	(0.06)	103	(0.06)
2013	173,303	8,022	(4.6)	3,733	(2.2)	119	(0.07)	105	(0.06)
2014	174,368	7,940	(4.6)	3,685	(2.1)	152	(0.09)	92	(0.05)
2015	177,185	8,058	(4.6)	3,939	(2.2)	125	(0.07)	96	(0.05)
2016	167,261	7,729	(4.6)	3,864	(2.3)	150	(0.09)	96	(0.06)
2017	174,756	8,113	(4.6)	4,045	(2.3)	123	(0.07)	116	(0.06)
2018	175,780	7,885	(4.5)	3,964	(2.2)	132	(0.07)	102	(0.06)
TOTAL	3,047,337	136,970	(4.5)	66,553	(2.2)	2,199	(0.07)	1,819	(0.06)

HAN - Ana Nery Hospital, Salvador (Bahia-Brazil); HGRS - Roberto Santos Hospital, Salvador (Bahia-Brazil); HbAS = Heterozygote AS, HbAC = Heterozygote AC, HbSS = Homozygote SS, HbSC = Heterozygous compound SC.

CAPÍTULO II

MANUSCRITO 2

Título:

Sickle cell trait increases risk of glomerular disease progression a biopsy based study

Autores: Dona J. Alladagbin, Nadia A. Khouri, Eptácio R. da Luz Neto, Tatiana Amorim, Guilherme S. Ribeiro, Geraldo GS Oliveira, Washington L.C. dos-Santos

Situação: A ser submetido

Objetivo: (referente ao objetivo específico 4 da tese)

Avaliar os marcadores de progressão, a prevalência da doença renal em estágio terminal e a sobrevida renal entre pacientes portadores de hemoglobinas variantes e do genótipo AA, durante cinco anos após a biópsia renal

Resumo do capítulo:

Introdução: A doença renal crônica (DRC) ocorre mais cedo e com maior frequência na população negra do que entre os caucasianos, principalmente por causa de determinantes sociais que dificultam o acesso aos cuidados de saúde e a adesão ao tratamento das principais causas de DRC. Além disso, diferenças na constituição gênica dos pacientes com DRC podem influenciar a progressão da doença. **Objetivo:** Investigar se pacientes com doenças renais, com traço falciforme ou hemoglobina C têm um risco aumentado de evoluir para doença renal terminal (DRET) em comparação com pacientes com hemoglobina AA (HbAA). **Métodos:** O perfil de hemoglobina e os genótipos de 297 pacientes submetidos à biópsia renal foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência e sequenciamento de DNA, respectivamente. Os pacientes foram acompanhados com revisão do prontuário médico durante cinco anos após a biópsia renal para detectar o desenvolvimento de marcadores de progressão da DRC e DRET. **Resultados:** A frequência do traço falciforme em pacientes submetidos à biópsia renal foi de 5%, semelhante à encontrada na população geral (4,5%, $p = 0,70$). O traço de

hemoglobina C estava presente em 3,7% dos pacientes e em 2,2% da população geral ($p = 0,11$). Cinco anos depois da biópsia renal, a taxa média de filtração glomerular foi de $35 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ em pacientes com traço falciforme, enquanto nos grupos HbAA e HbAC, ela foi de $84 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ e $103 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ respectivamente, $p = 0,01$. Pacientes com traço falciforme desenvolveram DRET com mais frequência, necessitando de diálise (31%) do que aqueles com HbAA (8%) ($p = 0,02$). Nenhum paciente com traço de hemoglobina C necessitou de diálise nos cinco anos de seguimento.

Conclusões: Nossos achados indicam que o traço falciforme está associado a um risco aumentado de progressão das doenças glomerulares. O traço de hemoglobina C não aumenta o risco de progressão das doenças glomerulares para DRET.

Title:

Sickle cell trait increases risk of glomerular disease progression a biopsy based study

Authors:

Dona J. Alladagbin¹, Nadia A. Khouri², Epitácio R. da Luz Neto³, Tatiana Amorim⁴,
Guilherme S. Ribeiro^{1,5}, Geraldo G.S. Oliveira¹, Washington L.C. dos-Santos^{1,5*}

1. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brazil
2. Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Brazil
3. Hospital Ana Nery, Salvador, Brazil
4. APAE , Salvador, Brazil
5. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina Salvador, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: wluis@bahia.fiocruz.br (WLCS)

Abstract

Background: Chronic kidney disease (CKD) occurs earlier and more frequently in the black population than among Caucasians, largely because of social determinants that hinder health care access and adherence to treatment of the main causes of CKD. In addition, differences in the genetic background of CKD patients have been shown to influence disease progression. **Aim:** To investigate whether renal patients with sickle cell trait and hemoglobin C trait had an increased risk of evolving to end-stage renal disease (ESRD) compared to patients with AA hemoglobin (HbAA). **Methods:** Hemoglobin profile and *APOL1* genotypes from 297 patients undergoing renal biopsy were characterized by high-performance liquid chromatography and DNA sequencing, respectively. Patients were followed by medical chart review over five years following renal biopsy to detect development of CKD progression markers and ESRD. **Results:** The frequency of sickle cell trait in patients undergoing renal biopsy was 5%, similar to that found in the general population (4.5%, $p=0.70$). The hemoglobin C trait was present in 3.7% of the patients and in 2.2% of the general population ($p=0.11$). Five years after renal biopsy, the estimated glomerular filtration rate mean was 35 mL / min / 1.73 m² in patients with sickle cell trait, while in the HbAA and HbAC groups, the estimated glomerular filtration rate mean was 84 mL / min / 1.73 m² and 103 mL / min / 1.73 m² respectively, $p=0.01$. Patients with sickle cell trait more frequently developed ESRD needing dialysis (31%) compared to those with HbAA (8%) ($p=0.02$). No patient with hemoglobin C trait required dialysis over the five-year follow-up. **Conclusions:** Our findings indicate that sickle cell trait is associated with increased risk of glomerular disease progression. Hemoglobin C trait does not increase the risk of glomerulopathy progression to ESRD.

Key words: Glomerular diseases, Biopsy, End-stage renal disease, Sickle cell trait, Hemoglobin C trait.

Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is one of the most important public health problems and affects between 10 and 16% of the adult population in many countries worldwide¹. In Brazil, according to an annual survey conducted by the Brazilian Society of Nephrology in 2017, the prevalence and incidence rates of patients in dialysis per million of inhabitants were 610 and 194, respectively. The renal replacement therapy consumes more than 5% of all resources spent by Brazil's Unified Health System (SUS) with medium and high complexity treatment, with an annual lethality rate of 19.9%.^{2,3} In addition to factors that are classically recognized as determining progression of kidney disease, a growing emphasis has been placed on the genetic makeup of patients.⁴⁻⁸

HbAS, heterozygous for HbS, is one of the heterozygous forms of sickle cell syndromes. It is defined by the inheritance of the abnormal S allele of the Hb beta-globin gene from one parent and the normal A allele of the other parent, manifesting itself as the AS genotype. Around 300 million people worldwide are HbAS carriers with the majority living in Africa, the Middle East and some in the Mediterranean.^{9,10} The substitution of glutamic acid (E) for valine (V) at the sixth amino acid position in the β -globin chain of hemoglobin encoded by the HBB gene on one chromosome 11 leads to hemoglobin polymerization and erythrocyte sickling. Sickled red blood cells clump together, causing blood vessel obstruction, which can lead to tissue damage due to ischemia and reperfusion, following by inflammatory processes, that may cause heart attack.¹¹⁻¹³ Nephropathy associated with sickle cell disease has been reported in literature and several functional and structural renal alterations are observed in individual carrier individuals.¹⁴⁻¹⁶ One of the most common glomerular lesions observed in patients with sickle cell anemia is focal segmental glomerulosclerosis associated with proteinuria followed by progressive loss of renal function.¹⁷ Tubular dysfunction, glomerular hyperfiltration, albuminuria, and decline in glomerular filtration rate all contribute to progression of kidney disease in these patients.

Although HbAS is considered a benign condition and carrier individuals remain asymptomatic, under conditions of tissue hypoxia, red blood cell sickness and vascular obstruction may occur, leading to tissue ischemia and microinfarction, as observed in some cases of renal papillary necrosis. Similar ischemic phenomena could reproduce in inflammatory conditions that result in congestion, thrombosis and necrosis of renal

capillaries, as in some glomerulonephritis. These phenomena could amplify tissue damage contributing to the long-term progression of renal failure.^{18,19} Some studies show the association between HbS and glomerular filtration rate decline, proteinuria and a higher risk for progression to ESRD.^{6,18,20} Cross-sectional studies have also shown a two-fold higher prevalence of HbAS in chronic dialysis patients compared with the prevalence in the general population of newborns.^{21,22} Additionally, the prevalence of hemoglobin C trait (HbAC) patients was also higher in dialysis patients in these studies.

In this study, we investigate the contribution of HbAS and HbAC for an increased risk of end-stage renal disease in patients undergoing renal biopsy. This study involves the population of Bahia-Brazil, one of the largest Afro-descendent population groups outside Africa, which has a particular miscegenation profile.

Since some variants of the *APOL1* favor the progression of renal diseases in Afrodescendent population we also investigate the effect of the combination of these *APOL1* variants with hemoglobin variants in the progression of renal diseases. In the 3' end of the last exon of *APOL1* gene located on chromosome 22q12, two genetic variants, called G1 and G2, have been found to play a protective role against African trypanosomes, which are responsible for the lethal form of sleeping sickness.^{23,24} However, these variants are risk factors for progression of various kidney diseases.²⁵⁻²⁸

Material and methods

Ethics statement: This study was carried out in accordance with the recommendations established in directive 466/2012, issued by the Brazilian National Health Council, and was approved by the Institutional Review Board for Research involving Human Subjects of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ), protocol number 382.273.

Patients and study design: A longitudinal study included 297 patients with native kidneys submitted to renal biopsy for glomerular disease diagnosis, in two public reference hospitals (Ana Nery Hospital and Roberto Santos General Hospital) in the state of Bahia.

Sample and data collection: A whole blood sample (5 mL) was collected, after explaining the objectives of the study and signing the informed consent form. Demographic data were collected through interviews at the time of sample collection. Skin color was self-reported. Patients were followed up with laboratory data and information on death and end stage of renal disease collected six months, one year and five years after the kidney biopsy. Glomerular filtration rates were estimated using the Cockcroft-Gault equation. Patients with glomerular filtration rate ≤ 10 mL/min/1.73 m² are kept on chronic dialysis.

Hemoglobin characterization: Determination of different hemoglobin variants were carried out by high-performance liquid chromatography. Hemoglobin was characterized using a VARIANT β -Thalassemia Short Program Reorder Pack - Bio-Rad, USA) in accordance with supplier recommendations. To estimate the prevalence of hemoglobin variants in the general population of Salvador, data from the Neonatal Screening Program of Bahia from 2002 to 2018 were analyzed.

DNA isolation, PCR amplification, and sequencing: DNA segment encoding part of the *APOL1* serum-resistance-associated (SRA) domain was sequenced. *APOL1* G1 single nucleotide polymorphisms (rs73885319 and rs60910145) and G2 indel (rs717185313) were genotyped. Briefly, human DNA was purified using reagents and materials from the QIAamp DNA mini kit following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, GERMANY). PCR was performed using oligonucleotide primers APOL1 6del seq F 5'-ACCAACTCACACGAGGCATT and APOL1 6del seq R 5'-CTGCCAGGCATATCTCTCCT.²² PCR products were treated with ExoSAP-IT Cleanup Reagent (ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer's

instructions. Sequencing was carried out by the Sanger method in both directions using the inner primers 5'-CACGAGGCATTGGGAAGGACATC and 5'-AGGCATATCTCTCCTGGTGGCT on an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Histopathological analysis of renal biopsies: The biopsies of the patients were analyzed by a specialist pathologist of reference in nephrology with extensive experience in this area, in the services of electron microscopy and histotechnology through the Program to support the diagnostic development in hepatic and renal pathology, a reference service located at the Gonçalo Institute Moniz - Fiocruz / Bahia, Brazil (IGM-FIOCRUZ). Activity and chronicity scoring were calculated according to the criteria of chronicity defined for Lupus Nephritis by Bajema et al. (2018), and for CKD classification, the diagnostic criteria defined by Churg et al. (1995) were used.^{29,30}

To assess the markers of activity and chronicity between groups of patients with sickle cell trait (cases) and with the AA genotype (controls), we selected 2 controls for each case. The controls were paired by renal disease, sex and age, allowing a variation up to two years above or below the age of the index patient. However, a second completely matched control was not found for a patient with one case with minor glomerular changes, a with minimal change disease for a with focal segmental glomerulosclerosis. For this reason we included a control of different opposite sex keeping the other pairing criteria.

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using Stata/SE software (StataCorp LP, College Station, TX, USA) version 13.1, and GraphPad Prism version 8.0.2. Demographic, clinical, and laboratory data were expressed as absolute numbers and summarized as median and interquartile range, or as frequency percentages where appropriate. The Kruskal-Wallis test was used to compare non-parametric variables and the ANOVA test to compare parametric variables between HbAA, HbAS and HbAC groups. Mann Whitney test was used to analyze the distribution of activity and chronicity markers between patients with HbAS and the AA genotype group. Differences between proportions were analyzed using the chi-square test or fisher's exact test where appropriate. The independent contribution of HbAS in ESRD was examined using multivariate logistic regression models and adjusted for systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, age, skin color and monthly income. Kaplan-Meier survival curve for HbAS/HbAC carriers and HbAA group in renal replacement therapy was constructed and

compared by a log-rank test. Results were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The total number of patients subjected to renal biopsy in the study period was 338. Forty one patients were excluded from the statistical analysis because they were not followed during the entire study period (25 patients), for exhibiting HbSS (1 patient) or two *APOLI* risk alleles (15 patients, being 14 of whom presented HbAA and one HbAS). Data from 297 patients were analyzed.

Electrophoretic hemoglobin patterns: The frequency of HbAS and HbAC was 5.1% (n=15) and 3.7% (n=11), respectively, (Table 1). Data from 3,047,337 newborns surveyed between 2002 and 2018 in Bahia (Brazil) revealed that 136,970 (4.5%) were HbAS and 66,553 (2.2%) were HbAC, (Table 1). The frequency of HbAS and HbAC did not show relevant variation in the course of these 17 years (supplementary table 1). We found that the frequency of HbAS among patients subjected to renal biopsy was not different from that found in the general population of newborns (Odds Ratio = 1.1; 95% CI = 0.7 – 1.9; p=0.70). Although a tendency towards a higher frequency of HbAC was seen in the present sample, this difference was not statistically significant (Odds Ratio = 1.73; 95% CI = 0.94 – 3.16; p=0.11).

Clinical, laboratory and histological parameters in patients with hemoglobin variants: The general characteristics of the participants of the study are summarized in table 2. Most patients were relatively young with a median age between 33 and 34 years. There was a predominance of females in HbAA group (61%) and HbAS group (80%). Hypertension was the most prevalent comorbidity present in more than 50% of the patients in each group. There were no statistically significant differences in age, sex, socioeconomic status, diabetes mellitus and hypertension diagnosis between HbAS or HbAC carriers, and HbAA group.

Patient outcomes after renal biopsy among different groups of hemoglobin variants: Table 3 shows the evolution of patients with different hemoglobin profiles during five years after renal biopsy. Only one (0.5%) of the patients died in the HbAA group, while no death was observed in the variants hemoglobin groups. The proportion of patients who undergone renal replacement therapy was 31% in the group with HbAS compared to 8% of patients with HbAA, p = 0.02. Twelve months after the biopsy, 17% of HbAS patients and 2% of the HbAA patients had the value of serum creatinine doubled, p = 0.04. The median of estimated glomerular filtration rate, one year after biopsy was lower in patients

sickle cell trait (median = 55[21-86] mL / min / 1.73 m²) compared to groups with hemoglobin C trait (median = 78[57-89] mL / min / 1.73 m²) and AA hemoglobin, (median = 92 [58-129] mL / min / 1.73 m², p = 0.04. Five years after, the estimated glomerular filtration rate decreased progressively to 24[10-57]mL / min / 1.73 m² in patients with sickle cell trait when there was no decrease in the patients groups with hemoglobin C trait and AA hemoglobin, with a median of 95[61-153]mL / min / 1.73 m² and 86[47-115] mL / min / 1.73 m², respectively, p = 0.01. Figure 1 shows the progressive increase in creatinine during the five years of follow-up reflecting the decline in the estimated glomerular filtration rate in the group of patients with sickle cell trait compared to the other groups.

Distribution of activity and chronicity markers between sickle cell trait patients and the AA genotype group: Table 4 shows the indexes of activity and chronicity markers in the different groups. The median of global and/or segmental sclerosis was significantly higher 40 [14-64]% in the group with sickle cell trait compared to 8 [0-27.8]% in the group with the AA genotype, p = 0.03. There was no statistically significant difference between the groups in relation to the other markers.

Association of SCT and ESRD in patients with glomerular diseases: After a 5 year follow up, 31% patients with HbAS had ESRD compared to 8% of non-carriers participants (Odds Ratio = 5.3; 95% CI = 1.4-19.1, p= 0.01) on unadjusted model. After adjusting for systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, age, skin color and monthly income, the association between HbAS and ESDR remains significant with increased of magnitude of the effect to an Odds Ratio = 8.1; 95% CI =1.7-38.1, p<0.01. (Table 5).

Kidney survival in patients carriers or non- carriers hemoglobin variants: Figure 2 shows the Kaplan-Meier kidney survival curves for ESRD. Overall kidney survival five years after renal biopsy was 69% in HbAS patients, 92% in HBAA patients and 100% in the HbAC patients, p < 0.01.

ESRD and glomerular diseases, according to hemoglobin profile: The renal diseases associated with sickle cell trait are shown in Table 6. Most of the patients had lupus

nephritis. However, the difference in the frequency of progression of lupus nephritis to ESRD between the groups was not statistically significant.

Table 1. Hemoglobinopathies frequencies in patients with glomerular disease and in a general population of newborns from Bahia, Brazil.

	HbAS, N(%)		HbAC, N(%)		HbSS, N(%)		HbSC, N(%)	
PATIENTS (N=297)	15	(5.1)	11	(3.7)	0	(0)	0	(0)
NEWBORNS (N=3,047,337)	136,970	(4.5)	66,553	(2.2)	2,199	(0.07)	1,819	(0.06)

HbAS = Sickle cell trait, HbAC = Hemoglobin C trait, HbSS = Homozygote SS, HbSC = Heterozygous compound SC

Table 2. Demographic variables stratified according to hemoglobin genotypes

Variable	HbAA (n = 271)	HbAS (n = 15)	HbAC (n = 11)	p value
Age in years, median (1st, 3rd quartile) ^a	32 [22 – 42]	33 [22 – 43]	34 [25 – 54]	0.85
Female, n (%) ^b	166/271 (61%)	12/15 (80%)	5/11 (45%)	0.18
Self-declared skin color, n (%) ^b				0.32

Black	83/266 (31%)	7/14 (50%)	5/10 (50%)	
Mixed-race	163/266 (61%)	7/14 (50%)	5/10 (50%)	
White	20/266 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	
Education, n (%) ^b				0.33
None	11/216 (5%)	0 (0%)	1/9 (11%)	
Primary	79/216 (37%)	4/13 (31%)	5/9 (56%)	
Secondary	98/216 (45%)	5/13 (38%)	3/9 (33%)	
Some college or university degree	28/216 (13%)	4/13 (31%)	0 (0%)	
Postgraduate degree	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Monthly income, n (%) ^b				0.37
No income	21/213 (10%)	0 (0%)	2/7 (29%)	
Up to 1 minimum wage	148/213 (69%)	7/12 (58%)	5/7 (71%)	
Up to 2 minimum wages	29/213 (14%)	4/12 (33%)	0 (0%)	
Up to 3 minimum wages	13/213 (6%)	1/12 (8%)	0 (0%)	
Above 3 minimum wages	2/213 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	
Clinical and laboratory data:				
Diabetes Mellitus, n (%) ^c	16/217 (6%)	3/14 (21%)	0 (0%)	0.05
Systemic Arterial Hypertension, n(%) ^b	180/271 (66%)	8/15 (53%)	6/11 (55%)	0.43

HbAA: AA hemoglobin; HbAS = Sickle cell trait, HbAC = Hemoglobin C trait; a: Kruskal-Wallis test; b: Chi-square test; c: Fisher's exact test; * Total varies according to availability of data.

Tabela 3. Patient outcomes after renal biopsy in different groups of hemoglobin variants.

Variable	HbAA (n = 271) median (1st, 3rd quartile) or %		HbAS (n = 15) median (1st, 3rd quartile) or %		HbAC (n = 11) median (1st, 3rd quartile) or %		p value
	N*	Value	N*	Value	N*	Value	
Death	190	1 (0.5%)	11	0 (0%)	6	0 (0%)	-
RRT ^C	207	16 (8%)	13	4 (31%)	8	0 (0%)	0.02
CREATININE ^d							
↑ 50% in 6 months	193	10 (5%)	12	2 (17%)	9	1 (11%)	0.14
↑ 100% in 6 months	193	4 (2%)	12	1 (8%)	9	0 (0%)	0.26
↑ 50% in 12 months	193	18 (9%)	12	3 (25%)	8	0 (0%)	0.11
↑ 100% in 12 months	193	4 (2%)	12	2 (17%)	8	0 (0%)	0.04
↑ 50% in 5 years	99	8 (8%)	11	2 (18%)	4	0 (0%)	0.26
↑ 100% in 5 years	99	3 (3%)	11	2 (18%)	4	0 (0%)	0.08
Basal Creatinine (mg/dL) ^a	243	1.1[0.8-1.8]	15	1.5[0.7-1.8]	11	1.2[0.9-1.6]	0.73
Creatinine 6 months (mg/dL) ^a	215	0.9[0.7-1.3]	12	1.2[0.7-3.3]	9	1.1 [0.9-1.3]	0.34

Creatinine 12 months (mg/dL) ^a	216	0.9[0.7-1.3]	12	1.3[0.9-3.3]	9	1.1[1-1.2]	0.09
Creatinine 5 years (mg/dL) ^a	109	0.9[0.7-1.3]	11	1.5[0.7-5]	4	0.9[0.7-1.2]	0.20
Basal eGFR (mL/min/1,73 m ²) ^a	165	70.5[41.5-106]	10	49[34-54]	7	73[47-106.5]	0.07
eGFR 6 months (mL/min/1,73 m ²) ^a	157	87[60 -122]	9	45[27-74]	8	90[57.5-109]	0.09
eGFR 12 months (mL/min/1,73 m ²) ^a	171	92[58-129]	10	55[21-86]	6	78[57-89]	0.04
eGFR 5 years (mL/min/1,73 m ²) ^a	83	86[47-115]	8	24[10-57]	3	95[61-153]	0.01
Basal 24-hour proteinuria (g/24h) ^a	188	3.4[1.4-7]	12	3.5[2-6.1]	7	5.6[1.3-6.7]	0.9
24-hour proteinuria 6 months (g/24h) ^a	155	1.1[0.3-3.1]	6	2[1.3-2.4]	5	1.5[0.3-2.8]	0.49
24-hour proteinuria 12 months (g/24h) ^a	157	0.9[0.2-2.5]	8	0.5[0.4-1.1]	7	0.4[0.1-1.2]	0.43
24-hour proteinuria 5 years (g/24h) ^a	82	0.8[0.2-2]	5	0.6[0.2-0.9]	3	0.1[0.1-0.2]	0.19
Basal hemoglobin (g/dL) ^b	236	12[10-13.5]	13	11[10-12.5]	11	10.5[10-14]	0.46
Hemoglobin 6 months (g/dL) ^b	200	12.5[11.5-14]	9	11.3[10-12]	9	11.5[11-13]	0.08
Hemoglobin 12 months (g/dL) ^b	203	12.5[11-14]	9	11.5[10.5-15]	9	12.3[10.5-14]	0.71
Hemoglobin 5 years (g/dL) ^b	101	13[11.5-14]	6	12.5[11.5-15]	6	14[10-14]	0.9
Basal hematocrit (%) ^b	195	35[30-40]	11	32.5[30-37.5]	10	31[29.5-37]	0.30
Hematocrit 6 months (%) ^b	174	38[33-41]	7	33.5[31.5-35.5]	7	36.5[35-41]	0.22
Hematocrit 12 months (%) ^b	179	38[34-42]	8	35.5[32-45]	7	37[33-40]	0.9

Hematocrit 5 years (%) ^b	85	38[34-42]	6	38.5[34-46]	3	42[30-44]	0.9
Basal total cholesterol (mg/dL) ^a	175	245[184-326]	9	230[213-261]	9	210[180-258]	0.62
Total cholesterol 6 months (mg/dL) ^a	151	217[174-284]	6	206.5[181-232]	6	202[171-321]	0.9
Total cholesterol 12 months (mg/dL) ^a	152	189[156-233]	8	188[168.5-208]	8	182[158-239.5]	0.9
Total cholesterol 5 years (mg/dL) ^a	88	184.5[147-245]	4	162.5[123.5-200]	3	162[129-192]	0.24
Basal albumina (g/dL) ^a	199	3[2-3.5]	11	4[2.7-4]	9	3[2.7-3.5]	0.11
Albumin 6 months (g/dL) ^a	163	3.7[3-4]	7	3[3-4]	8	3.6[2.6-4]	0.22
Albumin 12 months (g/dL) ^a	166	4[3.4-4.3]	9	4[3.4-4]	8	3.7[3-4.2]	0.66
Albumin 5 years (g/dL) ^a	82	3.7[3.3-4.3]	5	3.7[3.5-4]	3	4.3[4-4.6]	0.21

HbAA: AA hemoglobin; HbAS = Sickle cell trait, HbAC = Hemoglobin C trait; RRT: Renal replacement therapy; eGFR: Estimated glomerular filtration rate; a: Kruskal-Wallis test; b: ANOVA test; c: Fisher's exact test; d: Chi-square test; *:Total with available data.

Tabela 4. Distribution of activity and chronicity markers between sickle cell trait patients and the AA genotype group

Activity and chronicity indices	HbAS (n = 14) median [1st, 3rd quartile] or %	HbAA (n = 28) median [1st, 3rd quartile] or %	p value
Endocapillary hypercellularity^a			0.51
0	10/14 (71.4%)	16/28 (57.1%)	
<25%	1/14 (7.1%)	2/28 (7.1)	
25%-50%	3/14 (21.4%)	6/28 (21.4%)	
>50%	-	4/28 (14.3%)	
Neutrophils^a			0.18
0	13/14 (92.9%)	17/28 (60.7%)	
<25%	-	2/28 (7.1%)	
25%-50%	1/14 (7.1%)	8/28 (28.6%)	
>50%	-	1/28 (3.6%)	
Hyaline deposits ^a			0.18
0	12/14 (85.7%)	22/28 (78.6%)	
<25%	1/14 (7.1%)	-	
25%-50%	-	5/28 (17.8)	
>50%	1/14 (7.1%)	1/28 (3.6)	
Fibrinoid necrosis^b			0.9
0	14/14 (100%)	27/28 (96.4%)	

<25%	-	-	
25%-50%	-	-	
>50%	-	1/28 (3.6%)	
Interstitial Inflammation^a			0.45
0	4/14 (28.6%)	9/28 (32.1%)	
<25%	3/14 (21.4%)	9/28 (32.1%)	
25%-50%	7/14 (50%)	8/28 (28.6%)	
>50%	-	2/28 (7.1%)	
Cellular and/or fibrocellular crescents (%)	0[0-10.5]	-	-
Activity index (score)^c	2[0.5-8.5]	2[0-4]	0.50
Tubular atrophy^a			0.19
0	3/14 (21.4%)	6/28 (21.4%)	
<25%	-	7/28 (25.0%)	
25%-50%	7/14 (50%)	11/28 (39.3%)	
>50%	4/14 (28.6%)	4/28 (14.3%)	
Global and/or segmental sclerosis (%)^c	8 [0-27.8]	40[14-64]	0.03
Fibrous crescents (%)^c	0[0-3]	0[0-5.5]	0.97
Interstitial fibrosis (%)^c	10[5-20]	15[5-55]	0.52
Chronicity index (score)^c	5[3-8]	11[5-12]	0.11

a: Chi-square test; b:Fisher's exact test ; c: Mann Whitney test. **Table 5. Multivariate analysis of ESRD and hemoglobin status adjusting for arterial hypertension, diabetes mellitus, age, skin color and monthly income.**

Model	HbAS vs HbAA OR (95% CI)	P Value
ESRD		
Unadjusted	5.3 (1.4-19.1)	0.01
Adjusted for arterial hypertension and diabetes mellitus	7.0 (1.7-28.5)	<0.01
Adjusted for arterial hypertension, diabetes mellitus, age, skin color and monthly income	8.1 (1.7-38.1)	<0.01

HbAA: AA hemoglobin; HbAS = Sickle cell trait; ESRD: end-stage renal disease.

Table 6. Influence of type of glomerular disease on end-stage renal disease, according to hemoglobin profile.

Type of glomerular disease	HbAA (n=207)		HbAS (n= 13)		P
	with ESRD	without ESRD	with ESRD	without ESRD	
Lupus nephritis, n(%)	7 (10.2%)	61	2 (28.5%)	5	0.2
Focal segmental glomerulosclerosis, n(%)	1 (3%)	37	0 (0%)	1	0.9
Benign nephrosclerosis, n(%)	0 (0%)	1	1 (100%)	0	0.9
Membranous glomerulopathy, n(%)	3 (12%)	22	0 (0%)	1	0.9
Crescentic glomerulonephritis, n(%)	1 (13%)	7	0 (0%)	0	-
Sclerosing glomerulonephritis, n(%)	1 (100%)	0	0 (0%)	0	-
Amyloidosis, n(%)	1 (100%)	0	0 (0%)	0	-
Insufficient material for diagnosis, n(%)	0 (0%)	7	1 (100%)	0	0.1
Other, n(%)	2	56	0	2	
TOTAL	16	191	4	9	

ESRD: end-stage renal disease, HbAS: Sickle cell trait; HbAA: AA hemoglobin.

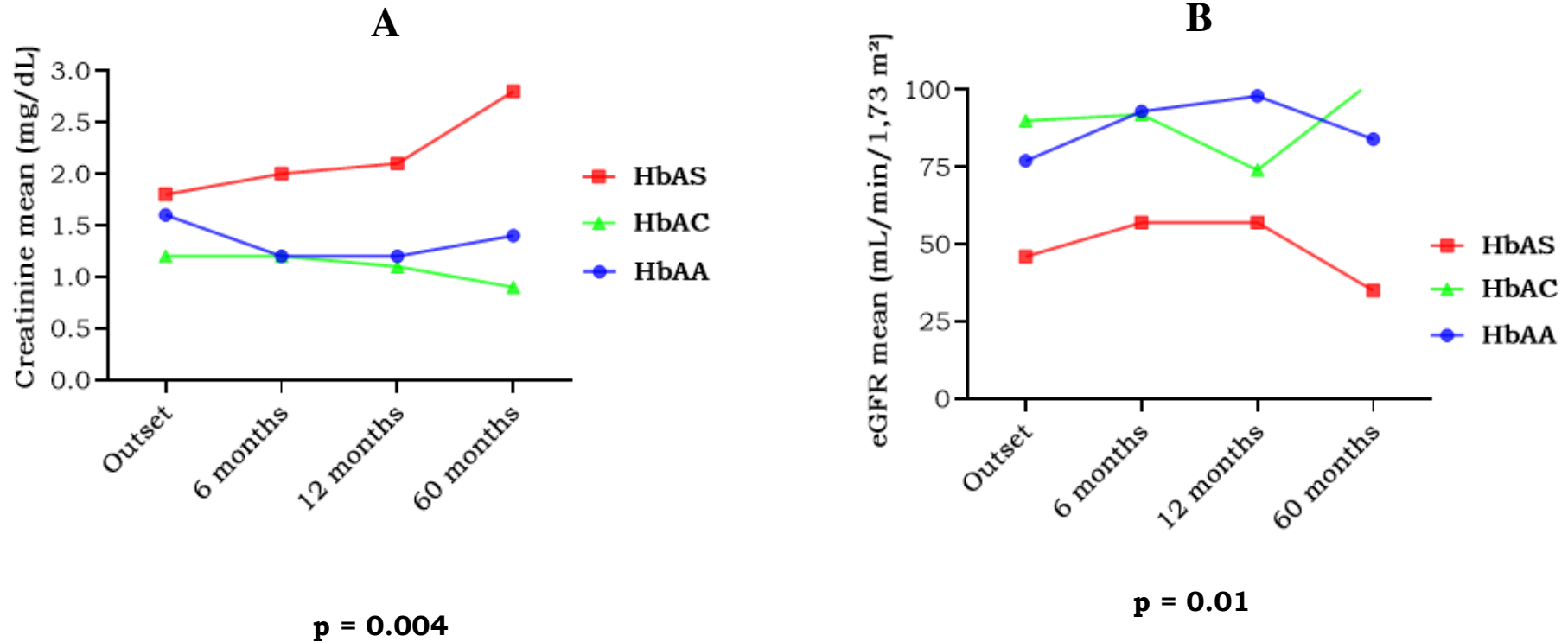


Figure 1: Five years follow up of patients with HbAS and renal biopsy-proven nephropathy, (A): The mean of creatinine was 2.8 mg/dL in patients with sickle cell trait compared to 1.4 mg/dL in patients with HbAA and 0.9 mg/dL in patients with HbAC, $p = 0.004$. B: The estimated glomerular filtration rate was 35 mL / min / 1.73 m² in patients with sickle cell trait, 84 mL / min / 1.73 m² in patients with HbAA and 103 mL / min / 1.73 m² in patients with HbAC, $p = 0.01$.

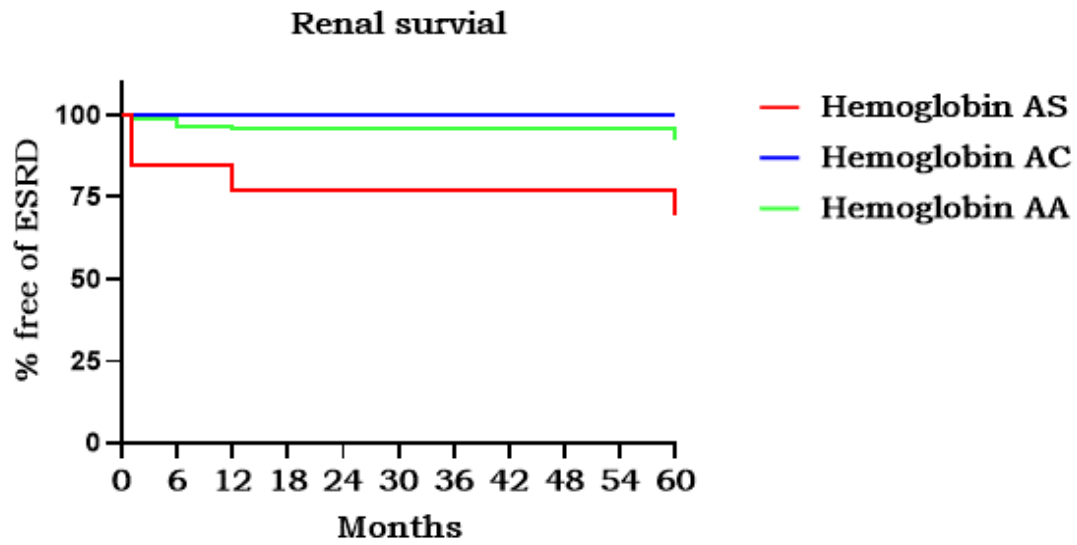


Figure 2: Kaplan-Meier renal survival curves of HbAS/HbAC carriers and HbAA group in renal replacement therapy. After five years of follow-up, overall renal survival was 69% in the group of patients with sickle cell trait, 100% in the group with hemoglobin C trait and 92% in the group with the normal hemoglobin genotype, $p < 0.01$.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study on the follow-up of patients with HbAS showing the progression of renal disease in patients with biopsy proven-diagnosis of glomerulopathy. It is show herein that although the frequency of HbAS among the patients undergoing renal biopsy was not different of that observed in the general population. The proportion patients on hemodialysis after five years of follow-up was almost four times higher among patients with HbAS than in patients with AA genotype. The decline in the glomerular filtration rate was more rapid among patients with sickle cell trait than among patients with AA genotype.

Naik and colleagues (2017) and Olaniran and collaborators (2019) found decrease in the eGFR and increased risk of incident ESRD in African Americans with sickle cell trait compared with individuals with normal hemoglobin.^{4,6} In the present work we confirm this finding using a population with a more heterogeneous genetic profile formed by the mixture of three ancestral groups: European, African, and Amerindian^{31,32} in which the diagnosis of nephropathy was confirmed by biopsy. Furthermore the findings of this work concur with those reported in cross-sectional studies performed by Derebail and colleagues (2010) in a population of African-Americans in North Carolina, USA, and by our group (Alladagbin et al, 2018) in the general population of Salvador, Brazil, showing that the frequency of HbAS was twice as higher in patients in chronic hemodialysis than in the general population of newborns.^{21,22} However, Mukendi and colleagues (2015), in a study performed in the African Congo did not find differences in the frequency of the HbAS between patients with CKD and those without CKD regularly followed in secondary care.³³ In the present work we studied patients with a more diverse range of biopsy proven glomerular disease than the patients studied by Mukendi and colleagues (2015).³³

After adjusting the HbAS with systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, age, skin color and monthly income in a logistic regression model, the HbAS continues to have a significant effect on end-stage renal disease, suggesting that the effect of the HbAS is independent of these factors. No relationship was observed between these factors and end-stage renal disease in this study, but their presence and especially hypertension increases the risk for renal disease progression.

The risk of progression to CKD associated by HbAS was not influenced by *APOLI* genetic variants that have an increasing emphasis on the progression of kidney disease because the frequency of the *APOLI* high-risk genotypes is very low in patients HbAS carriers. It do not seems to be determined by socio-economic reasons since the age, skin color and average wages are not different between patients with HbAS or patients with HbAA.

We also observed that patients with HbAS had greater proportion of global and/or segmental glomerulosclerosis and a tendency to greater intensity of tubular atrophy than patients with HbAA. Segmental or global glomerulosclerosis and tubular atrophy are two of the most relevant histological chronicity markers of renal diseases that point towards progression to CKD. The predominance of these histological changes suggest that patients with HbAS have indeed a more aggressive disease may progress more rapidly to ESRD with need for renal replacement therapy than patients with HbAA. Saraf and colleagues (2018) related evidence of progressive glomerular and tubular damage occurring in the kidneys of transgenic mice with HbAS and HbSS.³⁴ Low oxygen saturation, slow blood flow and interstitial hyperosmolarity, all favors HbS polymerization. In patients with sickle cell disease intracellular polymerization of HbS in red blood cells result in increased blood viscosity contributing to hypoxia and tissue lesion. In inflammatory processes such as glomerulonephritis the increase in the metabolic demands of cells decrease in oxygen concentrations due to impairment of blood flow by thrombosis, trauma, interstitial hypertension may lead to hypoxia (Eltzschig & Carmeliet, 2011),³⁵ favoring to HbS polymerization. Although these changes are more, frequent in homozygotic patients they may also occur in patients with sickle cell trait. In fact, Statius van Eps and colleagues (1970)³⁶ have shown significant vasa recta obliteration in patients with sickle cell trait. Therefore, it is possible that sickle cell trait will enhance tissue hypoxia in inflammatory conditions of the kidney, contributing to the chronic lesions and progression of renal disease reported herein.

Our study has limitations due to sample size. The possibility of assessing potential interactions between S or C variant hemoglobin and *APOLI* risk variants in ESRD was limited, as only one HbAS patient had two *APOL1* risk alleles and among the four patients presenting one risk allele, only 1 patient went to ESRD. Additionally, lupus

nephritis as the main renal disease in both groups. It was not possible to define associations between HbAS and specific kidney disease.

Conclusions

Our study shows that although the frequency of hemoglobin variants in patients undergoing renal biopsy is similar to that of the general population patients with Sickle cell trait had a five-fold increased risk of progression to ESRD. Hemoglobin C trait did not associate with increased risk of progression to ESRD.

Acknowledgments:

We thank Drs. Fernanda Bacelar, Márcia Carneiro and Maurício Teixeira, as well as the Nephology staff of the Roberto Santos General Hospital and the Ana Nery Hospital for their support during sample and data collection. We thank Jean Tadeu Brito and Paula Neves Fernandes for excellent technical support and participation in data collection. We are also grateful to Bruno Valença and Patricia Luz for administrative support. We also would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

Conflict of Interest Statement: none

References

1. Dienemann T, Fujii N, Orlandi P, et al. International Network of Chronic Kidney Disease cohort studies (iNET-CKD): a global network of chronic kidney disease cohorts. *BMC Nephrol.* 2016;17(1):121. doi:10.1186/s12882-016-0335-2
2. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol.* 2019;41(2):208-214. doi:10.1590/2175-8239-jbn-2018-0178
3. Alcalde PR, Kirsztajn GM. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. *J Bras Nefrol.* 2018;40(2):122-129. doi:10.1590/2175-8239-jbn-3918
4. Olaniran KO, Allegretti AS, Zhao SH, et al. Kidney Function Decline among Black Patients with Sickle Cell Trait and Sickle Cell Disease: An Observational Cohort Study. *JASN.* December 2019:ASN.2019050502. doi:10.1681/ASN.2019050502
5. Cañadas-Garre M, Anderson K, Cappa R, et al. Genetic Susceptibility to Chronic Kidney Disease – Some More Pieces for the Heritability Puzzle. *Front Genet.* 2019;10:453. doi:10.3389/fgene.2019.00453
6. Naik RP, Irvin MR, Judd S, et al. Sickle Cell Trait and the Risk of ESRD in Blacks. *JASN.* 2017;28(7):2180-2187. doi:10.1681/ASN.2016101086
7. Dummer PD, Limou S, Rosenberg AZ, et al. APOL1 Kidney Disease Risk Variants: An Evolving Landscape. *Seminars in Nephrology.* 2015;35(3):222-236. doi:10.1016/j.semnephrol.2015.04.008
8. Ainsworth HC, Langefeld CD, Freedman BI. Genetic epidemiology in kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2017;32(suppl_2):ii159-ii169. doi:10.1093/ndt/gfw270
9. Naik RP, Smith-Whitley K, Hassell KL, et al. Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2018;169(9):619. doi:10.7326/M18-1161

10. Akinbodewa AA, Ogunleye A, Adejumo OA, et al. Study of association between sickle cell trait and renal dysfunction among young adults in South-west Nigeria. 2019;22(2):201-207.
11. Kato GJ, Steinberg MH, Gladwin MT. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2017;127(3):750-760. doi:10.1172/JCI89741
12. Conran N, Belcher JD. Inflammation in sickle cell disease. Connes P, ed. *CH*. 2018;68(2-3):263-299. doi:10.3233/CH-189012
13. Quinn CT. Minireview: Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016;241(7):679-688. doi:10.1177/1535370216640385
14. Naik RP, Derebail VK. The spectrum of sickle hemoglobin-related nephropathy: from sickle cell disease to sickle trait. *Expert Review of Hematology*. 2017;10(12):1087-1094. doi:10.1080/17474086.2017.1395279
15. Bukar AA, Sulaiman MM, Ladu AI, et al. CHRONIC KIDNEY DISEASE AMONGST SICKLE CELL ANAEMIA PATIENT AT THE UNIVERSITY OF MAIDUGURI TEACHING HOSPITAL, NORTH EASTERN NIGERIA: A STUDY OF PREVALENCE AND RISK FACTORS. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1). doi:10.4084/mjhid.2019.010
16. Derebail VK, Ciccone EJ, Zhou Q, Kilgore RR, Cai J, Ataga KI. Progressive Decline in Estimated GFR in Patients With Sickle Cell Disease: An Observational Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases*. 2019;74(1):47-55. doi:10.1053/j.ajkd.2018.12.027
17. Guasch A, Navarrete J, Nass K, Zayas CF. Glomerular Involvement in Adults with Sickle Cell Hemoglobinopathies: Prevalence and Clinical Correlates of Progressive Renal Failure. *JASN*. 2006;17(8):2228-2235. doi:10.1681/ASN.2002010084
18. Naik RP, Derebail VK, Grams ME, et al. Association of Sickle Cell Trait With Chronic Kidney Disease and Albuminuria in African Americans. *JAMA*. 2014;312(20):2115. doi:10.1001/jama.2014.15063

19. Kotila TR. Sickle Cell Trait: A Benign State? *Acta Haematol.* 2016;136(3):147-151. doi:10.1159/000446526
20. Key NS, Derebail VK. Sickle-Cell Trait: Novel Clinical Significance. *Hematology.* 2010;2010(1):418-422. doi:10.1182/asheducation-2010.1.418
21. Derebail VK, Nachman PH, Key NS, Ansele H, Falk RJ, Kshirsagar AV. High Prevalence of Sickle Cell Trait in African Americans with ESRD. *JASN.* 2010;21(3):413-417. doi:10.1681/ASN.2009070705
22. Alladagbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. Lebensburger J, ed. *PLoS ONE.* 2018;13(12):e0209036. doi:10.1371/journal.pone.0209036
23. Uzureau P, Uzureau S, Lecordier L, et al. Mechanism of Trypanosoma brucei gambiense resistance to human serum. *Nature.* 2013;501(7467):430-434. doi:10.1038/nature12516
24. Limou S, Dummer PD, Nelson GW, Kopp JB, Winkler CA. APOL1 toxin, innate immunity, and kidney injury. *Kidney International.* 2015;88(1):28-34. doi:10.1038/ki.2015.109
25. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, et al. Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans. *Science.* 2010;329(5993):841-845. doi:10.1126/science.1193032
26. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, et al. APOL1 Genetic Variants in Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy. *JASN.* 2011;22(11):2129-2137. doi:10.1681/ASN.2011040388
27. Parsa A, Kao WHL, Xie D, et al. APOL1 Risk Variants, Race, and Progression of Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2013;369(23):2183-2196. doi:10.1056/NEJMoa1310345
28. Tzur S, Rosset S, Shemer R, 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):345-350. doi:10.1007/s00439-010-0861-0

29. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney International*. 2018;93(4):789-796. doi:10.1016/j.kint.2017.11.023
30. Churg, Jacob, Bernstein, Jay, Glassock, Richard J. *Renal Disease : Classification and Atlas of Glomerular Diseases*. 2nd ed. New York; 1995.
31. 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*. 2009:NA-NA. doi:10.1002/ajhb.20976
32. Queiroz EM, Santos AM, Castro IM, et al. Genetic composition of a Brazilian population: the footprint of the Gold Cycle. *Genet Mol Res*. 2013;12(4):5124-5133. doi:10.4238/2013.October.29.6
33. Mukendi K, Lepira F, Makulo J, Sumaili K, Kayembe P, Nseka M. Sick cell trait is not associated with chronic kidney disease in adult Congolese patients: a clinic-based, cross-sectional study: cardiovascular topic. *CVJA*. 2015;26(3):125-129. doi:10.5830/CVJA-2014-076
34. Saraf SL, Sysol JR, Susma A, et al. Progressive glomerular and tubular damage in sickle cell trait and sickle cell anemia mouse models. *Translational Research*. 2018;197:1-11. doi:10.1016/j.trsl.2018.01.007
35. Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. Schwartz RS, ed. *N Engl J Med*. 2011;364(7):656-665. doi:10.1056/NEJMra0910283
36. Van Eps LWS, Pinedo-Veels C, De Vries GH, De Koning J. NATURE OF CONCENTRATING DEFECT IN SICKLE-CELL NEPHROPATHY. *The Lancet*. 1970;295(7644):450-452. doi:10.1016/S0140-6736(70)90836-6

Supplementary table 1: Hemoglobinopathy frequencies in a general population of newborns (Bahia-Brazil, 2002 to 2018)

YEAR	NUMBER of NEWBORNS	HbAS (%)	HbAC (%)	HbSS (%)	HbSC (%)
2002	136,801	6,058 (4.4)	3,052 (2.2)	94 (0.07)	92 (0.07)
2003	168,443	7,421 (4.4)	3,597 (2.1)	119 (0.07)	111 (0.06)
2004	177,343	7,831 (4.4)	3,755 (2.1)	126 (0.07)	103 (0.06)
2005	187,854	8,574 (4.5)	4,045 (2.1)	123 (0.06)	116 (0.06)
2006	188,312	8,401 (4.4)	4,062 (2.1)	138 (0.07)	104 (0.05)
2007	189,177	8,535 (4.5)	4,005 (2.1)	130 (0.07)	118 (0.06)
2008	190,333	8,662 (4.5)	4,190 (2.2)	150 (0.08)	115 (0.06)
2009	193,814	8,749 (4.5)	4,238 (2.2)	124 (0.06)	102 (0.05)
2010	209,110	8,560 (4.1)	4,172 (2.0)	170 (0.08)	125 (0.06)
2011	187,234	8,490 (4.5)	4,254 (2.2)	110 (0.06)	123 (0.06)
2012	176,263	7,942 (4.5)	3,953 (2.2)	114 (0.06)	103 (0.06)
2013	173,303	8,022 (4.6)	3,733 (2.2)	119 (0.07)	105 (0.06)
2014	174,368	7,940 (4.6)	3,685 (2.1)	152 (0.09)	92 (0.05)
2015	177,185	8,058 (4.6)	3,939 (2.2)	125 (0.07)	96 (0.05)
2016	167,261	7,729 (4.6)	3,864 (2.3)	150 (0.09)	96 (0.06)
2017	174,756	8,113 (4.6)	4,045 (2.3)	123 (0.07)	116 (0.06)
2018	175,780	7,885 (4.5)	3,964 (2.2)	132 (0.07)	102 (0.06)
TOTAL	3,047,337	136,970 (4.5)	66,553 (2.2)	2,199 (0.07)	1,819 (0.06)

HbAS = Heterozygote AS, HbAC = Heterozygote AC, HbSS = Homozygote SS, HbSC = Heterozygous compound SC.

CAPÍTULO III

MANUSCRITO 3

Título:

APOLI renal risk alleles and renal disease progression in Brazil

Autores: Dona J. Alladagbin, Debora L. Viana, Luciano K. Silva, Nadia A. Khouri, Epitácio R. da Luz Neto, Camila A. Figueiredo, Ricardo R Oliveira, Guilherme S. Ribeiro, Geraldo G. S. Oliveira, Washington L.C. dos-Santos.

Situação: A ser submetido

Objetivo: (referente aos objetivos específicos 5 e 6 da tese)

Comparar a frequência do haplótipo G1 do gene *APOLI* entre pacientes submetidos à biópsia renal e a população em geral, além de avaliar os marcadores de progressão, a prevalência da doença renal em estágio terminal e a sobrevida renal em pacientes portadores ou não das variantes de risco do gene *APOLI* durante cinco anos após biópsia renal.

Resumo do capítulo:

Introdução: As variantes genéticas G1 e G2 identificadas no gene *APOLI*, comuns na África subsaariana e em indivíduos afrodescendentes, estão fortemente associadas a muitas formas de doença renal crônica e aqueles com dois alelos de risco progridem mais rapidamente para a doença renal em estágio terminal. **Objetivo:** Avaliar a progressão de nefropatias em pacientes com ou sem variantes de risco do gene da *APOLI* em uma população afrodescendente altamente miscigenada. **Métodos:** Estudo longitudinal incluindo 316 pacientes submetidos à biópsia renal em Salvador, BA, Brasil. Os genótipos de *APOLI* foram determinados por sequenciamento de DNA. Os pacientes foram acompanhados por cinco anos. **Resultados:** A proporção de inflamação intersticial, fibrose túbulo-intersticial, esclerose global e / ou segmentar e escore de atrofia tubular foi maior nos pacientes com dois alelos de risco, ($p < 0,05$ para cada um deles). Houve um declínio progressivo na taxa média de filtração glomerular em pacientes com dois alelos de risco durante os cinco anos de acompanhamento: (de 79 ± 51 mL / min / $1,73$ m² para

$22 \pm 13 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$, $p = 0,004$), comparado àqueles com um (de $77 \pm 41 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ para $194 \pm 54 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$), $p = 0,74$ ou nenhum (de $74 \pm 47 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$ para $78 \pm 45 \text{ mL} / \text{min} / 1,73 \text{ m}^2$, $p = 0,45$) alelo de risco do *APOLI*. A sobrevida renal é significativamente menor (69%) para pacientes com dois alelos de risco do *APOLI* em comparação com 94% e 91% entre os grupos com um e sem alelos de risco, respectivamente, $p = 0,024$. A proporção de pacientes diagnosticados com GESF que evoluíram para DRET foi significativamente maior em indivíduos com dois alelos de risco (33%) do que naqueles com um alelo de risco (0%) ou sem alelos de risco (3%), $p = 0,04$. **Conclusões:** O declínio progressivo na taxa estimada de filtração glomerular, a frequência de DRET e conseqüentemente, menor sobrevida renal foram significativamente maior es entre os pacientes portadores de dois alelos de risco da *APOLI*.

Title:

APOLI renal risk alleles and renal disease progression in Brazil

Authors:

Dona J. Alladagbin¹, Debora L. Viana¹, Luciano K. Silva¹, Nadia A. Khouri², Eptácio R. da Luz Neto³, Camila A. Figueiredo⁴, Ricardo R Oliveira¹, Guilherme S. Ribeiro^{1,5}, Geraldo G. S. Oliveira¹, Washington L.C. dos-Santos^{1,5*}

1. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil
2. Hospital Geral Roberto Santos, Salvador, Brazil
3. Hospital Ana Nery, Salvador, Brazil
4. Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil
5. Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: wluis@bahia.fiocruz.br (WLCS)

Abstract

Background: The G1 and G2 genetic variants identified in the *APOL1* gene, common in sub-Saharan Africa and in people of African descent, are strongly associated with many forms of chronic kidney disease and those with two risk alleles progress more quickly to end-stage kidney disease. **Objective:** To evaluate the progression of nephropathies in patients with or without risk variants of the *APOL1* gene in a highly miscegenated Afro-descendant population. **Methods:** This is a longitudinal study including 316 patients undergoing renal biopsy in Salvador, BA, Brazil. *APOL1* genotypes were determined by DNA sequencing. The patients were followed for five years. **Results:** The proportion of Interstitial Inflammation, tubulointerstitial fibrosis, global and/or segmental sclerosis and tubular atrophy score was higher in patients with two *APOL1* risk alleles ($p < 0.05$ for each of them). There was a progressive decline in the mean glomerular filtration rate between patients with two risk alleles between the time of biopsy and after five years of follow-up: (from 79 ± 51 mL / min / 1.73 m^2 to 22 ± 13 mL / min / 1.73 m^2 , $p = 0.004$), compared to those with one (from 77 ± 41 mL / min / 1.73 m^2 to 194 ± 54 mL / min / 1.73 m^2), $p = 0.74$ or none (from 74 ± 47 mL / min / 1.73 m^2 to 78 ± 45 mL / min / 1.73 m^2 , $p = 0.45$) *APOL1* risk allele. Renal survival is significantly lower (69%) for individuals with two *APOL1* risk alleles compared with 94% and 91% between groups with one and without *APOL1* risk alleles, respectively, $p = 0.024$. The proportion of patients diagnosed with FSGS who progressed to ESRD was significantly higher in individuals with two *APOL1* risk alleles (33%) than those with a risk allele (0%) or with no risk alleles (3%), $p = 0.04$. **CONCLUSIONS:** The progressive decline of the estimated glomerular filtration rate, the frequency of ESRD and, consequently, lower renal survival were significantly higher among patients with two *APOL1* risk alleles.

Key words: Glomerular diseases, Biopsy, End-stage renal disease, apolipoprotein L1 gene

Introduction

End-stage renal disease (ESRD) is one of the most important public health problems in the world due to its prevalence, increasing incidence and high burden to the families and public health systems (1). According to Brazilian Chronic Dialysis Survey, the number of patients on renal replacement therapy increased from 91,314 in 2011 to 126,583 in 2017, corresponding to an annual growth of 6.4% over the last 6 years with an annual lethality rate of 19.9. %. The treatment of end-stage renal disease consumes more than 5% of all resources spent by the Unified Health System (SUS) with medium and high complexity treatment (2–4). The difference between the incidence of ESRD at a rate of two to four times higher in the African descent population compared to the Caucasian population has been the reason for several investigations on the determining factors of this disparity (5–8). Although socioeconomic, clinical (higher blood pressure levels, inadequate glycemic control) and lifestyle factors may partially explain this disparity, recent studies have also shown that genetic makeup plays an important role (9–11). Initially, the association between genetic mutation on chromosome 22 and non-diabetic chronic kidney disease, as well as the association with focal segmental glomerulosclerosis was identified in 2008 by two independent research groups (12,13) . Subsequent studies, however, showed evidence of a significant association between chronic kidney disease in people of African descent and the *APOL1* gene (14). The *APOL1* gene is located on chromosome 22 and encodes the apolipoprotein L1. Apolipoprotein L1, a component of circulating high-density lipoprotein, is synthesized in many organs including the kidney. In normal human kidneys, the APOL1 protein is present in podocytes, proximal tubule epithelial cells, and in the endothelium of extraglomerular arterioles and small arteries (15,16). Two encoding alleles in *APOL1*, termed G1 and G2, are restricted to chromosomes of African origin, and are located in the last exon of gene . The *APOL1* G1 allele is comprised of two missense variants: rs73885319 (S342G) and rs60910145 (I384M), while the G2 allele variant presents a six–base pair deletion that removes two amino acids (N388-Y389); both are found at elevated frequencies in people of African ancestry (14,17). Homozygous (G1 / G1 or G2 / G2) or composite heterozygous (G1 / G2) individuals are referred to as having a high-risk genotype for Chronic Kidney Disease (CKD). These patients have an increased risk for a broad spectrum of glomerular diseases including collapsing focal segmental glomerulosclerosis, HIV-associated nephropathy,

hypertension-attributed ESRD and non-diabetic ESRD compared to heterozygous carriers (G0G1 or G0G2) and mutation-free individuals (G0G0) individuals (18–23).

In the present study, we analyzed the progression of kidney disease, the risk of ESRD and renal survival in patients with or without *APOLI* risk variants for five years after renal biopsy.

Material and methods

Ethics statement: The present study was performed in accordance with the recommendations established in directive 466/2012, issued by the Brazilian National Health Council, and was approved by the Research Ethics Committee involving Human Subjects of the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ), protocol number 382.273. The written informed consent form was obtained from all patients involved in the study.

Study design and population: A longitudinal study included 316 patients of both sexes submitted to renal biopsy for glomerular disease diagnosis, in nephrology units of public reference hospitals such as Ana Nery Hospital and Roberto Santos General Hospital in Salvador, Bahia-Brazil, and biopsy samples were then analyzed at the Gonçalo Moniz Institute (IGM-FIOCRUZ). The patients were followed for five years.

Sample and data collection: A five milliliter sample of blood was collected from each patient after explaining the project's objectives. Demographic, clinical and laboratorial data were collected through interviews and the review of patient medical records. Skin color was self-reported. Laboratory data and information on death and end stage of kidney disease were collected six months, one year and five years after renal biopsy. Glomerular filtration rates were estimated using the Cockcroft-Gault equation. Patients with glomerular filtration rate ≤ 10 mL/min/1.73 m² are kept on chronic dialysis.

Analysis of the *apoll1* gene haplotypes by the polymerase chain reaction and DNA sequencing by the Sanger method.

Genomic DNA was purified from peripheral blood samples, using reagents and materials from the QIAamp® DNA mini kit, following the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, GERMANY). The *APOLI* region that contains the last exon and that carries the G1 and G2 haplotypes was amplified by PCR and sequenced by the Sanger method. The oligonucleotide primers used were APOL1 6del seq 5'-ACCAACTCACACGAGGCATT and APOL1 6del seq 5'-CTGCCAGGCATATCTCTCCT, as previously described by (24). PCR products were purified with ExoSAP-IT reagent (ThermoFisher Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was performed using 5'-CACGAGGCATTGGGAAGGACATC and 5'-AGGCATATCTCTCCTGGTGGCT primers oligonucleotides on an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). *APOLI* forward and reverse sequences were aligned using Genbank

reference BC143038 and CLC Main Workbench v.8.0 software (Qiagen). The markers rs73885319, rs60910145 and rs71785313 were analyzed.

Histopathological analysis of renal biopsies: Data on the analysis of kidney biopsies were collected from the pathologist reports. These biopsies were fixed in alcoholic-acid formalin, embedded in paraffin and 2 μ -thick sections were stained with eosin, PAS, Azan's trichrome, and Jones' silver methenamine and analyzed by optical microscopy using semiquantitative scoring for the different lesions. Activity and chronicity indices were calculated according to the criteria of chronicity defined for Lupus Nephritis by Bajema et al. (2018), and the nephropathies classification was carried out according to the criteria defined by Churg et al. (1995) were used (25,26) .

To assess the markers of activity and chronicity between groups of patients with two *APOLI* risk alleles (cases) and patients with one or without *APOLI* risk alleles, we selected 1 control with one and 2 controls without *APOLI* risk alleles for each case. The controls were paired by biopsy diagnosis, sex and age range within 2 years older or younger than the age of the case. However we had to make a few changes: Three cases with focal segmental glomerulosclerosis and one case with IgA Nephropathy had only one or no control of the same sex. For these cases controls of the opposite sex were selected. A 60-year-old case has a 43-year control without risk alleles. Controls were drawn using the program 'O Sorteador.com.br'

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using Stata/SE software (StataCorp LP, College Station, TX, USA) version 13.1, and GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA) version 6.01. Demographic, clinical and laboratory data were expressed as absolute numbers and summarized as median and interquartile range, or as frequency percentages where appropriate. The Kruskal-Wallis test or ANOVA test was used to compare variables between groups where appropriate. Differences between proportions were analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test. For comparisons of categorical variables within multiple groups with statistically significant differences, Fisher's exact test was repeated to compare two groups. The independent contribution of

APOLI in ESRD was examined using multivariate logistic regression models and adjusted for systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, age and skin color. Kaplan-Meier survival curve for *APOLI* variants carriers and non-carriers in renal replacement therapy was constructed and compared by a log-rank test. Frequencies of haplotypes G0, G1 and G2, as well as the frequency of patients with no, one, or two *APOLI* RAs, were expressed as the percentage of the total number of patients genotyped. Genotyping strategy was validated and published elsewhere (24). Results were considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

Results

The total number of patients included in this study was 316. Among these patients, 78 were missed due to follow-up loss or impossibility of contacting the patient, with 238 remaining for kidney survival analysis.

Distribution of *APOLI* genotypes and haplotypes in the participants: Allele frequencies in patients were 22% for one *APOLI* risk allele and 5% for two *APOLI* risk alleles. The frequency of G1 and G2 haplotypes was 9.6% and 6.5% respectively (Table 1).

Baseline characteristics of participant: **Baseline characteristics of participant:** The general characteristics of the participants are summarized in Table 2. Patients with two *APOLI* risk alleles are apparently younger, (median and 1st, 3rd quartile, 26 [18 - 42] years) compared to groups with a risk allele (median and 1st, 3rd quartile, 30 [21 - 36 years]) and zero risk allele (median and 1st, 3rd quartile, 33 [24 - 45] years), $p = 0.08$. There was a predominance of females in group with one *APOLI* risk allele (66%) and zero *APOLI* risk allele group (62%). Hypertension was the most prevalent comorbidity present in more than 50% in each group of participants. There were no statistically significant differences in sex, socioeconomic status, arterial hypertension and diabetes diagnosis between groups.

Distribution of glomerular diseases by *Apol1* risk alleles status: The most common glomerular disease in patients with two risk alleles was FSGS with 50% compared to 20% in the group with a risk allele and 18% in the group without a risk allele, $p=0.0046$. Table 3

Distribution of activity and chronicity markers among patients with two and one or no *APOLI* risk alleles: The proportion of patients with interstitial inflammation greater than 25% was higher in the group with two risk alleles (61.5%) than in that with one risk allele (15%) or no risk alleles (31%), $p=0.04$. Seventy-seven percent of the patients with two risk alleles had a degree of tubular atrophy greater than 25% compared to 38.1% and 31% in the groups with one and no *APOLI* risk alleles respectively, $p=0.02$. The proportion of global and/or segmental sclerosis was higher in the group of patients with two risk alleles with a median of 50 [40-77]% compared to 22 [7-39]% in the group with one risk allele and 18 [0-44] % or in those without risk allele, $p = 0.03$. More intense tubulointerstitial fibrosis was also observed in patients with two risk alleles (median = 25

[15-52]%), compared to groups with one risk allele (median = 15 [5-20]%) or without risk allele (median = 5 [5-10]%), $p = 0.008$. The median chronicity index score was significantly high in the group with two risk alleles (8 [6-12]), than in patients with one risk allele (6 [3-10]) or in those with no risk allele (median = 4 [3-8]), $p = 0.03$.

Patient outcomes; six months, one year and five years after renal biopsy among different *APOLI* risk allele status: These results are shown in table 5. The proportion of patients with two *APOLI* risk alleles in renal replacement therapy was three times higher (31%) than in those with one risk allele (6%) or zero risk allele (9%) groups, $p = 0.024$. The proportion of patients who died was not different between groups, with 8% of patients with two *APOLI* risk alleles, 2% with one *APOLI* risk alleles and 1% in the group with zero *APOLI* risk alleles, $p=0.25$.

Six months after biopsy, 27% of patients with two risk alleles had a 50% increase in baseline creatinine compared to 6.5% and 6%, respectively, in the one-allele and zero-risk allele groups, $p = 0.026$. After one year there was a non-significant trend of increasing the proportion (30%) of patients with two risk alleles with a 50% increase in creatinine value compared to the one-risk allele group (7%) or zero-risk allele (10%), $p = 0.1$. Five years after the biopsy, 100% of patients with two risk alleles had creatinine increased by 50% compared to 13% of patients with one risk allele and 4% of zero-risk allele group, $p < 0.0001$. The proportion of patients with two risk alleles with the doubled creatinine value after 5 years was 60% compared to 5% and 1% respectively in patients with one and zero risk allele, $p < 0.0001$.

One year after biopsy, median and 1st, 3rd quartile creatinine in patients with two risk alleles was 1.6 [1-2.2] mg / dL compared to 0.9 [0.7-1.1] mg / dL in patients with one allele and 0.9 [0.7-1.4] mg / dL in those with zero-risk allele, $p = 0.02$. Five years after, creatinine in patients with two *APOLI* risk alleles increased progressively with the median of 2.5 [2.5-2.7] mg / dL compared to 0.9 [0.8-1.5] mg / dL in patients with one risk allele and 0.8 [0.7-1.4] mg / dL in those with zero risk allele, $p = 0.001$.

The median of estimated glomerular filtration rate, one year after biopsy was lower in patients with two *APOLI* risk alleles (median = 42 [34-60] mL / min / 1.73 m²) compared to the other groups with median of 98 [73-124] mL / min / 1.73 m² and 89 [58-125] mL / min / 1.73 m² respectively in patients groups with one or zero *APOLI* risk allele, $p = 0.029$. Five years after, the estimated glomerular filtration rate decreased progressively to

26 [10-31] mL / min / 1.73 m² in patients with two risk alleles while remaining stable in the patients groups with one or zero *APOLI* risk allele with a median of 101 [57-132] mL / min / 1.73 m² and 78 [42-109] mL / min / 1.73 m², respectively, $p = 0.003$. Figure 1 shows the evolution of creatinine and the estimated glomerular filtration rate over the five years of follow-up in the different groups. The creatinine mean increased from 1.4 ± 0.5 mg/dL at the time of biopsy to 3.8 ± 1.7 mg/dL, $p = 0.01$), compared to those with one (from 1.7 ± 1.4 mg/dL to 1.2 ± 0.9 mg/dL), $p = 0.43$ or none (from 1.7 ± 1.6 mg/dL to 1.5 ± 1.3 mg/dL, $p = 0.41$) *APOLI* risk allele. The estimated glomerular filtration rate mean decreased from 79 ± 51 mL / min / 1.73 m² at the time of biopsy to 22 ± 13 mL / min / 1.73 m², $p = 0.004$), compared to those with one (from 77 ± 41 mL / min / 1.73 m² to 94 ± 54 mL / min / 1.73 m²), $p = 0.74$ or none (from 74 ± 47 mL / min / 1.73 m² to 78 ± 45 mL / min / 1.73 m², $p = 0.45$) *APOLI* risk allele.

The hemoglobin rate after six months was lower in patients with two *APOLI* risk alleles (median = 11.9 [11-14.5] g / dL) compared to groups of patients with one allele (median and 1st, 3rd quartile = 12.7 [11.7-15] g / dL) or zero risk allele (median = 12.4 [11-13] g / dL), $p = 0.01$. Total serum cholesterol levels were higher in patients with two risk alleles (median: 320[281-470] mg/dL) than in those with one risk allele (205[173-299] mg / dL) or zero *APOLI* risk alleles (243[184-308] mg / dL), $p < 0.01$.

Association between *APOLI* risk alleles and ESRD: After a 5 year follow up, 31% patients with two *APOLI* risk alleles had ESRD compared to 6% of patients with one risk allele and 9% of patients without *APOLI* risk allele (Odds Ratio = 4.8; 95% CI = 1.3-17.1, $p = 0.015$) on unadjusted model. After adjusting for systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, age, and skin color, the association between *APOLI* risk alleles and ESRD remains significant with increased of magnitude of the effect to an Odds Ratio = 5.5 ; 95% CI = 1.4-21.3, $p = 0.01$. (Table 6).

Kidney survival among patients with two and one or no *APOLI* risk alleles: Figure 2 shows the Kaplan-Meier kidney survival curves for ESRD. Overall kidney survival five years after renal biopsy was 69% in patients with two *APOLI* risk alleles, 94% in the group with one *APOLI* risk alleles and 91% among patients without *APOLI* risk alleles, respectively $p = 0.024$.

Influence of type of glomerular disease on end-stage renal disease, according to *APOL1* risk alleles status: The proportion of patients diagnosed with FSGS who progressed to ESRD was significantly higher in individuals with two *APOL1* risk alleles (33%) than in those with one risk allele (0%) or no risk alleles (3%), $p=0.02$. Table 7.

Table 1. Frequencies of *APOL1* genotypes, haplotypes and risk alleles related to CKD risk

	Cases (n=316)
Genotypes, haplotypes and number of CKD risk alleles	N (%)
G0/G0	230 (73)
G0/G1	42 (13)
G0/G2	28 (9%)
G1/G1	7 (2.2%)
G1/G2	6 (2%)
G2/G2	3 (1%)
G1	9.6%
G2	6.5%

Table 2. Baseline demographic and clinical characteristics of participant by *APOLI* risk alleles

Variable	Zero risk allele (n = 229)	One risk allele (n = 71)	Two risk alleles (n = 16)	p value
Age in years, median (1st, 3rd quartile, ^a)	33 [24 - 45]	30 [21 - 36]	26 [18 - 42]	0.08
Female, n (%) ^b	142/229 (62%)	47/71 (66%)	8/16 (50%)	0.72
Self-declared skin color, n (%) ^b				0.17
Black	71/226 (31%)	30/71 (42%)	8/15 (53%)	
Mixed-race	137/226 (61%)	38/71 (54%)	7/15 (47%)	
White	18/226 (8%)	3/71 (4%)	0/15 (0%)	
Education, n (%) ^b				0.16
None	11/194 (6%)	2/61 (3%)	0/13 (0%)	
Primary	63/194 (32%)	32/61 (52%)	3/13 (23%)	
Secondary	93/194 (48%)	20/61 (33%)	9/13 (69%)	
Some college or university degree	26/194 (13%)	7/61 (12%)	1/13 (8%)	
Postgraduate degree	1/194 (1 %)	0/61 (0%)	0/13 (0%)	
Monthly income, n (%) ^b				0.70
No income	17/190 (9%)	8/60 (13%)	1/12 (8%)	
Up to 1 minimum wage	130/190 (69%)	42/60 (70%)	8/12 (67%)	
Up to 2 minimum wages	27/190 (14%)	8/60 (13%)	3/12 (25%)	

Up to 3 minimum wages	14/190 (7%)	1/60 (2%)	0/12 (0%)	
Above 3 minimum wages	2/190 (1%)	1/60 (2%)	0/12 (0%)	
Clinical data:				
Diabetes Mellitus, n (%) ^b	15/229 (7%)	6/71 (8%)	1/16 (6%)	0.8
Systemic Arterial Hypertension, n(%) ^b	144/229 (63%)	45/71 (63%)	10/16 (63%)	0.9

a: Chi-square test; b: Chi-square test

Table 3. Distribution of glomerular diseases by *Apol1* risk alleles statut

DIAGNOSIS	APOLI RISK ALLELES FOR CKD						TOTAL	
	0		1		2			
Lupus Nephritis	78	(34%)	20	(28%)	4	(25%)	102	(32%)
Focal and segmental glomerulosclerosis	40	(18%)	14	(20%)	8	(50%)	62	(20%)
IgA Nephropathy	13	(6%)	0	(0%)	1	(6%)	14	(4%)
Other diseases	90	(39%)	36	(51%)	0	(0%)	126	(40%)
Inconclusive*	8	(4%)	1	(1%)	3	(19%)	12	(4%)
TOTAL	229	(100%)	71	(100%)	16	(100%)	316	(100%)

*:Insufficient material for diagnosis; **Chi-square for trend P<0.0001 ODDS two APOLI risk alleles 4.7(1.6-13.6) P=0.0046**

Tabela 4. Distribution of activity and chronicity markers among patients with two and one or no *APOLI* risk alleles

Activity and chronicity indices	Zero risk allele median [1st, 3rd quartile] or % (n = 26)	One risk allele median [1st, 3rd quartile] or % (n = 13)	Two risk alleles median [1st, 3rd quartile] or % (n = 13)	p value
Endocapillary hypercellularity^a				0.84
<25%	20/26 (77%)	11/13 (85%)	10/13 (77%)	
>25%	6/26 (23%)	2/13 (15%)	3/13 (23%)	
Neutrophils^a				0.33
<25%	19/26 (73%)	11/13 (85%)	12/13 (92%)	
>25%	7/26 (27%)	2/13 (15%)	1/13 (8%)	
Hyaline deposits^a				0.9
<25%	22/26 (85%)	11/13 (85%)	11/13 (85%)	
>25%	4/26 (15%)	2/13 (15%)	2/13 (15%)	
Fibrinoid necrosis				-
<25%	26/26 (100%)	13/13 (100%)	13/13 (100%)	
>25%	0/26 (0%)	0/13 (0%)	0/13 (0%)	
Interstitial Inflammation^a				0.04
<25%	18/26 (69%)	11/13 (85%)	5/13 (38.5%)	
>25%	8/26 (31%)	2/13 (15%)	8/13 (61.5%)	
Cellular and/or fibrocellular crescents (%)	-	-	-	-
Activity index (score)^b	2[1-4]	1[0-2]	3[2-4]	0.07

Tubular atrophy^a				0.02
<25%	18/26 (69%)	8/13 (61.5%)	3/13 (23%)	
>50%	8/26 (31%)	5/13 (38.5%)	10/13 (77%)	
Global and/or segmental sclerosis (%)^c	18[0-44]	22[7-39]	50[40-77]	0.03
Fibrous crescents (%)^b	-	-	-	-
Tubulointerstitial fibrosis (%)^b	5[5-10]	15[5-20]	25[15-52]	0.008
Chronicity index (score)^b	4[3-8]	6[3-10]	8[6-12]	0.03

a:Chi-square test; b: Kruskal-Wallis test

Tabela 5: Patient outcomes after renal biopsy in different *APOL1* risk allele status.

Variable	Zero risk allele median (1st, 3 rd quartile) or % (n = 228)		One risk allele median (1st, 3 rd quartile) or % (n = 70)		Two risk alleles (nmedian (1st, 3 rd quartile) or % (n = 16)		p value
	N*	Value	N*	Value	N*	Value	
Death ^a	158	2 (1%)	48	1 (2%)	13	1 (8%)	0.25
RRT ^a	175	16 (9%)	50	3 (6%)	13	4 (31%)	0.024
Creatinine ^a							
↑ 50% in 6 months	156	9 (6%)	46	3 (6.5%)	11	3 (27%)	0.026
↑ 100% in 6 months	156	3 (2%)	46	1 (2%)	11	1 (9%)	0.31
↑ 50% in 12 months	152	15 (10%)	41	3 (7%)	10	3 (30%)	0.1
↑ 100% in 12 months	151	3 (2%)	41	0 (0%)	10	1 (10%)	0.12
↑ 50% in 5 years	74	3 (4%)	23	3 (13%)	5	5 (100%)	<0.0001
↑ 100% in 5 years	74	1 (1%)	23	1 (4%)	5	3 (60%)	<0.0001
Basal Creatinine (mg/dL) ^c	210	1.2[0.8-1.8]	63	1.2[0.8-1.9]	13	1.5[1.2-1.8]	0.77
Creatinine 6 months (mg/dL) ^c	170	0.9[0.7-1.3]	53	0.9[0.7-1.3]	11	1.2 [1-2.4]	0.11

Creatinine 12 months (mg/dL) ^c	171	0.9[0.7-1.4]	49	0.9[0.7-1.1]	11	1.6[1-2.2]	0.02
Creatinine 5 years (mg/dL) ^c	91	0.9[0.7-1.4]	25	0.9[0.8-1.5]	7	2.7[2.5-5]	0.001
Basal GFR (mL/min/1,73 m ²) ^c	145	66[40-102]	40	67[42-111]	10	64[41-95]	0.84
GFR 6 months (mL/min/1,73 m ²) ^c	126	83[57 -119]	40	90[65-117]	9	69[39-79]	0.32
GFR 12 months (mL/min/1,73 m ²) ^c	137	89[58-125]	37	98[73 -124]	9	42[34-60]	0.029
GFR 5 years (mL/min/1,73 m ²) ^c	69	78[42-109]	18	101[57-132]	7	26[10-31]	0.003
Basal 24-hour proteinuria (g/24h) ^c	166	3.5[1.4-6.9]	48	2.8[1.2-7.2]	12	4.4[2.2-11.7]	0.32
24-hour proteinuria 6 months (g/24h) ^c	118	1.2[0.3-3]	39	1.2[0.3-3.6]	7	2.5[1.6-4.4]	0.22
24-hour proteinuria 12 months (g/24h) ^c	124	0.8[0.2-2.1]	36	0.8[0.2-2]	8	1.6[1.1-7.7]	0.09
24-hour proteinuria 5 years (g/24h) ^c	68	0.7[0.2-2.4]	19	0.9[0.2-1.2]	3	1.2[0.3-2.7]	0.74
Basal hemoglobin (g/dL) ^b	206	12[10-13.3]	60	11.2[10-13]	13	12.5[12-14]	0.49
Hemoglobin 6 months (g/dL) ^b	158	12.4[11-13.3]	49	12.7[11.7-15]	11	11.9[11-14.5]	0.01
Hemoglobin 12 months (g/dL) ^b	159	12.3[11-13.7]	47	13[12-14]	11	12.5[12-13.7]	0.10
Hemoglobin 5 years (g/dL) ^b	82	13[11.6-14.5]	27	12.5[11-14]	4	12.4[10.4-15]	0.97
Basal hematocrit (%) ^b	178	35[30-40]	47	33[29-39]	12	37[32-41]	0.48
Hematocrit 6 months (%) ^b	137	37.5[33-40]	40	38[34.5-43]	9	35.6[33-42]	0.12
Hematocrit 12 months (%) ^b	137	37[33-42]	42	39[36-42]	9	36[34-41]	0.17

Hematocrit 5 years (%) ^b	73	39[34-43]	17	37[33-40]	3	32[26-40]	0.33
Basal total cholesterol (mg/dL) ^c	153	243[184-308]	46	205[173-299]	11	320[281-470]	<0.01
Total cholesterol 6 months (mg/dL) ^c	116	214[179-262]	37	235[173-337]	9	248[166-294]	0.78
Total cholesterol 12 months (mg/dL) ^c	118	190[157-243]	41	184[158-211]	9	254[173-282]	0.20
Total cholesterol 5 years (mg/dL) ^c	69	192[147-243]	22	169[141-213]	2	239[228-251]	0.21
Basal albumina (g/dL) ^c	171	3[2-3.6]	54	3.2[2-4]	14	2.5[1.7-3.4]	0.19
Albumin 6 months (g/dL) ^c	128	3.7[3.2-4]	41	3.6[3-4]	10	3.7[3-4]	0.50
Albumin 12 months (g/dL) ^c	132	3.8[3.3-4.2]	40	4[3.6-4.4]	6	3.4[3.3-4]	0.12
Albumin 5 years (g/dL) ^c	68	3.7[3.4-4.3]	19	3.8[3-4.4]	4	4.2[4-4.5]	0.14

RRT: Renal replacement therapy; GFR: Glomerular filtration rate; a:Chi-square test; b: ANOVA test; c:Kruskal-Wallis test.

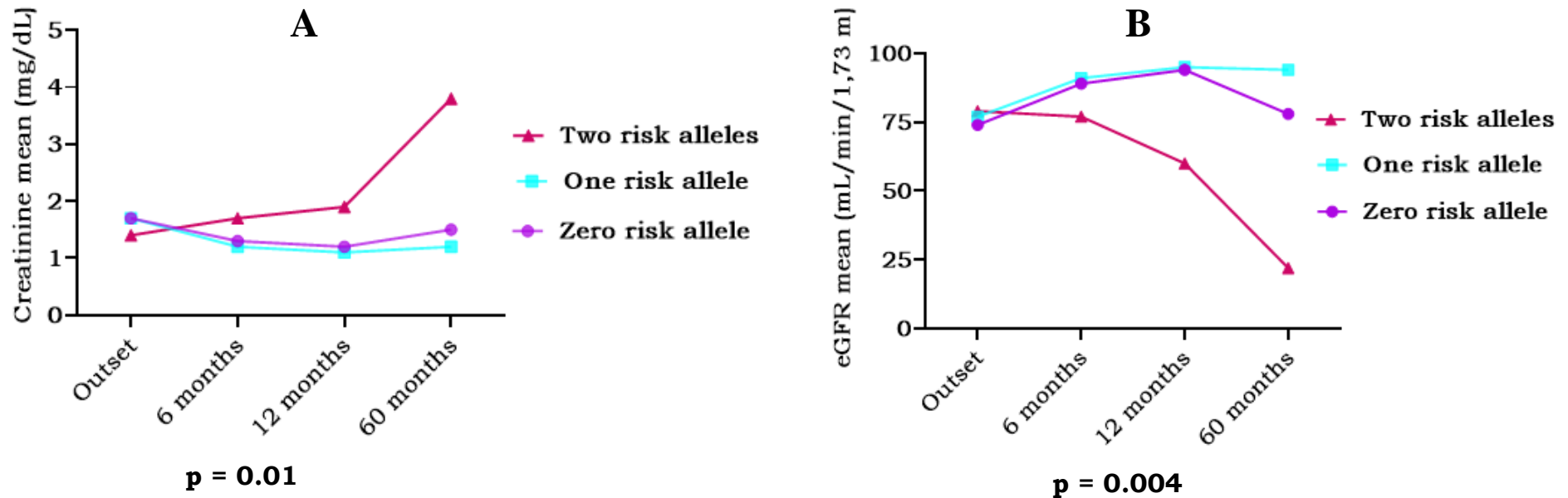


Figure 1: This figure shows the mean of creatinine and the estimated rate of glomerular filtration during the follow-up period. A: The creatinine mean increased from 1.4 ± 0.5 mg/dL at the time of biopsy to 3.8 ± 1.7 mg/dL, $p = 0.01$) in patients with *APOLI* risk allele, compared to those with one (from 1.7 ± 1.4 mg/dL to 1.2 ± 0.9 mg/dL), $p = 0.43$ or none (from 1.7 ± 1.6 mg/dL to 1.5 ± 1.3 mg/dL, $p = 0.41$) *APOLI* risk allele. B: The estimated glomerular filtration rate mean decreased from 79 ± 51 mL / min / 1.73 m^2 at the time of biopsy to 22 ± 13 mL / min / 1.73 m^2 , $p = 0.004$) in patients with *APOLI* risk allele, compared to those with one (from 77 ± 41 mL / min / 1.73 m^2 to 94 ± 54 mL / min / 1.73 m^2), $p = 0.74$ or none (from 74 ± 47 mL / min / 1.73 m^2 to 78 ± 45 mL / min / 1.73 m^2 , $p = 0.45$) *APOLI* risk allele. eGFR: Estimated glomerular filtration rate.

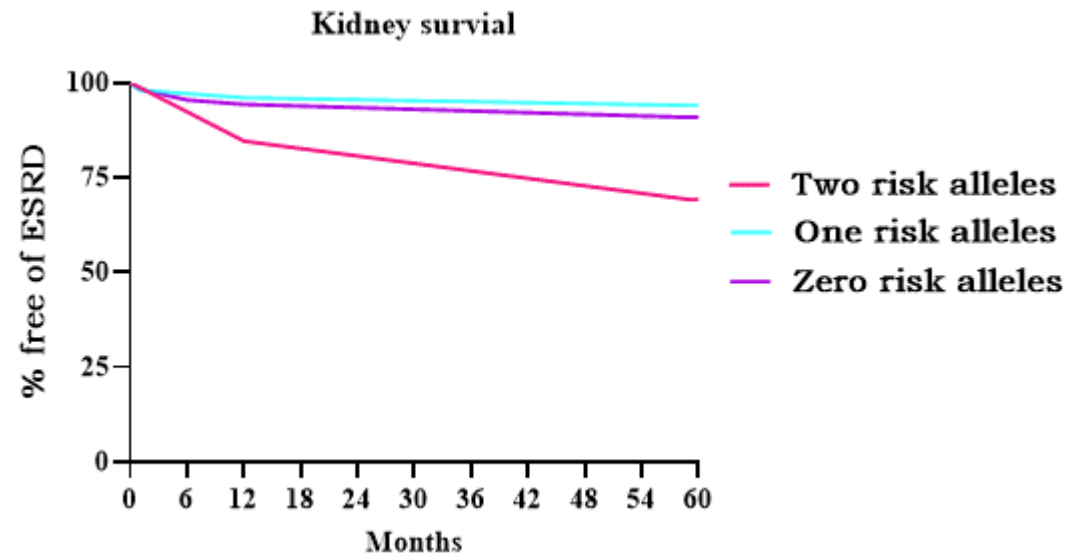


Figure 2: Kaplan-Meier renal survival curves for ESRD among patients with two and one or no *APOLI* risk alleles one renal replacement therapy. Overall kidney survival five years after renal biopsy was 69% in patients with two *APOLI* risk alleles, 94% in the group with one *APOLI* risk alleles and 91% among patients without *APOLI* risk alleles, respectively $p = 0.024$.

Table 6. Multivariate analysis of ESRD and hemoglobin status adjusting for arterial hypertension, diabetes mellitus, age and skin color,

Model	<i>APOLI</i>, Two versus Zero or One risk alleles OR (95% CI)	P Value
ESRD		
Unadjusted	4.8 (1.3-17.1)	0.01
Adjusted for arterial hypertension	4.6 (1.3-17)	0.02
Adjusted for arterial hypertension, diabetes mellitus, age and skin color	5.5 (1.4-21.3)	0.01

ESRD: End-stage renal disease.

Table 7. Influence of type of glomerular disease on end-stage renal disease, according to *APOL1* risk alleles status.

DIAGNOSIS	Two risk alleles (n= 13)		One risk alleles (n= 50)		Zero risk alleles (n= 175)		p*
	with ESRD	without ESRD	with ESRD	without ESRD	with ESRD	without ESRD	
Lupus Nephritis n(%)	0 (0%)	3 (100%)	2 (14%)	12 (86%)	7 (11%)	58 (89%)	0.89
Focal segmental glomerulosclerosis n(%)	2 (33%)	4 (67%)	0 (0%)	8 (100%)	1 (3%)	30 (97%)	0.02
Other diseases n(%)	0 (0%)	1(100%)	1 (4%)	26 (96%)	8 (11%)	65 (89%)	
Inconclusive*	2	1	0	1	0	6	
Total	4	9	3	47	16	159	

*: Chi-square test; ESRD: End-stage renal disease

Discussion

The present study evaluated the progression of chronic kidney disease and the rates of end stage renal disease among patients subjected to renal biopsies for diagnosis of glomerular disease, with or without *APOLI* risk variants in a five years study.

The decline in the glomerular filtration rate was more rapid among patients who had two *APOLI* risk alleles than among patients with one or no *APOLI* risk alleles, and proportionally with increased creatinine value in these patients. The proportion of patients with two risk alleles who had a 50% or 100% increase in creatinine value after six months of biopsy up to five years is considerably higher than in groups with one or no risk allele. In these same patients the progressive increase in creatinine after six months to five years and the faster decline in the estimated glomerular filtration rate indicates that the high risk genotype of *APOLI* is associated with progression of end-stage renal disease in the study population. Similar results were reported by Parsa and colleagues (2013) in black American with chronic kidney disease attributed to hypertension were patients in the *APOLI* high-risk group had a more rapid decline in the eGFR among those with diabetes and those without diabetes (21).

The risk of ESRD, defined as chronic dialysis was significantly higher among subjects with two *APOLI* risk alleles, with an Odd Ratio = 4.8 in the unadjusted model. This degree of risk for ESRD is similar to that conferred by sickle cell trait (OR = 5.3) in the cohort. This risk is higher than observed in studies conducted by Parsa and colleagues (2013), in African American with chronic kidney disease attributed to hypertension with two risk alleles that progressed to end-stage renal disease compared to those with lower risk genotype, and Foster et al 2013 in African Americans who did not have CKD at baseline (21,27).

In this cohort, arterial hypertension was significantly associated with ESRD with an Odd Ratio = 3 in the unadjusted model. In the presence of other factors such as diabetes mellitus, age, gender, skin color, education level and income that were not associated with ESRD, hypertension has lost its effect while *APOLI* remains significantly associated with ESRD with an Odd Ratio = 8.9. In addition, we show that renal survival is significantly lower for individuals carrying two *APOLI* risk alleles.

The proportion of patients diagnosed with FSGS who progressed to ESRD was significantly higher in individuals with two *APOLI* risk alleles. We also observed that

50% (8/16) of patients with two *APOL1* risk alleles submitted to renal biopsy have the diagnosis of FSGS. These findings prove that *APOL1* high-risk genotypes (G1G1, G1G2 or G2G2) confer a strong predisposition to the development of kidney disease and also cause particularly aggressive renal disease phenotypes that can progress rapidly to terminal stage. In a previous study conducted with the same participants, we observed that chronicity markers such as global and/or segmental glomerulosclerosis, tubular atrophy, and renal tubulointerstitial fibrosis were more intense in patients with *APOL1* high-risk genotypes.

Other studies have shown that individuals with two risk alleles, in addition to having a higher risk for FSGS and especially collapsing type, also have a higher risk for human immunodeficiency virus-associated nephropathy, for faster progression of kidney disease to end stage as hypertension-attributed ESRD and non-diabetic ESRD (18–23).

Despite the strong association between *APOL1* risk variants with CKD and ESRD, the mechanisms by which these risk variants lead to kidney disease and accelerate their progression to ESRD are not yet fully understood. Several mechanisms of cell damage induced by *APOL1* risk variants have been suggested, among others, impaired podocyte autophagy, impaired mitochondrial metabolism, and intracellular potassium depletion and subsequent signaling via stress-activated protein kinases (28–31). In addition to these mechanisms, there may be others by which *APOL1* risk variants lead to reduced podocyte density, which is a predisposing risk factor for glomerular disease, and ESRD due to total cumulative podocyte loss, increased glomerular filtration volume and cellular stress resulting from reduced podocyte density. Also, we show that patients with G1 or G2 homozygotes or compound heterozygotes (G1G2) are significantly younger. This result is similar to what was reported in African Americans undergoing renal biopsy published by Larsen and colleagues in 2015, in which patients with two *APOL1* risk alleles were younger than those who carried one or no risk alleles (32). In these patients *APOL1* proves to be a potential factor of progression because in addition to being younger than those with one or no risk allele, it was observed in the histological analysis of these patients that markers of renal chronicity are more intense.

Our study has limitations. The possibility of assessing potential interactions between *APOL1* risk variants and other genes potentially contributors for renal disease progression in Afrodescendent population was not feasible. For instance only one HbAS

patient had two *APOLI* risk alleles and no HbAC patients had two risk alleles. In Addition, we did not have data on genetic ancestry.

Conclusions

In summary, patients carrying two *APOLI* risk alleles are at an increased risk of progression faster to ESRD and the higher rates of ESRD. Two *APOLI* risk allele is a powerful contributor to risk for FSGS-associated ESRD. *APOLI* status was not significantly associated with death before a diagnosis of end-stage renal disease.

Acknowledgments:

We thank Drs. Fernanda Bacelar, Márcia Carneiro and Maurício Teixeira, as well as the Nephology staff of the Roberto Santos General Hospital and the Ana Nery Hospital for their support during sample and data collection. We thanks Elivani Sacramento de Jesus for technical help. We are also grateful to Bruno Valença and Patricia Luz for administrative support. We also would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

Conflict of Interest Statement: none

References

1. Okpechi IG, Ameh OI, Bello AK, Ronco P, Swanepoel CR, Kengne AP. Epidemiology of Histologically Proven Glomerulonephritis in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. Remuzzi G, organizador. PLoS ONE. 24 de março de 2016;11(3):e0152203.
2. Sesso R de CC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Watanabe Y, Santos DR dos. Chronic dialysis in Brazil - report of the Brazilian Dialysis Census, 2011. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 2012;34(3):272–7.
3. Alcalde PR, Kirsztajn GM. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. *J Bras Nefrol*. 4 de junho de 2018;40(2):122–9.
4. Thomé FS, Sesso RC, Lopes AA, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *J Bras Nefrol*. junho de 2019;41(2):208–14.
5. Choi AI, Rodriguez RA, Bacchetti P, Bertenthal D, Hernandez GT, O'Hare AM. White/Black Racial Differences in Risk of End-stage Renal Disease and Death. *The American Journal of Medicine*. julho de 2009;122(7):672–8.
6. Lipworth L, Mumma MT, Cavanaugh KL, Edwards TL, Ikizler TA, E.Tarone R, et al. Incidence and Predictors of End Stage Renal Disease among Low-Income Blacks and Whites. Singh SR, organizador. PLoS ONE. 24 de outubro de 2012;7(10):e48407.
7. Heneghan JF, Vantorpe DH, Shmukler BE, Giovinnazzo JA, Raper J, Friedman DJ, et al. BH3 domain-independent apolipoprotein L1 toxicity rescued by BCL2 prosurvival proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1º de setembro de 2015;309(5):C332–47.
8. Barreto SM, Ladeira RM, Duncan BB, Schmidt MI, Lopes AA, Benseñor IM, et al. Chronic kidney disease among adult participants of the ELSA-Brasil cohort: association with race and socioeconomic position. *J Epidemiol Community Health*. abril de 2016;70(4):380–9.
9. Ainsworth HC, Langefeld CD, Freedman BI. Genetic epidemiology in kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1º de abril de 2017;32(suppl_2):ii159–69.
10. George C, Yako YY, Okpechi IG, Matsha TE, Kaze Folefack FJ, Kengne AP. An African perspective on the genetic risk of chronic kidney disease: a systematic review. *BMC Med Genet*. dezembro de 2018;19(1):187.

11. Friedman DJ. Genes and environment in chronic kidney disease hotspots: Current Opinion in Nephrology and Hypertension. janeiro de 2019;28(1):87–96.
12. Kao WHL, Klag MJ, Meoni LA, Reich D, Berthier-Schaad Y, Li M, et al. MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. Nat Genet. outubro de 2008;40(10):1185–92.
13. 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. outubro de 2008;40(10):1175–84.
14. 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. 13 de agosto de 2010;329(5993):841–5.
15. O’Toole JF, Bruggeman LA, Madhavan S, Sedor JR. The Cell Biology of APOL1. Seminars in Nephrology. novembro de 2017;37(6):538–45.
16. Madhavan SM, O’Toole JF, Konieczkowski M, Ganesan S, Bruggeman LA, Sedor JR. APOL1 Localization in Normal Kidney and Nondiabetic Kidney Disease. JASN. novembro de 2011;22(11):2119–28.
17. 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 International. outubro de 2015;88(4):754–63.
18. 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. JASN. setembro de 2010;21(9):1422–6.
19. 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. JASN. novembro de 2011;22(11):2129–37.
20. Lipkowitz MS, Freedman BI, Langefeld CD, Comeau ME, Bowden DW, Linda Kao WH, et al. Apolipoprotein L1 gene variants associate with hypertension-attributed nephropathy and the rate of kidney function decline in African Americans. Kidney International. janeiro de 2013;83(1):114–20.

21. 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*. 5 de dezembro de 2013;369(23):2183–96.
22. 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. *JASN*. novembro de 2015;26(11):2882–90.
23. Chen TK, Tin A, Peralta CA, Appel LJ, Choi MJ, Lipkowitz MS, et al. APOL1 Risk Variants, Incident Proteinuria, and Subsequent eGFR Decline in Blacks with Hypertension-Attributed CKD. *CJASN*. 7 de novembro de 2017;12(11):1771–7.
24. Alladagbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, Brito JT, Oliveira GGS, Silva LK, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. *Lebensburger J*, organizador. *PLoS ONE*. 17 de dezembro de 2018;13(12):e0209036.
25. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. *Kidney International*. abril de 2018;93(4):789–96.
26. Churg, Jacob, Bernstein, Jay, Glassock, Richard J. *Renal disease : classification and atlas of glomerular diseases*. 2º ed. New York; 1995.
27. 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. *JASN*. setembro de 2013;24(9):1484–91.
28. Olabisi OA, Zhang J-Y, VerPlank L, Zahler N, DiBartolo S, Heneghan JF, et al. APOL1 kidney disease risk variants cause cytotoxicity by depleting cellular potassium and inducing stress-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 26 de janeiro de 2016;113(4):830–7.
29. Ma L, Chou JW, Snipes JA, Bharadwaj MS, Craddock AL, Cheng D, et al. APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. *JASN*. abril de 2017;28(4):1093–105.
30. Waitzman JS, Lin J. Ten years in: APOL1 reaches beyond the kidney. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. julho de 2019;28(4):375–82.

31. Ma L, Divers J, Freedman BI. Mechanisms of Injury in APOL1-associated Kidney Disease: Transplantation. março de 2019;103(3):487–92.
32. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Ambruzs JM, Cossey LN, Messias NC, et al. Histopathologic findings associated with APOL1 risk variants in chronic kidney disease. Mod Pathol. janeiro de 2015;28(1):95–102.

6. DISCUSSÃO

Esta tese apresenta três estudos sequenciais relativos aos polimorfismos de genes presentes em indivíduos afrodescendentes e que têm um papel na progressão de doenças renais. A relação entre os polimorfismos do gene *APOLI* e progressão de algumas doenças renais como GESF está agora bem sedimentado na literatura. Porém temos ainda muito pouco conhecimento sobre a distribuição dos haplótipos desse gene no Brasil. O Brasil é um país que difere dos demais lugares onde o gene *APOLI* tem sido estudado pela intensa miscigenação e variação em composição étnica nas diferentes regiões do país. Nós mostramos neste trabalho que o efeito deletério, sobre doenças renais apresenta uma correspondência com o que se tem relatado na literatura mundial, GESF emergindo como principal enfermidade renal afetada pela presença de haplótipos de risco do *APOLI*. No nosso estudo a presença, apenas um alelo de risco do *APOLI*, não correspondeu a um curso pior das doenças, como tem sido também relatado por vários autores. Contudo, são preciso outros estudos com amostras mais substanciais para que possamos examinar os efeitos da interação desses haplótipos de risco isolados com outros genes que também afetem negativamente o curso de doenças renais.

Em relação a HbS o nosso estudo traz informações que confirmam a associação dessa variante de hemoglobina com um curso mais severo de algumas enfermidades renais. Este assunto tem sido motivo de controvérsia na literatura. Um artigo recém publicado por Olaniram e colaboradores (2019) apresentou resultados semelhantes aos apresentados aqui, sobre a redução da taxa de filtração glomerular em pacientes com nefropatia e HbAS. Nosso trabalho avança em mostrar dados morfológicos sobre essa associação, os quais pretendemos aprofundar e um artigo em fase de redação.

É interessante notar que tanto em pacientes com de dois alelos de risco de *APOLI* ou com o traço falciforme os marcadores de cronicidade do rim como glomeruloesclerose global e / ou segmentar, fibrose túbulo-intersticial e atrofia tubular são os achados morfológicos diferenciais mais relevantes. Os marcadores teciduais de atividade não foram diferentes dos grupos de pacientes com hemoglobina ou *APOLI* normais.

Adicionalmente, foi reportado que nos pacientes com HbAS, há uma tendência de maior prevalência da NL. Não se sabe a incidência da NL em pacientes com doenças falciformes porque a maioria dos estudos publicados são relatos de casos. A semelhança nas manifestações clínicas e dados laboratoriais entre o lúpus eritematoso sistêmico e a doença falciforme pode

dificultar e atrasar o diagnóstico de lúpus nos pacientes com coexistência dos dois (MAAMAR et al., 2012; MINOCHA; RANA, 2013; ROBAZZI et al., 2015). Assim, o atraso no diagnóstico e no tratamento adequado pode levar a disfunção renal conhecida como NL que é uma das complicações mais comuns e graves nos pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico. A NL foi a nefropatia mais comum. Essa observação se explica pelo fato que a NL é uma doença que afeta predominantemente o sexo feminino e nesse trabalho a proporção de mulheres (62%) é mais alta do que os homens e dentro dos 109 casos identificados como NL, 96 (88%) eram mulheres com 10 vezes mais chances, $p < 0,0001$. Um trabalho realizado na Bahia por dos-Santos e colaboradores (2017) evidenciou uma tendência de queda na prevalência da GESF e de aumento dos casos de NL (DOS-SANTOS et al., 2017). Outros trabalhos realizados por Crensiglova e colaboradores em 2015 em uma região sul do Brasil e Costa et colaboradores em 2017 em Pernambuco mostraram a predominância da NL na amostra estudada (COSTA et al., 2017; CRENSIGLOVA et al., 2016). Nestes trabalhos com a NL como diagnóstico principal, o sexo feminino é mais prevalente

A elevada prevalência de síndrome nefrótica como a principal indicação de biópsia renal nos pacientes corrobora com a distribuição das nefropatias observada neste trabalho (COSTA et al., 2017; CRENSIGLOVA et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017; FERAZ et al., 2010; MAZZUCHI et al., 2005; OKPECHI et al., 2016).

No secundo manuscrito foi avaliada e discutida a associação do traço falciforme com a progressão das doenças glomerulares e a sobrevida renal. Também foi observada que a proporção dos pacientes com a taxa de filtração glomerular estimada inferior a $60 \text{ mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ foi maior nos portadores de HbAS em comparação aos do grupo HbAA, $p=0,01$. A mesma observação foi feita nos pacientes portadores de hipertensão arterial, $p=0,007$.

Os pacientes portadores de HbAC, apesar de apresentar uma proporção de atrofia tubular, mas intensa do que pacientes com hemoglobina AA, não foi observada um risco maior de DRET nem a diminuição da sobrevida dos rins nesses pacientes. Estudos realizados por Derebail et al (2010) e Alladagbin et al (2018) evidenciaram uma frequência significativamente maior do traço C da hemoglobina nos pacientes em hemodiálise do que na população geral (ALLADAGBIN et al., 2018; DEREBAIL et al., 2010). No presente estudo os pacientes foram acompanhados durante um período de cinco anos e talvez esse tempo fosse menor e é necessário estender o período de acompanhamento para investigar se realmente a HbAC contribui para a

progressão da doença renal em pacientes com doenças glomerulares desde que as lesões renais nos portadores da HbAC são menos comuns e ocorrem mais tardiamente.

7 CONCLUSÕES

1. A idade de diagnóstico da doença renal nos pacientes com o genótipo de alto risco do *APOLI* é menor que nos pacientes com um ou sem alelo de risco;
2. Pacientes com genótipo de alto risco do *APOLI* desenvolvem uma forma mais grave da glomeruloesclerose segmentar e focal com evidências histológicas de prognóstico pior e progressão mais rápida para estágio terminal da doença;
3. O genótipo de alto risco do *APOLI* está fortemente associado com o declínio progressivo e mais rápido da taxa estimada de filtração glomerular, bem com a taxa mais alta de doença renal em estágio terminal;
4. A concentração sérica do colesterol total é mais alta no grupo dos pacientes com genótipo de alto risco, entretanto, o risco de doenças cardiovasculares não foi avaliado no presente estudo;
5. Os pacientes com HbAS apresentam atrofia tubular mais intensa que os pacientes com genótipo normal;
6. HbAS está associado com o declínio mais rápido da taxa de filtração glomerular, o risco aumentado de doença renal em estágio terminal e a menor sobrevida renal em comparação a HbAA;
7. As frequências do haplótipo G1 de *APOLI*, HbAS e HbAC não diferem entre os pacientes submetidos a biópsia renal e a população geral.

REFERÊNCIAS

- ADEYEMO, T. A. *et al.* Health related quality of life and perception of stigmatisation in adolescents living with sickle cell disease in Nigeria: A cross sectional study: HRQoL of Nigerian Adolescents. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 7, p. 1245–1251, jul. 2015.
- ADORNO, E. V. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 1, p. 292–298, fev. 2005.
- AINSWORTH, H. C.; LANGEFELD, C. D.; FREEDMAN, B. I. Genetic epidemiology in kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. suppl_2, p. ii159–ii169, 1 abr. 2017.
- AKINBODEWA, A.A. *et al.* Study of association between sickle cell trait and renal dysfunction among young adults in South-west Nigeria. v. 22, n. 2, p. 201–207, 2019.
- ALCALDE, P. R.; KIRSZTAJN, G. M. Expenses of the Brazilian Public Healthcare System with chronic kidney disease. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, n. 2, p. 122–129, 4 jun. 2018.
- ALLADAGBIN, D. J. *et al.* The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0209036, 17 dez. 2018.
- ALVAREZ, O. *et al.* Renal medullary carcinoma and sickle cell trait: A systematic review: Renal Medullary Carcinoma. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 62, n. 10, p. 1694–1699, out. 2015.
- ANIGILAJE, E. A.; OLUTOLA, A. Prospects of genetic testing for steroid-resistant nephrotic syndrome in Nigerian children: a narrative review of challenges and opportunities. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 12, p. 119–136, 2019.
- ANSARI, J.; GAVINS, F. N. E. Ischemia-Reperfusion Injury in Sickle Cell Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 4, p. 706–718, abr. 2019.
- ANYAEGBU, E. I. *et al.* Clinical phenotype of APOL1 nephropathy in young relatives of patients with end-stage renal disease. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 6, p. 983–989, jun. 2015.

ARAÚJO, M. C. P. E. DE *et al.* Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 1, p. 123–128, fev. 2004.

ARAÚJO, S. DE A. *et al.* First report of collapsing variant of focal segmental glomerulosclerosis triggered by arbovirus: dengue and Zika virus infection. **Clinical Kidney Journal**, v. 12, n. 3, p. 355–361, 1 jun. 2019.

ARDUINI, G. A. O.; RODRIGUES, L. P.; TROVÓ DE MARQUI, A. B. Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 39, n. 1, p. 52–56, jan. 2017.

AVRAMOVIC, M.; STEFANOVIC, V. Health-related quality of life in different stages of renal failure: HRQoL in patients with renal failure. **Artificial Organs**, v. 36, n. 7, p. 581–589, jul. 2012.

BADEJO, O. *et al.* Outcome of cranial surgery in Nigerian patients with hemoglobinopathies: A retrospective study. **Surgical Neurology International**, v. 10, n. 1, p. 16, 2019.

BARBOUR, S. *et al.* The BC Glomerulonephritis network: improving access and reducing the cost of immunosuppressive treatments for glomerular diseases. **Canadian Journal of Kidney Health and Disease**, v. 5, p. 205435811875955, jan. 2018.

BARRERA-HERRERA, L. E. *et al.* The spectrum of glomerular disease between the years 2003 and 2015 in Columbia: A review of 12,613 cases. **Revista Española de Patología**, v. 50, n. 1, p. 3–7, jan. 2017.

BARRETO, S. M. *et al.* Chronic kidney disease among adult participants of the ELSA-Brasil cohort: association with race and socioeconomic position. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 70, n. 4, p. 380–389, abr. 2016.

BEHAR, D. M. *et al.* Absence of APOL1 Risk Variants Protects against HIV-Associated Nephropathy in the Ethiopian Population. **American Journal of Nephrology**, v. 34, n. 5, p. 452–459, 2011.

BISSONNETTE, M. L. Z. *et al.* Medullary microvascular thrombosis and injury in sickle hemoglobin C Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 5, p. 1300–1304, maio 2016.

BOYER, O. *et al.* Mutational analysis of the PLCE1 gene in steroid resistant nephrotic syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 47, n. 7, p. 445–452, 1 jul. 2010.

BRIGANTI, E. M. *et al.* The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 16, n. 7, p. 1364–1367, 1 jul. 2001.

BRINGAS, M. *et al.* Tertiary and quaternary structural basis of oxygen affinity in human hemoglobin as revealed by multiscale simulations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10926, dez. 2017.

BRUGGEMAN, L. A.; O'TOOLE, J. F.; SEDOR, J. R. Identifying the Intracellular Function of APOL1. **Journal of the American Society of Nephrology: JASN**, v. 28, n. 4, p. 1008–1011, 2017.

BUKAR, A. A. *et al.* Chronic kidney disease amongst sickle cell anaemia patient at the University of Maiduguri Teaching Hospital, North Eastern Nigeria: A study of prevalence and risk factors. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2019.

CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, set. 2007.

CARLOS, A. M. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns in the southern region of the Triângulo Mineiro, Brazil. Cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, n. 5, p. 439–444, out. 2015.

CHEN, T. K. *et al.* APOL1 Risk Variants, Incident Proteinuria, and Subsequent eGFR Decline in Blacks with Hypertension-Attributed CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 11, p. 1771–1777, 7 nov. 2017.

CHIANG, C.-K.; INAGI, R. Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics. **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 9, p. 539–554, set. 2010.

CHIU, H.-F. *et al.* Distribution of glomerular diseases in Taiwan: preliminary report of National Renal Biopsy Registry—publication on behalf of Taiwan Society of Nephrology. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 6, dez. 2018.

CHOI, A. I. *et al.* White/black racial differences in risk of end-stage renal disease and death. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 7, p. 672–678, jul. 2009.

CHOI, H. S. *et al.* The risk of end-stage renal disease in systemic lupus erythematosus: A nationwide population-based study in Korea. **Medicine**, v. 98, n. 28, p. e16420, jul. 2019.

CONRAN, N.; BELCHER, J. D. Inflammation in sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 263–299, 28 mar. 2018.

COOPER, A. *et al.* APOL1 renal risk variants have contrasting resistance and susceptibility associations with African trypanosomiasis. **eLife**, v. 6, p. e25461, 24 maio 2017.

COSTA, D. M. DO N. *et al.* Comparative analysis of primary and secondary glomerulopathies in the northeast of Brazil: data from the Pernambuco Registry of Glomerulopathies - REPEG. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 1, p. 29–35, mar. 2017.

CRENSIGLOVA, C. *et al.* Frequency and clinical histological analysis of glomerular diseases in a tertiary hospital in southern Brazil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, 2016.

CUYPERS, B. *et al.* Apolipoprotein L1 Variant Associated with Increased Susceptibility to Trypanosome Infection. **mBio**, v. 7, n. 2, p. e02198-15, /mbio/7/2/e02198-15.atom, 4 maio 2016.

DALIBALTA, S. *et al.* Novel permeability characteristics of red blood cells from sickle cell patients heterozygous for HbS and HbC (HbSC genotype). **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 45, n. 1, p. 46–52, jun. 2010.

DAVID, A. N. *et al.* Prevalence and impact of sickle cell trait on the clinical and laboratory parameters of HIV infected children in Lagos, Nigeria. **The Pan African Medical Journal**, v. 31, p. 113, 2018.

DE CASTRO LOBO, C. L. *et al.* Newborn screening program for hemoglobinopathies in Rio de Janeiro, Brazil: Hemoglobinopathy Newborn Screening in Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 61, n. 1, p. 34–39, jan. 2014.

DEREBAIL, V. K. *et al.* High prevalence of sickle cell trait in african americans with ESRD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 3, p. 413–417, mar. 2010.

DEREBAIL, V. K. *et al.* Progressive decline in estimated gfr in patients with sickle cell disease: an observational cohort study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 74, n. 1, p. 47–55, jul. 2019.

DIENEMANN, T. *et al.* International network of chronic kidney disease cohort studies (iNET-CKD): a global network of chronic kidney disease cohorts. **BMC Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 121, dez. 2016.

DIEPSTRATEN, S. T.; HART, A. H. Modelling human haemoglobin switching. **Blood Reviews**, v. 33, p. 11–23, jan. 2019.

DINIZ, D. *et al.* Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 188–194, jan. 2009.

DOS-SANTOS, W. L. C. *et al.* Current distribution pattern of biopsy-proven glomerular disease in Salvador, Brazil, 40 years after an initial assessment. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 4, 2017.

DOSHI, M. D. *et al.* APOL1 genotype and renal function of black living donors. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 4, p. 1309–1316, abr. 2018.

DUMMER, P. D. *et al.* APOL1 Kidney disease risk variants: an evolving landscape. **Seminars in Nephrology**, v. 35, n. 3, p. 222–236, maio 2015.

EL ARISS, A. B. *et al.* Prevalence of sickle cell trait in the Southern Suburbs of Beirut, Lebanon. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 8, p. 2016015, 20 fev. 2016.

ELFICKI, Y. *et al.* Coexistence of lupus nephritis and sickle cell trait, an electron microscopic assessment of renal glomerular damage: Case report of a rare association. **Electronic Physician**, v. 9, n. 9, p. 5298–5302, 25 set. 2017.

ELLER, R.; DA SILVA, D. B. Evaluation of a neonatal screening program for sickle-cell disease. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 4, p. 409–413, jul. 2016.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 7, p. 656–665, 17 fev. 2011.

FERRAZ, F. H. R. P. *et al.* Perfil das doenças glomerulares em um hospital público do Distrito Federal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 32, n. 3, p. 249–256, set. 2010.

FIORENTINO, M. *et al.* Renal Biopsy in 2015 - From Epidemiology to Evidence-Based Indications. **American Journal of Nephrology**, v. 43, n. 1, p. 1–19, 2016.

FITZHUGH, C. *et al.* Cardiopulmonary complications leading to premature deaths in adult patients with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, p. NA-NA, 2009.

FOLSOM, A. R. *et al.* Prospective study of sickle cell trait and venous thromboembolism incidence. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 1, p. 2–9, jan. 2015.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 2, p. a011684–a011684, 1 fev. 2013.

FOSTER, M. C. *et al.* APOL1 Variants associate with increased risk of CKD among African Americans. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 9, p. 1484–1491, set. 2013.

FREEDMAN, B. I. *et al.* The Apolipoprotein L1 (APOL1) Gene and Nondiabetic Nephropathy in African Americans. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 9, p. 1422–1426, set. 2010.

FREEDMAN, B. I. *et al.* End-stage renal disease in African Americans with lupus nephritis is associated with APOL1. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 66, n. 2, p. 390–396, fev. 2014.

FREEDMAN, B. I. *et al.* Apolipoprotein L1 gene variants in deceased organ donors are associated with renal allograft failure: *APOL1* in kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 6, p. 1615–1622, jun. 2015.

FREEDMAN, B. I. *et al.* APOL1 Genotype and kidney transplantation outcomes from deceased African American Donors. **Transplantation**, v. 100, n. 1, p. 194–202, jan. 2016.

FREITAS, S. L. F. DE *et al.* Quality of life in adults with sickle cell disease: an integrative review of the literature. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, n. 1, p. 195–205, fev. 2018.

FRIEDMAN, D. J. Genes and environment in chronic kidney disease hotspots: **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 28, n. 1, p. 87–96, jan. 2019.

FRIEDMAN, D. J.; POLLAK, M. R. Apolipoprotein L1 and Kidney Disease in African Americans. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 204–215, abr. 2016.

GALADANCI, A. A.; DEBAUN, M. R.; GALADANCI, N. A. Neurologic complications in children under five years with sickle cell disease. **Neuroscience Letters**, v. 706, p. 201–206, jul. 2019.

GARAU, M. *et al.* Temporal trends in biopsy proven glomerular disease in Uruguay, 1990-2014. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0206637, 29 out. 2018.

GENOVESE, G. *et al.* Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 841–845, 13 ago. 2010.

GEORGE, C. *et al.* An African perspective on the genetic risk of chronic kidney disease: a systematic review. **BMC Medical Genetics**, v. 19, n. 1, p. 187, dez. 2018.

GHANSAH, A. *et al.* Haplotype Analyses of Haemoglobin C and Haemoglobin S and the dynamics of the evolutionary response to malaria in Kassena-Nankana District of Ghana. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34565, 10 abr. 2012.

GILBERT, SCOTT J. *et al.* **National Kidney Foundation's primer on kidney diseases**. 6. ed. Philadelphia, PA: [s.n.].

GOLAY, V. *et al.* The spectrum of glomerular diseases in a single center: A clinicopathological correlation. **Indian Journal of Nephrology**, v. 23, n. 3, p. 168, 2013.

GRAMS, M. E. *et al.* Race, APOL1 Risk, and eGFR Decline in the General Population. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 9, p. 2842–2850, set. 2016.

GUARAGNA, M. S. *et al.* NPHS1 gene mutations confirm congenital nephrotic syndrome in four Brazilian cases: A novel mutation is described: Congenital nephrotic syndrome and NPHS1 gene mutations. **Nephrology**, v. 21, n. 9, p. 753–757, set. 2016.

GUASCH, A. *et al.* Glomerular Involvement in Adults with Sickle Cell Hemoglobinopathies: Prevalence and Clinical Correlates of Progressive Renal Failure. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 8, p. 2228–2235, ago. 2006.

GUTIÉRREZ, O. M. *et al.* APOL1 Nephropathy Risk Variants and Incident Cardiovascular Disease Events in Community-Dwelling Black Adults. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, v. 11, n. 6, jun. 2018.

HARRISON, S. E.; WALCOTT, C. M.; WARNER, T. D. Knowledge and Awareness of Sickle Cell Trait Among Young African American Adults. **Western Journal of Nursing Research**, v. 39, n. 9, p. 1222–1239, set. 2017.

HELMS, C.; KIM-SHAPIRO, D. B. Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 464–472, ago. 2013.

HENEGHAN, J. F. *et al.* BH3 domain-independent apolipoprotein L1 toxicity rescued by BCL2 prosurvival proteins. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 309, n. 5, p. C332–C347, 1 set. 2015.

HU, C.-A. A.; KLOPFER, E. I.; RAY, P. E. Human apolipoprotein L1 (ApoL1) in cancer and chronic kidney disease. **FEBS Letters**, v. 586, n. 7, p. 947–955, 5 abr. 2012.

ITO, K. *et al.* Increased Burden of Cardiovascular Disease in Carriers of *APOL1* Genetic Variants. **Circulation Research**, v. 114, n. 5, p. 845–850, 28 fev. 2014.

JEGATHEESAN, D. *et al.* Epidemiology of biopsy-proven glomerulonephritis in Queensland adults: Glomerulonephritis in Queensland. **Nephrology**, v. 21, n. 1, p. 28–34, jan. 2016.

JOSHI, S. *et al.* Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing. **Acta Paediatrica**, v. 102, n. 9, p. 844–856, set. 2013.

KANJI, Z. *et al.* Genetic Variation in APOL1 Associates with Younger Age at Hemodialysis Initiation. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 2091–2097, nov. 2011.

KAO, W. H. L. *et al.* MYH9 is associated with nondiabetic end-stage renal disease in African Americans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 10, p. 1185–1192, out. 2008.

KASEMBELI, A. N. *et al.* APOL1 Risk Variants Are Strongly Associated with HIV-Associated Nephropathy in Black South Africans. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 11, p. 2882–2890, nov. 2015.

KATO, G. J.; STEINBERG, M. H.; GLADWIN, M. T. Intravascular hemolysis and the pathophysiology of sickle cell disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 750–760, 1 mar. 2017.

KEY, N. S.; DEREBAIL, V. K. Sickle-Cell Trait: Novel Clinical Significance. **Hematology**, v. 2010, n. 1, p. 418–422, 4 dez. 2010.

KOPP, J. B. *et al.* MYH9 is a major-effect risk gene for focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Genetics**, v. 40, n. 10, p. 1175–1184, out. 2008.

KOPP, J. B. *et al.* APOL1 Genetic Variants in Focal Segmental Glomerulosclerosis and HIV-Associated Nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 2129–2137, nov. 2011.

KOPP, J. B. *et al.* Clinical Features and Histology of Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy in the FSGS Clinical Trial. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 6, p. 1443–1448, jun. 2015.

KOTILA, T. R. Sickle Cell Trait: A Benign State? **Acta Haematologica**, v. 136, n. 3, p. 147–151, 2016.

KREUELS, B. *et al.* Differing effects of HbS and HbC traits on uncomplicated falciparum malaria, anemia, and child growth. **Blood**, v. 115, n. 22, p. 4551–4558, 3 jun. 2010.

KRUZEL-DAVILA, E.; WASSER, W. G.; SKORECKI, K. APOL1 Nephropathy: A Population Genetics and Evolutionary Medicine Detective Story. **Seminars in Nephrology**, v. 37, n. 6, p. 490–507, nov. 2017.

KUMAR, V. *et al.* Role of Apolipoprotein L1 in Human Parietal Epithelial Cell Transition. **The American Journal of Pathology**, v. 188, n. 11, p. 2508–2528, nov. 2018.

KUO, C.-C. *et al.* Haemodialysis and the risk of stroke: A population-based cohort study in Taiwan, a country of high incidence of end-stage renal disease: Haemodialysis and the risk of stroke. **Nephrology**, v. 17, n. 3, p. 243–248, mar. 2012.

- LARSEN, C. P. *et al.* Histopathologic findings associated with APOL1 risk variants in chronic kidney disease. **Modern Pathology**, v. 28, n. 1, p. 95–102, jan. 2015.
- LECORDIER, L. *et al.* C-Terminal Mutants of Apolipoprotein L-I Efficiently Kill Both *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 12, p. e1000685, 4 dez. 2009.
- LEE, Y. K. *et al.* Recent progress in laboratory diagnosis of thalassemia and hemoglobinopathy: a study by the Korean Red Blood Cell Disorder Working Party of the Korean Society of Hematology. **Blood Research**, v. 54, n. 1, p. 17, 2019.
- LIMOU, S. *et al.* APOL1 Kidney Risk Alleles: Population Genetics and Disease Associations. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 21, n. 5, p. 426–433, set. 2014.
- LIMOU, S. *et al.* APOL1 toxin, innate immunity, and kidney injury. **Kidney International**, v. 88, n. 1, p. 28–34, jul. 2015.
- LINS, T. C. *et al.* Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, p. NA-NA, 2009.
- LIPKOWITZ, M. S. *et al.* Apolipoprotein L1 gene variants associate with hypertension-attributed nephropathy and the rate of kidney function decline in African Americans. **Kidney International**, v. 83, n. 1, p. 114–120, jan. 2013.
- LIPWORTH, L. *et al.* Incidence and Predictors of End Stage Renal Disease among Low-Income Blacks and Whites. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e48407, 24 out. 2012.
- LIU, Y. C.; CHUN, J. Prospects for Precision Medicine in Glomerulonephritis Treatment. **Canadian Journal of Kidney Health and Disease**, v. 5, p. 205435811775361, jan. 2018.
- LIU, Z.-H. Nephrology in China. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 9, p. 523–528, set. 2013.
- LIYANAGE, T. *et al.* Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. **The Lancet**, v. 385, n. 9981, p. 1975–1982, maio 2015.
- LOVRIC, S. *et al.* Genetic testing in steroid-resistant nephrotic syndrome: when and how? **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 11, p. 1802–1813, nov. 2016.

M. MADHAVAN, S.; O'TOOLE, J. F. The biology of APOL1 with insights into the association between APOL1 variants and chronic kidney disease. **Clinical and Experimental Nephrology**, 15 nov. 2013.

MA, L. *et al.* APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 4, p. 1093–1105, abr. 2017.

MA, L.; DIVERS, J.; FREEDMAN, B. I. Mechanisms of Injury in APOL1-associated Kidney Disease: **Transplantation**, v. 103, n. 3, p. 487–492, mar. 2019.

MAAMAR, M. *et al.* Systemic lupus erythematosus associated with sickle-cell disease: a case report and literature review. **Journal of Medical Case Reports**, v. 6, n. 1, p. 366, dez. 2012.

MACHARIA, A. W. *et al.* The clinical epidemiology of sickle cell anemia In Africa. **American Journal of Hematology**, v. 93, n. 3, p. 363–370, mar. 2018.

MADHAVAN, S. M. *et al.* APOL1 Localization in Normal Kidney and Nondiabetic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 2119–2128, nov. 2011.

MAIGNE, G. *et al.* Glomerular Lesions in Patients With Sickle Cell Disease: **Medicine**, v. 89, n. 1, p. 18–27, jan. 2010.

MAISONNEUVE, P. *et al.* Distribution of primary renal diseases leading to end-stage renal failure in the United States, Europe, and Australia/New Zealand: Results from an international comparative study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 35, n. 1, p. 157–165, jan. 2000.

MAIXNEROVA, D. *et al.* Nationwide biopsy survey of renal diseases in the Czech Republic during the years 1994–2011. **Journal of Nephrology**, v. 28, n. 1, p. 39–49, fev. 2015.

MAKANI, J.; WILLIAMS, T. N.; MARSH, K. Sickle cell disease in Africa: burden and research priorities. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 3–14, jan. 2007.

MALAFRONTI, P. *et al.* Paulista registry of glomerulonephritis: 5-year data report. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 11, p. 3098–3105, 12 set. 2006.

MAZZUCHI, N. *et al.* [Frequency of diagnosis and clinic presentation of glomerulopathies in Uruguay]. **Nefrologia: Publicacion Oficial De La Sociedad Espanola Nefrologia**, v. 25, n. 2, p. 113–120, 2005.

MCGANN, P. T. *et al.* Prevalence of inherited blood disorders and associations with malaria and anemia in Malawian children. **Blood Advances**, v. 2, n. 21, p. 3035–3044, 13 nov. 2018.

MINOCHA, V.; RANA, F. Lupus Nephritis in a Patient with Sickle Cell Disease. **Case Reports in Hematology**, v. 2013, p. 1–4, 2013.

MITTAL, P. *et al.* Spectrum of biopsy-proven renal disease in northern India: A single-centre study. **Nephrology**, v. 25, n. 1, p. 55–62, jan. 2020.

MODELL, B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 2008, n. 6, p. 480–487, 1 jun. 2008.

MUKENDI, K. *et al.* Sickle cell trait is not associated with chronic kidney disease in adult Congolese patients: a clinic-based, cross-sectional study: cardiovascular topic. **Cardiovascular Journal Of Africa**, v. 26, n. 3, p. 125–129, 29 jun. 2015.

NAGAI, M. *et al.* A role of heme side-chains of human hemoglobin in its function revealed by circular dichroism and resonance Raman spectroscopy. **Biophysical Reviews**, v. 10, n. 2, p. 271–284, abr. 2018.

NAGEL, R. L.; FABRY, M. E.; STEINBERG, M. H. The paradox of hemoglobin SC disease. **Blood Reviews**, v. 17, n. 3, p. 167–178, set. 2003.

NAIK, R. P. *et al.* Association of Sickle Cell Trait With Chronic Kidney Disease and Albuminuria in African Americans. **JAMA**, v. 312, n. 20, p. 2115, 26 nov. 2014.

NAIK, R. P. *et al.* Sickle Cell Trait and the Risk of ESRD in Blacks. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 7, p. 2180–2187, jul. 2017.

NAIK, R. P. *et al.* Clinical Outcomes Associated With Sickle Cell Trait: A Systematic Review. **Annals of Internal Medicine**, v. 169, n. 9, p. 619, 6 nov. 2018.

NAIK, R. P.; DEREBAIL, V. K. The spectrum of sickle hemoglobin-related nephropathy: from sickle cell disease to sickle trait. **Expert Review of Hematology**, v. 10, n. 12, p. 1087–1094, 2 dez. 2017.

NAIR, R.; WALKER, P. D. Is IgA nephropathy the commonest primary glomerulopathy among young adults in the USA? **Kidney International**, v. 69, n. 8, p. 1455–1458, abr. 2006.

NASR, S. H. *et al.* Sickle cell disease, nephrotic syndrome, and renal failure. **Kidney International**, v. 69, n. 7, p. 1276–1280, abr. 2006.

NATH, K. A.; FERVENZA, F. C. Disease Progression and End-Stage Renal Disease in Diverse Glomerulopathies. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 2, p. 133–135, fev. 2018.

NG, D. K. *et al.* APOL1-associated glomerular disease among African-American children: a collaboration of the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) and Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE) cohorts. **Nephrology Dialysis Transplantation**, p. gfw061, 27 abr. 2016.

OKPECHI, I. *et al.* Patterns of renal disease in Cape Town South Africa: a 10-year review of a single-centre renal biopsy database. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 6, p. 1853–1861, 1 jun. 2011.

OKPECHI, I. G. *et al.* Epidemiology of Histologically Proven Glomerulonephritis in Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0152203, 24 mar. 2016.

OLABISI, O. A. *et al.* APOL1 kidney disease risk variants cause cytotoxicity by depleting cellular potassium and inducing stress-activated protein kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 4, p. 830–837, 26 jan. 2016.

OLANIRAN, K. O. *et al.* Kidney Function Decline among Black Patients with Sickle Cell Trait and Sickle Cell Disease: An Observational Cohort Study. **Journal of the American Society of Nephrology**, p. ASN.2019050502, 6 dez. 2019.

O'SHAUGHNESSY, M. M. *et al.* Temporal and Demographic Trends in Glomerular Disease Epidemiology in the Southeastern United States, 1986–2015. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 4, p. 614–623, 3 abr. 2017.

PARSA, A. *et al.* APOL1 Risk Variants, Race, and Progression of Chronic Kidney Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 23, p. 2183–2196, 5 dez. 2013.

PECES, R. *et al.* [Co-inheritance of autosomal dominant polycystic kidney disease and sickle cell trait in African Americans. **Nefrología**, v. 31, n. 2, p. 162–168, mar. 2011.

PECKER, L. H.; SCHAEFER, B. A.; LUCHTMAN-JONES, L. Knowledge insufficient: the management of haemoglobin SC disease. **British Journal of Haematology**, v. 176, n. 4, p. 515–526, fev. 2017.

PIEL, F. B. *et al.* Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142–151, jan. 2013.

PIEL, F. B. *et al.* Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. **The Lancet Global Health**, v. 2, n. 2, p. e80–e89, fev. 2014.

PIEL, F. B. *et al.* Observed and expected frequencies of structural hemoglobin variants in newborn screening surveys in Africa and the Middle East: deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. **Genetics in Medicine**, v. 18, n. 3, p. 265–274, mar. 2016.

PIEL, F. B.; STEINBERG, M. H.; REES, D. C. Sickle Cell Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 16, p. 1561–1573, 20 abr. 2017.

POEHLING, K. A. *et al.* Sickle Cell Trait, Hemoglobin C Trait, and Invasive Pneumococcal Disease: **Epidemiology**, v. 21, n. 3, p. 340–346, maio 2010.

POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A. R.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9617 native kidney biopsies. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 490–496, 1 fev. 2010.

POLLAK, M. R.; GENOVESE, G.; FRIEDMAN, D. J. *APOLI* and kidney disease: **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 21, n. 2, p. 179–182, mar. 2012.

QUEIROZ, E. M. *et al.* Genetic composition of a Brazilian population: the footprint of the Gold Cycle. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 5124–5133, 2013.

QUINN, C. T. Minireview: Clinical severity in sickle cell disease: the challenges of definition and prognostication. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 7, p. 679–688, abr. 2016.

RAHIMI, Z. Genetic Epidemiology, Hematological and Clinical Features of Hemoglobinopathies in Iran. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

RIELLA, C. *et al.* APOL1-Associated Kidney Disease in Brazil. **Kidney International Reports**, v. 4, n. 7, p. 923–929, jul. 2019.

RIVERA, F.; LÓPEZ-GÓMEZ, J. M.; PÉREZ-GARCÍA, R. Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. **Kidney International**, v. 66, n. 3, p. 898–904, set. 2004.

ROBAZZI, T. C. M. V. *et al.* Coexistência de lúpus eritematoso sistêmico e doença falciforme: relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 1, p. 68–74, jan. 2015.

ROSENBERG, H. G. Primary glomerular diseases. **Pathology - Research and Practice**, v. 181, n. 5, p. 489–523, out. 1986.

RYCHLIK, I. *et al.* The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 19, n. 12, p. 3040–3049, 1 dez. 2004.

RYU, J.-H. *et al.* APOL1 renal risk variants promote cholesterol accumulation in tissues and cultured macrophages from APOL1 transgenic mice. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0211559, 18 abr. 2019.

SAMPSON, M. G. *et al.* Integrative Genomics Identifies Novel Associations with APOL1 Risk Genotypes in Black NEPTUNE Subjects. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 27, n. 3, p. 814–823, mar. 2016.

SANTIAGO, R. P. *et al.* Hemoglobin Variant Profiles among Brazilian Quilombola Communities. **Hemoglobin**, v. 41, n. 2, p. 83–88, 4 mar. 2017.

SARAF, S. L. *et al.* Progressive glomerular and tubular damage in sickle cell trait and sickle cell anemia mouse models. **Translational Research**, v. 197, p. 1–11, jul. 2018.

SASONGKO, T. H.; NAGALLA, S.; BALLAS, S. K. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors for proteinuria and microalbuminuria in people with sickle cell disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 4 jun. 2015.

SCHENA, F. P. Survey of the Italian Registry of Renal Biopsies. Frequency of the renal diseases for 7 consecutive years. The Italian Group of Renal Immunopathology. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 12, n. 3, p. 418–426, 1 mar. 1997.

SCHNOG, J. B. *et al.* Sickle cell disease; a general overview. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 62, n. 10, p. 364–374, nov. 2004.

SEN, E. S. *et al.* Clinical genetic testing using a custom-designed steroid-resistant nephrotic syndrome gene panel: analysis and recommendations. **Journal of Medical Genetics**, v. 54, n. 12, p. 795–804, dez. 2017.

SESSO, R. C. *et al.* Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, 2017.

SESSO, R. DE C. C. *et al.* Chronic dialysis in Brazil - report of the Brazilian Dialysis Census, 2011. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 272–277, 2012.

SHARMA, A. K. *et al.* Structural characterization of the C-terminal coiled-coil domains of wild-type and kidney disease-associated mutants of apolipoprotein L1. **The FEBS Journal**, v. 283, n. 10, p. 1846–1862, maio 2016.

SHARPE, C. C.; THEIN, S. L. How I treat renal complications in sickle cell disease. **Blood**, v. 123, n. 24, p. 3720–3726, 12 jun. 2014.

SILVA, C. DE A. *et al.* Triagem neonatal de hemoglobinopatias no município de São Carlos, São Paulo, Brasil: análise de uma série de casos. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 33, n. 1, p. 19–27, mar. 2015.

SILVA, W. *et al.* Screening for Structural Hemoglobin Variants in Bahia, Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 225, 18 fev. 2016.

SIM, J. J. *et al.* Distribution of Biopsy-Proven Presumed Primary Glomerulonephropathies in 2000-2011 Among a Racially and Ethnically Diverse US Population. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 68, n. 4, p. 533–544, out. 2016.

SIM, J. J. *et al.* End-Stage Renal Disease and Mortality Outcomes Across Different Glomerulonephropathies in a Large Diverse US Population. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 2, p. 167–178, fev. 2018.

SIMON, P. *et al.* Epidemiologic data of primary glomerular diseases in western France. **Kidney International**, v. 66, n. 3, p. 905–908, set. 2004.

SIPICZKI, T. *et al.* [The incidence of renal diseases as diagnosed by biopsy in Hungary]. **Orvosi Hetilap**, v. 145, n. 26, p. 1373–1379, 27 jun. 2004.

SOMMER, C. K. *et al.* Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 8, p. 1709–1714, ago. 2006.

SPENCER, J. D.; SANDERS, J. T.; AULT, B. H. Two cases of hematuria with hemoglobin C trait. **Pediatric Nephrology**, v. 24, n. 12, p. 2455–2457, dez. 2009.

SUGIYAMA, H. *et al.* Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 15, n. 4, p. 493–503, ago. 2011.

SUGIYAMA, H. *et al.* Japan Renal Biopsy Registry and Japan Kidney Disease Registry: Committee Report for 2009 and 2010. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 17, n. 2, p. 155–173, abr. 2013.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 14, n. 1, p. 263–292, 24 jan. 2019.

TELES, A. F. *et al.* Hemoglobinas de origem africana em comunidades quilombolas do estado do Tocantins, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 1, p. 39–46, abr. 2017.

THOMÉ, F. S. *et al.* Brazilian chronic dialysis survey 2017. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 41, n. 2, p. 208–214, jun. 2019.

THOMSON, R. *et al.* Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 20, p. E2130–E2139, 20 maio 2014.

TITA, A. T. N. *et al.* Perinatal and Maternal Outcomes in Women With Sickle or Hemoglobin C Trait: **Obstetrics & Gynecology**, v. 110, n. 5, p. 1113–1119, nov. 2007.

TSARAS, G. *et al.* Complications Associated with Sickle Cell Trait: A Brief Narrative Review. **The American Journal of Medicine**, v. 122, n. 6, p. 507–512, jun. 2009.

TZUR, S. *et al.* Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. **Human Genetics**, v. 128, n. 3, p. 345–350, set. 2010.

USMANI, A.; MACHADO, R. F. Vascular complications of sickle cell disease. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 68, n. 2–3, p. 205–221, 28 mar. 2018.

UZUREAU, P. *et al.* Mechanism of Trypanosoma brucei gambiense resistance to human serum. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 430–434, set. 2013.

VAJGEL, G. *et al.* A single APOL1 nephropathy variant increases risk of advanced lupus nephritis in Brazilians. **The Journal of Rheumatology**, p. jrheum.190684, 15 nov. 2019.

VAN EPS, L. W. S. *et al.* Nature of concentrating defect in sickle-cell nephropathy. **The Lancet**, v. 295, n. 7644, p. 450–452, fev. 1970.

VANHOLLEBEKE, B.; PAYS, E. The function of apolipoproteins L. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 17, p. 1937–1944, set. 2006.

VELASCO-RODRÍGUEZ, D. *et al.* Laboratory parameters provided by Advia 2120 analyser identify structural haemoglobinopathy carriers and discriminate between Hb S trait and Hb C trait. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 10, p. 912–920, out. 2016.

VIVAS, W. L. P. *et al.* Heterozigose para hemoglobinopatias em doadores de sangue do Centro de Hemoterapia de Sergipe. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 4, dez. 2006.

WAITZMAN, J. S.; LIN, J. Ten years in: APOL1 reaches beyond the kidney. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 28, n. 4, p. 375–382, jul. 2019.

WALLEN, G. R. *et al.* Sleep disturbance, depression and pain in adults with sickle cell disease. **BMC Psychiatry**, v. 14, n. 1, p. 207, dez. 2014.

- WARE, R. E. *et al.* Sickle cell disease. **The Lancet**, v. 390, n. 10091, p. 311–323, jul. 2017.
- WAREJKO, J. K. *et al.* Whole Exome Sequencing of Patients with Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 53–62, 6 jan. 2018.
- WEATHERALL, D. J. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 7, p. 592–599, nov. 2008.
- WEBSTER, A. C. *et al.* Chronic Kidney Disease. **The Lancet**, v. 389, n. 10075, p. 1238–1252, mar. 2017.
- WETMORE, J. B. *et al.* The incidence, prevalence, and outcomes of glomerulonephritis derived from a large retrospective analysis. **Kidney International**, v. 90, n. 4, p. 853–860, out. 2016.
- WOO, K.-T. *et al.* Global Evolutionary Trend of the Prevalence of Primary Glomerulonephritis over the Past Three Decades. **Nephron Clinical Practice**, v. 116, n. 4, p. c337–c346, 28 jul. 2010.
- XIE, L. *et al.* MRI tools for assessment of microstructure and nephron function of the kidney. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 311, n. 6, p. F1109–F1124, 1 dez. 2016.
- XU, X. *et al.* Analysis of 4931 renal biopsy data in central China from 1994 to 2014. **Renal Failure**, v. 38, n. 7, p. 1021–1030, 8 ago. 2016.
- YANG, Y. *et al.* The Spectrum of Biopsy-Proven Glomerular Disease in China: A Systematic Review. **Chinese Medical Journal**, v. 131, n. 6, p. 731–735, mar. 2018.
- ZHANG, X. *et al.* Analysis of pathological data of renal biopsy at one single center in China from 1987 to 2012. **Chinese Medical Journal**, v. 127, n. 9, p. 1715–1720, 2014.
- ZHOU, Q. *et al.* Changes in the diagnosis of glomerular diseases in east China: a 15-year renal biopsy study. **Renal Failure**, v. 40, n. 1, p. 657–664, 15 out. 2018.

APÊNDICES

RESULTADOS COMPLEMENTARES

A tabela 1 apresenta a frequência das nefropatias nos grupos HbAA, HbAS e HbAC e foi observada ligeira predominância da nefrite lúpica (57,14%) nos pacientes portadores de HbAS. Odds Ratio = 2,8 (95% CI = 0,9-8,2); p= 0,05.

Na tabela 2, observamos que 61,54% dos pacientes com alelos de alto risco (dois alelos de risco) têm o diagnóstico de glomeruloesclerose segmentar e focal em comparação à 18,55% dos pacientes com alelo de baixo risco (um ou nenhum alelo de risco) de *APOL1*. Odds Ratio = 7 (95% CI = 2,2-22,3); p= 0,0006.

Table 1. Distribution of nephropathies eases by statut hemoglobin variants

Nephropathy Diagnosis	HbAA (%)	HbAS (%)	HbAC (%)	OR (95% CI) HbAS versus HbAA	P Value
Lupus nephritis	97 (32.44)	8 (57.14)	4 (33.33)	2.8 (0.9-8.2)	0.05
Focal segmental glomerulosclerosis	63 (21.07)	1 (7.14)	2 (16.67)		NS
Membranous glomerulonephritis	33 (11.04)	1 (7.14)	2 (16.67)		NS
Minimal change disease	18 (6.02)	1 (7.14)	0 (00)		NS
Minor glomerular changes	15 (5.02)	1 (7.14)	0 (00)		NS
IgA Nephropathy	14 (4.68)	0 (00)	0 (00)		NS
Membranoproliferative glomerulonephritis	10 (3.34)	0 (00)	0 (00)		NS
Crescentic glomerulonephritis	9 (3.01)	0 (00)	0 (00)		NS
Mesangial proliferative glomerulonephritis	5 (1.67)	0 (00)	0 (00)		NS
Alport syndrome	5 (1.67)	0 (00)	0 (00)		NS
Diffuse proliferative glomerulonephritis	4 (1.34)	0 (00)	1 (8.33)		NS
Focal and segmental glomerulonephritis	3 (1.00)	0 (00)	1 (8.33)		NS

Sclerosing glomerulonephritis	2 (0.67)	0 (00)	00 (00)		NS
Others	21 (7.02)	2 (14.29)	2 (16.67)		NS

NS: not significant

Table 2. Distribution of **nephropathies** by statut *ApolI* risk allele

Histopathology Diagnosis	0 risk allele (%)	1 risk allele (%)	2 risk alleles (%)	OR (95% CI) 2 versus 0 and 1 risk alleles	P Value
Lupus nephritis	78 (35.14)	20 (28.99)	4 (30.77)		
Focal segmental glomerulosclerosis	40 (18.02)	14 (20.29)	8 (61.54)	7 (2.2-22.3)	0.0006
Membranous glomerulonephritis	22 (09.91)	11 (15.94)	0 (00)		NS
Minimal change disease	13 (5.86)	4 (5.80)	0 (00)		NS
IgA Nephropathy	13 (5.86)	0 (00)	1 (7.69)		NS
Minor glomerular changes	11 (4.95)	4 (5.80)	0 (00)		NS

Membranoproliferative glomerulonephritis	7 (3.15)	2 (2.90)	0 (00)		NS
Crescentic glomerulonephritis	6 (2.70)	3 (4.35)	0 (00)		NS
Diffuse proliferative glomerulonephritis	3 (1.35)	1 (1.45)	0 (00)		NS
Focal and segmental glomerulonephritis	3 (1.35)	1 (1.45)	0 (00)		NS
Sclerosing glomerulonephritis	2 (0.90)	0 (00)	0 (00)		NS
Mesangial proliferative glomerulonephritis	2 (0.90)	2 (2.90)	0 (00)		NS
Alport syndrome	2 (0.90)	3 (4.35)	0 (00)		NS
Others	20 (9.01)	4 (5.80)	0 (00)		NS

NS: not significant

TERMOS DE CONSENTIMENTO E DE ASSENTIMENTO



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (PACIENTES MAIORES DE IDADE)

Prezado (a) Senhor (a)

Você está sendo convidado para participar de um estudo sobre alterações do funcionamento dos rins. O nome do estudo é “TRAÇO FALCIFORME COMO POTENCIAL DETERMINANTE DA PROGRESSÃO DE DOENÇAS RENAIAS NA BAHIA”. Isso quer dizer que nós queremos ver se as pessoas que têm um problema nas células vermelhas do sangue pioram da doença renal. Essa alteração é que é chamada de traço falciforme ou traço da hemoglobina C, porque as pessoas que tem esse problema, apesar de poder viver uma vida saudável, quando tem desidratação ou alguma inflamação, as células do sangue podem ficar com o formato de uma foice, tendo dificuldade de caminhar nos vasos sanguíneos. Queremos ver se isso afeta o curso da doença renal. Queremos também investigar se você tem algumas mutações nos genes de apolipoproteína (APOL1) e da cadeia pesada da miosina não-muscular (MYH9) para ver se essas mutações afetam o curso da doença renal. O motivo de estarmos lhe convidando para o estudo é que, por indicação do seu médico assistente, você vai fazer ou já fez a biópsia renal, para o esclarecimento do diagnóstico de sua doença. Durante este estudo nós analisaremos a história de sua doença olhando para detalhes como idade, sexo, qual o diagnóstico na biópsia renal, a presença de Síndrome Nefrótica (que é o surgimento de inchaço com perda de muita proteína na urina), os exames realizados antes da biópsia e revisaremos as lâminas de sua biópsia e examinaremos se você tem o traço falciforme ou traço da hemoglobina C. Além disso, serão avaliados marcadores Informativos de Ancestralidade para confirmar a sua autodeclaração em relação à cor de pele e saber mais sobre as suas origens ancestrais. Para isso, você será solicitado a doar 5 ml (mais ou menos 1 colher de sopa) de sangue que será retirado da veia do braço, antebraço ou mão, onde for mais adequado. A coleta dessa quantidade de sangue, como você sabe, geralmente não traz problemas; há apenas o inconveniente da dor da punção e, raramente a formação de pequeno hematoma no local. O estudo não implicará em mudança na conduta do seu médico e nem vai interferir no seu diagnóstico ou no seu tratamento. O estudo deverá, contudo, alertar os médicos para a presença de traço falciforme ou traço da hemoglobina C em quem tiver, com benefício

para pessoa e também, caso fique comprovado de que isso afeta o curso da doença renal, ajudará os médicos a modificar o tratamento dessas pessoas levando em conta a alteração. Você não terá nenhum custo para participar deste estudo, nem receberá qualquer vantagem financeira. No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento, tais como transporte e alimentação

Todos os dados colhidos serão mantidos em sigilo e em nenhum momento seu nome será exposto em decorrência do estudo. Caso você não concorde em participar deste estudo, você não terá qualquer prejuízo por causa disso e continuará tendo o mesmo acompanhamento e tratamento. Após a realização dos exames descritos no projeto, as amostras serão autoclavadas e posteriormente descartadas conforme a resolução CNS 441/2011. Esse termo é feito em duas vias e uma delas será entregue a você se aceitar participar. Caso você queira ter outras informações sobre o estudo, você pode perguntar agora ou, se as questões surgirem no futuro entre em contato com o pesquisador responsável no endereço abaixo. Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos, o (a) senhor (a) poderá procurar o Comitê de Ética e Pesquisa nos contatos abaixo:

Aceito Participar do estudo	Digital
ASSINATURA:	
NOME	
DATA	

Dr Washington Luis Conrado dos Santos – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone (071) 31762262 / Fax: (071) 31762326.

Comitê de Ética e Pesquisa - Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone/Fax 71 31762285



Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (PACIENTES MENORES DE IDADE)

Prezado (a) Senhor (a)

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) para participar de um estudo sobre alterações do funcionamento dos rins. O nome do estudo é “TRAÇO FALCIFORME COMO POTENCIAL DETERMINANTE DA PROGRESSÃO DE DOENÇAS RENAIIS NA BAHIA”. Isso quer dizer que nós queremos ver se as pessoas que têm um problema nas células vermelhas do sangue pioram da doença renal. Essa alteração é que é chamada de traço falciforme ou traço da hemoglobina C, porque as pessoas que tem esse problema, apesar de poder viver uma vida saudável, quando tem desidratação ou alguma inflamação, as células do sangue podem ficar com o formato de uma foice, tendo dificuldade de caminhar nos vasos sanguíneos. Queremos ver se isso afeta o curso da doença renal. Queremos também investigar se você tem algumas mutações nos genes de apolipoproteína (APOL1) e da cadeia pesada da miosina não-muscular (MYH9) para ver se essas mutações afetam o curso da doença renal. O motivo de estarmos lhe convidando para o estudo é que, por indicação do seu médico assistente, você vai fazer ou já fez a biópsia renal, para o esclarecimento do diagnóstico de sua doença. Durante este estudo nós analisaremos a história de sua doença olhando para detalhes como idade, sexo, qual o diagnóstico na biópsia renal, a presença de Síndrome Nefrótica (que é o surgimento de inchaço com perda de muita proteína na urina), os exames realizados antes da biópsia e revisaremos as lâminas de sua biópsia e examinaremos se você tem o traço falciforme ou traço da hemoglobina C. Além disso, serão avaliados marcadores Informativos de Ancestralidade para confirmar a sua autodeclaração em relação à cor de pele e saber mais sobre as suas origens ancestrais. Para isso, você será solicitado a doar 5 ml (mais ou menos 1 colher de sopa) de sangue que será retirado da veia do braço, antebraço ou mão, onde for mais adequado. A coleta dessa quantidade de sangue, como você sabe, geralmente não traz problemas; há apenas o inconveniente da dor da punção e, raramente a formação de pequeno hematoma (manchas de acúmulo de sangue na pele) no local. O estudo não implicará em mudança na conduta do seu médico e nem vai interferir no seu diagnóstico ou no seu tratamento. O estudo deverá, contudo, alertar os médicos para a presença de traço falciforme ou traço da

hemoglobina C em quem tiver, com benefício para pessoa e também, caso fique comprovado de que isso afeta o curso da doença renal, ajudará os médicos a modificar o tratamento dessas pessoas levando em conta a alteração. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo para participar deste estudo, nem receberá qualquer vantagem financeira. No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da sua participação na pesquisa, haverá ressarcimento, tais como transporte e alimentação.

Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se participar. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não terá qualquer penalidade por causa disso e continuará tendo o mesmo acompanhamento e tratamento. Todos os dados colhidos serão mantidos em sigilo e em nenhum momento seu nome será exposto em decorrência do estudo. Após a realização dos exames descritos no projeto, as amostras serão autoclavadas e posteriormente descartadas conforme a resolução CNS 441/2011. Esse termo de assentimento é feito em duas vias e uma delas será entregue a você se aceitar participar. Caso você queira ter outras informações sobre o estudo, você pode perguntar agora ou, se as questões surgirem no futuro entre em contato com o pesquisador responsável no endereço abaixo. Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos, o (a) senhor (a) poderá procurar o Comitê de Ética e Pesquisa nos contatos abaixo:

Aceito Participar do estudo NOME E ASSINATURA DO MENOR:	Digital
NOME E ASSINATURA DO RESPONSÁVEL LEGAL:	

Dr Washington Luis Conrado dos Santos – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone (071) 31762262 / Fax: (071) 31762326.

Comitê de Ética e Pesquisa - Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone/Fax 71 31762285



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ao responsável legal do menor de idade

Prezado (a) Senhor (a)

O menor de idade pelo qual o (a) senhor (a) é responsável legal está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “TRAÇO FALCIFORME COMO POTENCIAL DETERMINANTE DA PROGRESSÃO DE DOENÇAS RENAIIS NA BAHIA”.

Os objetivos deste estudo consistem em investigar se o menor pelo qual o (a) senhor (a) é responsável tem alguma mutação genética (genes da hemoglobina, APOL1 e MYH9) e se essas mutações afetam o curso da doença renal. O motivo de estarmos convidando ele (a) para o estudo é que, por indicação do médico assistente, ele (a) vai fazer ou já fez a biópsia renal, para o esclarecimento do diagnóstico da doença. Durante este estudo nós analisaremos a história de doença dele olhando para detalhes como idade, sexo, qual o diagnóstico na biópsia renal, a presença de Síndrome Nefrótica (que é o surgimento de inchaço com perda de muita proteína na urina), os exames realizados antes da biópsia e revisaremos as lâminas da biópsia. Além disso, serão avaliados marcadores Informativos de Ancestralidade para confirmar a autodeclaração que ele (a) fez em relação à cor de pele e saber mais sobre as origens ancestrais dele (a). Caso você autoriza a participação dele (a), ele (a) será solicitado (a) a doar 5 ml (mais ou menos 1 colher de sopa) de sangue que será retirado da veia do braço, antebraço ou mão, onde for mais adequado. A coleta dessa quantidade de sangue, como você sabe, geralmente não traz problemas; há apenas o inconveniente da dor da punção e, raramente a formação de pequeno hematoma (manchas de acúmulo de sangue na pele) no local. O estudo não implicará em mudança na conduta do médico dele (a) e nem vai interferir no diagnóstico ou no tratamento dele (a). O estudo deverá, contudo, alertar os médicos para a presença dessas mutações em quem tiver, com benefício para pessoa e

também, caso fique comprovado de que isso afeta o curso da doença renal, ajudará os médicos a modificar o tratamento dessas pessoas levando em conta a mutação. Ele (a) não terá nenhum custo para participar deste estudo, nem receberá qualquer vantagem financeira. No entanto, caso haja qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento, tais como transporte e alimentação.

Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para aceitar ou recusar a participação dele (a). Você poderá retirar o consentimento ou interromper a participação dele (a) a qualquer momento. A sua autorização é voluntária e a recusa não terá qualquer penalidade por causa disso e ele (a) continuará tendo o mesmo acompanhamento e tratamento. Todos os dados colhidos serão mantidos em sigilo e em nenhum momento o nome dele (a) será exposto em decorrência do estudo. Após a realização dos exames descritos no projeto, as amostras serão autoclavadas e posteriormente descartadas conforme a resolução CNS 441/2011. Esse termo de consentimento é feito em duas vias e uma delas será entregue a você se autorizar a participação. Caso você queira ter outras informações sobre o estudo, você pode perguntar agora ou, se as questões surgirem no futuro entre em contato com o pesquisador responsável no endereço abaixo. Em caso de dúvidas sobre os aspectos éticos, o (a) senhor (a) poderá procurar o Comitê de Ética e Pesquisa nos contatos abaixo:

Pesquisador principal do estudo: Dr Washington Luis Conrado dos Santos – Centro de
Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone (071) 31762262 / Fax: (071) 31762326.

Comitê de Ética e Pesquisa - Instituto Gonçalo Moniz – FIOCRUZ/BA

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Telefone/Fax 71 31762285.

Eu, _____, abaixo assinado, concordo com a participação de (nome do menor) _____ pelo qual sou responsável legal no presente estudo como participante. O pesquisador me informou sobre tudo o que vai acontecer na pesquisa, o que ele(a) deverá fazer, inclusive sobre os

possíveis riscos e benefícios envolvidos na participação dele(a). O pesquisador me garantiu que ele(a) poderá sair da pesquisa a qualquer momento e que eu poderei retirar meu consentimento, sem que tenhamos que dar alguma explicação, e que esta decisão não nos trará nenhum tipo de penalidade ou interrupção de qualquer tratamento ou atendimento.

Assinatura do responsável legal

QUESTIONÁRIOS

Ficha de coleta 1

**RIMFAL – ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 E
HEMOGLOBINAS VARIANTES COM PROGRESSÃO DAS DOENÇAS
GLOMERULARES NA BAHIA**Numero no banco de dados (*Num Banco*): _____**Identificação e Dados pessoais**

Q01. Nome: _____

Q02. Idade: _____ anos Q03. Data de nascimento: ____/____/____

Q04. Sexo: [] 1. Masc. [] 2. Fem.

Q05. Cor da pele: [] 1. Branca [] 2. Parda [] 3. Negra [] 9. S/
informação

Q06. Nível de escolaridade: _____

Q07. Renda familiar (número de salário): _____

Q08. Procedência: _____

Q09. End: _____

Q10. Tel.: _____

Dados ClínicosQ11. PA sistólica (*PAS*): _____ mmHg Q12. PA diastolica (*PAD*): _____
mmHg

Q13. Peso: _____ Kg Q14. Altura: _____ cm

Q15. Diagnostico de Diabetes (*DM*): [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informaçãoQ16. Diagnostico de HAS (*HAS*): [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q17. Síndromes clínicas: _____

Dados Laboratoriais

Q18. Leucograma: _____ mg/dL Neut: _____ Linf: _____

Q19. Hematócrito: _____ % Q20. Hemoglobina: _____ g/d

Q21. Albumina: _____ g/dL Q22. Creatinina: _____ mg/dL

Q23. Colesterol total: _____ mg/dL Q24. Ureia): _____ mg/dL

Q25. Proteinúria 24h: _____ g Q26. HIV: _____

Dados anatomopatológicos

Q27. Data de biopsia: ____/____/____ Q28: N° de biopsia: _____

Q30. Diagnóstico:

Q31. % de Fibrose: _____ Q32. % de esclerose global e segmentar:

Q33. % de crescente fibrosa: _____ Q34. Escore da atrofia tubular:

Q35. Índice de cronicidade: _____

Ficha de coleta 2

**RIMFAL – ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 E
HEMOGLOBINAS VARIANTES COM PROGRESSÃO DAS DOENÇAS
GLOMERULARES NA BAHIA**

Numero no banco de dados (*Num Banco*): _____

Dados de acompanhamento

Q01. Nome: _____

Q02. Data de biopsia: ____/____/____

Q03. Óbito: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q04. Terapia renal substitutiva [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q05. Creatinina basal: _____ mg/dL

Q06. Creatinina 6 meses: _____ mg/dL

Q07. ↑Cr > 50% em 6 meses: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q08. ↑Cr > 100% em 6 meses: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q9. Creatinina 12 meses: _____ mg/dL

Q10. ↑Cr > 50% em 12 meses: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q11. ↑Cr > 100% em 12 meses: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q12. Creatinina 5 anos: _____ mg/dL

Q13. ↑Cr > 50% em 5 anos: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q14. ↑Cr > 100% em 5 anos: [] 1. Sim. [] 2. Não [] 9. S/ informação

Q15. Taxa de filtração glomerular basal: _____ mL / min / 1,73 m²

- Q16. Taxa de filtração glomerular 6 meses: _____ mL / min / 1,73 m²
- Q17. Taxa de filtração glomerular 12 meses: _____ mL / min / 1,73 m²
- Q18. Taxa de filtração glomerular 5 anos: _____ mL / min / 1,73 m²
- Q19. Proteinúria 24h basal: _____ g
- Q20. Proteinúria 24h 6 meses: _____ g
- Q21. Proteinúria 24h 12 meses: _____ g
- Q22. Proteinúria 24h 5 anos: _____ g
- Q23. Hemoglobina basal: _____ g/d
- Q24. Hemoglobina 6 meses: _____ g/d
- Q25. Hemoglobina 12 meses: _____ g/d
- Q26. Hemoglobina 5 anos: _____ g/d
- Q27. Hematócrito basal: _____ %
- Q28. Hematócrito 6 meses: _____ %
- Q29. Hematócrito 12 meses: _____ %
- Q30. Hematócrito 5 anos: _____ %
- Q31. Colesterol basal: _____ mg/dL
- Q32. Colesterol 6 meses: _____ mg/dL
- Q33. Colesterol 12 meses: _____ mg/dL
- Q34. Colesterol 5 anos: _____ mg/dL
- Q35. Albumina basal: _____ g/dL
- Q36. Albumina 6 meses: _____ g/dL
- Q37. Albumina 12 meses: _____ g/dL
- Q38. Albumina 5 anos: _____ g/dL