



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI (LIKA)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GISELE VAJGEL FERNANDES

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
VARIANTES DE RISCO DO *APOL1* E EVOLUÇÃO DA DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM PACIENTES COM NEFRITE LÚPICA**

Recife

2020

GISELE VAJGEL FERNANDES

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
VARIANTES DE RISCO DO *APOL1* E EVOLUÇÃO DA DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM PACIENTES COM NEFRITE LÚPICA**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Immunopatologia Keiso Azami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Paula Sandrin-Garcia

Departamento de Genética, CCB/UFPE

Laboratório de Immunopatologia Keiso Azami/UFPE

Coorientadora

Prof^a. Dr^a. Gianna Mastroianni Kirsztajn

Departamento de Medicina (Nefrologia), EPM/UNIFESP

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Fernandes, Gisele Vajgel

Relação entre parâmetros clínicos, histopatológicos e variantes de risco do *APOL1* e evolução da doença renal crônica em pacientes com nefrite lúpica / Gisele Vajgel Fernandes – 2020.

124 f. : il.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia.

Coorientadora: Gianna Mastroianni Kirsztajn.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada a Saúde, Recife, 2020.

Inclui referência, apêndices e anexos.

1. Rins – Doenças. 2. Lupus eritematoso sistêmico. 3. Genética – pesquisa. I. Sandrin-Garcia, Paula (orientadora) II. Kirsztajn, Gianna Mastroianni (coorientadora) III. Título.

615.85

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-079

GISELE VAJGEL FERNANDES

**RELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E
VARIANTES DE RISCO DA *APOL1* E EVOLUÇÃO DA DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM PACIENTES COM NEFRITE LÚPICA**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em 26/03/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Sandrin-Garcia (Orientadora)

Departamento de Genética, CB/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda

Área acadêmica de Medicina Clínica –CCM/UFPE
Infectologia, Hospital das Clínicas de Pernambuco – HC/UFPE

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Área acadêmica de Patologia – CCM/UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Prof. Dr. Jorge Reis Almeida

Departamento de Nefrologia
Universidade Federal Fluminense – UFF

Dedico a minha amada família, por todo amor e incentivo recebidos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela vida, saúde e o grande privilégio de poder cuidar de outras vidas. Ter nascido com espírito inquieto e curioso, me fez buscar cada vez mais o conhecimento e me deu forças para concluir mais essa etapa da minha inacabável formação profissional.

Aos meus queridos pais, **Milena e Jorge**, por terem me guiado desde os primeiros passos num lar de muito amor, companheirismo e integridade pessoal. Nunca mediram esforços para me proporcionar a melhor educação possível, mesmo que isso tenha implicado em privações pessoais. Obrigada pela dedicação a família e exemplo que nos dão até hoje.

Ao meu amado marido **Bruno**, parceiro na construção de uma família, agradeço pelo apoio incondicional em toda trajetória dessa etapa e pela compreensão nos momentos de ausência. Não teria seguido em frente sem você ao meu lado.

Aos meus filhos **Gabriel e Giovana**, que me apresentaram ao maior amor do mundo, muito obrigada pela torcida a cada prova, experimento, apresentação e submissão a revistas. Jamais esquecerei dos cafezinhos, chocolates, copos de água levados à noite ao escritório e principalmente das massagens nas costas para incentivar a finalização dos trabalhos. Amo vocês!

Aos meus irmãos **André e Bruno**, obrigada por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida e sempre torcendo pela irmã mais velha. Agradeço também às minhas cunhadas queridas, **Bruna e Ilana** pelo apoio e dicas nas diversas áreas.

Aos meus sogros **Lucia e Luiz Peixoto** (*in memoriam*), por me acolherem na família e pelo suporte com as crianças.

Às minhas ajudantes incansáveis, **Andrea e Guia**, agradeço pelo apoio de todas as horas com a administração da casa e das crianças. Jamais teria concluído essa etapa sem a ajuda de vocês.

Às minhas amigas-irmãs do coração, **Gabriela, Brena, Manuela e Catarina**, agradeço por me proporcionarem risadas que suavizam a vida e pelo incentivo a cada etapa vencida.

À minha orientadora **Paula Sandrin-Garcia**, por ter aceitado ser minha orientadora e ter feito o trabalho com tanta dedicação e disponibilidade. Diante de

tanta dificuldade para se fazer ciência nesse país, você é um exemplo de pesquisadora incansável. Obrigada de coração a você e a seu grupo de pós-graduandos, em especial a **Diego Santana e Suelen Lima**, sempre disponíveis para ajudar uma clínica (quase alienígena) dentro do laboratório.

À minha co-orientadora **Gianna Mastroianni Kirsztajn**, referência em glomerulonefrites no Brasil, agradeço a disponibilidade em fazer a parceria e na eficiente correção dos textos. Aprendi muito com suas opiniões e sinto-me honrada em tê-la como coorientadora.

Às minhas queridas colegas nefrologistas do grupo de glomerulopatias do HC/UFPE, **Lucila Valente, Alina Cavalcante, Denise Costa e Camila Barbosa** agradeço o apoio, opiniões e paciência com meus planos grandiosos. Em especial a **Lucila**, meu exemplo diário de médica competente e dedicada, gostaria de agradecer pelo pioneirismo em fundar o ambulatório de glomerulopatias no HC/UFPE há mais de duas décadas. Obrigada por me contaminar com a paixão em salvar rins!

A **Ivanize Souza e Poliana Cassia**, queridas assistentes da Nefrologia HC/UFPE por todo apoio logístico com a pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, funcionários, professores e coordenadores que me acolheram e foram muito prestativos em toda trajetória.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos pacientes portadores de lúpus que aceitaram participar da pesquisa e gentilmente doaram seu sangue e tempo em prol do conhecimento.

Muito Obrigada a todos!

“Remembering that you are going to die is the best way I know to avoid the trap of thinking you have something to lose. You are already naked.

There is no reason not to follow your heart.”

(Steve JOBS, 2005)

RESUMO

A nefrite lúpica (NL) pode afetar até 70% dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) a depender de sexo, idade de aparecimento e raça. Afro-americanos, hispânicos e asiáticos têm maior risco para desenvolver lesão renal do que os caucasianos. Além de fatores socioeconômicos, a genética tem papel fundamental neste processo. O gene da apolipoproteína L1 (*APOL1*) possui dois alelos de risco renal (ARR) G1 e G2 que estão associados com doença renal crônica (DRC) estágio 5 em negros com NL. O presente estudo teve como objetivo a análise de fatores de risco clínicos, demográficos, histológicos e genéticos (alelos de risco da *APOL1* [G1 e G2]) em uma coorte brasileira de 280 pacientes com NL para avaliar a associação com desfechos renais. Nossos resultados mostraram que a raça auto-declarada pelo paciente não foi um fator importante para diferenciar desfecho renal final. No entanto, a análise de regressão logística ajustada mostraram que biópsia renal inicial com NL classe IV (odds ratio [OR] 14.91; intervalo de confiança 95% [IC 95%] 1.77–125.99; $p=0.01$), fibrose intersticial $\geq 25\%$ (OR 5.87; 95% IC 95% 1.32–26.16; $p = 0.02$) ausência de resposta completa ou parcial inicial após 12 meses do tratamento de indução (OR 16.3; IC 95% 3.74–71.43; $p<0.001$) e presença de recidivas após resposta (OR 4.49; IC 95% 1.10–18.44; $p=0.04$) foram correlacionados com doença renal crônica estágio ≥ 4 (TFGe sustentada < 30 mL/min/1,73m²). Na curva de sobrevivência de Kaplan-Meier também observamos que NL classe IV e fibrose intersticial $\geq 25\%$ forma associados a evolução para DRC estágio 5 (razão de risco [RR] 2.96; IC 95% 1.3–7.0; $p=0.036$ and RR 4.96; IC 95% 1.9–12.9; $p<0.0001$, respectivamente. Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no G1 (rs73885319; rs60910145) e um *indel* para a variante G2 (rs71785313) foram genotipados em 201 pacientes não-brancos com NL e em 222 indivíduos saudáveis não-brancos (controles). A frequência dos alelos de risco da *APOL1* em brasileiros não-brancos com NL não diferiu significativamente de controles saudáveis e quatro pacientes com NL tiveram 2 ARR (0,4% e 2%, respectivamente). No entanto, casos de NL com uma ou mais variantes da *APOL1* tiveram características basais, mas apresentaram maior risco de DRC progressiva com TFGe < 30 mL/min/1,73m² em comparação àqueles com 0 ARR (11,1% com 0; 29,6% com 1; 50% com 2 ARR, $p=0,005$). Embora as lesões glomerulares e os escores de atividade na biópsia renal inicial não tenham diferido significativamente

entre os indivíduos com base no genótipo *APOL1*, os escores de cronicidade, atrofia tubular e fibrose intersticial foram mais graves naqueles com ≥ 1 ARR ($p=0,002$, $p=0.018$ e $p=0.011$, respectivamente). Portanto, apesar das características iniciais e as respostas ao tratamento terem sido semelhantes, um único ARR *APOL1* em brasileiros não brancos com NL foi associado a maior dano túbulo-intersticial crônico na biópsia inicial e ao aumento do risco de DRC avançada no longo prazo.

Palavras-chave Ascendência africana. Brasil. *APOL1*. Doença renal crônica. Biópsia renal. Nefrite lúpica.

ABSTRACT

Lupus nephritis (LN) can affect up to 70% of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) depending on sex, age of onset and race. African Americans, Hispanics and Asians are at higher risk for developing kidney damage than Caucasians. In addition to socioeconomic factors, genetics has a fundamental role in this process. The apolipoprotein L1 gene (*APOL1*) has two G1 and G2 renal risk alleles (RRA) that are associated with stage 5 chronic kidney disease (CKD) in blacks with LN. The present study aimed to analyze clinical, demographic, histological and genetic risk factors (risk alleles of *APOL1* [G1 and G2]) in a Brazilian cohort of 280 patients with NL to assess the association with renal outcomes. Our results showed that the patients' self-declared race was not an important factor in differentiating the final renal outcome. However, the adjusted logistic regression analysis showed that initial renal biopsy with LN class IV (odds ratio [OR] 14.91; 95% confidence interval [95% CI] 1.77–125.99; $p=0.01$), interstitial fibrosis $\geq 25\%$ (OR 5.87; 95% CI 1.32–26.16; $p=0.02$) absence of complete or partial initial response after 12 months of induction treatment (OR 16.3; 95% CI 3.74–71.43; $p<0.001$) and presence of recurrences after response (OR 4.49; 95% CI 1.10–18.44; $p=0.04$) they were correlated with chronic kidney disease stage ≥ 4 (sustained eGFR <30 mL/min/1.73 m²). In the Kaplan-Meier survival curve, we also observed that LN class IV and interstitial fibrosis $\geq 25\%$ were associated with progression to stage 5 CKD (risk ratio [RR] 2.96; 95% CI 1.3–7.0; $p=0.036$ and RR 4.96; 95% CI 1.9–12.9; $p<0.0001$, respectively. Two single nucleotide polymorphisms (SNP) in G1 (rs73885319; rs60910145) and one indel for variant G2 (rs71785313) were genotyped in 201 non-white patients with LN and in 222 healthy non-white individuals (controls) The frequency of *APOL1* risk alleles in non-white Brazilians with LN did not differ significantly from healthy controls and four patients with LN had 2 RRAs (0.4% and 2%, respectively). However, cases of LN with one or more variants of *APOL1* had similar baseline characteristics, but they had a higher risk of progressive CKD with eGFR <30 ml / min / 1.73 m² compared to those with 0 RRA (11.1 % with 0, 29.6% with 1; 50% with 2 RRA, $p=0.005$). Although glomerular lesions and activity scores on the initial renal biopsy did not differ significantly between individuals based on the *APOL1* genotype, the chronicity, tubular atrophy and interstitial fibrosis scores were more severe in those with ≥ 1 RRA ($p=0.002$, $p=0.018$ and $p=0.011$,

respectively). Therefore, although the initial characteristics and responses to treatment were similar, a single RRA for *APOL1* in non-white Brazilians with LN was associated with greater chronic tubulo-interstitial damage at initial biopsy and with an increased risk of advanced CKD in the long-term follow-up.

Key Words African ancestry. Brazil. *APOL1*. Chronic kidney disease. Kidney biopsy. Lupus nephritis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Prevalência de LES e frequência de NL de acordo com regiões e etnias. Retirado de Almaani et al., 2017.....	21
Figura 1 - Classificação histológica da NL de acordo com os achados na microscopia óptica, imunofluorescência, microscopia eletrônica e desenho representando localização dos depósitos imunes. Autor Charles Jennette. Fonte https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/lupus/	23
Quadro 2 - Classificação de NL pela Sociedade Internacional de Nefrologia/ Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) Extraído de Weening et al., 2004.....	23
Quadro 3 - Proposta de modificação dos índices de atividade e de cronicidade da classificação de NL feita pela Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS). Extraído de Bajema et al., 2018.....	25
Figura 2 - Risco estimado de desenvolvimento de doença renal crônica terminal (DRCT) em 5, 10 e 15 anos de acordo com a classificação histológica da NL. Retirado de Tektonidou et al., 2016.....	26
Quadro 4 - Genes associados à susceptibilidade para desenvolvimento de NL. Extraído de Munroe & James, 2015.....	27
Figura 3 - Vias da imunidade inata que contribuem para desenvolvimento da NL. Extraído de Munroe & James, 2015.....	29
Figura 4 - Vias da imunidade adaptativa que contribuem para desenvolvimento da NL. Extraído de Munroe & James, 2015.....	30
Figura 5 - Variantes de genes expressos no rim que podem aumentar susceptibilidade a lesão renal na NL. Extraído de Munroe & James, 2015.....	31
Figura 6 - Representação da proteína apol1 com a localização dos sítios dos polimorfismos (A) e dos alelos G0, G1 e G2 do gene <i>APOL1</i> . Extraído de Limou et al., 2014.....	33
Figura 7 - Representação da interação epigenética e desenvolvimento da nefropatia. Extraído de Kasembeli et al., 2015.....	35
Figura 8 - Fisiopatogenia da lesão podocitária decorrente da nefropatia da <i>APOL1</i> após segundo gatilho. Extraído de Beckerman e Suztak, 2018.....	42
Figura 9 - Fluxograma dos pacientes com NL dos três centros brasileiros e controles	

saudáveis não-brancos.....	46
----------------------------	----

Artigo 1

Figure 1 - Kaplan-Meier renal survival curves according to the degree of interstitial fibrosis and LN ISN/RPS classification in the initial kidney biopsy.....	56
---	----

Artigo 2

Figure 1 - Kaplan-Meier survival curves, based on <i>APOL1</i> genotype.....	87
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variantes de risco renal do <i>APOL1</i> e risco para DRC em afroamericanos.....	34
--	----

Artigo 1

Table 1 - LN patients' baseline and follow-up characteristics.....	52
Table2 - Initial biopsy from LN patients.....	53
Table 3 - Lupus nephritis patients' characteristics based on last renal function.....	54
Table 4 - Table 4. Lupus nephritis patients' first treatment and response based on last renal function.....	55
Table 5 - Univariate analysis and multivariable prediction model for CKD.....	55

Artigo 2

Table 1 - Demographic characteristics of non-white Brazilian cases with lupus nephritis and non-SLE controls.....	81
Table 2 - Non-white Brazilian lupus nephritis case characteristics, based on <i>APOL1</i> genotype.....	82
Table 3 - Non-white Brazilian lupus nephritis case treatment and outcomes, based on <i>APOL1</i> genotype.....	84
Table 4 - Results of second kidney biopsy for LN cases.....	85
Table 5 - Characteristics and outcomes of LN cases with two <i>APOL1</i> risk alleles....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
<i>APOL1</i>	Gene codificante da apolipoproteína L1
apoL1	Apolipoproteína L1
ARR	Alelos de risco renal
BCR	Receptor de célula B
CR	Receptores de complemento
DRC	Doença renal crônica
DRCT	Doença renal crônica terminal
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FcR	Receptor para fração Fc
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GN	Glomerulonefrite
GWAS	Genome wide association study (Estudo de associação de genoma amplo)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HIVAN	Nefropatia associada ao HIV
IA	Índice de atividade (biópsia renal)
IAA	Índice de ancestralidade africana
IC	Índice de cronicidade (biópsia renal)
IFN	Interferon
IFNR	Receptor de interferon
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira
ISN/RPS	Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
NL	Nefrite lúpica
OR	Razão de chances ou odds ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
REPEG	Registro Pernambucano de Glomerulopatias

RNA _m	RNA mensageiro
RR	Risco relativo
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SNP	Single Nucleotype Polymorphism (Polimorfismo de Base Única)
TCR	Receptor da célula T
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TLR	Receptores <i>toll like</i>
TNF α	Tumor Necrosis Factor α (Fator de Necrose Tumoral)
TRS	Terapia renal substitutiva
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA NEFRITE LÚPICA.....	20
2.2	HISTOPATOLOGIA DA NEFRITE LÚPICA.....	22
2.3	FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA NEFRITE LÚPICA.....	26
2.4	<i>APOL1</i> E DOENÇA RENAL	32
2.5	<i>APOL1</i> E NEFRITE LÚPICA.....	37
2.6	MECANISMOS PATOGÊNICOS DA NEFROPATIA DO <i>APOL1</i>	39
2.7	DRC ASSOCIADA A <i>APOL1</i> NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	43
2.8	TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA.....	45
3	METODOLOGIA.....	46
3.1	SELEÇÃO, TAMANHO E COLETA DAS AMOSTRAS HUMANAS.....	46
3.2	ISOLAMENTO DO DNA.....	48
3.3	SELEÇÃO DOS SNPS E TECNOLOGIAS PARA GENOTIPAGEM.....	49
3.4	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	49
4	RESULTADOS.....	50
4.1	ARTIGO 1.....	50
4.2	ARTIGO 2.....	59
5	DISCUSSÃO GERAL.....	88
6	CONCLUSÕES.....	94
7	PERSPECTIVAS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	APÊNDICE A- ABSTRACT PUBLICADO (NDT).....	108
	APÊNDICE B- RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.....	109
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	110
	ANEXO B- PARECER CONEP (EMENDA APROVADA).....	111
	ANEXO C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	112
	ANEXO D- FICHA CLÍNICA.....	116

1 INTRODUÇÃO

As glomerulonefrites (GN), incluindo a nefrite lúpica (NL), são uma importante causa de doença renal crônica (DRC) estágio 5. Dados do *US Renal Data System* revelaram que 14% das causas de DRC dialíticas são provocadas pelas GN (USRDS 2012 ANNUAL DATA REPORT, 2012). No Brasil, registros da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) apontam que as GN são a terceira causa de DRC com necessidade de terapia renal substitutiva (TRS) (SESSO et al., 2013) e a NL é a doença glomerular secundária mais comum em pacientes atendidos no Ambulatório de GN do Serviço de Nefrologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) (COSTA et al., 2017) e em serviços especializados de São Paulo (MALAFRONTTE et al., 2006).

A NL não controlada pode levar à doença renal crônica (DRC) e à necessidade de TRS (ANDERS e ROVIN, 2016). A falta de obtenção de remissão da proteinúria após o tratamento é um preditor de pior desfecho do paciente (PARIKH et al., 2014), mas pode representar atividade de doença em curso ou cicatrização estabelecida. Nos últimos anos, os avanços na compreensão da imunopatogênese da NL forneceram esperança para oportunidades de desenvolvimento da medicina de precisão individualizada. O manejo da NL é significativamente dificultado pela dependência de biomarcadores clínicos que não mudam diretamente com os eventos que ocorrem no rim. Marcadores comumente utilizados para avaliar atividade renal são proteinúria, creatinina sérica e sedimento urinário, mas podem não refletir simultaneamente a real lesão renal. A biópsia renal é o método padrão ouro para o diagnóstico e definição do prognóstico do dano renal do LES. Embora a classificação histológica, os índices de atividade e de cronicidade sejam relevantes para a tomada de decisão terapêutica, eles não predizem se o paciente responderá ao tratamento (DAVIDSON, 2015).

As variantes genéticas do gene *APOL1* foram denominadas G1 e G2, em virtude dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), e a sequência de referência foi designada como G0. Esses SNPs, fortemente relacionados a DRC dialítica não diabética, localizam-se no último éxon do gene da *APOL1*. Apesar do polimorfismo do gene da *APOL1* estar associado a pior prognóstico renal em pacientes lúpicos afro-descendentes, sua influência numa população miscigenada, como a Brasileira, ainda é pouco estudada (NADKARNI et al., 2018) e pode fornecer mais informações

quanto à chance de falha terapêutica ou de evolução para DRC, o que trará ajuda na conduta em relação ao tratamento desses pacientes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a possível associação das variantes de risco do gene do *APOL1* e evolução para doença renal crônica em pacientes brasileiros portadores de nefrite lúpica.

1.1.2 Objetivos específicos

- a. Determinar as características demográficas, clínicas e histológicas dos pacientes com NL que se associam com a evolução da DRC avançada.
- b. Comparar as frequências das variantes de risco de *APOL1* em pacientes com NL e controles saudáveis.
- c. Estratificar os pacientes portadores de NL de acordo com as variantes do gene de *APOL1*, de acordo com a resposta terapêutica e desfechos clínicos.
- d. Avaliar associação das variantes G1 e G2 do gene *APOL1* com os achados histopatológicos da biópsia renal.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA NEFRITE LÚPICA

O envolvimento renal é uma manifestação grave e comum no LES, podendo ocorrer em qualquer momento da doença, com uma prevalência variável (40 a 70%), a depender do sexo, idade e raça. O LES afeta mais as mulheres em todas as faixas etárias, sendo a relação mulher-homem maior na idade reprodutiva, variando de 81 a 151, no entanto a NL é mais frequente e mais agressiva nos homens (SCHWARTZMAN-MORRIS e PUTTERMAN, 2012; ALMAANI, MEARA e ROVIN, 2017;). Fatores hormonais, imunológicos e genéticos têm sido implicados nesta disparidade entre os sexos (SOUYRIS et al., 2018). Na infância, antes da puberdade, essa diferença entre os sexos é sutil, chegando a uma razão de quatro meninas para três meninos (MINA e BRUNNER, 2010).

A prevalência e incidência de LES e NL são variáveis de acordo com as regiões do mundo, desenvolvimento socioeconômico e diferentes etnias (Quadro 1). Populações com menor desenvolvimento socioeconômico apresentam a maior prevalência e gravidade do LES e NL, o que gera confusão com o fator racial. Contreras et al. (2006), em um estudo realizado com 213 casos com biópsias comprovando NL, em doentes de três diferentes grupos étnicos, encontrou resultados menos favoráveis quanto aos desfechos renais nos afro-americanos e hispânicos. No entanto, esses dois grupos étnicos também tinham rendimento anual familiar mais baixo. Outros autores mostraram que o fator sócio econômico também foi determinante para influenciar numa pior evolução de pacientes afro-americanos em comparação aos brancos. Porém, após o ajuste para a nível de pobreza e cobertura de seguro-saúde, o risco relativo (RR) para progressão da NL em hispânicos se manteve (BARR et al., 2003). No entanto, sabe-se que negros e hispânicos desenvolvem NL mais precocemente do que brancos (BURGOS et al., 2011), além de apresentarem curso mais agressivo da LN com evolução mais frequente para DRC estágio 5 e desfechos fatais (CONTRERAS et al., 2006; DANILA et al., 2008; ALMAANI, MEARA e ROVIN, 2017).

Quadro 1 Prevalência de LES e frequência de NL de acordo com regiões e etnias. Retirado de Almaani et al., 2017.

Dados demográficos	Prevalência (por 100.000)	Frequência %	Referências
LES			
Região			
Estados Unido, Canada	4,8-78,5		(DANCHENKO; ANTHONY, 2006) SATIA;
Europa (Reino Unido, Alemanha, França, Itália, Espanha, Escandinávia)	25-91		(DANCHENKO; ANTHONY, 2006) SATIA;
Austrália	19-63		(DANCHENKO; ANTHONY, 2006) SATIA;
China	30-50		(OSIO-SALIDO; MANAPAT-REYES, 2010)
Japão	8-18		(OSIO-SALIDO; MANAPAT-REYES, 2010)
Nefrite Lúpica			
Raça/Etnia			
Negro		69	(BASTIAN et al., 2002)
Branco		29	(BASTIAN et al., 2002)
Asiático		40-82	(JAKES et al., 2012)
Hispanico		61	(BASTIAN et al., 2002)

A população brasileira é miscigenada, com diferentes proporções de ancestralidade ameríndia, africana e europeia. Em estudos norte-americanos e europeus, os brasileiros têm sido classificados como hispânicos, assim como os habitantes de outros países sul-americanos de língua hispânica e com diferentes proporções de ancestralidade ameríndia. Um estudo comparando o índice de ancestralidade africana (IAA) entre brasileiros negros e brancos de cada região do país encontrou IAAs similares entre indivíduos das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil, no entanto o IAA em africanos originais era maior do que o encontrado nos brasileiros. Por outro lado, ao se comparar com o português colonizador, o IAA dos brasileiros se mostrou maior (PARRA et al., 2003).

Um estudo realizado no Brasil, mais precisamente no estado de Pernambuco, mostrou que não houve diferença significativa nas ancestralidades baseadas na pigmentação da pele dos pernambucanos. Nesse estudo, observou-se que a ascendência europeia (59,7%) era predominante, seguidos por africana (23,0%) e ameríndia (17,3%) (COELHO et al., 2015). Outros estudos usando marcadores de ancestralidade de diferentes regiões brasileiras revelaram padrões semelhantes de dominância europeia, seguidos por ancestralidade genética africana e, em menor extensão, ameríndia (PENA et al., 2009; LINS et al., 2010). Além da forte contribuição genética, fatores ambientais também influenciam o aparecimento do

LES. Um estudo na cidade de Natal-RN evidenciou uma elevada incidência de LES entre seus habitantes, sendo considerada a maior incidência mundial 8,7/100.000 por ano (VILAR e SATO, 2002; LEWIS e JAWAD, 2017). Em Pernambuco, Costa e colaboradores (2017) demonstrou, através do Registro Pernambucano de Glomerulopatias (REPEG), que a NL é a doença glomerular secundária mais comum entre os pacientes atendidos em três serviços especializados em GN no Estado (COSTA et al., 2017).

2.2 HISTOPATOLOGIA DA NEFRITE LÚPICA

A classificação da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) reconhece seis diferentes classes de GN por LES mediadas por complexos imunes com base nos achados da biópsia renal (Quadro 2). A classe I representa a lesão glomerular mais leve possível com depósitos imunes limitados ao mesângio, sem hiper celularidade mesangial associada. Na classe II, os depósitos mesangiais detectados por imunofluorescência e/ou microscopia eletrônica são acompanhados por hiper celularidade mesangial de qualquer grau. Na classe III, há proliferação endocapilar focal e predominantemente segmentar e/ou esclerose que afeta menos de 50% dos glomérulos amostrados. As lesões endocapilares ativas tipicamente incluem monócitos infiltrados e neutrófilos e podem apresentar características necrotizantes, incluindo necrose fibrinoide, ruptura da membrana basal glomerular e apoptose nuclear. Na classe IV, as lesões endocapilares envolvem 50% dos glomérulos amostrados, tipicamente em uma distribuição difusa e global. A classe IV é a mais frequente e tem um prognóstico pior quando comparada às classes não proliferativas como I, II e V (WEENING et al., 2004; MAROZ e SEGAL, 2013; VANDEPAPELIERE et al., 2014; MODY; MODY e ASSOUNGA, 2018; OBRIȘCĂ et al., 2018). A classe V denota NL membranosa. Os depósitos subepiteliais são a característica definidora, geralmente sobreposta a uma base de hiper celularidade mesangial com ou sem depósitos imunes mesangiais. Nos pacientes com lesões membranosas e endocapilares combinadas, é feito um diagnóstico tanto da classe V quanto da classe III ou IV. Essas classes mistas têm um prognóstico pior do que a NL de classe V pura (MERCADAL et al., 2002). A classe VI identifica DRC avançada com esclerose glomerular superior a 90%, sem atividade residual (Figura 1) (WEENING et al., 2004).

Quadro 2 Classificação de NL pela Sociedade Internacional de Nefrologia / Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) Extraída de Weening et al., 2004.

Classe I	Nefrite lúpica minimamente mesangial
Classe II	Nefrite lúpica proliferativa mesangial
Classe III	Nefrite lúpica focal ^a
Classe IV	Nefrite lúpica difusa segmental (IV-S) ou global (IV-G) ^b
Classe V	Nefrite lúpica membranosa ^c
Classe VI	Nefrite lúpica esclerosante avançada

Indica e gradua (leve, moderada, severa) atrofia tubular, inflamação e fibrose intersticial, severidade da arterioesclerose e outras lesões vasculares.

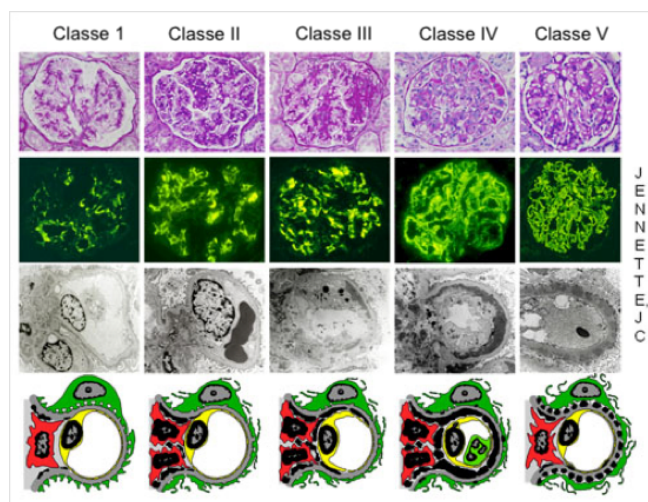
^aIndica a proporção de glomérulos com lesões ativas e escleróticas

^bIndica a proporção de glomérulos com necrose fibrinóide e crescentes celulares

^cClasse V pode ocorrer em combinação com classe III ou IV, e no case ambas serão diagnosticadas.

A classificação da ISN/RPS é atualmente o padrão-ouro utilizado para guiar a decisão terapêutica com relação à NL. No entanto, pacientes com a mesma classificação de NL podem ter prognósticos completamente distintos. Outros dados da histologia renal têm importante correlação com o desenvolvimento de DRC avançada (AUSTIN et al., 1994; MORONI, DEPETRI e PONTICELLI, 2016; YU et al., 2017). Recentemente, um estudo de um único centro na Holanda mostrou que determinadas lesões renais poderiam prever desfecho de maneira mais acurada do que a simples categorização por classes de NL. Esses autores demonstraram, após análise multivariada, que a presença de necrose fibrinóide, crescentes fibróticos, atrofia tubular e fibrose intersticial são dados correlacionados com DRC dialítica no longo prazo (RIJNINK et al., 2017).

Figura 1 Classificação histológica da NL de acordo com os achados na microscopia óptica, imunofluorescência, microscopia eletrônica e desenho representando localização dos depósitos imunes. Autor Dr Charles Jennette. Fonte <https://unckidneycenter.org/kidneyhealthlibrary/glomerular-disease/lupus/>



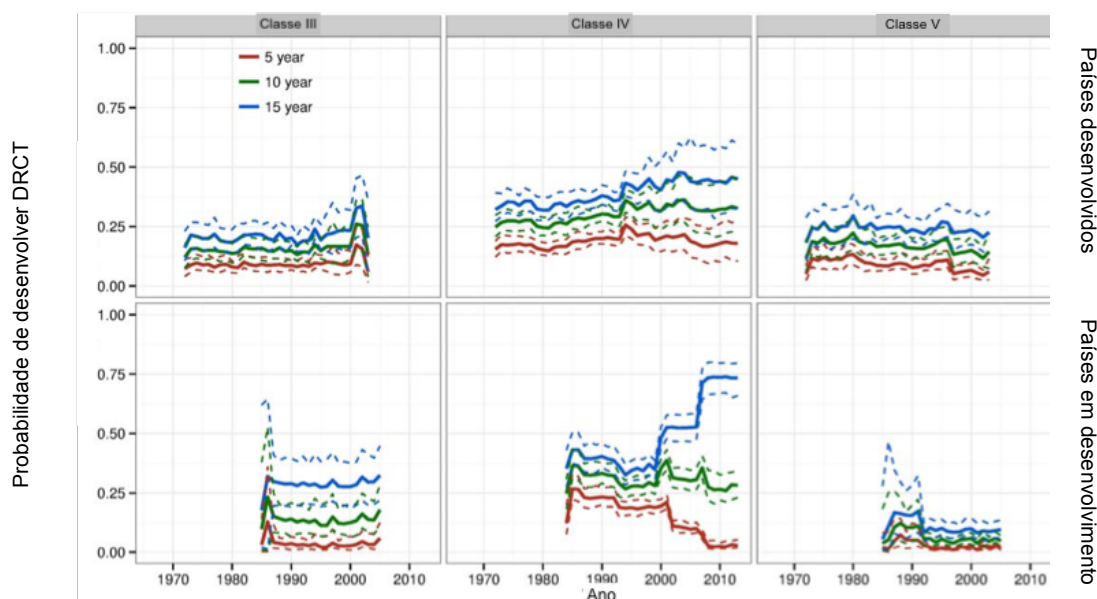
Com o objetivo de melhorar a correlação clínico-histológica, um comitê internacional de especialistas em nefropatologia atualizou a classificação histopatológica da NL. Assim, foi publicada uma proposta de mudança da classificação onde ficaria extinta a subclassificação de NL classe IV em segmentar e global; além de se dar uma maior atenção aos índices de atividade (IA) e de cronicidade (IC). Nesta nova proposta o IA individualiza a presença e graduação da necrose fibrinoide, em virtude do mau prognóstico que ela representa, e agrupa infiltrado neutrofílico com cariorrexe, já que essa última representa restos apoptóticos de neutrófilos. Crescentes fibrosas, anteriormente não citadas, foram incluídas no IC (BAJEMA et al., 2018) (Quadro 3).

A sobrevida de pacientes com LES tem aumentado nos últimos 20 anos, o que se atribui a muitos fatores, como diagnóstico precoce da doença renal, melhor monitoramento da atividade lúpica, uso de corticosteroides e agentes imunossupressores. No entanto, menos de 50% apresentarão remissão clínica completa e cerca de 40% dos pacientes com NL classe III-V terão algum grau de disfunção renal no futuro (ROVIN, PARIKH e ALVARADO, 2014; VANDEPAPELIERE et al., 2014). Uma metanálise recente mostrou que o risco para desenvolver DRC estágio 5 foi mais alto entre os pacientes com NL classe IV, com riscos de 5, 10 e 15 anos de 19% (IC 95% 12–29%), 33% (IC 95% 22–44%) e 44% (IC 95% 32–56%), respectivamente, em estudos em países desenvolvidos de 2000 a 2006. Já os casos de NL de classe V tiveram risco mais baixos, mostrando que em 5, 10 e 15 anos esses pacientes tiveram 4% (IC 95% 2–8%), 11% (IC 95% 6–18) e 20% (IC 95% 13–28%) de chance de desenvolver DRCT no mesmo período, respectivamente (TEKTONIDOU, DASGUPTA e WARD, 2016) (figura 2). Apesar da limitação desse interpretar dados retrospectivos, observa-se que houve uma redução do risco de DRC estágio 5 da década de 1970 para meados de 1990 em países desenvolvidos, o que se deve as estratégias de tratamento com imunossupressores. Porém, esse risco ficou praticamente inalterado nos anos 2000, também para os países em desenvolvimento (TEKTONIDOU, DASGUPTA e WARD, 2016).

Quadro 3 Proposta de modificação dos índices de atividade e de cronicidade da classificação de NL feita pela Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS). Extraído de Bajema et al., 2018.

Índice de atividade NIH modificado	Definição	Score
Hipercelularidade endocapilar	Hipercelularidade endocapilar em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	0-3
Neutrófilos/cariorrexe	Neutrófilos/cariorrexe em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	0-3
Necrose fibrinoide	Necrose fibrinoide em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	(0-3) x 2
Depósitos hialinos	Lesões em alça de arame e/ou trombo hialino em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	0-3
Crescentes celulares/fibrocelulares	Crescentes celulares e/ou fibrocelulares em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	(0-3) x 2
Inflamação intersticial	Leucócitos intersticiais em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) no córtex	0-3
<i>Total</i>		<i>0-24</i>
Índice de cronicidade NIH modificado	Definição	Score
Score total de glomerulosclerose	Esclerose global ou segmentar em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	0-3
Crescentes fibrosas	Crescentes fibrosas em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos glomérulos	0-3
Atrofia tubular	Atrofia tubular em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) dos túbulos corticais	0-3
Fibrose intersticial	Fibrose intersticial em <25%(1+), 25%-50%(2+) ou >50%(3+) do córtex	0-3
<i>Total</i>		<i>0-12</i>
NIH <i>National Institute of Health</i> (Instituto nacional de saúde)		

Figura 2 Risco estimado de desenvolvimento de doença renal crônica terminal (DRCT) em 5, 10 e 15 anos de acordo com a classificação histológica da NL. Retirado de Tektonidou et al., 2016.



2.3 FATORES ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA NEFRITE LÚPICA

O LES é uma síndrome clínica complexa caracterizada pela desregulação imune com a produção de altas concentrações de auto-anticorpos, comprometendo diferentes órgãos e sistemas. Embora não se conheça por completo a patogenia da NL, sabe-se que antígenos intrínsecos, como componentes da matriz extracelular ou glicoproteínas da superfície da membrana basal glomerular, podem servir de alvo para a ligação de auto-anticorpos (WEENING et al., 2004). A inflamação crônica e autoimune pode acometer a maioria dos órgãos e tecidos de maneira leve a severa, de forma imprevisível, com períodos de atividade e de remissão (MOHAN e PUTTERMAN, 2015).

A etiologia do LES ainda não é definida, mas sabe-se que existe envolvimento de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A herança genética do LES é forte e bem estabelecida. Estudos em gêmeos monozigóticos mostram taxas de incidência concordante de 24 a 69%, comparadas às taxas de gêmeos dizigóticos e irmãos de 2 a 5% (JAMES, 2014). A complexidade genética nessas doenças poligênicas está relacionada à baixa penetrância de cada gene contribuinte. Mais de 50 *loci* associados à susceptibilidade ao LES foram identificados ao longo dos anos,

bem como os produtos desses genes e sua função na via patogênica da doença (MOHAN e PUTTERMAN, 2015).

A genética da NL é complexa e os genes associados à NL podem ser atribuídos a uma das quatro categorias funcionais genes que afetam a ativação dos linfócitos, particularmente células B; genes que afetam a imunidade inata, particularmente a ativação do fator nuclear kappa de células B ativadas (NFκβ) e a assinatura do interferon (IFN); genes que podem expressar-se internamente nos rins, promovendo potencialmente danos ao tecido renal; e os genes que influenciam o manejo de detritos apoptóticos, cromatina e complexos imunes que carregam antígenos nucleares (MOHAN e PUTTERMAN, 2015; MUNROE e JAMES, 2015) (Quadro 4).

Quadro 4 Genes associados à susceptibilidade para desenvolvimento de NL. Extraído de Munroe & James, 2015.

Morte celular programada FAS DNASE1 ATG5 MTMR3	Imunidade inata IFH1 RIG1 TLR3, TLR7, TLR9 MAVS TREX1 MYD88 TRAF6 IRAK1 IRF5, IRF7 TNFAIP3 TNIP1 UBE2L3
Clearance de imunocomplexos FCGR2A, FCGR 2B, FCGR 3A, FCGR3B C1Q (A, B, C) C4 (A, B) CRP MBL2 CR1 ITGAM IKZF1	Imunidade adaptativa HLA-DR PTPN22 CTLA4 PKCD1 TNFSF4 STAT1 STAT4 IFNG TGFB1 IL-10 BLK CD40
Patogênese intra-renal TNFRSF1B CCL2 CXCL8 CCR5 CXCL12 KLK1, KLK3 ACE AGT APOL1	

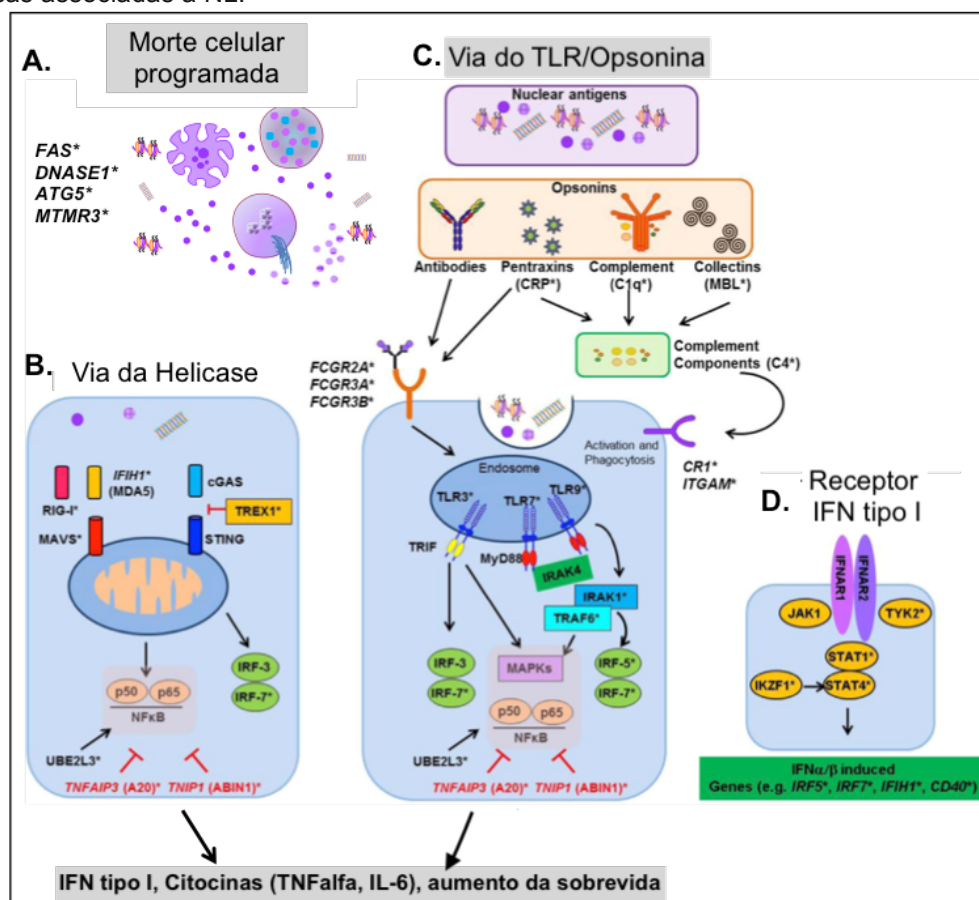
A região do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) localizada no cromossomo 6 (25–32 Mb) é a mais importante para a susceptibilidade ao LES, mas seu papel na susceptibilidade a NL não está estabelecido. Um estudo com mulheres europeias portadoras de lúpus evidenciou que o SNP mais fortemente associado a

NL no CHM foi o rs9267972 (*odds ratio* ou razão de chances [OR], 1,85; intervalo de confiança de 95% [IC95%], 1,46-2,33; $p=1,5 \times 10^{-6}$). Cinco loci fora da região do CHM mostraram associação mais importante do que aqueles dentro do CHM, sendo o rs1364989 o SNP de mais forte associação com NL (OR, 3,41; IC95%, 2,10-5,54; $p=4,5 \times 10^{-7}$) localizado no 4q11-q13 (CHUNG et al., 2014). Recentemente, um estudo transversal de análise de 817.810 SNPs revelou associações genéticas distintas e significantes para NL em diferentes etnias. Nesse estudo, o SNP rs 8091180 no *NFATC1* foi o mais associado a NL em todas as etnias (OR 1,43; $p=3,3 \times 10^{-4}$), com o maior OR entre afro-americanos (OR 2,17; $p=0,0035$) (LANATA et al., 2018). O *NFATC1* é um local de risco validado para DRC e codifica células T ativadas por fator nuclear (dependente de calcineurina 1) que está envolvido na ativação do receptor de antígeno de célula T (KLEIN-HESSLING et al., 2017). Os autores tentaram replicar esse achado em uma coorte independente de 1620 pacientes afro-americanos com lúpus e analisaram 66 SNPs na região *NFATC1* para associação com NL. Embora o rs8091108 não tenha se replicado, (OR 1,02 IC95% 0,85–1,23, $p=0,8$) outros dois SNPs nesse gene foram associados ao LN, rs11660906 (OR 0,45 IC95% 0,27–0,74, $p=0,0013$) e rs11663132 (OR 0,46 IC95% 0,28-0,76, $p=0,0018$), indicando que variantes nessa região podem estar associadas a NL. (LANATA et al., 2018). É interessante notar que o *NFATC1* é alvo da ciclosporina e tacrolimus, drogas inibidoras da via da calcineurina frequentemente utilizadas no tratamento da NL (BAO et al., 2008; KRONBICHLER et al., 2019).

O componente genético do LES também é reforçado pela observação, há mais de três décadas, de maior frequência de DRCT em famílias afro-americanas dos Estados Unidos da América (EUA) com NL (FREEDMAN et al., 1999).

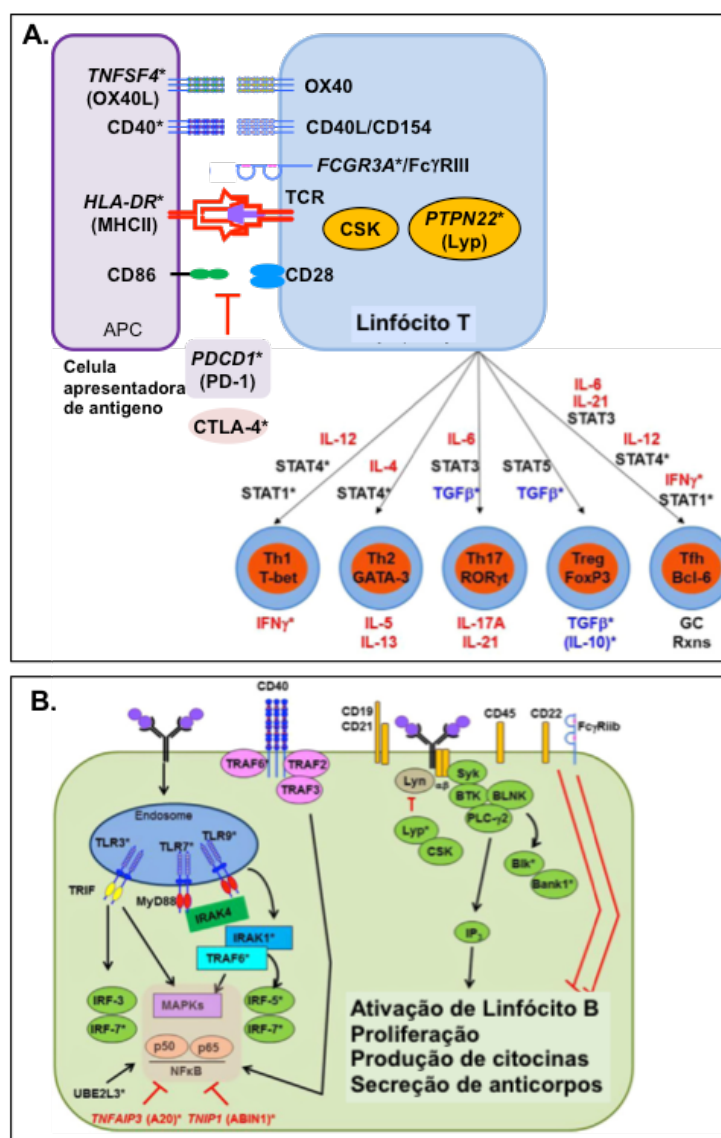
Os *loci* associados à NL podem influenciar os mecanismos intrarrenais que produzem diretamente danos nos rins, bem como mecanismos extrarrenais que promovem a NL através da desregulação dos mecanismos inato, adaptativo e efetor da inflamação. Inicialmente, os genes que ativam a sinalização da imunidade inata podem induzir a ativação principalmente da via do IFN tipo I através de debris nucleares e ácidos nucleicos causando a produção de citocinas inflamatórias que amplificam a resposta inflamatória (Figura 3).

Figura 3 Vias da imunidade inata que contribuem para desenvolvimento da NL. Modificado de Munroe & James, 2015. Os processos de imunidade inata contribuem para a nefrite lúpica. (A) Morte celular programada associada à diminuição da depuração de detritos celulares, resulta na maior disponibilidade de autoantígenos nucleares, incluindo nucleossomos, partículas nucleares, RNA e DNA. (B) Os sensores de RNA intracelular (RIG-I e MDA5) e DNA cíclico-GMP-AMP (cGAS) sintase (cGAS) interagem com RNA, DNA e partículas nucleares. (C) Os antígenos nucleares são opsonizados por anticorpos, complemento, pentraxinas e/ou coletinas (os dois últimos interagem com componentes do complemento), que interagem com FcR (anticorpo) ou receptores de complemento (CR) para trazer antígenos para os endossomos fagocitários, onde o RNA e o DNA podem interagir com os receptores *toll like* (TLR) TLR3, TLR7 e TLR9, respectivamente. As vias helicase (B) e opsonina/TLR (C) resultam em sobrevivência prolongada das células imunes e na secreção de citocinas pró-inflamatórias. (D) Incluem IFNs do tipo I, que estimulam o receptor de IFN do tipo I. A ativação do receptor de IFN tipo I resulta na produção de fatores de transcrição, citocinas e receptores que prolongam e amplificam a resposta imune. * Genes/moléculas com variantes genéticas associadas à NL.



Em seguida, os genes que afetam primordialmente a imunidade adaptativa provocam ativação linfocitária desregulada o que pode levar à produção de anticorpos anti-nucleares ou IgM polirreagente, mas não desencadeiam NL isoladamente, sugerindo que apenas a presença destes anticorpos não é suficiente para levar ao desenvolvimento de lesão renal, uma vez que depósitos de imunocomplexos nos glomérulos são presentes em praticamente todos os pacientes com LES (CLYNES, 1998) (Figura 4).

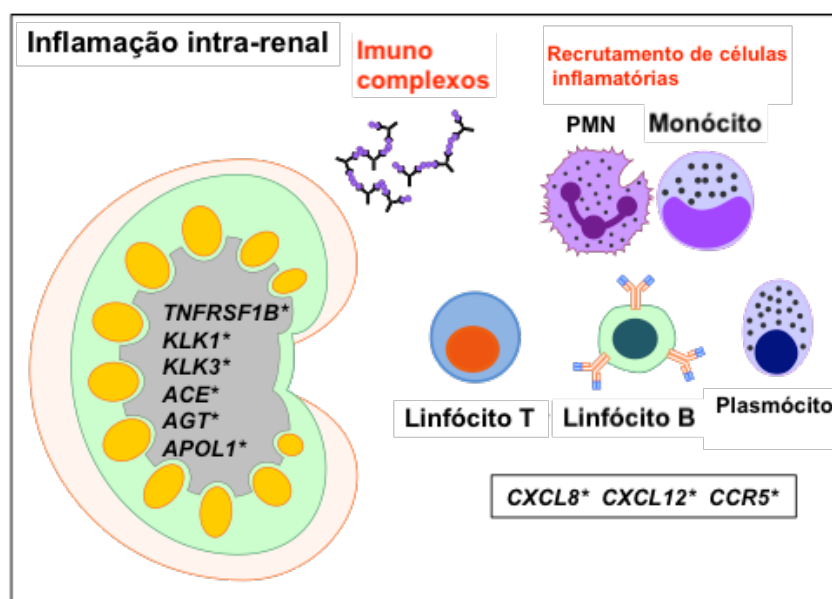
Figura 4 Vias da imunidade adaptativa que contribuem para desenvolvimento da NL. Modificado de Munroe & James, 2015. Os processos de imunidade adaptativa contribuem para a nefrite lúpica. (A) ativação de linfócitos T. Os antígenos nucleares são fagocitados, processados e apresentados ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC) pela célula apresentadora de antígeno (APC), que então interage com o receptor da célula T (TCR) nos linfócitos T e ativa os eventos celulares de sinalização (sinal 1). As moléculas co-estimuladoras das famílias CD28 e TNFR se envolvem para prevenir a anergia e amplificar a principal resposta II/TCR do complexo de histocompatibilidade nas células T CD4 auxiliares (sinal 2). Os sinais a jusante levam à secreção de citocinas (sinal 3), que interagem com reguladores da transcrição para conduzir as vias de diferenciação dos linfócitos T. (B) ativação de linfócitos B. Os antígenos nucleares estimulam o receptor de célula B (BCR), ativando o complexo de sinalização que resulta na amplificação dos eventos de sinalização. Moléculas co-estimuladoras, incluindo CD40 e TLRs, sinergizam com o BCR para amplificar a ativação dos linfócitos B. * Genes / moléculas com variantes genéticas associadas à NL.



Por fim, polimorfismos relacionados a genes expressos no rim podem propiciar terreno fértil para que os processos inflamatórios sejam perpetuados e levem a nefrite refrataria e progressão para DRCT (Figura 5). Portanto, a interação

entre genes de várias categorias é necessária para o desenvolvimento da NL avançada (MOHAN e PUTTERMAN, 2015; MUNROE e JAMES, 2015).

Figura 5 Variantes de genes expressos no rim que podem aumentar susceptibilidade a lesão renal na NL. Modificado de Munroe & James, 2015. A inflamação intrarrenal contribui para a nefrite lúpica. Os complexos imunes contendo autoanticorpos ficam ligados no glomérulo, levando à inflamação que resulta no recrutamento de células imunes ao rim, incluindo polimorfonucleares (PMNs), monócitos, linfócitos T, linfócitos B e células plasmáticas. As células imunes interagem e amplificam ainda mais a resposta imune. Além disso, variantes genéticas nos genes expressos no rim (incluindo *TNFRSF1B*, *KLK1*, *KLK3*, *ACE*, *AGT* e *APOL1*) podem resultar em maior suscetibilidade a dano renal decorrente da NL.* Genes / moléculas com variantes genéticas associadas à NL.



Estudos de transcriptômica em tecido renal revelaram vias de ativação diferentemente expressas de acordo com a fase de ativação ou remissão da NL. Um estudo recente mostrou que genes relacionados à via de sinalização do IFN tipo I estavam com expressão aumentada nos episódios de *flare* (ou recaída), porém havia redução dessa expressão naqueles que respondiam à terapia, o que não ocorria com os não respondedores (PARIKH et al., 2017); e mais expressos na biópsia inicial do que na segunda biópsia durante segundo *flare* (MEJIA-VILET et al., 2018). Diferentemente da assinatura do INF, os autores relatam que a expressão gênica controlada pelo TNF α ("assinatura TNF α ") foi maior nos episódios de *flare* do que no diagnóstico (MEJIA-VILET et al., 2018). Por outro lado, após tratamento inicial, havia aumento de expressão de genes relacionados à ativação de linfócitos T nos pacientes que não responderam bem, o que pode indicar que o tratamento específico com inibidores de calcineurina (ciclosporina ou tacrolimus) possa surtir efeito nessa doença (PARIKH et al., 2017).

Recentemente, um estudo demonstrou que o sequenciamento de RNA de único tipo celular pode trazer informações valiosas a respeito das vias de ativação específicas para as diversas classes de NL. Sendo que as vias de sinalização do IFN tipo I e do TNF α estavam mais expressas nas células tubulares de pacientes com classes proliferativas (III e IV) de NL do que na classe V, com correlação positiva entre células tubulares e queratinócitos da pele em relação a via do IFN (DER et al., 2019).

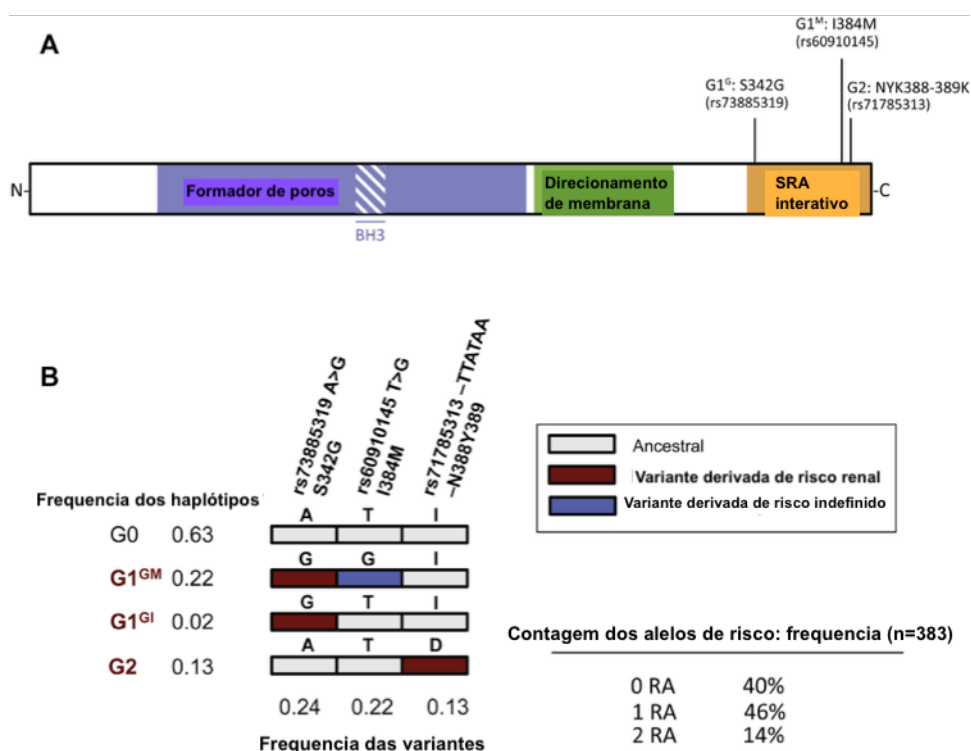
2.4 APOL1 E DOENÇA RENAL

Há mais de três décadas, observa-se uma maior incidência de DRC estágio 5 em afro-americanos em comparação aos caucasianos (KLAG et al., 1997) e apesar do fator socioeconômico “pobreza” aumentar o risco para DRC em ambos os grupos étnicos, os negros padeciam dessa condição mesmo após análise multivariada (WHITTLE et al., 1993; VOLKOVA et al., 2007). Em 2008, dois estudos indicaram a participação de determinado *locus* do cromossomo 22 no risco de desenvolvimento de DRC não-diabética na população africana (KAO et al., 2008; KOPP et al., 2008). Essa região do cromossomo 22 contém 35 genes, entre eles o gene da *non-muscle myosin heavy chain 9* (*MYH9*), considerado um forte candidato, em virtude de sua expressão no podócito e da prévia identificação de mutações do *MYH9* em portadores de desordens plaquetárias hereditárias que apresentavam penetrância variável de doença renal (KOPP et al., 2008). De todos os SNPs e haplótipos estudados, o haplótipo E1 (íntrons 13 e 23) do *MYH9* mostrou forte associação para desenvolvimento de DRC hipertensiva, glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e nefropatia associada ao HIV (HIVAN) (NELSON et al., 2010).

Ainda em 2010, outros dois estudos apontaram um outro gene, adjacente ao *MYH9*, que mostrou apresentar uma associação mais significativa com DRC do que *MYH9*. O gene da *APOL1* está localizado no braço curto do cromossomo 22, que contém 14,5kb distribuídos em sete éxons, sendo o único gene da família das apolipoproteínas que codifica uma proteína secretada, a apolipoproteína 1, com 398 aminoácidos, que se associa a partículas de colesterol de alta densidade (*high density lipoprotein* - HDL) na circulação (SMITH e MALIK, 2009; FREEDMAN et al., 2010b). As variantes genéticas codificantes para *APOL1* foram denominadas G1 e

G2 e a sequência de referência foi designada como G0. Esses SNPs, fortemente relacionados a DRC dialítica não diabética, localizam-se no último éxon do gene da *APOL1*. O alelo G1 consiste de um haplótipo formado por dois SNPs as variantes rs73885319 (S342G) e rs60910145 (I384M), que se encontram em codificação não sinônima e em desequilíbrio de ligação perfeito, enquanto que o alelo G2, com deleção de seis pares de bases, é representado pela variante rs71785313 (GENOVESE et al., 2010; TZUR et al., 2010). Para GESF, observou-se OR 10,5 (IC95% 6,0-18,4) e para DRC hipertensiva OR 7,3 (IC 95% 5,6-9,5). O risco de DRC conferido pelas variantes de risco seguem modo recessivo de hereditariedade e provocam mudanças na sequência da proteína próximo à extremidade C-terminal, uma região chamada de domínio associado à resistência sérica (*SRA domain*) (GENOVESE et al., 2010) (Figura 6).

Figura 6 Representação da proteína apol1 com a localização dos sítios dos polimorfismos (A) e dos alelos G0, G1 e G2 do gene *APOL1*. Modificado de Limou et al., 2014.



Admite-se a hipótese que as variantes de risco para nefropatia, G1 e G2, da *APOL1* parecem ter sido selecionadas na África subsaariana nos últimos 10 mil anos, e sua presença confere proteção contra a infecção parasitária através da lise do *Trypanosoma brucei rhodesiense*, etiologia da doença do sono africana

transmitida pela mosca *Tse-tse* (GENOVESE et al., 2010). A proteína plasmática APOL1 é um constituinte do HDL colesterol com propriedade de, ao ser ingerida pelo tripanossomo susceptível, formar poros nas membranas dos lisossomos provocando a lise do parasita (PAYS et al., 2006). O *Trypanosoma brucei rhodesiense* produz uma proteína que neutraliza a ação tripanolítica da APOL1 selvagem, porém não é capaz de neutralizar a ação da APOL1 mutante (THOMSON et al., 2014). Essas variantes estão praticamente ausentes em populações de descendência europeia e asiática e conferem risco de nefropatias em afro-americanos com formas comprovadas por biópsia em afro-americanos. Estudos prévios evidenciam um OR de 29, 17 e 7,3 para HIVAN, GESF e DRC associada à nefropatia hipertensiva (glomerulosclerose global e focal com fibrose intersticial e alterações arteriolares) (FREEDMAN et al., 2010b; KOPP et al., 2011), respectivamente (Tabela 1 e Figura 7).

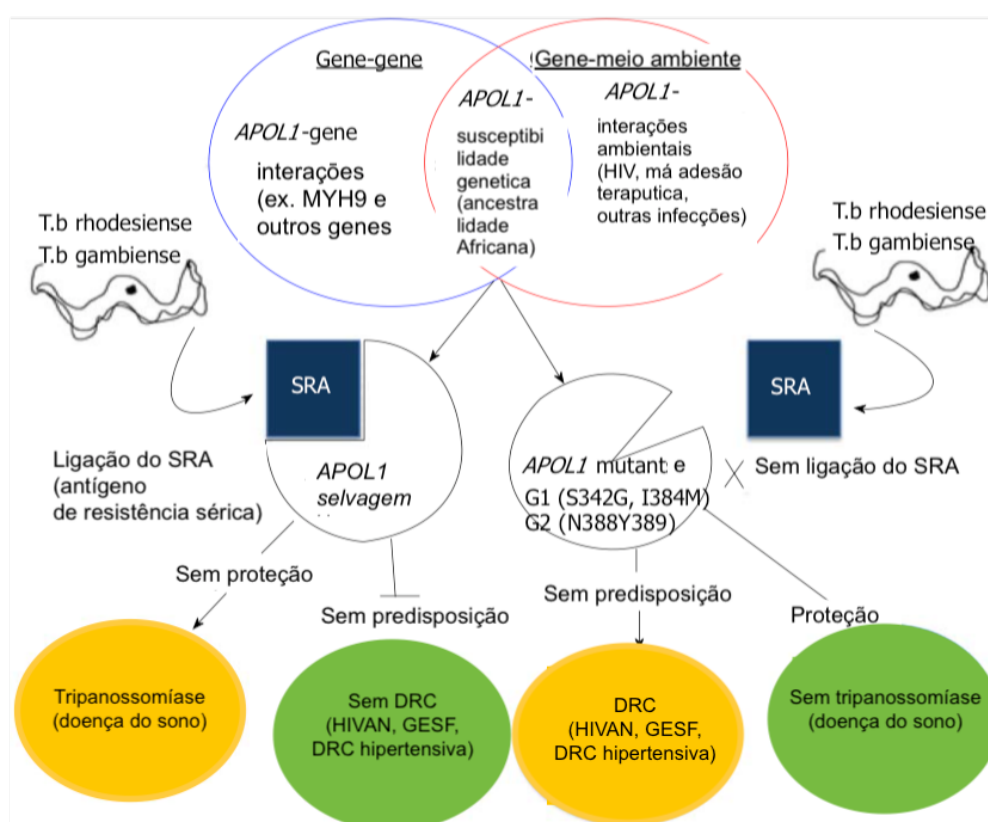
Tabela 1 Variantes de risco renal da *APOL1* e risco para DRC em afro-americanos

Patologia associada	% 2 ARR	N	OR ou RR (IC 95%)	Referências
Nefropatia associada ao HIV	72	54	29 (13-68,5)	(KOPP et al., 2011)
GESF primaria	72	217	17 (11-26)	(KOPP et al., 2011)
Glomerulopatia colapsante lúpica	50	26	5,4 (0,4-12,1)	(LARSEN et al., 2013)
DRCT por nefrite lúpica	25	855	2,7 (1,8-4,2)	(FREEDMAN et al., 2014)
Anemia falciforme	45	540	3,4	(ASHLEY-KOCH et al., 2011)
DRC atribuída a hipertensão	23	675	2,6 (1,8-3,6)	(LIPKOWITZ et al., 2012)

A associação de risco inicialmente atribuída ao *MYH9* em populações de descendência africana provavelmente refletiu forte inter-relação com o gene *APOL1* porque 89% das pessoas com a variante G1 e 76% com a variante G2 também eram portadoras do haplótipo de risco *MYH9* (FREEDMAN, 2012). No entanto, parece haver associação presente, porém mais fraca, entre *MYH9* e nefropatia em europeus e asiáticos, sugerindo que os alelos de susceptibilidade adicionais existam nessas regiões, em virtude das variantes de risco G1 e G2 da *APOL1* estarem praticamente ausentes nesses grupos (CHENG et al., 2011; O'SEAGHDHA et al., 2011; COOKE et al., 2012). Porém, as evidências quanto ao papel do *MYH9* no desenvolvimento da DRC não hipertensiva foram perdendo forças à medida em que não se encontrou mutação relacionada à DRC dialítica não diabética (HAWKINS et

al., 2015), e sua associação com DRC se deveria ao desequilíbrio de ligação com os alelos de risco da *APOL1* (GENOVESE et al., 2010).

Figura 7 Representação da interação ambiental e genética para o desenvolvimento da nefropatia. Modificado de Kasembeli et al., 2015. Interação gene-meio ambiente levando a DRC associada a *APOL1* e a seleção positiva de variantes de DRC associadas a *APOL1* como resultado de um ambiente com a presença da Tripanossomíase. SRA proteína associada resistente ao soro; HIV vírus da imunodeficiência humana; T.b Trypanosoma brucei; *APOL1* apolipoproteína L1; MYH9 cadeia pesada de miosina não muscular 9; HIVAN nefropatia associada ao vírus da imunodeficiência humana; GESF glomerulosclerose segmentar focal; DM2 diabetes mellitus tipo 2; DRC doença renal crônica.



É importante ressaltar que a maioria dos portadores dos alelos de risco não desenvolvem doença renal, sendo necessária a presença de um segundo gatilho para que haja o acometimento renal. Um estudo realizado com familiares de pacientes com nefropatia não diabética mostrou que eles têm mais chance de serem portadores das variantes de risco; no entanto, isso não foi suficiente para o desenvolvimento de formas incipientes de doença renal, reforçando a tese do segundo fator desencadeante (FREEDMAN et al., 2012). Recentemente, esses mesmo grupo realizou um estudo de associação ampla do genoma e demonstrou

que fatores ambientais são gatilhos mais eficientes do que interação gene-gene para o desencadeamento da nefropatia da *APOL1* (LANGEFELD et al., 2018). Evidências apontam para a interação gene-vírus como um dos fatores desencadeadores da nefropatia da *APOL1*. Nefropatia associada ao HIV se desenvolve em cerca de 50% dos afro-americanos portadores do HIV sem tratamento e que possuem duas variantes de risco do *APOL1* (KOPP et al., 2011). O rim funciona como um reservatório para a replicação do vírus HIV (WINSTON et al., 2001). Infecções virais não HIV, particularmente aqueles com o potencial de infecções renais ou uroepiteliais, como o JC poliovírus, parecem ter influência no desenvolvimento da nefropatia associada a *APOL1*. Em 2013, foi observada a associação de quatro tipos de infecções virais (BK e JC poliovírus [JCV], herpes vírus tipo 6 e citomegalovírus) que poderiam agir como segundo gatilho no desenvolvimento da nefropatia associada a *APOL1*. Para surpresa dos autores, houve uma redução do desenvolvimento da nefropatia nos pacientes com elevada carga viral para JCV. Esse dado pode sugerir que o JCV tenha ação inibitória sobre outros vírus nefrotóxicos ou tenha impacto na expressão do gene da *APOL1*, impedindo sua patogênese (DIVERS et al., 2013). Recentemente, esse mesmo grupo demonstrou que a presença da virúria pelo JCV está associada tanto à proteção quanto à evolução para DRC, independentemente dos genótipos do *APOL1* (FREEDMAN et al., 2018). Estudos de um grupo da região norte do Brasil reforçam essa ideia ao demonstrarem menor prevalência de infecção pelo JCV em pacientes portadores de DRCT em comparação aos controles sem a doença (PIRES et al., 2011; MELO et al., 2013).

Hipertensão como causa de doença renal não-diabética, mais frequentemente presente na raça negra, tem seu papel revisado após estudos prospectivos de grandes coortes multicêntricas. Aumento dos níveis tensionais é frequentemente encontrado à medida que a função renal deteriora, porém não é raro na prática clínica se rotular um paciente como portador de nefropatia hipertensiva quando não se encontra causa aparente para sua doença renal. No entanto, vários estudos envolvendo grande número de afro-americanos, não encontrou correlação entre os genótipos de alto risco da *APOL1* e aumento dos níveis tensionais, apesar dessa população apresentar mais hipertensão do que os americanos brancos (GRAMS et al., 2016; CHEN et al., 2017a, 2017b; ROBINSON; FREEDMAN, 2019). Além disso, o controle intensivo da hipertensão não modificou a progressão da

nefropatia e levou os autores à conclusão de que a progressão da doença renal está associada ao papel das variantes do gene *APOL1* (LIPKOWITZ et al., 2012; FREEDMAN et al., 2017).

Recentemente foi publicado que a presença de um ou dois alelos de risco do *APOL1* foi associado ao aumento do risco de sepse de origem comunitária em afro-americanos. A associação dos alelos de risco *APOL1* com sepse não seguiu o padrão de herança observado para DRC, em que o aumento do risco se encaixa nos modelos genéticos recessivos. Porém, a associação das variantes de risco da *APOL1* com o aumento do risco de sepse foi observada apenas nos modelos genéticos dominante (RR, 1,55; IC95%, 1,13 a 2,11) e aditivos (RR por cópia do alelo variante, 1,25; IC95%, 1,02 a 1,53) ajustados para covariantes e ancestralidade, sugerindo que o transporte de até um alelo de risco confere maior risco de sepse. Isso é consistente com a constatação de que é necessário o transporte de apenas um alelo de risco *APOL1* para conferir proteção contra a tripanossomíase (PARANJPE et al., 2020).

2.5 APOL1 E NEFRITE LÚPICA

Além de infecções virais como o HIV, que estimulam a via do interferon (IFN), o uso exógeno de IFN para tratamento de doenças, como infecção pelo vírus da hepatite C e esclerose múltipla, pode desencadear glomerulopatia colapsante nos portadores de dois alelos de risco (2 ARR) do *APOL1* (NICHOLS et al., 2015). Foi demonstrado ainda, em cultura de células, que o ambiente rico em IFN promovia o aumento da expressão do RNAm de *APOL1* através de estímulo de *Toll-like Receptors* (TLRs) da imunidade inata. Os autores utilizaram o Poly IC, um agonista do TLR3, que aumentou a expressão de *APOL1*, regulando positivamente os interferons diretamente ou por meio de uma via dependente do fator 3 regulador de IFN (IRF3) independente do IFN. (NICHOLS et al., 2015). Interessantemente foi mostrado no mesmo trabalho que o uso da cloroquina, um inibidor da acidificação endossômica muito utilizada no tratamento do lúpus, amenizava a expressão de *APOL1* nos podócitos e células endoteliais. Isso reforçou a hipótese de que a inibição de uma via endossômica dependente de TLR3 poderia estar ligada a nefropatia da *APOL1*.

Apesar de ser uma doença auto-imune produtora de IFN tipo 1 e aumentar a expressão de genes relacionados a assinatura do IFN no rim, os estudos envolvendo *APOL1* e severidade da NL são escassos. Em 2010, Freedman e colaboradores realizaram estudo com um pequeno número de afro-americanos com DRC dialítica por NL e sugeriram que havia uma associação com os genes *MYH9/APOL1* (FREEDMAN et al., 2010a). No entanto, essa observação não se manteve quando pacientes adicionais com formas leves de NL foram incluídos no estudo. Lin e colaboradores (2012) encontraram associação entre *MYH9*, mas não *APOL1*, e NL em euro-americanos, porém sem evidência de associação da *MYH9* com afro-americanos, asiáticos, índios ou hispânicos com NL (LIN et al., 2012).

Para abordar a relação do risco genético com a gravidade da NL, Freedman e colaboradores (2014) analisaram 668 afro-americanos com DRCT por NL quanto às variantes da *APOL1* e o de risco de associação com nefropatia. Este estudo detectou um OR de 2,35 ($p=4.25E^{-9}$) para a associação da *APOL1* com DRC estágio 5 por NL (FREEDMAN et al., 2014).

Um estudo brasileiro realizado por pesquisadores de São Paulo avaliou a influência das variantes de risco G1 e G2 e do haplótipo E1 do *MYH9* na evolução para DRCT de pacientes ambulatoriais com NL. A maioria dos pacientes se auto-identificou como brancos (65%) e apenas 30% dos marcadores de ancestralidade autossômicos eram de origem africana. Dos 196 pacientes, 62 apresentaram duplicação da creatinina sérica ou necessidade de terapia renal substitutiva, e apenas o SNP rs37522462 do *MYH9* foi significativo para o desfecho, não sendo o modelo recessivo de 2 alelos de risco da *APOL1* associado à DRC naquela população. Os autores sugeriram que a falta de associação de evolução para DRC com os alelos de risco da *APOL1* nos pacientes com NL poderia ser devida à baixa frequência das duas variantes de risco (10%) ou ao tamanho amostral da pesquisa (COLARES et al., 2014).

Um estudo com 546 biópsias renais de pacientes com NL encontrou associação entre a presença de glomerulopatia colapsante e crescentes não necrotizantes e a presença das duas variantes de risco da *APOL1*, além de uma tendência a maior índice de cronicidade, não havendo diferença quanto às classes histológicas da NL (LARSEN et al., 2013). Como já citado, a glomerulopatia colapsante foi associada ao uso exógeno de IFN e à HIVAN em pacientes com as variantes de alto risco renal (KOPP et al., 2011; MCNICHOLAS e NELSON, 2015).

Estudos em pacientes afro-americanos com nefropatia não-diabética apontam que alguns pacientes desenvolvem glomeruloesclerose global com fibrose e alterações vasculares intersticiais, enquanto outros desenvolvem GESF (FOGO et al., 1997; FOGO, 2014; LIPKOWITZ et al., 2012). Larsen e colaboradores (2014) publicaram estudo com biópsias renais de afro-americanos com nefroesclerose arteriolar e não evidenciaram uma proporção significativamente maior de obsolescência glomerular nos afro-americanos com duas variantes de risco, porém descreveram maiores graus de glomeruloesclerose solidificada e glomérulos que “desaparecem”, bem como menor alteração arteriolar.

Hoy e colaboradores (2015) examinaram cortes microscópicos de rins saudáveis de afro-americanos e descreveram os fenótipos de acordo com o perfil de *APOL1*. O estudo mostrou que indivíduos com uma ou duas variantes de risco perdem glomérulos precocemente em comparação à população saudável, que geralmente começa a perder glomérulos a partir dos cinquenta anos. Essas diferenças persistiram após o ajuste para variáveis como a hipertensão arterial. Além da redução no número total de glomérulos, houve um aumento no volume dos glomérulos, que deve ser decorrente de hipertrofia compensatória, gerada pelo hiperfluxo sanguíneo nos glomérulos remanescentes.

2.6 MECANISMOS PATOGÊNICOS DA NEFROPATIA DO *APOL1*

Evidências sugerem que a expressão do gene *APOL1*, através da apolipoproteína L-1 pode afetar a função glomerular por meio de seu papel na biologia das lipoproteínas. Após sua codificação, apolipoproteína L1 é excretada para o meio extracelular e seu transporte plasmático se faz acoplando-se às partículas de lipoproteína de densidade alta (HDL) (FORNONI, MERSCHER e KOPP, 2014). A contribuição de apolipoproteína L1 para o metabolismo do colesterol ainda não foi estabelecida, mas admite-se que ela possa ter papel na manutenção da integridade da membrana plasmática dos processos podocitários (LIMOU et al., 2015).

Olabisi e colaboradores (2016) em um estudo experimental mostraram relação com as variantes de risco, tanto G1 como G2, com o edema e morte celular em decorrência do fluxo intracelular de potássio que provoca ativação das proteínas-

quinases ativadas por estresse (OLABISI et al., 2016). No entanto, não ficou claro se a suscetibilidade à lesão renal decorrente da presença dos alelos de risco renal da *APOL1* é iniciada por via endógena com sua expressão em nível glomerular ou por circulação da *APOL1*. Propõe-se que o alto nível de expressão da proteína *APOL1* em podócitos humanos normais é devido simultaneamente à síntese endógena e à sua absorção proveniente da circulação (MA et al., 2014), e a absorção das variantes de risco da *APOL1* (G1 e G2) foi o fator que contribuiu para a lesão podocitária (LAN et al., 2014).

Esses resultados *in vitro* contrastam com dois outros estudos de aloenxerto renal que sugeriram que a expressão das variantes de risco da *APOL1* causam dano intrínseco renal, mas não quando estão presentes na sua circulação sanguínea. Em um dos estudos a presença do genótipo de risco da *APOL1* nos receptores renais não provocou redução na sobrevida do enxerto recebido por eles, sugerindo que não houve impacto da *APOL1* circulante (LEE et al., 2012); no entanto, os rins de doadores com dois alelos de risco *APOL1* tiveram significativamente menor tempo de sobrevida em comparação com aqueles que receberam rins de doadores com um ou nenhum alelo de risco, sugerindo um papel endógeno para a fisiopatologia da *APOL1* (REEVES-DANIEL et al., 2011; FREEDMAN et al., 2015).

Como o gene da *APOL1* está presente apenas em humanos e alguns primatas, dispor de um modelo experimental da nefropatia se torna mais complicado. A maioria dos estudos que avaliaram os mecanismos de lesão são provenientes de culturas de células. Acredita-se que as variantes de risco aumentam a expressão de canais ou poros na membrana celular permitindo o efluxo de potássio e consequente lesão celular (OLABISI et al., 2016; OLABISI e HENEGHAN, 2017). No entanto, estudos experimentais demonstram que a disfunção mitocondrial precede a depleção de potássio (MA et al., 2016; GRANADO et al., 2017) e nos lisossomos, promove a autofagia e morte celular (LAN et al., 2014).

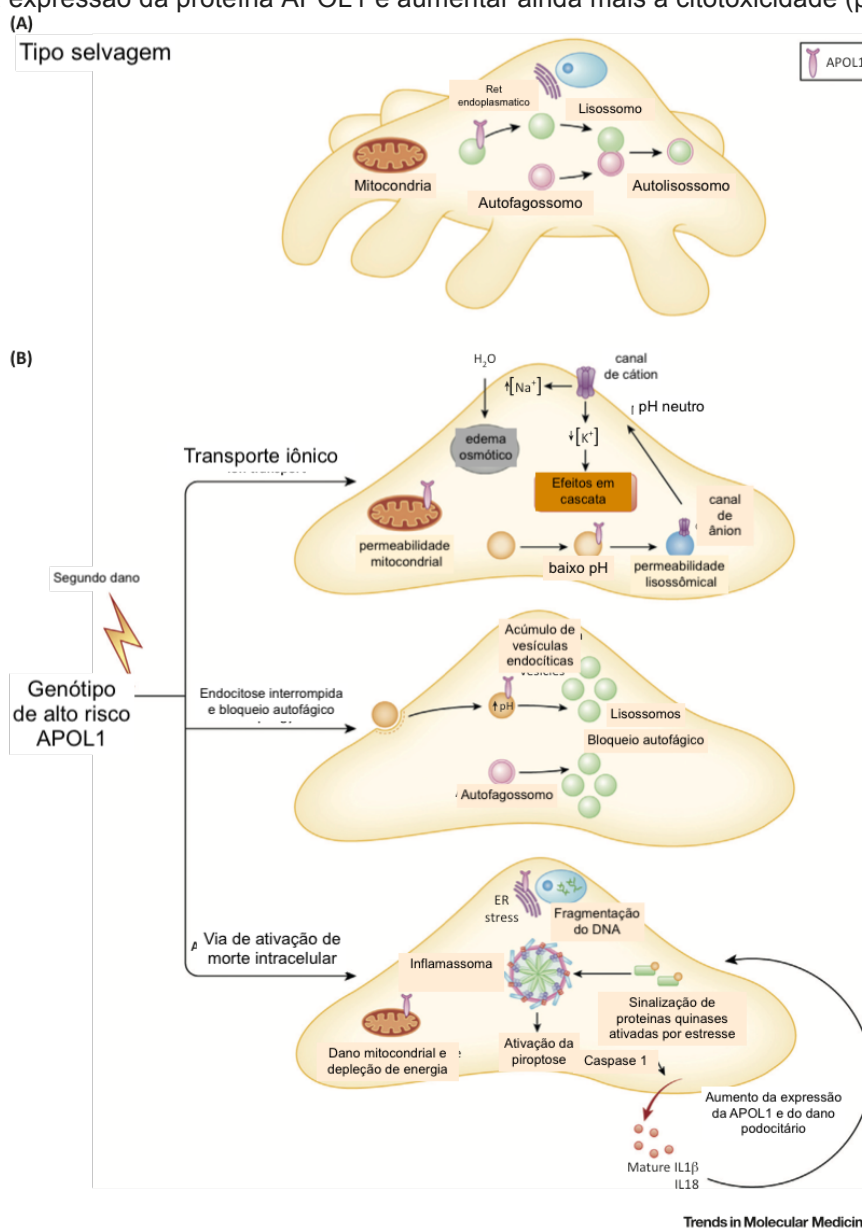
Recentemente foi relatado que o receptor do ativador do plasminogênio tipo uroquinase sérico (suPAR) e a integrina $\alpha_v\beta_3$ formam um complexo com a *APOL1* na membrana da célula podocitária, levando à lesão celular e à proteinúria em camundongos transgênicos (HAYEK et al., 2017). Em outro estudo, Beckerman *et al.* (2017) mostraram, em camundongos transgênicos, que os alelos de risco para *APOL1* induziram doença glomerular quando expressos nos podócitos ao serem expostos à tetraciclina (BECKERMAN et al., 2017). O modelo demonstra que os

podócitos de camundongos com os alelos G1/G2 manifestaram comprometimento do tráfego endolisossômico e do fluxo autofágico, possivelmente devido à acidificação do compartimento endossomal, e isso está associado ao acúmulo de autofagossomos. Além disso, houve ativação do inflamassoma, com geração de IL-1 β , indicativo de piroptose (Figura 8) (BECKERMAN e SUSZTAK, 2018).

Ressalta-se que as alterações estruturais e funcionais foram mais severas em camundongos expressando os alelos G1 e G2 em comparação com o alelo G0. Interessante notar que a indução de lesão glomerular foi dependente da passagem de um limiar de expressão gênica e foi provavelmente reversível quando a expressão gênica foi reduzida. Os autores ainda analisaram amostras de rins de indivíduos com DRC, definidos como aqueles com taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) menor que 60 ml/min/1,73 m², comparados com controles (BECKERMAN et al., 2017). Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que os alelos de risco para *APOL1* induzem a lesão glomerular principalmente quando estão com expressão aumentada, como ocorreria, por exemplo, no contexto da estimulação da via IFN, que se encontra exacerbada nos episódios de atividade nefrítica do LES (MEJIA-VILET et al., 2018).

O risco genético para DRC associada à *APOL1* em humanos é tradicionalmente autossômico recessivo. Os estudos de modelos animais são complicados pela ausência de *APOL1* nos não primatas. Poucos modelos animais testaram o estado heterozigótico, tipicamente uma condição livre de doença em humanos, no entanto um estudo recente mostrou que o modelo de camundongo transgênico com uma variante G0 protegeu os animais da perda podocitária associada a nefropatia do HIV, o que não foi visto nos que expressavam *APOL1*-G2 (BRUGGEMAN, TOOLE e SEDOR, 2019).

Figura 8 Fisiopatogenia da lesão podocitária decorrente da nefropatia da *APOL1* após segundo gatilho. Modificado de Beckerman e Suztak, 2018. Mecanismos Intracelulares de Citotoxicidade Induzida por Apolipoproteína L1 (*APOL1*). (A) Nos podócitos selvagens, o alelo de referência *APOL1* não afeta a endocitose e a autofagia. A autofagia inibe a piroptose e as funções do retículo mitocondrial e endoplasmático (ER) são mantidas. (B) Após a exposição a um segundo insulto, é iniciada uma cascata de eventos nos podócitos que expressam dois alelos de risco *APOL1*, culminando na perda de podócitos e desdiferenciação. A *APOL1* se insere nas membranas e cria ânion (quando exposto a pH baixo, por exemplo, no lisossomo) ou canal de cátion (quando exposto a pH neutro, por exemplo, na membrana plasmática). Esses canais mediam os fluxos de íons que induzem o inchaço osmótico e ativam ainda as vias intracelulares tóxicas (painel superior). Devido ao tráfego endo-lisossômico defeituoso e à acidificação prejudicada dos vacúolos endocíticos, há um defeito na maturação do autofagossomo, resultando em bloqueio da autofagia e acúmulo de vacúolos endocíticos (painel do meio). Consequentemente, várias vias intracelulares são ativadas; incluindo sinalização de proteína quinase ativada por estresse, dano mitocondrial e ER e ativação de inflamassoma, resultando em morte celular inflamatória mediada por caspase1, piroptose. A piroptose envolve a liberação de IL1 e IL18, fragmentação do DNA e, por um loop de feedback positivo, pode aumentar a expressão da proteína *APOL1* e aumentar ainda mais a citotoxicidade (painel inferior).



Embriões de *zebrafish*, com supressão do gene *APOL1* pela CRISPR/Cas9, revelaram perda de podócitos e defeitos de filtração glomerular que foram corrigidos

pela expressão de RNAm de *APOL1* do tipo selvagem – G0 (ANDERSON et al., 2015). No entanto, a adição do alelo G1 ou G2 não amenizaram defeitos causados pela supressão da *APOL1* (ANDERSON et al., 2015). Sabe-se que os afro-americanos com 1 ou 2 alelos de risco do *APOL1* necessitam de terapia renal substitutiva em média de cinco a nove anos mais cedo do que aqueles com alelos selvagens, respectivamente (TZUR et al., 2012). Além disso, em um estudo com pacientes portadores de DRCT decorrente de NL, à medida que o número de alelos do *APOL1* aumentou, o período de tempo até o início de terapia renal substitutiva foi reduzido, indicando que a presença de um ou mais alelos do *APOL1* funcionava como fator de progressão da nefropatia (FREEDMAN et al., 2014).

Recentemente foi publicado um elegante estudo utilizando edição do genoma por CRISPR-Cas9 em células-tronco humanas pluripotentes. Os autores conseguiram inserir a variante G1 de alto risco da *APOL1* no locus genômico nativo. As células-tronco induzidas com as variantes G0 e G1 diferenciaram-se em organoides renais contendo estruturas semelhantes a néfrons com células epiteliais glomerulares, túbulos proximais, túbulos distais e células endoteliais. Os organoides expressaram *APOL1* detectável somente após exposição ao IFN- γ . O sequenciamento de RNA de única célula revelou diferenças específicas do tipo de célula na resposta organoide G1 à indução de *APOL1*. O estresse adicional da exposição à tunicamicina levou ao aumento da desdiferenciação das células epiteliais glomerulares nos organoides G1 em comparação ao modelo com G0, o que mimetiza o segundo insulto, importante para estudos futuros sobre a patogenia da *APOL1* (LIU et al., 2020).

2.7 DOENÇA RENAL CRÔNICA ASSOCIADA AO *APOL1* NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

Como abordado anteriormente, populações sul-americanas têm contribuições variáveis de ancestrais da África Ocidental devido ao tráfico de escravos que ocorreu há 500 anos. Os brasileiros são uma população miscigenada, com diferentes proporções de ancestralidade ameríndia, africana e europeia. A hipótese atual aponta que as variantes *APOL1* G1 e G2 surgiram nos últimos 10.000 anos na África Subsaariana, provavelmente na África Ocidental, onde foram submetidas a uma intensa seleção positiva, uma vez que a presença de um ou mais

alelos de risco (G1 ou G2) forneceria resistência ao *Trypanosoma brucei rhodesiense* (GENOVESE et al., 2010; LIMOU et al., 2014). A América do Sul provavelmente foi povoada entre 15.000 e 13.500 anos atrás, provavelmente por uma única onda de migração (ROTHHAMMER; DILLEHAY, 2009), antes da seleção positiva para *APOL1*. Portanto, acredita-se que a influência da ancestralidade africana veio do comércio de escravos transatlântico durante os séculos XVI a XIX. Populações asiáticas, nativas americanas e caucasianas geralmente têm frequências muito baixas das variantes de risco de *APOL1* em pacientes com DRC (FRANCESCHINI et al., 2014; UDLER et al., 2015; YADAV et al., 2016; PENG, WANG e LI, 2017). Entre os índios americanos, os alelos de risco derivados de africanos na sequência de DNA das regiões codificadoras de *APOL1* estavam ausentes, fornecendo evidências adicionais de que essas variantes de risco estão presentes apenas naqueles com ancestralidade africana recente (FRANCESCHINI et al., 2014). No entanto, entre os hispânicos e latinos americanos, com ascendência africana, os dois genótipos de risco da *APOL1* estavam presentes em 2% dos indivíduos dessas etnias nos EUA (PARSA et al., 2013).

Um estudo na cidade de Salvador-BA, no Brasil, avaliou 45 casos de DRCT e identificou apenas um indivíduo (2,0%) com dois alelos de risco para *APOL1* (ALLADAGBIN et al., 2018). Recentemente, um estudo brasileiro avaliando 106 pacientes portadores de DRCT e 106 controles (parentes de primeiro grau) de etnia negra ou mista, detectaram frequências 10 vezes maiores de genótipos de risco renal em comparação com controles relacionados (9,4% *versus* 0,9%; OR=10,95, p=0,0017) Além disso, os portadores de dois alelos de risco iniciaram terapia renal substitutiva cerca de 12 anos mais cedo do que aqueles com nenhum alelo de risco. Este último estudo revela que a *APOL1* está associada à DRCT não diabética em brasileiros de maneira autossômica recessiva; no entanto, os casos avaliados foram todos de pacientes em estágio 5 da DRC (em terapia renal substitutiva) e aqueles com etiologia auto-imune para DRC, como NL, foram excluídos (RIELLA et al., 2019).

2.8 TRATAMENTO DA NEFRITE LÚPICA

O grande objetivo do tratamento da NL é evitar a evolução para DRC e DRCT, que acontece mais frequentemente nas classes proliferativas, principalmente na classe IV. As drogas imunossupressoras são utilizadas para inibir a formação de auto-anticorpos e minimizar o dano nos órgãos nobres, como é o caso dos rins. Em geral, após o diagnóstico da NL, segue-se a fase de tratamento de indução que dura cerca de 3 a 6 meses, podendo ser prolongado a depender da resposta. Normalmente, as drogas mais utilizadas nesta fase são a ciclofosfamida e o micofenolato de mofetil em conjunto com corticosteroides (HOUSSIAU et al., 2010; KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES, 2012; ALMAANI, MEARA e ROVIN, 2017). Em seguida à indução, passa-se à fase de manutenção, que é caracterizada por uma intensidade menor da imunossupressão e com menor toxicidade, porém a duração é mais prolongada. As drogas mais escolhidas para essa fase são o micofenolato de mofetil e a azatioprina (DOOLEY et al., 2011; TAMIROU et al., 2016). No entanto, existem esquemas alternativos utilizados principalmente nos casos refratários (ALMAANI, MEARA e ROVIN, 2017; KRONBICHLER et al., 2019).

Resposta precoce ao tratamento imunossupressor tem sido descrita como um dos principais fatores associados a bom prognóstico renal no longo prazo (HOUSSIAU et al., 2004, 2010; MALVAR et al., 2017; TEKTONIDOU, DASGUPTA e WARD, 2016). Por outro lado, falha ou refratariedade e recidivas frequentes são correlacionadas a DRC progressiva (PARIKH et al., 2014; KRONBICHLER et al., 2019). No entanto, o tratamento da NL expõe o paciente a riscos principalmente de infecção, o que aumenta a mortalidade consideravelmente nessa população (CERVERA et al., 2003; ALMAANI, MEARA e ROVIN, 2017).

Portanto, o tratamento da NL é desafiador e deve ser cuidadosamente escolhido e individualizado para a fase da doença em que se encontra o paciente, com o objetivo de não ser insuficiente nem exagerado para a necessidade de cada caso. Deste modo, o nefrologista precisa de indicadores clínicos, histológicos, laboratoriais que, em conjunto com biomarcadores genéticos possam guiar a escolha precisa do tratamento para o paciente com NL.

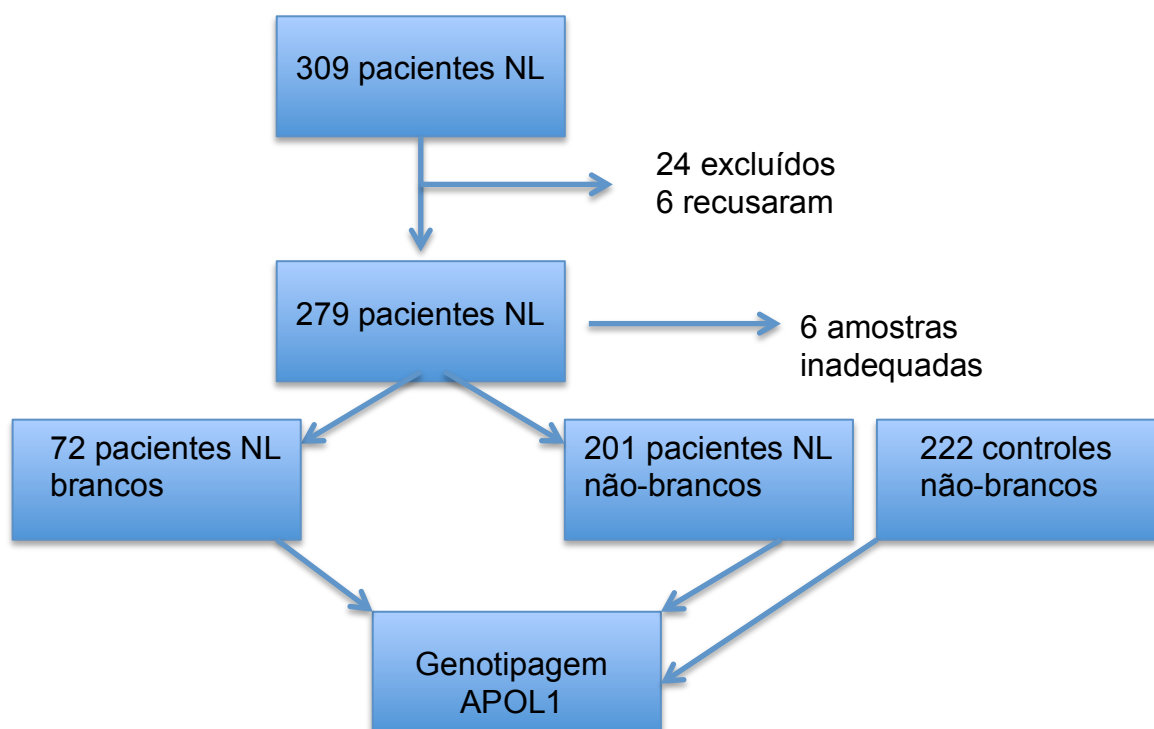
3 METODOLOGIA

3.1 SELEÇÃO, TAMANHO E COLETA DAS AMOSTRAS HUMANAS

No presente estudo, observacional tipo coorte retrospectiva e prospectiva, foram avaliados os pacientes portadores de NL acompanhados nos Ambulatórios de Glomerulopatias do Hospital das Clínicas de Pernambuco, do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, no Recife – PE e no Ambulatório de Glomerulopatias da Escola Paulista de Medicina (EPM) – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em São Paulo – SP.

Os participantes do estudo que assinaram termo de consentimento foram submetidos aos mesmos procedimentos habituais aplicados aos não participantes quanto aos procedimentos clínicos e biópsia renal. O estudo foi aprovado pelo CEP CCS/UFPE (parecer 1.712.037) e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP, relatório 2.568.450) e realizado de acordo com a Declaração de Helsinque.

Figure 9 Fluxograma dos pacientes com NL dos três centros brasileiros e controles saudáveis não-brancos.



No total, 309 pacientes com diagnóstico prévio de NL foram recrutados entre agosto de 2015 e dezembro de 2018. Todos eram maiores de 18 anos de idade, não relacionados, preenchiam os critérios de classificação clínica do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)* (PETRI et al., 2012) e apresentavam sorologias negativas para hepatite B, hepatite C, HIV e sífilis. Seis pacientes que se recusaram a participar e 24 que apresentaram padrões histológicos de GN não lúpica na biópsia renal (GN membranosa idiopática, GESF, nefropatia por IgA, vasculite ou glomerulopatia colapsante) ou com <6 meses de acompanhamento após indução foram excluídos. Para análise do polimorfismo, utilizamos os pacientes dos três centros, com coletas entre agosto 2015 e julho de 2018, totalizando 279 pacientes. Seis pacientes com amostra inadequada e 72 com raça branca auto-declarada foram excluídos. Assim, 201 pacientes com NL na biópsia renal inicial com base nas diretrizes da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) foram analisados. No entanto, para análise das características demográficas, clínicas e histológicas associadas a DRC, utilizamos dados apenas dos pacientes de Pernambuco, brancos e não-brancos, com amostra de DNA analisada ou não, e que foram recrutados até dezembro de 2018, totalizando 280 pacientes com NL. A identificação da raça foi realizada pelo paciente no momento da entrevista, dadas as opções previstas no questionário clínico. Em caso de dúvida, o examinador fez a classificação.

As biópsias renais, já realizadas no momento do recrutamento, tinham seus laudos assinados pelo patologista responsável de cada serviço. No HC/UFPE, mais de 90% das biópsias e, na EPM/UNIFESP, 100% delas foram analisadas pelo nefropatologista Dr. Luiz Moura. Enquanto que no IMIP, o nefropatologista responsável foi o Dr. Luiz da Fonte.

Os dados históricos a respeito dos exames, tratamento e resposta a terapia foram registrados a partir da revisão do prontuário e os participantes foram acompanhados prospectivamente até fevereiro de 2019. De um modo geral, durante as exacerbações agudas do LES, os casos com NL foram submetidos à terapia de indução com pulsoterapia com metilprednisolona intravenosa, seguida por prednisona oral e seis sessões de pulsoterapia com ciclofosfamida intravenosa 0,5-1g ou micofenolato de mofetil de 2-3 gramas ao dia (ou doses equivalentes de micofenolato de sódio). Após a indução, os casos receberam terapia de manutenção com azatioprina ou micofenolato, com base em protocolos estabelecidos.

Hidroxicloroquina foi usada por mais de 80% dos pacientes com NL. A resposta renal à terapia, com base na alteração da proteinúria e da concentração sérica de creatinina de acordo com as diretrizes do KDIGO, foi classificada como resposta completa, parcial ou ausente, e com DRC nos estágios 3 ou 4 (TFGe sustentada <60 ou <30 mL/min/1,73m², usando a equação CKD-Epidemiology Collaboration [EPI], respectivamente) e DRCT (KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) GLOMERULONEPHRITIS WORK GROUP., 2012). Aqueles com história de hipertensão essencial ou com leituras de pressão arterial ≥ 140 mmHg de pressão sistólica e/ou ≥ 90 mmHg de diastólica em pelo menos duas ocasiões foram considerados portadores de hipertensão arterial. A NL refratária foi definida como a ausência de resposta completa ou parcial após dois tratamentos de indução diferentes, incluindo pelo menos um ciclo de tratamento com ciclofosfamida. Alguns dos casos refratários receberam ciclosporina em associação com micofenolato ou rituximabe.

Um total de 222 doadores de sangue saudáveis, não brancos, não relacionados, dos Estados de Pernambuco e São Paulo, foram considerados como controles saudáveis. Esse grupo consistiu de indivíduos maiores de 18 anos, não aparentados aos pacientes e que não apresentavam doenças autoimunes, inflamatórias ou qualquer tipo de doença renal. A classificação da raça também foi realizada pelo próprio indivíduo, no momento da abordagem para inclusão no estudo.

3.2 ISOLAMENTO DO DNA

Foram realizadas as extrações de DNA para genotipagem do sangue periférico dos indivíduos participantes da pesquisa e esses foram posteriormente organizados em banco de amostras (-20° C). O DNA genômico foi isolado do sangue total anticoagulado coletado em tubos de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) utilizando a metodologia de mini Salting out (Sambrook & Russel, 2006). As amostras de DNA extraídas foram quantificadas em Nanodrop para a verificação da concentração e pureza do material extraído.

3.3 SELEÇÃO DOS SNPS E TECNOLOGIAS PARA GENOTIPAGEM

Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) na variante de risco de nefropatia G1 (rs73885319; rs60910145) e um indel para a variante de risco de nefropatia G2 (rs71785313) foram selecionados de acordo com a literatura e seu impacto relevante na NL. As amostras de DNA genômico de pacientes e controles saudáveis foram enviadas, em gelo, para a Wake Forest School of Medicine, estado da Carolina do Norte - EUA, em colaboração com o Dr. Barry Freedman, onde foi realizada a genotipagem *APOL1* usando ensaios de sondas Taqman® na plataforma ViiA 7 (Applied Biosystems for Life Tech). Os participantes que apresentaram os dois genótipos ARRs (G1G2, G1G1 ou G2G2) foram considerados de alto risco para *APOL1*.

3.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

As características dos participantes foram comparadas usando o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney para variáveis contínuas, como apropriado, ou o teste exato de Fisher para variáveis categóricas. Análises de regressão de risco proporcional de Cox univariada e multivariada foram realizadas para identificar preditores independentes de DRC estágio ≥ 4 . Covariáveis com valor de $p < 0,05$ na análise univariada foram incluídas na análise multivariada de riscos proporcionais de Cox. O software SPSS foi utilizado para realizar a regressão logística. Em todas as análises, os valores de p são bicaudais e todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e adicionados ao modelo multivariado. Dada a baixa frequência de duas variantes de risco, as curvas de sobrevida de Kaplan Meier foram calculadas separadamente para *APOL1* ARR=0 e ARR ≥ 1 , e as diferenças foram calculadas usando o teste *logrank*. Os modelos de riscos proporcionais de Cox foram calculados para estimar uma razão de risco (HR) para ARR=0 vs. ARR ≥ 1 . A comparação de ARR=0 vs. ARR ≥ 1 foi a inferência *a priori* primária. A significância foi estabelecida em $p < 0,05$. Os dados resultantes da relação entre dados clínicos e a genotipagem foram analisados com o programa GraphPad Prism (versão 8.1, 2018. La Jolla, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1



Lupus (2020) 29, 83–91

journals.sagepub.com/home/lup

LUPUS AROUND THE WORLD

Initial renal histology and early response predict outcomes of Brazilian lupus nephritis patients

G Vajgel^{1,2} , CBL Oliveira^{1,3} , DMN Costa^{1,3}, MAGM Cavalcante¹, LM Valente¹, R Sesso⁴, S Crovella^{2,5}, GM Kirsztajn⁴ and P Sandrin-Garcia^{2,5}

¹Division of Nephrology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ²Molecular Biology Laboratory, Keizo Asami Immunopathology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ³Division of Nephrology, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Brazil; ⁴Division of Nephrology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil; and ⁵Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Objective: We analyzed baseline and follow-up characteristics related to poorer renal outcomes in a Brazilian cohort of admixture race patients with lupus nephritis. **Methods:** Overall, 280 outpatients with a diagnosis of systemic lupus erythematosus and previous kidney biopsy of lupus nephritis were recruited from August 2015 to December 2018 and had baseline laboratory and histologic data retrospectively analyzed; patients were then followed-up and data were recorded. The main outcome measure was the estimated glomerular filtration rate at last follow-up. Secondary analyses assessed the impact of initial kidney histology and treatment in long-term kidney survival. **Results:** Median duration of lupus nephritis was 60 months (interquartile range: 27–120); 40 (14.3%) patients presented progressive chronic kidney disease (estimated glomerular filtration rate <30 and ≥ 10 ml/min/1.73 m²) or end-stage kidney disease at last visit. Adjusted logistic regression analysis showed that class IV lupus nephritis (odds ratio 14.91; 95% confidence interval 1.77–125.99; $p = 0.01$) and interstitial fibrosis $\geq 25\%$ at initial biopsy (odds ratio 5.87; 95% confidence interval 1.32–26.16; $p = 0.02$), lack of complete or partial response at 12 months (odds ratio 16.3; 95% confidence interval 3.74–71.43; $p < 0.001$), and a second renal flare (odds ratio 4.49; 95% confidence interval 1.10–18.44; $p = 0.04$) were predictors of progressive chronic kidney disease. In a Kaplan-Meier survival curve we found that class IV lupus nephritis and interstitial fibrosis $\geq 25\%$ were significantly associated with end-stage kidney disease throughout follow-up (hazard ratio 2.96; 95% confidence interval 1.3–7.0; $p = 0.036$ and hazard ratio 4.96; 95% confidence interval 1.9–12.9; $p < 0.0001$, respectively). **Conclusion:** In this large cohort of admixture race patients, class IV lupus nephritis and chronic interstitial damage at initial renal biopsy together with non-response after 1 year of therapy and relapse were associated with worse long-term renal outcomes. *Lupus* (2020) 29, 83–91.

Key words: Nephritis; renal lupus; systemic lupus erythematosus

Introduction

Lupus nephritis (LN) affects 60–70% of lupus patients depending on ethnicity, age at onset, and sex.^{1,2} Afro-Americans, Hispanics, and Asians have higher risk for worse renal outcomes compared to Caucasians. Although that might be due to socioeconomic influences, genetics are known to be decisive factors involved.^{1,3–5} Despite advances

in immunosuppressive drugs in the last few decades, less than 50% of patients will present complete clinical remission and about 40% of those with class III–V LN will have some degree of renal dysfunction, including end-stage kidney disease (ESKD).^{6,7} The International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS)⁸ classification of LN is currently the gold standard for choosing the appropriate therapy; however, individuals from the same LN class could have different responses to the same treatment.^{6,9,10} Rijnink et al. recently showed it was not the LN class but the individual characterization of histological lesions that could predict worse prognosis for LN patients.¹¹ Thus, clinicians need novel indicators that could guide more or less aggressive therapy.

Correspondence to: Dr Gisele Vajgel, Division of Nephrology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Pernambuco, Brazil.

Email: giselevajgel@hotmail.com

Received 17 July 2019; accepted 5 November 2019

© The Author(s), 2019. Article reuse guidelines: sagepub.com/journals-permissions

10.1177/0961203319890681

Admixture populations, such as that of Brazil, lack long-term outcome studies or are usually ascribed to a Hispanic ethnicity, regardless of the minor Spanish ancestry within the country. The Brazilian population is heterogeneous as a result of five centuries of interethnic crosses between people from three continents: Amerindians, Europeans (mainly Portuguese and Italian colonizers), and Africans.^{12–14} Thus, we have studied the course of long-term kidney function in a large admixture cohort of retrospectively and prospectively followed-up subjects with LN, aiming to analyze clinical, demographic, and histological renal characteristics that could predict long-term outcomes.

Materials and methods

Patient selection and covariates

The present cohort of LN patients was enrolled from two public outpatient clinics in Northeastern Brazil specializing in treatment of glomerulonephritis (GN), Federal University of Pernambuco and the Professor Fernando Figueira Integrative Medicine Institute (Recife, Pernambuco). All cases provided written informed consent. The study was approved by the Brazilian National Committee for Ethics in Research (report number: 2.568.450) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Overall, 308 patients with LN were enrolled during routine consults between August 2015 and December 2018. About two-thirds of those were on maintenance and the remaining undergoing induction therapy. Initial and last follow-up laboratory data were retrospectively recorded from medical charts. All subjects were ≥ 18 years of age, unrelated, met the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria, and had negative serologies for hepatitis B, hepatitis C, HIV, and syphilis. We excluded 28 patients with non-LN histologic patterns on kidney biopsy (including lupus podocitopathy and collapsing GN) or with less than 6 months of follow-up. The remaining 280 patients were analyzed. Although nine patients had initial biopsies with fewer than five glomeruli, one of them had a second biopsy and the others had a clear clinical presentation of LN, thus they were included in the overall analysis. Classification of LN on kidney biopsy was based on the ISN/RPS guidelines. There were no class I or class VI (more than 90% of glomeruli globally sclerosed) LN cases. Included cases were in one of

the following classes: class II, mesangial proliferative LN, showing purely mesangial hyper-cellularity of any degree and/or mesangial matrix expansion; class III, focal LN involving $< 50\%$ of the total number of glomeruli; class IV, diffuse segmental or global LN involving 50% or more of the total number of glomeruli either segmentally or globally. We did not report sub-classification of class IV into diffuse segmental and diffuse global because a panel of nephropathology experts has recently abandoned that.¹⁵ Class V is membranous LN. The activity index (AI) and the chronicity index (CI) of the biopsy were also calculated according to the National Institutes of Health scores.^{8,16}

Race was defined based on self-perception and categorized as white and non-white (mixed or black); Amerindians and Asians were not present.¹⁷ Familiar income was not analyzed because more than 90% of national public health system (Sistema Único de Saúde, SUS) users earn less than US\$100 monthly, but all the immunosuppressive medications are provided by the state government of Pernambuco.¹⁸ Those with a history of essential hypertension or with blood pressure readings ≥ 140 mmHg systolic and/or ≥ 90 mmHg diastolic on at least two occasions were considered to have hypertension.

Treatment protocols and outcomes

During acute flares of systemic lupus erythematosus, cases with LN underwent induction therapy with intravenous methylprednisolone, followed by oral prednisone and six infusions of intravenous cyclophosphamide 0.5–1 g or mycophenolate mofetil (MMF) 2–3 g/day. Post-induction, the patients received maintenance therapy with either azathioprine or MMF, based on established protocols.^{7,9,19} Hydroxychloroquine was taken by more than 80% of LN cases and almost 67% of them were receiving angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor antagonist at recruitment. Kidney response to first induction therapy, based on the change in proteinuria, and serum creatinine (Scr) concentration according to the Kidney Disease Improving Outcomes guidelines, was classified as a complete or partial response, non-responsive and with progressive CKD if there was Stage 4 (sustained estimated glomerular filtration rate (eGFR) < 30 mL/min/1.73 m² using the CKD-Epidemiology Collaboration equation) or ESKD (sustained eGFR < 10 mL/min/1.73 m² or on renal replacement therapy).²⁰ Refractory LN was defined as lack of a complete or partial response after two

different induction treatments within 1 year, including at least one course of cyclophosphamide. Some of those may have received cyclosporine plus MMF or rituximab.^{21,22}

Statistical methods

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism software (version 8.1.1, La Jolla, CA, USA). Continuous variables were expressed as either mean (standard deviation) or median (interquartile range (IQR): 25–75th percentiles) and categorical variables as percentages. For continuous variables, differences between groups were assessed by the Student *t* test for normally distributed data and by the Mann-Whitney test for non-normally distributed data. For categorical data, differences between groups were evaluated using the Fisher test. Survival curves were constructed according to the Kaplan-Meier method to evaluate histological aspects associated with ESKD. The log rank test was used to compare the curves and the Cox proportional hazards analysis was used to estimate hazard ratios for ESKD. Univariate and multivariable logistic regression analyses were performed to identify independent predictors of progressive CKD (eGFR < 30 ml/min/1.73 m² or ESKD), as a binomial response. Covariates with a *p* value < 0.05 in the univariate analysis were included in the subsequent logistic regression. A prediction model was built to express the probability of CKD. The SPSS software version 25.0 (IBM, Armonk, NY) was used to perform the logistic regression analyses. In all analyses, *p* values are two tailed and all *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

The characteristics of all patients are displayed in Table 1. The vast majority of patients from this cohort were non-white, young females, non-diabetic, non-smokers, almost 60% had hypertension usually due to LN and most were high school graduates. Median time of LN diagnosis was 60 months (IQR: 27–120); at initial presentation they had a normal range of Scr but nephrotic proteinuria with low serum albumin. Overall, 270 LN patients had an initial kidney biopsy analyzed based on ISN/RPS classification (Table 2). Class IV (+/-V) LN was the most prevalent classification (58.5%); almost half of all patients had crescents and a membranous component (pure or associated with class III or IV). At initial biopsy, patients had

Table 1 LN patients' baseline and follow-up characteristics

	All patients N = 280
<i>Demographics</i>	
Age, years	
Mean ± SD	35.0 ± 10.5
Age at onset, years	
Mean ± SD	29.4 ± 9.9
Female sex, n (%)	255 (91.1)
Race non-white, n (%)	209 (74.6)
Less than high school graduation, n (%) (n = 267)	108 (40.4)
Mean (SD) BMI, kg/m ² (n = 277)	25.1 ± 5.0
Hypertension at recruitment, n (%)	161 (59.6)
Diabetes, n (%)	10 (3.6)
Smoking, current, n (%) (n = 223)	10 (4.5)
Mean SLICC criteria (SD)	6.8 ± 1.9
Median duration of SLE (IQR), mos.	86.5 (46–143)
Median duration of LN (IQR), mos.	60 (27–120)
Median duration from SLE to LN (IQR), mos.	0.0 (0–28)
Family history of SLE, n (%) (n = 264)	47 (17.8)
<i>Initial laboratory results</i>	
ANA +, n (%) (n = 247)	240 (97.2)
dsAnti-DNA +, n (%) (n = 94)	66 (70.2)
C3 < 90 mg/dL, n (%) (n = 166)	127 (76.5)
C4 < 10 mg/dL, n (%) (n = 155)	87 (56.1)
Median SCr (IQR), mg/dL (n = 229)	1.00 (0.7–2.1)
Median CKD-EPI eGFR (IQR), ml/min (n = 227)	74 (31–118)
Mean (SD) SAlb, mg/dL (n = 157)	2.68 ± 0.77
Median Proteinuria (IQR), g/day (n = 216)	3.50 (1.80–6.48)
<i>Treatment</i>	
Induction: cyclophosphamide, n (%) (n = 278)	202 (72.7)
Maintenance: mycophenolate mofetil, n (%) (n = 269)	231 (85.9)
Hydroxychloroquine, n (%) (n = 279)	235 (84.2)
ACEi/ARB, n (%) (n = 273)	235 (66.7)
<i>Outcomes at last follow-up</i>	
Median SCr (IQR), mg/dL	0.80 (0.70–1.30)
Median eGFR (IQR)	92 (54–115)
Mean SAlb (SD), mg/dL (n = 251)	3.88 ± 0.57
Median Proteinuria (IQR), g/day (n = 276)	0.40 (0.14–1.18)
Complete/partial response, n (%)	140/51 (50.0/18.2)
Flare after response, n (%)	116 (47.1)
Refractory nephritis, n (%)	45 (16.2)
eGFR < 60 and ≥ 30 ml/min per 1.73 m ² , n (%)	33 (11.8)
eGFR < 30 and ≥ 10 ml/min per 1.73 m ² , n (%)	14 (5)
ESKD, n (%)	26 (9.3)
Median (IQR) time to ESKD, in months	78 (14.0–132.0)

CKD, chronic kidney disease; BMI, body mass index; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria; SLE, systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis; IQR, interquartile range; SCr, serum creatinine; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, SAlb, serum albuminemia; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor antagonist; ESKD, end-stage kidney disease.

The number of patients with available information is indicated in parentheses, if other than 280.

more activity than chronicity, namely a median AI of 6.0 (IQR: 2–8) and a median CI of 2.0 (IQR: 2–4), and tubular atrophy (TA) ≥ 25% in 14.7% and interstitial fibrosis (IF) ≥ 25% in 21.5%. The great majority of patients received

Table 2 Initial biopsy from LN patients

<i>Initial kidney biopsy</i>	
Proliferative class, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 270)	224 (83.3)
Classes (<i>n</i> = 270)	
LN class II, <i>n</i> (%)	4 (1.5)
LN class III (+/-V), <i>n</i> (%)	65 (24.1)
LN class IV (+/-V), <i>n</i> (%)	158 (58.5)
LN class V <i>n</i> (%)	43 (15.9)
Median number of glomeruli (IQR), <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 237)	14 (10–21)
Median global glomerular sclerosis (IQR), % (<i>n</i> = 209)	0 (0–15)
Presence of crescents, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 247)	112 (45.3)
Median % of crescents (<i>n</i> = 239)	0.0 (0.0–22.0)
Presence of synechia to BC, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 161)	94 (58.4)
Presence of fibrinoid necrosis, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 244)	10 (4.1)
Presence hyaline thrombi, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 243)	28 (11.5)
Presence of TMA <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 244)	13 (5.3)
Presence of membranous component, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 255)	123 (48.2)
Presence of TIN, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 241)	26 (10.8)
Tubular atrophy $\geq 25\%$, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 225)	33 (14.7)
Interstitial fibrosis $\geq 25\%$, <i>n</i> (%) (<i>n</i> = 228)	49 (21.5)
Median activity index (IQR) (<i>n</i> = 104)	6.0 (2.0–8.0)
Median chronicity index (IQR) (<i>n</i> = 102)	2.0 (2.0–4.0)

BC, Bowman capsule; TMA, thrombotic microangiopathy; TIN, tubule-interstitial nephritis; IQR: interquartile range.

cyclophosphamide as induction therapy and MMF as maintenance treatment. At last follow-up, 14 (5%) of the patients presented with progressive CKD (eGFR <30 and ≥ 10 ml/min/1.73 m²) and 26 (9.3%) with ESKD (Table 1).

Among the recorded baseline variables, univariate analysis indicated that hypertension at recruitment, higher Scr, low eGFR at onset, class IV LN, median percentage of global glomerulosclerosis and crescents, TA and IF $\geq 25\%$ and higher CI in the initial biopsy were associated with a risk for eGFR <30 ml/min/1.73 m² (Table 3). Ethnicity was not a significant factor to predict renal outcomes in this admixture cohort with similar socioeconomic background. Among follow-up characteristics, the treatment regimen was different between groups, but this was excluded from multivariable analysis as it was directly related to the severity of the stage of clinical presentation. Time-scaled responses and refractoriness to treatment were significantly different between groups, but only the 12-month response was entered into the multivariable analysis because of the inter-correlation (Table 4).

Univariate logistic regression was performed and covariates with a *p* value <0.05 in the non-adjusted analysis were included in the subsequent multivariable analysis. The percentage of sclerotic glomeruli did not reach statistical significance (*p* = 0.82), so we tested the multivariable logistic regression: hypertension, median eGFR (and not Scr because

they are related), class IV LN, percentage of crescents, IF (and not TA and CI as they are correlated), response to treatment at 12 months and at least a second episode of flare after initial response (Table 5). Response (complete or partial) to treatment correlated well to renal outcomes at 6, 12, and 24 months and last follow-up in the non-adjusted analysis. Patients with refractory nephritis and those who presented with at least one episode of flare after remission also had more chance to finish with eGFR <30 ml/min/1.73 m² or ESKD. For the multivariable analysis, we chose response at 12 months as the marker for response to treatment as it was associated with progressive CKD based on previous studies.^{23,24} The rest of the time-scaled and refractoriness responses were not independent from each other, which could lead to confusion if included in the model.

When the clinical-histologic and follow-up covariates were considered in the multivariable logistic regression analysis, histological findings such as class IV LN (odds ratio (OR) 14.91; 95% confidence interval (CI) 1.77–125.99; *p* = 0.01) and IF $\geq 25\%$ (OR 5.87; 95% CI, 1.32–26.16; *p* = 0.02) at initial biopsy were significant covariates for eGFR <30 ml/min/1.73 m² or ESKD (Table 5). Lack of complete or partial response at 12 months (OR 16.3; 95% CI 3.74–71.43; *p* < 0.001) and at least a second episode of flare (OR 4.49; 95% CI, 1.10–18.44; *p* = 0.04) were also significant predictors of progressive CKD.

A prediction model built with these four variables is as follows:

$$P(CKD) = \frac{1}{1 + e^{-4.864 + 2.702 \times \text{class IV} + 1.770 \times \text{IF} + 2.780 \times \text{lack of response} + 1.503 \times \text{flare}}}$$

In Figure 1, we present Kaplan-Meier renal survival curves according to the findings in the initial biopsy. From that we excluded analysis cases with insufficient material for LN classification and those without data about IF. The presence of class IV LN and IF $\geq 25\%$ were significantly associated with ESKD throughout follow-up (hazard ratio (HR) 2.96; 95% CI 1.3–7.0; *p* = 0.036 and HR 4.96; 95% CI 1.9–12.9; *p* < 0.0001, respectively).

Discussion

“Race is the product of a marriage of social and biologic influences” wrote Cooper et al.²⁵ Although it has been hard to analyze ancestry without

Table 3 Lupus nephritis patients' characteristics based on last renal function

	<i>Last eGFR</i> ≤30 ml min/1.73 m ² n = 40	<i>Last eGFR</i> ≥30 ml min/1.73 m ² n = 240	p value
Demographics			
Age, years			
Mean ± SD	36.03 ± 11.8	34.78 ± 10.3	0.49
Age at onset, years			
Mean ± SD	28.75 ± 11.8	29.49 ± 9.6	0.66
Female sex, n (%)	35 (87.5)	220 (91.7)	0.37
Race non-white, n (%)	29 (72.5)	180 (75)	0.70
Less than high school graduation, n (%)	16 (45.7)	92 (39.7)	0.58
Mean (SD) BMI, kg/m ²	24.1 ± 5.6	25.3 ± 4.9	0.17
Hypertension at enrollment, n (%)	35 (87.5)	126 (52.5)	<0.0001
Diabetes, n (%)	3 (7.50)	7 (2.92)	0.16
Smoking, current, n (%)	1 (3.4)	9 (4.6)	0.46
Mean SLICC criteria (SD)	6.5 ± 1.7	6.9 ± 1.9	0.22
Median duration of LN (IQR), mos	92.5 (39–140)	58.5 (24–108)	0.15
Initial laboratory results			
Median SCr (IQR), mg/dL	2.00, n = 32 (0.8–4.2)	0.90, n = 197 (0.7–2.0)	0.01
Median eGFR (IQR), ml/min	35, n = 31 (15–101)	80, n = 196 (31–117)	0.02
Mean (SD) SAlb, mg/dL	2.90 ± 0.6	2.65 ± 0.79	0.19
Median proteinuria (IQR), g/day	3.90, n = 22 (2.2–7.8)	3.50, n = 194 (1.8–6.5)	0.24
Initial kidney biopsy			
Proliferative class, n (%)	56 (81.2)	167 (83.9)	0.58
Classes (overall test)			0.11 ^a
LN class II, n (%)	0 (0.0)	4 (1.7)	1.00
LN class III (+/-V), n (%)	6 (15.8)	59 (25.4)	0.23
LN class IV (+/-V), n (%)	29 (76.3)	129 (55.6)	0.02
LN class V n (%)	3 (7.9)	40 (17.2)	0.23
Median number of glomeruli (IQR), n (%)	13 (9–21)	15 (10–21)	0.73
Median global glomerular sclerosis (IQR), n (%)	16.7, n = 28 (0.0–31.2)	0.0, n = 181 (0.0–14.3)	0.001
Presence of crescents, n (%)	18 (56.2)	94 (43.7)	0.19
Median % of crescents	13.5, n = 32 (0.0–48.6)	0.0, n = 208 (0.0–18.0)	0.02
Presence of synechia to BC, n (%)	16 (76.2)	78 (56.1)	0.10
Presence of fibrinoid necrosis, n (%)	1 (3.1)	9 (4.2)	1.00
Presence hyaline thrombi, n (%)	2 (6.2)	26 (12.3)	0.55
Presence of TMA, n (%)	3 (9.4)	10 (4.7)	0.39
Presence of membranous component, n (%)	14 (41.2)	109 (49.3)	0.46
Presence of TIN, n (%)	5 (15.6)	21 (10.0)	0.36
Tubular atrophy ≥ 25%, n (%)	16 (48.5)	17 (8.9)	<0.0001
Interstitial fibrosis ≥ 25%, n (%)	19 (55.9)	30 (15.5)	<0.0001
Median activity index (IQR)	6.5, n = 16 (3.2–9.7)	6.0, n = 88 (2.5–8.0)	0.10
Median chronicity index (IQR)	5.0, n = 16 (3.0–6.8)	2.0, n = 86 (2.0–4.0)	<0.0001

^aChi-square test.

T-test was used for normally distributed continuous variables and reported as mean and standard deviation (±SD); Mann-Whitney test was used for non-normally distributed continuous variables and displayed as median and 25–75th percentile; Fisher's exact test was used for categorical variables.

CKD, chronic kidney disease; BMI, body mass index; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification; SLE, systemic lupus erythematosus, LN, lupus nephritis; IQR, interquartile range; SCr, serum creatinine; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, SAlb, serum albuminemia; BC, Bowman capsule; TMA, thrombotic microangiopathy; TIN, tubule-interstitial nephritis.

socioeconomic bias,^{3,26} the present study gathered patients attended by the Brazilian public health system (SUS) whose users are known to have a monthly income of less than US\$100 per person,¹⁸ but had access to free immunosuppressive drugs. Different from several previous cohorts that found more cases of ESKD among non-white LN

biopsies, we found no significant differences in clinical-laboratory and histological characteristics at onset and no different renal outcomes among self-declared white and non-white races.^{3,11,27} There was no ancestry informative marker (AIM) analysis, but we previously reported no significant difference in ancestries based on skin pigmentation

Table 4 Lupus nephritis patients' first treatment and response based on last renal function

	Last eGFR <30 ml min/1.73 m ² n = 40	Last eGFR ≥30 ml min/1.73 m ² n = 240	p value
Treatment			
Induction: cyclophosphamide, n (%)	36 (90.0)	166 (69.8)	0.01
Maintenance: mycophenolate mofetil, n (%)	32 (82.0)	199 (86.5)	0.46
Hydroxychloroquine, n (%)	29 (72.5)	206 (86.2)	0.04
ACEi/ARB, n (%)	18 (47.4)	164 (69.8)	0.01
Response to treatment			
Complete or partial response (6 mo), n (%)	5 (16.7)	143 (74.1)	<0.0001
Complete or partial response (12 mo), n (%)	6 (20.0)	157 (81.3)	<0.0001
Complete or partial response (24 mo), n (%)	6 (26.1)	106 (78.5)	<0.0001
Complete or partial response (last F/U), n (%)	0	191 (79.6)	<0.0001
Flare after response, n (%)	24 (64.9)	93 (44.5)	0.03
Refractory nephritis, n (%)	24 (60.0)	21 (8.8)	<0.0001

^cGFR, estimated glomerular filtration rate; ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor antagonist; F/U, follow-up.

Table 5 Univariate analysis and multivariable prediction model for CKD^a

Variables	Univariate			Multivariable		
	Regression coefficients βs.e. ^b	OR (95% CI)	p value	Regression coefficients βs.e. ^b	OR (95% CI)	p value
Hypertension	1.850 (0.495)	6.33 (2.40–16.72)	<0.001			
Initial eGFR	−0.110 (0.005)	0.99 (0.98–0.99)	0.022			
Crescents	0.021 (0.007)	1.02 (1.01–1.02)	0.003			
Class IV LN	0.945 (0.404)	2.57 (1.17–5.68)	0.019	2.702 (1.089)	14.90 (1.77–126)	0.013
Interstitial fibrosis ≥25%	1.935 (0.398)	6.92 (3.17–15.12)	<0.001	1.770 (0.763)	5.87 (1.32–26.16)	0.020
Lack of complete or partial response (12 month)	2.859 (0.492)	17.54 (6.66–45.45)	<0.001	2.780 (0.744)	16.30 (3.74–71.43)	<0.001
2 nd flare	0.834 (0.371)	2.30 (1.11–4.77)	0.025	1.503 (0.720)	4.5 (1.10–18.44)	0.037

^aLogistic regression analysis. The logistic model is given by: $P(\text{CKD}) = \frac{1}{1 + e^{-4.864 + 2.702 \times \text{class IV LN} + 1.770 \times \text{IF} + 2.780 \times \text{lack of resp} + 1.503 \times \text{flare}}}$ where P(CKD) is the probability of developing chronic kidney disease based on the predictor variables listed on the table; use 1 = yes and 0 = no for binomial covariates. The constant in the multivariable model is −4.864 with *p* value = 0.005. *R*² = 0.47 (Hosmer and Lemeshow), 0.35 (Cox and Snell), 0.58 (Nagelkerke). $\chi^2(7) = 56.21$.

^bs.e. = standard error.

CI: confidence interval; LN: lupus nephritis; eGFR: estimated glomerular filtration rate; CKD: chronic kidney disease.

in Northeastern Brazilians. In that report, participants from Recife had mainly European ancestry (59.7%), followed by African (23.0%) and Amerindian (17.3%).²⁸ Additional studies using AIM from other Brazilian regions reported similar patterns of European dominance, followed by African, and to a lesser extent, Amerindian genetic ancestry.^{12,14}

Hypertension was found in patients who had worse eGFR at last follow-up in the adjusted analysis, as either a cause or consequence of renal dysfunction, but it was not an independent covariate in the adjusted model. Analysis from a large Chinese cohort revealed that time-average mean

arterial pressure during the follow-up was an important risk factor for ESKD, with better predictive values than the baseline proteinuria and mean arterial pressure.²⁹ Surprisingly, lower age of onset or longer LN duration were not associated with CKD; in addition, schooling had no significant impact on the renal outcome of the present low-income cohort with free access to medication. It has been reported that racial inequity, seen especially in North Americans with diabetic nephropathy, has disappeared when Afro-Americans were subjected to the same glucose control as Caucasians.³⁰ The male sex is usually associated with worse renal outcomes but this was not found

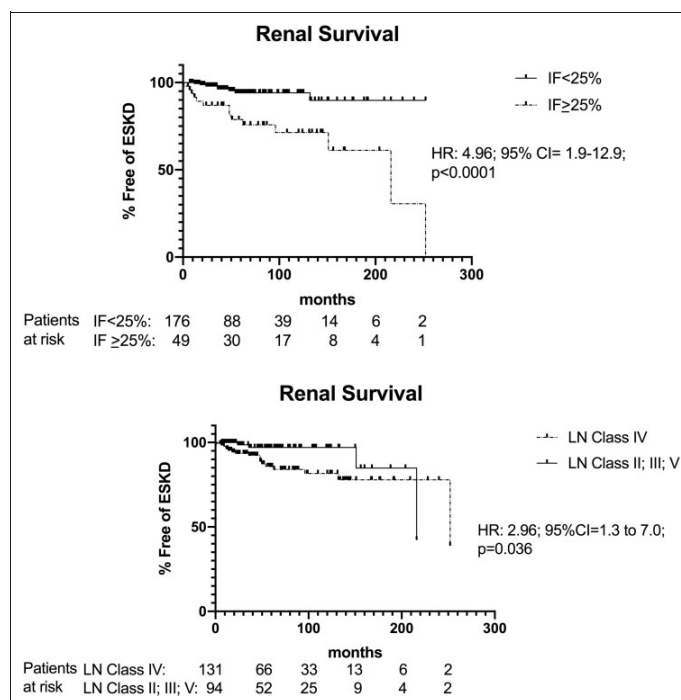


Figure 1 Kaplan-Meier renal survival curves according to the degree of interstitial fibrosis and LN ISN/RPS classification in the initial kidney biopsy. LN: lupus nephritis; ISN/RPS: International Society of Nephrology/Renal Pathology.

in this cohort, possibly due to the small number of men included.^{29,31}

Initial kidney biopsy showed a pronounced correlation with renal outcome at last follow-up in this cohort and remains the gold-standard prognostic marker for LN. Class IV was the most prevalent class of LN and was more frequent in the initial kidney biopsy of those who had eGFR < 30 ml/min/1.73 m² or ESKD at last follow-up in the adjusted analysis, as it is a known risk factor for worse renal outcomes.^{11,29,32,33} A recent transcriptomic study described several differently expressed signaling pathways in kidney biopsies of proliferative classes (class III or IV) that had higher interferon type I and TNF signaling compared to membranous (class V) patients.³⁴ We have confirmed in this cohort that class IV LN had worse renal survival when compared to class III and non-proliferative classes, namely II and V. However, rather than classification of LN, scoring target lesions such as crescents and tubule-interstitial damage seem to be more valuable in predicting outcomes, similar to the Oxford classification for IgA nephropathy.^{11,35} Moreover, it was not the AI but

the median percentage of crescents that increased the risk for progressive CKD in LN patients in the unadjusted analysis, as shown in previously reported cohorts,^{11,33,36} however, in this cohort, glomerular lesions were not significantly independent variables in the logistic regression analysis. Our study has confirmed that chronic lesions in glomeruli (global sclerosis) and in the tubule-interstitial compartment such as TA and IF led to higher scores in the CI and were associated with progressive CKD at last follow-up in the unadjusted analysis and that IF was significant in the adjusted analysis and in the Cox regression analysis. Cellular crescents and IF were present in those who had duplication of Scr during follow-up in a previous study.¹⁶ A CI above four has also been associated with advanced CKD at long-term follow-up, which strengthens the importance of scoring chronic lesions on the kidney biopsy.^{32,37-39}

This retrospective cohort study did not have the scope to analyze treatment efficacy and the findings of greater prevalence of CKD at last follow-up in those patients who received cyclophosphamide as induction therapy, reflecting the choice for a more

potent drug for a more severe presentation of LN. It is worth noting that the more patients presented with a drop in their eGFR, the more often they had hydroxychloroquine and an angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II receptor blocker removed from their prescriptions. However, early response to therapy and lack of subsequent flare episodes were strong independent predictors of better renal outcomes. Several studies revealed that time-average proteinuria and failing to reduce proteinuria to less than 0.8 g/day at 12 months have been associated with worse renal outcomes. Predictive value was not improved by adding SCr or urine red blood cells to proteinuria at 1 year.^{23,24,29,40} In spite of the Euro-Lupus Nephritis and MAINTAIN trials having enrolled mainly Caucasian LN subjects, our study has confirmed that achieving at least a partial response at 6 and 12 months also increases the chance of better long-term outcomes in this admixture population. A previous cohort showed that patients who did not reach a complete or partial remission of their nephritis flare had a rate of renal function decline 30-fold faster than responders.⁴⁰ Rather than the number of flare episodes, time under flare activity and nephritic (more than nephrotic) flare are risk factors for CKD during long-term follow-up.^{31,41}

The strength of the present work relies on the long-term analysis of a high number of admixture low-income South Americans, with free access to immunosuppressive medication. Regardless of skin color or self-description of race, this cohort had a higher prevalence of progressive CKD compared to that in Caucasians,^{24,36,40} suggesting that the prognosis of our “white” patients is not similar to that of European Caucasians. A prediction model of CKD was built with the main variables associated with this outcome. However, that model should be validated in further prospective cohorts to be reliable. This study has some limitations related to its retrospective nature; our data are observational and treatment allocation was not randomized; however, treatment was chosen based on established protocols in both hospitals. Yet, no conclusions or influence from treatment choice can be drawn about renal end points as both clinics indicated cyclophosphamide for crescentic LN or with rapidly progressive GN for induction therapy and therapy followed international recommendations.^{9,20,24}

In conclusion, we have shown that self-described race in this admixture cohort was not a significant predictor of renal outcomes. Class IV LN, IF on initial kidney biopsy, lack of early response to therapy, and a second episode of flare were independent

predictors of progressive renal dysfunction. Therefore, besides using kidney histology as a predictor of outcomes, clinicians need further non-invasive biomarkers to avoid delay or unnecessary treatment of LN.

Acknowledgements

The authors thank all the patients enrolled in the study and the nephropathologists Luiz Moura and Luiz da Fonte for the renal biopsy reports.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iDs

G Vajgel  <https://orcid.org/0000-0002-2606-3638>
CBL Oliveira  <https://orcid.org/0000-0003-2080-923X>

References

- 1 Mok CC. Prognostic factors in lupus nephritis. *Lupus* 2005; 14: 39–44.
- 2 Alarcón GS, Calvo-Alén J, McGwin G, *et al.* Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort: LUMINA XXXV. Predictive factors of high disease activity over time. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1168–1174.
- 3 Contreras G, Lenz O, Pardo V, *et al.* Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. *Kidney Int* 2006; 69: 1846–1851.
- 4 Barr RG, Seliger S, Appel GB, *et al.* Prognosis in proliferative lupus nephritis: The role of socio-economic status and race/ethnicity. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2039–2046.
- 5 Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, *et al.* End-stage renal disease in African Americans with lupus nephritis is associated with APOL1. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 390–396.
- 6 Vandepapeliere J, Aydin S, Cosyns J-P, Depresseux G, Jadoul M, Houssiau FA. Prognosis of proliferative lupus nephritis subsets in the Louvain Lupus Nephritis inception Cohort. *Lupus* 2014; 23: 159–165.
- 7 Tamirou F, D'Cruz D, Sangle S, *et al.* Long-term follow-up of the MAINTAIN Nephritis Trial, comparing azathioprine and mycophenolate mofetil as maintenance therapy of lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2016; 75: 526–531.

- 8 Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 241–250.
- 9 Dooley MA, Jayne D, Ginzler EM, *et al.* Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 1886–1895.
- 10 Cervera R, Khamashta MA, Font J, *et al.* Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82: 299–308.
- 11 Rijnink EC, Teng YKO, Wilhelmus S, *et al.* Clinical and histopathologic characteristics associated with renal outcomes in lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12: 734–743.
- 12 Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Brazilian J Med Biol Res* 2009; 42: 870–876.
- 13 Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 177–182.
- 14 Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 2010; 22: 187–192.
- 15 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 Int* 2018; 93: 789–796.
- 16 Austin HA, Boumpas DT, Vaughan EM, Balow JE. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis: Contributions of clinical and histologic data. *Kidney Int* 1994; 45: 544–550.
- 17 CENSO-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE, <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe> (2016, accessed 1 January 2017).
- 18 Silva ZP da, Ribeiro MCS de A, Barata RB, de Almieda MF. Socio-demographic profile and utilization patterns of the public healthcare system (SUS), 2003–2008. *Cien Saude Colet* 2011; 16: 3807–3816.
- 19 Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, *et al.* Early response to immunosuppressive therapy predicts good renal outcome in lupus nephritis: Lessons from long-term followup of patients in the Euro-lupus nephritis trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3934–3940.
- 20 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 2012; 2: 139.
- 21 Kronbichler A, Brezina B, Gauckler P, Quintana LF, Jayne DRW. Refractory lupus nephritis: When, why and how to treat. *Autoimmun Rev*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.autrev.2019.03.004.
- 22 Bao H, Liu Z-H, Xie H-L, Hu WX, Zhang HT, Li LS. Successful treatment of class V + IV lupus nephritis with multitarget therapy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2001–2010.
- 23 Tamirou F, Lauwerys BR, Dall'Era M, *et al.* A proteinuria cut-off level of 0.7 g/day after 12 months of treatment best predicts long-term renal outcome in lupus nephritis: data from the MAINTAIN Nephritis Trial. *Lupus Sci Med* 2015; 2: e000123–e000123.
- 24 Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, *et al.* The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 61–64.
- 25 Cooper RS, Kaufman JS, Ward R. Race and genomics. *N Engl J Med* 2003; 348: 1166–1170.
- 26 Bomback AS, Gharavi AG. Ancestry, genetic risk and health disparities. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9: 699–700.
- 27 Adler M, Chambers S, Edwards C, Neild G, Isenberg D. An assessment of renal failure in an SLE cohort with special reference to ethnicity, over a 25-year period. *Rheumatol* 2006; 45: 1144–1147.
- 28 Coelho AVC, Moura RR, Cavalcanti CAJ, *et al.* A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* 2015; 14: 2876–2884.
- 29 Yang J, Liang D, Zhang H, *et al.* Long-term renal outcomes in a cohort of 1814 Chinese patients with biopsy-proven lupus nephritis. *Lupus* 2015; 24: 1468–1478.
- 30 Gerber C, Cai X, Lee J, *et al.* Incidence and progression of chronic kidney disease in black and white individuals with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018; 13: 884–892.
- 31 Moroni G, Quaglini S, Maccario M, Banfi G, Ponticelli C. “Nephritic flares” are predictors of bad long-term renal outcome in lupus nephritis. *Kidney Int* 1996; 50: 2047–2053.
- 32 Moroni G, Pasquali S, Quaglini S, *et al.* Clinical and prognostic value of serial renal biopsies in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 530–539.
- 33 Yokoyama H, Wada T, Hara A, *et al.* The outcome and a new ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis in Japanese. *Kidney Int* 2004; 66: 2382–2388.
- 34 Der E, Suryawanshi H, Morozov P, *et al.* Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. *Nat Immunol*. Epub ahead of print 20 May 2019. DOI: 10.1038/s41590-019-0386-1.
- 35 Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, *et al.* Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: An update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int* 2017; 91: 1014–1021.
- 36 Obrisca B, Jurubiã R, Andronesi A, *et al.* Histological predictors of renal outcome in lupus nephritis: The importance of tubulointerstitial lesions and scoring of glomerular lesions. *Lupus* 2018; 27: 1455–1463.
- 37 Moroni G, Depetri F, Ponticelli C. Lupus nephritis: When and how often to biopsy and what does it mean? *J Autoimmun* 2016; 74: 27–40.
- 38 Alvarado A, Malvar A, Lococo B, *et al.* The value of repeat kidney biopsy in quiescent Argentinian lupus nephritis patients. *Lupus* 2014; 23: 840–847.
- 39 Malvar A, Pirruccio P, Alberton V, *et al.* Histologic versus clinical remission in proliferative lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32: 1338–1344.
- 40 Reich HN, Gladman DD, Urowitz MB, *et al.* Persistent proteinuria and dyslipidemia increase the risk of progressive chronic kidney disease in lupus erythematosus. *Kidney Int* 2011; 79: 914–920.
- 41 Parikh SV, Nagaraja HN, Hebert L, Rovin BH. Renal flare as a predictor of incident and progressive CKD in patients with lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014; 9: 279–284.

4.2 ARTIGO 2

**The Journal of Rheumatology**

A single *APOL1* nephropathy variant increases risk of advanced lupus nephritis in Brazilians

Gisele Vajgel, Suelen Cristina Lima, Diego Jeronimo S. Santana, Camila B. L. Oliveira, Denise Maria N. Costa, Pamela J. Hicks, Maria Alina G. M. Cavalcante, Carl D. Langefeld, Lucila Maria Valente, Sergio Crovella, Gianna Mastroianni Kirsztajn, Barry I. Freedman and Paula Sandrin-Garcia

DOI: 10.3899/jrheum.190684

<http://www.jrheum.org/content/early/2019/11/08/jrheum.190684>

1. Sign up for TOCs and other alerts
<http://www.jrheum.org/alerts>
2. Information on Subscriptions
<http://jrheum.com/faq>
3. Information on permissions/orders of reprints
http://jrheum.com/reprints_permissions

The Journal of Rheumatology is a monthly international serial edited by Earl D. Silverman featuring research articles on clinical subjects from scientists working in rheumatology and related fields.

A single *APOL1* nephropathy variant increases risk of advanced lupus nephritis in Brazilians

Gisele Vajgel^{1,2}; Suelen Cristina Lima²; Diego Jeronimo S. Santana²; Camila B. L. Oliveira^{1,3}; Denise Maria N. Costa^{1,3}; Pamela J. Hicks⁴; Maria Alina G. M. Cavalcante¹; Carl D. Langefeld⁴; Lucila Maria Valente¹; Sergio Crovella²; Gianna Mastroianni Kirsztajn⁵; Barry I. Freedman^{6,7}; Paula Sandrin-Garcia².

¹ Division of Nephrology, Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;

² Molecular Biology Laboratory, Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;

³ Division of Nephrology, Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP), Recife, Pernambuco, Brazil;

⁴ Division of Public Health Sciences, Department of Biostatistical Sciences; Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina, USA

⁵ Division of Nephrology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

⁶ Center for Diabetes Research; Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina, USA

⁷ Department of Internal Medicine, Section on Nephrology; Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, North Carolina, USA

Running Head: *APOL1* in lupus nephritis

Word Counts: Abstract 250, Text 3499, Tables 5, Figures 1, Suppl. Materials 0

Support: NIH grants R01 DK084149 (BIF), R01 DK070941 (BIF).

Disclosures: Wake Forest University Health Sciences and BIF have rights to an issued US patent related to *APOL1* genetic testing (www.apol1genetest.com). Dr. Freedman is a consultant for AstraZeneca Pharmaceuticals and Renalytix AI.

Correspondence:

Dr. Gisele Vajgel (@gvajgel)
Division of Nephrology, Hospital das Clinicas,
Federal University of Pernambuco (UFPE),
Recife, Pernambuco, Brazil Av. Prof Moraes Rego, 1235.
Cidade Universitaria Recife PE – Brazil
ZIP: 50670-901
Telephone/Fax: +558121263734

giselevajgel@hotmail.com

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

This article has been accepted for publication in The Journal of Rheumatology following full peer review. This version has not gone through proper copyediting, proofreading and typesetting, and therefore will not be identical to the final published version. Reprints and permissions are not available for this version. Please cite this article as doi 10.3899/jrheum.190684. This accepted article is protected by copyright. All rights reserved.

Abstract:

Background: Apolipoprotein L1 gene (*APOL1*) G1 and G2 renal-risk alleles (RRAs) are associated with end-stage renal disease (ESRD) in blacks with lupus nephritis (LN). The present study determined frequencies of *APOL1* RRAs in non-white Brazilian patients with LN and controls to assess association with renal outcomes.

Methods: *APOL1* RRAs were genotyped in 222 healthy blood donors (controls) and 201 cases with LN from three outpatient clinics. Two single nucleotide polymorphisms in the G1 (rs73885319; rs60910145) and an indel for the G2 (rs71785313) variant were genotyped.

Results: The frequency of *APOL1* RRAs in non-white Brazilian LN cases did not differ significantly from healthy controls, few participants had 2 RRAs. In the sample, 84.6% of LN cases and 82.9% of controls had 0 RRAs, 13.4% and 15.3% had 1 RRA, and 2.0% and 0.4% had 2 RRAs, respectively. LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRAs had similar baseline characteristics and renal responses to treatment, yet faced higher risk for progressive chronic kidney disease (CKD) to an eGFR <30 ml/min/1.73² compared to those with 0 RRAs (11.1% with 0, 29.6% with 1; 50% with 2 RRAs, $p=0.005$). Although glomerular lesions and activity scores on initial kidney biopsy did not differ significantly between individuals based on *APOL1* genotype, chronicity scores, tubular atrophy and interstitial fibrosis were more severe in those with ≥ 1 RRA.

Conclusions: Although initial kidney lesions and treatment responses were similar, a single *APOL1* RRA in non-white Brazilians with LN was associated

with increased risk of advanced CKD and possibly more tubulo-interstitial
Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The
Journal of Rheumatology

damage.

Introduction

Non-diabetic chronic kidney disease (CKD) is significantly more prevalent in those who possess recent African ancestry; a finding related in part to presence of apolipoprotein L1 gene (*APOL1*) renal risk alleles (RRAs). Two coding nephropathy variants in *APOL1*, G1 (rs73885319; rs60910145) and G2 (rs71785313), appear to have been selected for in sub-Saharan Africa because their circulating proteins provide resistance to *Trypanosoma brucei rhodesiense* and development of African sleeping sickness (1,2). Although 13% of African Americans possess *APOL1* high-risk genotypes, defined as having two copies of the G1 and/or G2 allele, only a minority develops CKD. It appears likely that modifying factors are required to initiate *APOL1* nephropathy.

High interferon (IFN) states, including HIV infection (producing HIV-associated nephropathy [HIVAN]) (3), exogenously administered IFN (4), and systemic lupus erythematosus (SLE) are linked with collapsing glomerulopathy in carriers of two *APOL1* RRAs (autosomal recessive inheritance) (5). In addition, severe lupus nephritis (LN), LN-end-stage renal disease (ESRD), is associated with *APOL1* in an autosomal recessive inheritance pattern (6,7). Effects of *APOL1* on non-diabetic ESRD reveal odds ratios (ORs) for association of 3 in patients with LN-ESRD and 29-89 in those with HIVAN (3,6,8). A recent large genome-wide association study searching for modifying genes in *APOL1* nephropathy failed to identify second genes or

additional variants meeting genome-wide significance for association with LN-
Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The
Journal of Rheumatology

ESRD, suggesting environmental modifiers often trigger *APOL1* nephropathy (7).

Relative to Caucasians, African Americans and Hispanics develop more aggressive LN with earlier onset and poorer long-term renal outcomes (9). European ancestry is reportedly protective from LN in patients with SLE (10). Moreover, familial clustering of LN and CKD suggests a role for genetic factors (11) and African Americans with ≥ 1 *APOL1* RRAs were reported to initiate renal replacement therapy earlier than those lacking *APOL1* RRAs (12,13). South American populations have variable contributions of West African ancestry due to the slave trade that occurred 500 years ago (14,15). This should result in a range of *APOL1* RRA frequencies in this relatively understudied population (16). Similar to other areas of the Latin America, the repeated forced migration of individuals of West African ancestry during the slave trade resulted in significant genetic admixture (i.e., interbreeding of two previously separated and distinct populations) (17). Brazilians are an admixed population, with differing proportions of Amerindian, African and European ancestry (14,15,18). Frequencies of *APOL1* RRAs have been variable, depending on the region of Brazil. One study in Brazilians with LN revealed that approximately 30% of their genome was African; however, only 10% of cases had two *APOL1* RRAs without significant association with CKD (19). Another report genotyped black and mixed Brazilian populations with ESRD; they detected 10-fold higher frequencies of *APOL1* renal-risk genotypes (two RRAs) compared to related controls (20). The latter study reveals that *APOL1* is associated with non-diabetic ESRD in Brazilians in autosomal recessive

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The
Journal of Rheumatology

The primary hypothesis of this study was to determine whether there was an association between *APOL1* RRAs and development of progressive CKD defined as a sustained eGFR <30 mL/min/1.73m² in this non-white (mixed) Brazilian population. Secondary analyses assessed the impact of *APOL1* RRAs on additional kidney outcomes in LN, including kidney histology and long-term kidney function.

Materials and Methods

Cases with LN were enrolled from three outpatient clinics in Brazil specializing in treatment of glomerulonephritis (GN), *Federal University of Pernambuco (UFPE)* and *Prof Fernando Figueira Integrative Medicine Institute – IMIP* (Recife, Northeastern Brazil) and Federal University of São Paulo – EPM/UNIFESP (São Paulo, Southeastern Brazil). All cases provided written informed consent. The study was approved by the Brazilian National Committee for Ethics in Research (CONEP, report number: 2.568.450) and performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Overall, 309 patients with a previous diagnosis of LN were recruited between August 2015 and July 2018. All were ≥ 18 years of age, unrelated, met Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria, and had negative serologies for hepatitis B, hepatitis C, HIV and syphilis. All patients had a renal biopsy. Biopsies were analyzed by two renal pathologists, one from IMIP, Recife and one from EPM/UNIFESP, São Paulo. The classification and characteristics of LN were described according to the

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019. Published by The International Society of Nephrology/Renal Pathology Society guidelines. We
Journal of Rheumatology

excluded 30 patients with non-LN histologic patterns (including IgA nephropathy, vasculitis, post-infectious GN, idiopathic membranous GN, focal segmental glomerulosclerosis [FSGS] or collapsing GN) and those with <6 months of follow-up after diagnosis of LN. In addition, nine patients with inadequate DNA and 72 self-reporting their ancestry as white were excluded. The remaining 201 cases had LN on initial kidney biopsy. None had Class I or Class VI (>90% of glomeruli globally sclerosed) LN. We analyzed cases with Class II mesangial proliferative LN (pure mesangial hyper-cellularity and/or matrix expansion); Class III focal proliferative LN (involving <50% of the total number of glomeruli); Class IV diffuse proliferative or global LN (involving $\geq$ 50% of the total number of glomeruli) and Class V membranous LN (21). Eight of 201 cases (4%) did not have enough kidney tissue to classify LN, but were retained in the analyses based on appropriate clinical presentations with follow-up similar to the other LN cases (one had Class IV LN on a subsequent renal biopsy during a second lupus flare several months later). Those with a history of essential hypertension or with blood pressure readings $\geq$ 140 mmHg systolic and/or $\geq$ 90 mmHg diastolic on at least two occasions were considered to have hypertension.

Historical data regarding initial laboratory tests, first induction/maintenance therapy and treatment response were recorded from chart review. Thereafter, participants were followed prospectively during routine care through February 2019. During acute flares of nephritis, cases with LN underwent induction therapy with intravenous methylprednisolone, followed by oral prednisone and six boluses of intravenous cyclophosphamide

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

they received maintenance azathioprine or MMF, based on established protocols. At baseline, hydroxychloroquine was prescribed to more than 80% of LN cases. Changes in proteinuria and serum creatinine concentration (SCr) were recorded from chart reviews at 6, 12, 24 months and/or latest follow-up, according to Kidney Disease Improving Outcomes guidelines (22). Renal responses to therapy were classified as complete, partial or non-responsive (22). LN cases who developed CKD Stage 3 or Stage 4 (defined as a sustained eGFR <60 or <30 mL/min/1.73m² using the CKD-Epidemiology Collaboration [EPI] equation, respectively) and ESRD defined as the need for renal replacement therapy or eGFR <10mL/min/1.73m² were recorded. Refractory LN was defined as lack of a complete or partial response after two different induction treatments, including at least one course of cyclophosphamide (some may have received cyclosporine with MMF or rituximab).

A total of 222 unrelated, non-white, adult healthy blood donors from two Brazilian blood centers (Recife - PE and Ribeirão Preto - SP) were genotyped and served as non-SLE controls.

Genomic DNA was isolated from anti-coagulated whole blood collected in ethylenediaminetetraacetic acid blood tubes using the PureGene system, based on manufacturer instructions. Samples were shipped on ice to Wake Forest School of Medicine for *APOL1* genotyping. Two single-nucleotide polymorphisms in the G1 nephropathy risk variant (rs73885319; rs60910145) and an indel for the G2 nephropathy risk variant (rs71785313) were

genotyped using Taqman assays on the ViiA 7 platform (Applied Biosystems).
Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

for Life Tech). *APOL1* high-risk genotypes were present if participants had 2 RRAs (G1G2, G1G1 or G2G2).

Participant characteristics were compared using a student's t-test or Mann-Whitney U test (i.e., Wilcoxon rank-sum test) as distributionally appropriate or Fisher's exact test for categorical variables. Given the low frequency of 2 *APOL1* RRAs, Kaplan Meier survival curves were computed separately for *APOL1* RRA=0 and RRA $\geq$ 1, and differences were computed using the logrank test. Cox proportional hazards models were computed to estimate a hazard ratio (HR) for RRA=0 vs. RRA $\geq$ 1. The comparison of RRA=0 vs. RRA $\geq$ 1 on development of progressive CKD (defined based on sustained eGFR <30 mL/min/1.73m²) was the primary *a priori* inference. Significance was set at p<0.05. Additional outcomes, including renal histologic changes and long-term clinical parameters, were considered secondary outcomes.

We computed three power analyses to quantify the effect size detectable with 0.80 power and a type 1 error rate of $\alpha=0.05$. For binary outcomes (e.g., ESKD) between LN cases and controls, the study had 0.80 power to detect effects with odds ratios of 1.78. For continuous outcomes the study has 0.80 power to detect differences between cases and controls that explain 1.9% of the variation (i.e., $r^2=0.019$), and case-only continuous traits that explain 3.9% of the variation.

Results

APOL1 genotypes and demographic characteristics in self-reported non-white LN cases and non-SLE controls are displayed in Table 1. As expected, cases with LN had more females than non-SLE controls (90% vs 36%). *APOL1* allele frequencies did not differ significantly between LN cases and controls. Among the 72 self-described white LN cases excluded from the analyses, three had 1 *APOL1* RRA (4%) and none had 2 RRAs. Thus, white non-SLE controls were not genotyped.

Race was categorized as self-reported white and non-white (including mixed or black); Asians and Amerindians were not present (23). Household income was not analyzed because more than 90% of the national public health system (*Sistema Único de Saúde*) users earn less than US\$ 100 monthly, and immunosuppressive medications are provided by the State government (24). Demographic characteristics, baseline laboratory results, kidney biopsy findings and long-term outcomes in non-white LN cases are displayed in Table 2, stratified by *APOL1* genotype. Because only 4 LN cases (2%) possessed 2 *APOL1* RRAs, groups were analyzed based on the presence of ≥ 1 *APOL1* RRAs. Although not statistically significant, cases with 1 or 2 *APOL1* RRAs tended to be younger and have shorter LN durations than cases with 0 RRAs ($p=0.09$ and 0.36 , respectively). However, higher frequencies of CKD Stage 4 and 5 (ESRD) were present in LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRA ($p=0.005$ and 0.007 , respectively). This occurred despite similar baseline demographic characteristics, CKD risk factor profiles, eGFR, proteinuria and histologic class of LN. In addition, prescribed treatments were similar in LN cases regardless of *APOL1* genotype. Although no differences

were observed in the initial clinical response between genotype groups. LN
Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The
Journal of Rheumatology

cases with ≥ 1 *APOL1* RRA more often developed sustained $\text{eGFR} < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ six months after induction therapy, compared to those with 0 RRA (21.7% vs 4.4%; $p=0.018$, $\text{OR}=5.12$, 95% confidence interval [95% CI]=1.6-17.6) (Table 3).

In secondary analyses, a trend towards higher percentages of glomeruli with global glomerulosclerosis and crescents were seen in LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRAs; although, types of LN-related glomerular lesions were not different between genotypes (Table 2). Interstitial damage, measured by the percentage of tubular atrophy (TA) and interstitial fibrosis (IF), was more severe in LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRA ($p=0.002$ and $p=0.018$, respectively). The activity index was similar between genotype groups ($p=0.92$), but chronicity index on the initial kidney biopsy was significantly higher in LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRA (4.1 ± 2.3), versus 0 RRA (2.8 ± 1.6 ; $p=0.011$). Fifty of 201 LN cases (43 with 0 *APOL1* RRAs and 7 with ≥ 1 RRAs) received a second kidney biopsy (Table 4). There was no statistically significant difference in renal histology between genotype groups, except that median percentage of crescents (not presence) was higher on the second biopsy in LN patients with ≥ 1 *APOL1* RRA ($p=0.03$). It is difficult to estimate the value of the second biopsy done during relapses from only a quarter of participants.

Figure 1 displays Kaplan-Meier renal survival curves for CKD, $\text{eGFR} < 30 \text{ mL/min/1.73m}^2$ ($p=0.003$, $\text{HR}=2.97$, 95% CI=1.1-8.2) and ESRD ($p=0.006$, $\text{HR}=3.49$, 95% CI=1.0-12.5).

The time from initial diagnosis of LN to ESRD was significantly shorter in LN cases with ≥ 1 *APOL1* RRA, compared to those with 0 RRAs (14, [25-

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

75th=9-22] vs 114 [25-75th=36-220] months, $p=0.0023$). Thus, faster progression to ESRD was present in those with ≥ 1 RRA (Table 3).

Table 5 displays the outcomes in the four LN cases with 2 APOL1 RRAs. Despite the small sample, half progressed to CKD Stage 4 (eGFR <30 ml/min/1.73m²) and one has persistent proteinuria after three rounds of induction therapy.

Discussion

The results of this study in Brazilians with LN demonstrate that participants with ≥ 1 APOL1 RRA had more severe kidney disease at initial diagnosis and higher stages of CKD after six months of therapy compared to those with 0 APOL1 RRA. Populations with mixed ancestry are not typically screened for APOL1 RRAs; frequencies are expected to vary based on extent of recent African ancestry (16). The Brazilian population is heterogeneous as a result of interethnic mating of peoples from three continents: European colonizers (mainly Portuguese), African slaves, and local Amerindians (14,15). This study genotyped self-reported non-white healthy controls and cases with LN. Cases and controls had similar and low frequencies of APOL1 high-risk genotypes (two RRAs), 0.4% and 2.0% respectively. A study in the Brazilian city Salvador genotyped 45 ESRD cases and identified only one (2.0%) with 2 APOL1 RRAs (25). In contrast, Riella *et al.* reported a higher prevalence of APOL1 2 RRA (12.4%) and 1 RRA carriers (17.5%) among 274 self-declared Brazilian mixed-race and black patients with ESRD; those with autoimmune kidney disease were excluded (20). They also analyzed 106 matched, first-degree relatives of cases and found lower frequencies of

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

APOL1 2 RRA carriers (0.9%) and similar frequencies with 1 RRA (13.2%) (20). The *APOL1* frequencies in their controls appear similar to those in healthy blood donor controls from the present study.

A study from São Paulo genotyped *APOL1* in 196 female outpatients with LN; participants had 30% African ancestry based on ancestry informative markers (AIMs) (19). Of these, 10% possessed 2 *APOL1* RRAs and there was no significant association of *APOL1* with doubling of the baseline Scr in a recessive genetic model (19). In the present cohort of LN cases and controls, AIMs were lacking due to a paucity of DNA. Although skin color is not an accurate predictor of AIMs in such an admixed population, those self-described as black or mixed Brazilians reportedly have a higher African ancestry index (AAI) (14). We detected no significant difference in genetic ancestry based on skin pigmentation in Brazilians; participants from Recife had 59.7% European ancestry, 23.0% African ancestry and 17.3% Amerindian ancestry (18). Other studies using AIMs from different Brazilian regions revealed similar patterns of European dominance, followed by African, and to a lesser extent Amerindian genetic ancestry (15,26).

A study comparing the AAI among black and white Brazilians from each region of the country found similar AAIs between individuals from the Northeast and Southeast regions of Brazil, but lower AAI in original Africans (and higher than in the founding Portuguese) (14). The prevailing hypothesis is that *APOL1* G1 and G2 RRAs arose in the past 10,000 years in sub-Saharan Africa, likely in West Africa where they were subjected to intense positive selection since circulating *APOL1* RRA proteins provide resistance to

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

Trypanosoma brucei rhodesiense (1,27). South America was likely colonized around 15,000 years ago, likely by a single wave of migration (28) and before positive selection for *APOL1*. This suggests that *APOL1* RRAs came from the trans-Atlantic slave trade during the 16th to 19th centuries.

Asian, Native American, and Caucasian populations with CKD generally have very low frequencies of *APOL1* RRAs (29–32). Among American Indians, African-derived risk alleles in the DNA sequence of *APOL1* coding regions were absent, providing additional evidence that these risk variants are only present in those with recent African ancestry (33). However, among admixed (with African ancestry) Hispanic and Latin Americans, *APOL1* two RRA genotypes were present in 2% of individuals (31). This is similar to the present study, with low rates of CKD.

The low frequency of *APOL1* 2 RRA carriers in our Brazilian LN cohort did not permit performance of outcome analyses using the traditional autosomal recessive model. However, presence of even one *APOL1* RRA demonstrated significant association with advanced CKD during follow-up. Presence of ≥ 1 *APOL1* RRAs confers immunity against *Trypanosoma brucei rhodesiense* (34). *APOL1* cellular toxicity may arise from the same trypanolytic factors that produce chloride channels in lysosomes, producing damage to cell membranes, mitochondria and cell death (35,36).

Genetic risk for *APOL1*-associated CKD in humans is autosomal recessive; animal models are complicated by the lack of *APOL1*. Few animal models have tested the heterozygous state, typically a disease-free condition

Downloaded from www.jrheum.org on November 29, 2019. Published by The Journal of Rheumatology

in humans (37). Zebrafish embryos with *APOL1* CRISPR loss

editing revealed podocyte loss and glomerular filtration defects that could be rescued by expression of wild-type *APOL1* mRNA (38). However, the *APOL1* G1 RRA did not ameliorate defects caused by suppression of *APOL1*, nor did G2, which was deleterious to protein function (38). African Americans with 1 or 2 *APOL1* RRAs are known to require dialysis an average of five years and nine years earlier than those with 0 RRAs (13). Moreover, as the number of *APOL1* RRAs increased in the present study, duration from SLE onset to ESRD decreased (6).

Untreated patients with HIV who carry 2 *APOL1* RRAs have among the highest ORs for CKD (29-89); however, even 1 RRA was associated with HIVAN in Africans (OR: 5.49) (8). A single *APOL1* RRA also confers a 1.7-fold increased risk for FSGS, although 2 RRAs confer ten-fold higher risk (3). These findings support the influence of a single *APOL1* RRA in kidney injury. Chromosome 22q is also enriched for gene duplications in the *APOL1-4* gene cluster and copy number variation may change gene dosage and expression. Additional copies of *APOL1* were observed more frequently in CKD cases than controls, possibly increasing susceptibility to CKD in heterozygotes (39). Association between null variants in *APOL3* and ESRD has been reported (40), irrespective of *APOL1* genotype status and percentage African ancestry. This supports the concept that other APOL proteins (besides *APOL1*) may influence risk for non-diabetic CKD.

The spectrum of *APOL1* nephropathy has known mediating factors in those with 2 *APOL1* RRAs, including HIV infection and interferons in collapsing glomerulopathy (3-5). Interferons are up regulated in patients with

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

active SLE. Thus, this milieu might trigger *APOL1* nephropathy even in cases with 1 RRA. α -Interferon increases *APOL1* mRNA expression in endothelial cells (4) and LN reflects a chronic type I interferon-induced state. The present study identified a higher chronicity index and more frequent moderate to severe tubular atrophy and interstitial fibrosis on initial kidney biopsies in cases with LN with ≥ 1 *APOL1* RRAs, versus 0 RRAs. However, significant differences in the type of glomerular lesion were not seen between genotypic groups, except a trend towards more global glomerulosclerosis and crescent formation in those with ≥ 1 *APOL1* RRAs. As in Larsen *et al.*, we did not detect differences among histologic classes of LN based on *APOL1* genotypes, but saw a trend toward higher chronicity index in the ≥ 1 RRA group (41), with an increased risk for progression to ESRD in cases with at least 1 RRA.

This study has strengths and limitations. Strengths include longitudinal follow-up in a relatively large sample of Brazilians with LN. A weakness included the lack of AIMS in self-described non-white cases and controls due to insufficient DNA; instead, we relied on self-reported ancestry. We note that the “non-white” cases and controls were from the same geographic region, self-reported ancestry was obtained in the same fashion in each group, and *APOL1* RRA frequencies were generally consistent with those expected. We note that Parra *et al.* also found that Brazilians self-reporting as black or mixed had higher proportions of African ancestry (14). Therefore, we restricted our sample to those self-reporting as non-white. Another limitation was absence of SLE controls without LN. However, when comparing LN cases with SLE controls lacking LN, it is possible that some “non-nephropathy

controls” may develop LN given longer follow-up. A large number of the LN

cases in our cohort first developed kidney disease five (or more) years after their diagnosis of SLE. The infrequent presence of 2 *APOL1* RRAs in this cohort and few cases with LN-ESRD did not permit evaluation of *APOL1* associations in an autosomal recessive model. However, among the 4 Brazilian LN cases with 2 *APOL1* RRAs (Table 5), the only case that had a complete response initially presented with Class V (non-proliferative) membranous LN on kidney biopsy, a less aggressive lesion known to have lower Th1 lymphocytes response (42).

We conclude that frequencies of *APOL1* RRAs in non-white Brazilians with LN are not significantly different from those in healthy non-white Brazilians; but participants with ≥ 1 *APOL1* RRA had more severe kidney disease at presentation and higher stages of CKD after therapy compared to those with 0 *APOL1* RRA. However, results do not preclude a recessive model. Our sample lacked sufficient numbers of individuals with two *APOL1* RRAs needed to detect such an effect. Regardless of treatment for LN, presence of ≥ 1 *APOL1* RRAs is associated with higher rates of chronic tubulo-interstitial injury and increased risk for advanced Stage 4 CKD and ESRD; there was no difference in the type of renal glomerular lesion. *APOL1* genotyping in this admixed South American population sheds new light on the role of precision medicine in LN. Treatment approaches may need to be more aggressive or directly target the *APOL1* gene in order to reduce rates of ESRD due to LN in the non-white Brazilian population.

Acknowledgements

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

The authors thank all the patients enrolled in the study, Michelle Tiveron for processing the samples at EPM/UNIFESP and the administrative staff from the Division of Nephrology/Federal University of Pernambuco: Mrs. Poliana Cassia and Mrs. Ivanize Souza.

Funding

B.I.F. received NIH grants: R01 DK084149, R01 DK070941.

Disclosure

Wake Forest University Health Sciences and B.I.F. have rights to an issued United States patent related to *APOL1* genetic testing. B.I.F. is a consultant for AstraZeneca and Renalytix AI Pharmaceuticals. None of the other authors declare competing interests.

References

1. 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* 2010;329:841 LP - 845.
2. 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* 2013;369:2183-96.
3. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, et al. *APOL1* genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:2129-37.
4. Nichols B, Jog P, Lee JH, Blackler D, Wilmot M, Agati VD, et al. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. *Kidney Int* 2015;87:332-42.
5. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Ambruzs JM, Cossey LN, Messias
Downloaded from www.jmeum.org on November 20, 2019 - Published by The
Journal of Clinical Investigation

NC, et al. Histopathologic findings associated with *APOL1* risk variants

- in chronic kidney disease. *Mod Pathol* 2014;28:95-102.
6. Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, Croker J a, Williams AH, Garner NE, et al. End-Stage Renal Disease in African Americans With Lupus Nephritis Is Associated With APOL1. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:390-6.
 7. Langefeld CD, Comeau ME, Ng MCY, Guan M, Dimitrov L, Mudgal P, et al. Genome-wide association studies suggest that APOL1-environment interactions more likely trigger kidney disease in African Americans with nondiabetic nephropathy than strong APOL1-second gene interactions. *Kidney Int* 2018;94:599-607.
 8. Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M, Mosiane P, Dickens C, Dix-Peek T, et al. APOL1 Risk Variants Are Strongly Associated with HIV-Associated Nephropathy in Black South Africans. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:2882-90.
 9. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Burgos PI, Hachuel L, Boggio G, Wojdyla D, et al. Mestizos with systemic lupus erythematosus develop renal disease early while antimalarials retard its appearance: data from a Latin American cohort. *Lupus* 2013;22:899-907.
 10. Richman IB, Taylor KE, Chung SA, Trupin L, Petri M, Yelin E, et al. European Genetic Ancestry Is Associated With a Decreased Risk of Lupus Nephritis. *Arthritis Rheum* 2012;64:3374-82.
 11. Freedman BI, Wilson CH, Spray BJ, Tuttle AB, Olorenshaw IM, Kammer GM. Familial clustering of end-stage renal disease in blacks with lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1997;29:729-32.
 12. 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. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:2091-7.
 13. Tzur S, Rosset S, Skorecki K, Wasser WG. APOL1 allelic variants are associated with lower age of dialysis initiation and thereby increased dialysis vintage in African and Hispanic Americans with non-diabetic end-stage kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:1498-505.
 14. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1779-82.

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

15. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 2010;22:187-92.
16. Nadkarni GN, Gignoux CR, Sorokin EP, Daya M, Rahman R, Barnes KC, et al. Worldwide Frequencies of *APOL1* Renal Risk Variants. *N Engl J Med* 2018;379:2571-2.
17. Adhikari K, Mendoza-Revilla J, Chacón-Duque JC, Fuentes-Guajardo M, Ruiz-Linares A. Admixture in Latin America. *Curr Opin Genet Dev* 2016;41:106-14.
18. Coelho AVC, Moura RR, Cavalcanti CAJ, Guimarães RL. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* 2015;14:2876-84.
19. Colares VS, Titan SMDO, Pereira ADC, Malafronte P, Cardena MM, Santos S, et al. MYH9 and APOL1 Gene Polymorphisms and the Risk of CKD in Patients with Lupus Nephritis from an Admixture Population. *PLoS One* 2014;9:e87716.
20. Riella C, Siemens TA, Wang M, Campos RP, Moraes TP, Riella L V., et al. APOL1-Associated Kidney Disease in Brazil. *Kidney Int Reports* 2019;4:923-9.
21. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan S V, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241-50.
22. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerulonephritis Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 2012;2:139.
23. CENSO-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Internet]. IBGE 2016 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>
24. Silva ZP da, Ribeiro MCS de A, Barata RB, Almeida MF De. Socio-demographic profile and utilization patterns of the public healthcare system (SUS), 2003- 2008. [Article in Portuguese] *Cien Saude Colet* 2011;16:3807-16.
25. Alladaqbin DJ, Fernandes PN, Tavares MB, Brito JT, Oliveira GGS, Silva LR, et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

- Salvador, Brazil. PLoS One 2018;13:e0209036.
26. Pena SDJ, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Brazilian J Med Biol Res* 2009;42:870-6.
 27. Limou S, Dummer PD, Nelson GW, Kopp JB, Winkler C a. APOL1 toxin, innate immunity, and kidney injury. *Kidney Int* 2015;88:28-34.
 28. Rothhammer F, Dillehay TD. The late pleistocene colonization of South America: An interdisciplinary perspective. *Ann Hum Genet* 2009;73:540-9.
 29. Peng T, Wang L, Li G. The analysis of APOL1 genetic variation and haplotype diversity provided by 1000 Genomes project. *BMC Nephrol* 2017;18:267.
 30. Yadav AK, Kumar V, Sinha N, Jha V. APOL1 risk allele variants are absent in Indian patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2016;90:906-7.
 31. Udler MS, Nadkarni GN, Belbin G, Lotay V, Wyatt C, Gottesman O, et al. Effect of Genetic African Ancestry on eGFR and Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1682-92.
 32. Limou S, Nelson GW, Kopp JB, Winkler CA. APOL1 Kidney Risk Alleles: Population Genetics and Disease Associations. *Adv Chronic Kidney Dis* 2014;21:426-33.
 33. Franceschini N, Haack K, Almasy L, Laston S, Lee ET, Best LG, et al. Generalization of Associations of Kidney-Related Genetic Loci to American Indians. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:150-8.
 34. Toole JFO, Bruggeman LA, Madhavan S, Sedor JR. The Cell Biology of APOL1. *Semin Nephrol* 2017;37:538-45.
 35. Vanwalleghem G, Fontaine F, Lecordier L, Tebabi P, Klewe K, Nolan DP, et al. Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nat Commun* 2015;6:8078.
 36. Ma L, Chou JW, Snipes JA, Bharadwaj MS, Craddock AL, Cheng D, et al. APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2016;28:1-13.
 37. Bruggeman LA, Toole JFO, Sedor JR. APOL1 polymorphisms and kidney disease. Loss-of-function or gain-of-function? *Am J Physiol Ren*

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

- Physiol 2019;316:F1-8.
38. Anderson BR, Howell DN, Soldano K, Garrett ME, Katsanis N, Telen MJ, et al. In vivo Modeling Implicates APOL1 in Nephropathy: Evidence for Dominant Negative Effects and Epistasis under Anemic Stress. *PLOS Genet* 2015;11:e1005349.
 39. Ruchi R, Genovese G, Lee J, Charoonratana VT, Bernhardt AJ, Alper SL, et al. Copy number variation at the APOL1 locus. *PLoS One* 2015;10:1-11.
 40. Skorecki KL, Lee JH, Langefeld CD, Rosset S, Tzur S, Wasser WG, et al. A null variant in the apolipoprotein L3 gene is associated with non-diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2018;33:323-30.
 41. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Walker PD. Apolipoprotein L1 risk variants associate with systemic lupus erythematosus-associated collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:722-5.
 42. Kaveri S V, Mouthon L, Bayry J. Basophils and Nephritis in Lupus. *N Engl J Med* 2010;363:1080-2.

Table 1. Demographic characteristics of non-white Brazilian cases with lupus nephritis and non-SLE controls.

	LN cases n=201	Non-SLE controls n=222	P-value
Mean±SD age, years	35.0±11.0	33.6±10.4	0.17
Female sex, n (%)	179 (89.0%)	80 (36.0%)	<0.0001
APOL1			
0 RRA	170 (84.6%)	187 (84.2%)	0.30**
1 RRA	27 (13.4%)	34 (15.3%)	
2 RRA	4 (2.0%)	1 (0.4%)	
Genotype frequency			
G0G0	170 (84.6%)	187 (84.2%)	0.44**
G0G1	17 (8.4%)	19 (8.6%)	
G0G2	10 (5.0%)	15 (6.8%)	
G1G1	4 (2.0%)	1 (0.4%)	
G1G2	0	0	
G2G2	0	0	

Abbreviations: SLE, systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis; RRA, renal risk alleles.

**Chi-square test

Table 2. Non-white Brazilian lupus nephritis case characteristics, based on *APOL1* genotype.

	0 <i>APOL1</i> RRA n=170	1 <i>APOL1</i> RRA n=27	2 <i>APOL1</i> RRA n=4	P-value 0 vs ≥1 RRA
Characteristic				
Age at enrollment, years	35.5±10.8	32.1±12.1	35.0±10.8	0.09
Mean±SD (Median)	(34.5)	(28.0)	(30.5)	
Age at onset, years	30.0±10.2	26.6±8.8	30.5±12.4	0.14
Mean±SD (Median)	(29.0)	(26.0)	(27.0)	
Female sex, n (%)	149(87.6)	26(96.3)	4(100.0)	0.21
Less than high school graduate, n (%)	58(36.9)	10(45.4)	1(33.3)	0.51
Mean±SD BMI, kg/m ²	25.4±4.9	26.3±5.4	26.0±6.3	0.41
Hypertension, n (%)	104(61.2)	20(74.1)	2(50.0)	0.32
Diabetes, n (%)	6(3.5)	2(7.4)	0(0.0)	0.36
Active smoker, n (%)	5(3.8)	1(5.3)	0(0.0)	0.58
Mean±SD SLICC	6.8±1.8	6.3±1.5	6.2±2.1	0.10
Median duration SLE at last FU (25-75 th), mos	78.0(43.8-138.8)	66.0(28.0-128.0)	89.0(52.7-126.0)	0.52
Median duration LN at last FU (25-75 th), mos	60.0(30.0-252.0)	36.0(14.0-128.0)	58.5(43.3-107.5)	0.36
Initial laboratory results				
C3 <90mg/dL, n (%)	81(79.4)	10(62.5)	1(100.0)	0.21
C4 <10mg/dL, n (%)	57 (60.0)	6 (40.0)	0 (0)	0.11
Median SCr (25-75 th), mg/dL	1.20(0.70-2.00)	0.85(0.55-1.85)	4.18(0.77-6.00)	0.45
Median CKD-EPI eGFR (25-75 th), ml/min/1.73m ²	66(36.0-115.3)	86(30.9-127.4)	12(10.2-125.3)	0.60
Mean±SD SAlb, mg/dL	2.7±0.76	2.4±0.83	2.7±0.85	0.21
Median Proteinuria (25-75 th), g/day	3.40(1.60-6.20)	2.20(0.97-7.65)	3.21(2.20-4.20)	0.73
Initial LN kidney biopsy				
Proliferative lesion, %	81.7	84.0	75.0	1.00
Class (overall test)				0.89**
Class II, n (%)	3(1.8)	0	0	1.00
Class III (±V), n (%)	41(25.0)	8(32.0)	0	0.82
Class IV (±V), n (%)	93(56.7)	13(52.0)	3(75.0)	1.00
Class V, n (%)	27(16.5)	4(16.0)	1(25.0)	1.00
Median # glomeruli (25-75 th), n	15(9-21)	13(9-22)	13(6-18)	0.68
Median Global glomerular sclerosis (25-75 th), %	0.0(0.0-12.5)	6.0(0.0-20.0)	25.0(6.2-36.8)	0.055
Crescents, n (%)	64(43.4)	15(65.2)	1(25.0)	0.14
Median % crescents (25-75 th), %	0.0(0.0-18.1)	12.8(0-48.6)	0.0(0-10)	0.08

Downloaded from www.jrheum.org on November 20, 2019 - Published by The Journal of Rheumatology

Synechia to BC, n (%)	54(54.0)	12(70.6)	2(50.0)	0.34
Fibrinoid necrosis, n (%)	6(4.0)	1(4.3)	0(0.0)	1.00
Hyaline thrombi, n (%)	20(13.4)	4(17.4)	1(25.0)	0.55
TMA, n (%)	7(4.7)	1(4.3)	0(0.0)	1.00
Membranous component, n (%)	76 (49.7)	12(50.0)	3(75.0)	0.84
TIN, n (%)	15(10.1)	0(0.0)	1(25.0)	0.47
Tubular atrophy >25%, n (%)	17(11.6)	14(63.6)	2(50.0)	0.002
Interstitial fibrosis >25%, n (%)	25(17.0)	8(36.3)	2(50.0)	0.018
Mean±SD activity index	5.4±3.3	6.1±5.4	3.0±3.0	0.92
Mean±SD chronicity index	2.8±1.6	4.1±2.3	4.0±2.0	0.011

****Chi –square test**

T-test used for normally distributed continuous variables and reported as mean and standard deviation (±SD); Mann-Whitney test used for non-normally distributed continuous variables and displayed as median and 25-75th percentile; Fisher's exact test used for categorical variables.

Abbreviations: CKD, chronic kidney disease; BMI, body mass index; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria; SLE, systemic lupus erythematosus, LN, lupus nephritis; FU, follow-up; mos, months; RRA, renal-risk allele; SCr, serum creatinine; eGFR, estimated glomerular filtration rate; CKD-EPI, SALb, serum albuminaemia; BC, Bowman capsule; TMA, thrombotic microangiopathy; TIN, tubule-interstitial nephritis.

Table 3. Non-white Brazilian lupus nephritis case treatment and outcomes, based on *APOL1* genotype.

	0 <i>APOL1</i> RRA n=170	1 <i>APOL1</i> RRA n=27	2 <i>APOL1</i> RRA n=4	P-value 0 vs ≥1 RRA
Treatment				
First Induction:	118(70.2)	18(66.7)	3(75.0)	0.83
Cyclophosphamide, n (%)				
Maintenance: Mycophenolate	141(86.0)	19(76.0)	3(75.0)	0.17
Mofetil, n (%)				
Hydroxychloroquine at	142(84.0)	20(74.1)	4(100.0)	0.43
enrollment, n (%)				
ACEi/ARB at enrollment, n (%)	118(71.1)	16(64.0)	3(75.0)	0.66
Response after induction				
Complete or partial response at	85 (65.9)	13(56.5)	1(33.3)	0.66
6mos, n (%)				
Sustained eGFR <60	6(4.4)	5(21.7)	0	0.018
ml/min/1.73m ² at 6 mos, n (%)				
Complete or partial response at	104(77.0)	12(57.1)	2(66.7)	0.075
12mos, n (%)				
Sustained eGFR <60	9(6.7)	4(19.0)	0	0.11
ml/min/1.73m ² at 12 mos, n (%)				
Complete or partial response at	91(82.0)	8(61.5)	3(100)	0.31
24mos, n (%)				
Sustained eGFR <60	8(7.2)	3(23.1)	0	0.14
ml/min/1.73m ² at 24 mos, n (%)				
Outcomes at last follow-up				
Median Scr (25-75 th), mg/dL	0.80(0.68-1.20)	0.80(0.60-3.00)	1.45(0.62-2.58)	0.69
Median eGFR (25-75 th)	97(64.8-116.1)	95(20.9-118.9)	72(22.3-135.6)	0.63
Mean SAlb, mg/dL	3.8±0.54	3.8±0.55	3.7±0.48	0.47
Median Proteinuria (25-75 th),	0.40(0.15-1.20)	0.49(0.20-1.67)	0.13(0.11-0.76)	0.74
g/day				
Complete or partial response, n	121(71.1)	17(63.0)	2(50.0)	0.29
(%)				
Flare after response, n (%)	65(47.8)	8(44.4)	1(33.3)	0.82
Refractory nephritis, n (%)	23(13.6)	8(29.6)	0	0.10
eGFR <60 ml/min/ 1.73m ² , n(%)	40(23.5)	8(29.6)	2(50.0)	0.37
eGFR <30 ml/min/ 1.73m ² , n (%)	19(11.2)	8(29.6)	2(50.0)	0.005
ESRD, n (%)	10(5.9)	7(25.9)	0	0.007
Median time to ESRD (25-75 th),	114(36-220)	14(9-22)	0	0.002
mos				

Abbreviations: ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor antagonist; ESRD, end stage kidney disease.

Table 4. Results of second kidney biopsy for LN cases.

	0 <i>APOL1</i> RRA n=43	1 <i>APOL1</i> RRA n=7	2 <i>APOL1</i> RRA n=0	P-value 0 vs ≥1 RRA
Proliferative lesion, %	81.4	71.4	0.0	0.62
Classes (overall test)				0.28**
Class II	1(2.3)	0(0.0)	0.0	1.00
Class III (±V)	15(34.9)	0(0.0)	0.0	0.09
Class IV (±V)	20(46.5)	5(71.4)	0.0	0.42
Class V	7(16.3)	2(28.6)	0.0	0.60
Median # glomeruli (25-75 th)	12(8-16)	18(10-22)	0.0	0.11
Median Global glomerular sclerosis (25-75 th), %	8.3 (0.0-28.2)	4.0 (0.0-13.3)	0.0	0.55
Crescents, n (%)	10(23.8)	4(57.1)	0.0	0.09
Median % crescents (25-75 th), %	0(0-22)	18.2(5-75)	0.0	0.03
Synechia to BC, n (%)	24(70.6)	2(40.0)	0.0	0.31
Fibrinoid necrosis, n (%)	2(4.8)	0(0.0)	0.0	1.00
Hyaline thrombi, n (%)	6(4.7)	1(14.3)	0.0	1.00
TMA, n (%)	2(4.7)	0(0.0)	0.0	1.00
Membranous component, n (%)	26(61.9)	5(71.4)	0.0	1.00
TIN, n (%)	4(9.5)	3(42.9)	0.0	0.05
Tubular atrophy >25%, n (%)	13(37.1)	2(33.3)	0.0	1.00
Interstitial fibrosis >25%, n (%)	16(45.7)	4(66.7)	0.0	0.41
Mean±SD activity index	3.9±2.8	5.7±3.5	0.0	0.32
Mean±SD chronicity index	4.4±1.9	4.7±0.6	0.0	0.80

**Chi-square test

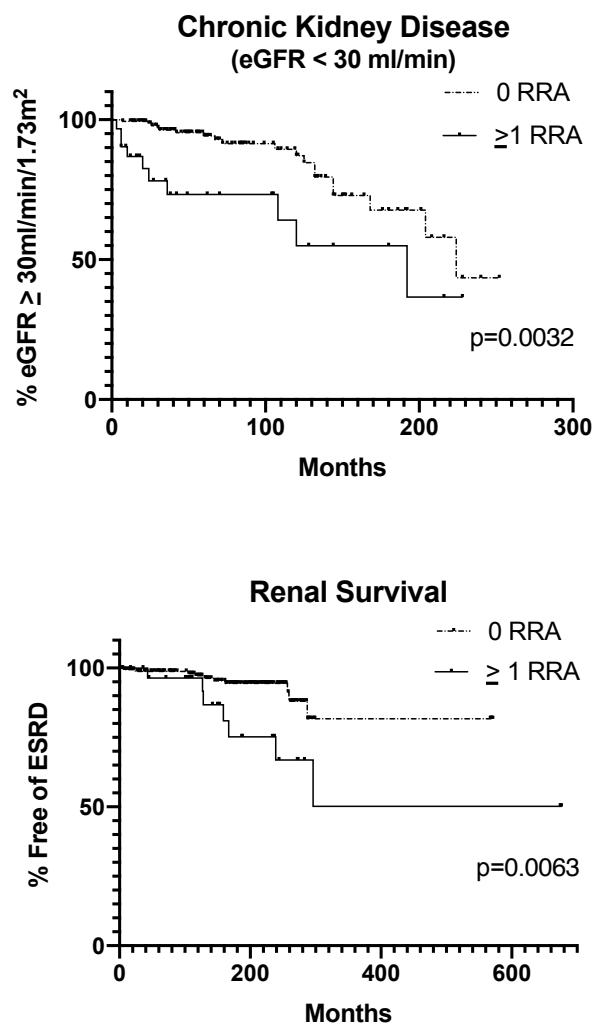
Abbreviations: RRA, renal-risk allele; BC, Bowman capsule; TMA, thrombotic microangiopathy; TIN, tubule-interstitial nephritis.

Table 5. Characteristics and outcomes of LN cases with two *APOL1* risk alleles.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age at recruitment	28	51	29	32
Sex	Female	Female	Female	Female
Ancestry	Black	Mixed	Black	Mixed
SLICC criteria	8	5	4	8
LN duration, months	120	47	70	42
Kidney biopsy	LN class IV-S	LN class IV-G/V	LN class IV-S/V	LN class V
Crescents, %	10	0	0	0
Global sclerosis, %	36.8	25	25	0
TA/IF, %	50-75	50-75	<25	<25
AI/CI	3/6	NA	6/4	0/2
Treatment	CF, MMF, steroids	CF, MMF, steroids	CF, MMF, CsA, steroids	CF, MMF, steroids
eGFR, mL/min (CKD-EPI) last follow-up	28	18	140	113
Outcome	CKD stage 4	CKD stage 4	Partial response	Complete response
<i>APOL1</i> genotype	G1G1	G1G1	G1G1	G1G1

Abbreviations: SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria; LN, lupus nephritis; TA, tubular atrophy; IF, interstitial fibrosis; AI, activity index; CI, chronicity index; NA, not available; CF, cyclophosphamide; MMF, mycophenolate mofetil; CsA, cyclosporine; CKD, chronic kidney disease.

Figure1: Kaplan-Meier survival curves, based on *APOL1* genotype.



P-values represent results from logrank test.

5 DISCUSSÃO GERAL

A presente tese analisou diversas características demográficas, clínicas, laboratoriais, histológicas e de resposta ao tratamento implicadas nesse desfecho em uma coorte de pacientes atendidos no serviço público de saúde em dois ambulatorios de referência em glomerulopatias no estado de Pernambuco, com mediana de cerca de cinco anos de acompanhamento. A esses foram adicionados pacientes de outro serviço de referência em São Paulo. Também realizamos genotipagem para as variantes de risco renal do gene *APOL1*.

Características clínico-laboratoriais como hipertensão arterial no momento do recrutamento e TFG reduzida na apresentação da NL foram dados correlacionados a DRC progressiva ($\text{TGF}_{\text{e}} < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) na análise univariada. No entanto, a hipertensão não se mostrou como variável independente na análise de regressão logística. Hipertensão arterial pode ser uma causa de doença renal, como também pode ser uma consequência da função renal deteriorada (AUSTIN et al., 1994; BARR et al., 2003). Os dados de hipertensão foram avaliados no momento do recrutamento e, como a grande maioria dos pacientes eram mulheres jovens que tiveram diagnóstico de NL com menos de 30 anos em média, não eram diabéticas previamente (menos e 4% desenvolveu diabetes em decorrência do tratamento), a maioria não tinha histórico de hipertensão, entretanto desenvolveram a hipertensão no curso da NL.

Em relação a fatores socioeconômicos, vários autores relatam que esse aspecto confunde a interpretação do papel do fator racial, em virtude de negros e hispânicos dos EUA terem menos acesso à saúde (BARR et al., 2003; CONTRERAS et al., 2006). O presente estudo analisou uma coorte bastante uniforme em que todos os pacientes, usuários do sistema único de saúde (SUS), tinham acesso gratuito aos medicamentos imunossupressores, apesar de serem em sua grande maioria de baixa renda (com rendimento mensal de cerca de 100 dólares *per capita*). O estudo mostrou que escolaridade não foi um fator significativo para determinar desfecho de DRC ao final do acompanhamento, assim como raça nessa população miscigenada. Não havia participantes indígenas ou asiáticos, porém o fato do paciente se autodeclarar branco ou não-branco não foi importante para determinar o desfecho renal ao final do acompanhamento. Apesar de um estudo brasileiro ter mostrado que os indivíduos auto-declarados negros ou pardos tinham

maior ancestralidade africana (PARRA et al., 2003), isso não foi demonstrado em um estudo realizado em Pernambuco onde a cor da pele não pareceu ter relação com marcadores de ancestralidade (COELHO et al., 2015). Outras regiões do país também apresentam um perfil similar de ancestralidade, com predomínio da europeia, seguida pela africana e, em um percentual menor, pela ameríndia (PARRA et al., 2003).

Raça não foi variável importante para desfecho de DRC nesta população, porém a presença de variantes de risco renal do gene *APOL1* foi implicada no desfecho renal desfavorável. Apesar da frequência de duas variantes de risco do *APOL1* ter sido baixa nos pacientes não-brancos ambulatoriais com NL (2,0%), não diferindo dos controles saudáveis também não-brancos (0,4%), observa-se que 50% dos casos com 2 ARR evoluíram para DRC estágio 4, em comparação com 11,2% e 29,6% dos pacientes com 0 ARR e 1 ARR, respectivamente. No estudo de Freedman e colaboradores (2014) 25% dos pacientes afro-americanos portadores de DRCT em TRS por NL tinham 2 ARR, enquanto que 12% dos portadores de lúpus sem nefropatia possuíam as duas variantes de risco do *APOL1*. Nesse mesmo estudo, a frequência daqueles com 1 ARR não se mostrou diferente entre os grupos (42% e 47%, respectivamente).

A biópsia renal inicial continua sendo o exame padrão-ouro para avaliação de tratamento e prognóstico e a presente coorte de Pernambuco confirma esse achado. Pacientes com diagnóstico de NL classe IV na biópsia inicial e lesão túbulo-intersticial crônica (fibrose intersticial) apresentaram maior chance de evolução para DRC na análise de regressão logística. De fato, a classe IV, NL proliferativa difusa, é a classe mais agressiva com maior risco de dano renal irreversível e a fibrose intersticial (FI), em conjunto com atrofia tubular (AT), denotam lesão cicatricial que não é mais passível de tratamento com imunossupressor (AUSTIN et al., 1994; RIJNINK et al., 2017; YANG et al., 2015). No entanto, na curva de sobrevida renal, com desfecho para DRCT, apenas FI $\geq 25\%$ e NL classe IV na biópsia renal inicial foram estatisticamente significante com um RR de 4,96 (IC 95%=1.9-12,9, $p<0,0001$) e 2,96 (IC 95%= 1,3–7,0; $p=0,036$), respectivamente.

Esta coorte retrospectiva não tinha poder suficiente para analisar a eficácia do tratamento. Os achados de maior prevalência de DRC no último seguimento naqueles que receberam ciclofosfamida como terapia de indução refletem

primordialmente a escolha de um medicamento mais potente para uma apresentação mais grave de NL. Vale ressaltar que, a partir do momento em que os pacientes apresentavam queda na sua TFG_e, hidroxicloroquina e inibidor da enzima conversora da angiotensina ou bloqueador do receptor da angiotensina II eram mais frequentemente retirados de sua prescrição. No entanto, a resposta precoce à terapia e a ausência de novos episódios subsequentes de atividade renal foram fortes preditores independentes de melhores desfechos renais. Vários estudos revelaram que a proteinúria média no tempo de acompanhamento e a incapacidade de reduzir a proteinúria para menos de 0,8g/dia aos 12 meses têm sido associados a piores desfechos renais. O valor preditivo não foi melhorado pela adição de avaliação de hematúria, creatinina sérica ou de proteinúria em um ano (HOUSSIAU et al., 2010; REICH et al., 2011; TAMIROU et al., 2015; YANG et al., 2015). Apesar dos estudos EURO-LUPUS e MAINTAIN terem incluído principalmente indivíduos caucasianos com NL, nosso estudo confirmou que a obtenção de uma resposta pelo menos parcial aos 6 e 12 meses aumenta a chance de melhores resultados no longo prazo também nesta população de raça miscigenada (HOUSSIAU et al., 2004; TAMIROU et al., 2016). Uma coorte anterior mostrou que os pacientes que não alcançaram a remissão completa ou parcial da atividade da NL tiveram uma taxa de declínio da função renal 30 vezes mais rápida do que os respondedores (REICH et al., 2011). Nosso estudo demonstrou ainda que uma segunda recidiva após resposta também aumenta a chance de evolução para DRC progressiva, corroborando o achado de outros autores que mostraram que o tempo sob atividade de exacerbação em surto nefrítico (mais do que nefrótico) é fator de risco para DRC no longo prazo (MORONI et al., 1996; PARIKH et al., 2014).

Na análise do impacto da genotipagem das variantes de risco da *APOL1*, observamos que a presença de apenas ≥ 1 ARR estava associada a maior percentual de FI e AT, danos crônicos intersticiais, mas não se relacionava com maior atividade glomerular ou maior presença de NL classe IV. Esse dado já havia sido descrito em um estudo em síndrome nefrótica, para os casos com 2 ARR, isto é mais lesão crônica intersticial e tubular e não glomerular (SAMPSON et al., 2015). Outro estudo que avaliou as variantes G1 e G2 do *APOL1* em biópsias de NL também não evidenciou diferença entre classes ou atividade glomerular, exceto por crescentes não necrotizantes e glomerulopatia colapsante, naqueles com 2 ARR (LARSEN et al., 2013). Na nossa coorte, observamos que, apesar das

características clínico-laboratoriais iniciais e tratamento similares entre os grupos, os pacientes não-brancos com ≥ 1 ARR apresentaram biópsia inicial com mais cronicidade e isso se associou a mais DRC progressiva.

Estudos recentes têm reforçado que a interação entre o ambiente e a genética é fundamental para a deflagração da nefropatia pelo *APOL1* (KOPP, HEYMANN e WINKLER, 2017; LANGEFELD et al., 2018). Infecção pelo HIV, conhecido estimulante da imunidade inata produtora de IFN, leva ao desenvolvimento de nefropatia em cerca de 50% dos afro-americanos portadores do HIV sem tratamento e que possuem duas variantes de risco do *APOL1* (KOPP et al., 2011). Além disso, uso exógeno de IFN pode levar a um aumento de expressão do gene *APOL1* com risco de desenvolvimento de glomerulopatia colapsante nos portadores do genótipo de risco (NICHOLS et al., 2015). Nos pacientes com NL que evoluíram para DRC dialítica foi evidenciada associação com 2 ARR em um estudo multicêntrico americano (FREEDMAN et al., 2014). Não se observou associação com o genótipo *APOL1* naqueles com NL ambulatorial, não-dialíticos, em um estudo brasileiro; mas houve correlação com um polimorfismo do haplótipo E1 do gene *MYH9*, e os autores admitem que isso pode ter sido decorrente de amostragem insuficiente uma vez que esse se encontra em desequilíbrio de ligação com o gene *APOL1* (COLARES et al., 2014).

A grande maioria dos estudos utiliza o modelo recessivo para análise de risco, no entanto há indícios de que o modelo dominante, ou seja, a presença de um ou mais alelos de risco, pode levar ao aparecimento de um fenótipo intermediário. Um estudo em HIVAN mostra um OR de 89 para 2 ARR e um OR de 5,5 para 1 ARR (KASEMBELI et al., 2015b) e outro em GESF mostra um risco 1,7 vezes maior para aqueles com 1 ARR, e um risco 10 vezes maior para 2 ARR (KOPP et al., 2011). No próprio estudo que demonstrou 2 ARR da *APOL1* associado a DRCT decorrente de NL, relata-se que os casos com 1 ARR iniciaram diálise mais precocemente do que os com 0 ARR, porém mais tardiamente quando comparados aos com 2 ARR (FREEDMAN et al., 2014).

Esses achados dão suporte à influência de um único alelo *APOL1* como importante para DRC em ambientes onde está presente o segundo gatilho. O cromossomo 22q também possui risco maior para duplicação de genes na região do gene *APOL1-4* e a variação do número de cópias pode alterar a dosagem e a expressão dos genes. Cópias adicionais de *APOL1* foram observadas com maior

frequência em casos de DRC do que nos controles, possivelmente aumentando a suscetibilidade à DRC em heterozigotos (RUCHI et al., 2015). A associação entre variantes ausentes em *APOL3* e DRCT já foi relatada (SKORECKI et al., 2018), independentemente do *status* do genótipo *APOL1* e da porcentagem de ancestralidade africana. Isso reforça o conceito de que outras apolipoproteínas (além da *apol1*) podem influenciar o risco para DRC não diabética.

Este estudo tem pontos fortes e limitações. A força do estudo reside sobretudo no acompanhamento longitudinal, com mediana de 5 anos, em uma amostra relativamente grande de brasileiros com biópsia renal confirmando NL. As limitações incluem a falta de marcadores de ancestralidade em casos e controles não brancos auto-descritos. A presença infrequente de 2 ARR de *APOL1* nesta coorte e poucos casos de NL com DRCT não permitiram a avaliação de associações de *APOL1* em um modelo autossômico recessivo. No entanto, entre os 4 casos brasileiros de NL com 2 ARRs de *APOL1*, a única que obteve resposta completa apresentou NL membranosa ou classe V (não proliferativa), uma lesão menos agressiva conhecida por ter menor resposta de linfócitos Th1 (KAVERI, MOUTHON e BAYRY, 2010). Em contraste, os casos de NL classe IV geralmente apresentam-se com vias de ativação do fator de necrose tumoral α e de sinalização de INF durante períodos de atividade nefrítica (PARIKH et al., 2017; DER et al., 2019). Portanto, a expressão de ARRs de *APOL1*, que são supra-regulados por citocinas inflamatórias em surtos na NL, pode resultar em morte celular e mais liberação de citocinas, favorecendo o ciclo vicioso de ativação da piroptose (BECKERMAN e SUSZTAK, 2018).

Portanto, concluímos que a distinção de raça nessa coorte não teve correlação com o prognóstico, mas a presença de um ou mais ARRs de *APOL1* está associada a taxas mais altas de lesão túbulo-intersticial crônica e aumento do risco de evolução para estágio avançado de DRC e DRCT, embora não haja diferença no tipo de lesão glomerular renal com base no genótipo *APOL1*. Construímos uma equação que prediz a evolução para DRC estágio 4, a chamada nefropatia progressiva, com base nas características significativas no modelo multivariado. Além disso, demonstramos que as frequências de alelos de risco do gene *APOL1* em brasileiros não brancos com NL não são significativamente diferentes daquelas em brasileiros saudáveis não brancos. No entanto, a presença de um único (ou dois) ARR(s) *APOL1* influenciou os resultados dos pacientes com NL, independentemente

do protocolo de tratamento. A genotipagem de *APOL1* nesta população brasileira de raça miscigenada lança nova luz sobre o papel da medicina de precisão para o tratamento da NL. As abordagens de tratamento podem precisar ser mais agressivas ou direcionar-se diretamente à *APOL1* para reduzir as taxas de DRCT por NL na população brasileira não branca.

6 CONCLUSÕES

- Na coorte pernambucana (280 pacientes com NL) 40 (14,3%) evoluiu com DRC estágio ≥ 4 . Os fatores associados a esse desfecho foram presença de NL classe IV e FI $\geq 25\%$ na biópsia renal inicial, ausência de resposta renal a terapia de indução e manutenção aos 12 meses e recorrência da nefrite após resposta inicial.
- A curva de sobrevida renal de Kaplan-Meier mostrou que NL classe IV e FI $\geq 25\%$ na biópsia renal inicial foram determinantes para desenvolver DRC estágio 5 ou necessidade de TRS.
- As variantes de risco de *APOL1* (G1 e G2) não foram mais frequentes nos 201 pacientes não brancos com NL em comparação aos 222 controles saudáveis não brancos. A presença de dois alelos de risco renal foi baixa tanto em pacientes como em controles (2 e 0,4%, respectivamente).
- Os pacientes que tinham um ou dois alelos de risco renal *APOL1* apresentaram biópsia renal inicial com mais cronicidade (maior índice de cronicidade, mais atrofia tubular e fibrose intersticial) e desenvolveram DRC progressiva ou DRC estágio 5 mais frequentemente comparado aos que tinham o genótipo selvagem.

7 PERSPECTIVAS

A avaliação dos fatores de risco clínicos e histopatológicos em conjunto com marcadores genéticos como os alelos de risco do *APOL1* permitirão definir estratégias terapêuticas mais adequadas e individualizadas para os pacientes com NL. Do ponto de vista prático, podemos citar como exemplo o caso da paciente portadora de 2 ARR (caso 3 – tabela 5, artigo 2) que mantém proteinúria persistente apesar de ter recebido três tipos de tratamento de indução para nefrite lúpica. Pode-se tratar de um caso de lesão pela *APOL1* e não nefrite lúpica em atividade isolada. Além disso, o conhecimento do risco real permite uma discussão mais concreta sobre o prognóstico pode levar a um aumento da aderência dos pacientes portadores de doenças crônicas como o lúpus (KOPP; WINKLER, 2020).

A partir do conhecimento da patogênese da nefropatia da *APOL1*, pode-se avaliar estratégias terapêuticas futuras. Como demonstrado, o IFN desencadeia mecanismos de lesão celular ao aumentar a expressão da *APOL1*, e o uso da cloroquina *in vitro* minimizou esse efeito (NICHOLS et al., 2015). Estudos clínicos são necessários para analisar o potencial terapêutico da cloroquina, bem como de inibidores de IFN. Como estratégia terapêutica definitiva podemos vislumbrar para o futuro o uso de terapia genética com uso da técnica de CRISP-cas9 para correção da mutação nos alelos de risco renal de *APOL1*.

REFERÊNCIAS

- 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, 2018.
- ALMAANI, S.; MEARA, A.; ROVIN, B. H. Update on lupus nephritis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 825–835, 2017.
- ANDERS, H. J.; ROVIN, B. A pathophysiology-based approach to the diagnosis and treatment of lupus nephritis. **Kidney International**, v. 90, n. 3, p. 493–501, 2016.
- ANDERSON, B. R. et al. In vivo Modeling Implicates APOL1 in Nephropathy Evidence for Dominant Negative Effects and Epistasis under Anemic Stress. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 7, p. e1005349, 6 jul. 2015.
- ASHLEY-KOCH, A. E. et al. MYH9 and APOL1 are both associated with sickle cell disease nephropathy. n. Ld, p. 386–394, 2011.
- AUSTIN, H. A. et al. Predicting renal outcomes in severe lupus nephritis Contributions of clinical and histologic data. **Kidney International**, v. 45, n. 2, p. 544–550, fev. 1994.
- BAJEMA, I. M. 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**, p. 789–796, 2018.
- BAO, H. et al. Successful Treatment of Class V+IV Lupus Nephritis with Multitarget Therapy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 10, p. 2001–2010, 2008.
- BARR, R. G. et al. Prognosis in proliferative lupus nephritis The role of socio-economic status and race/ethnicity. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, p. 2039–2046, 2003.
- BASTIAN, H. M. et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. **Lupus**, v. 11, n. 3, p. 152–160, 2 mar. 2002.
- BECKERMAN, P. et al. Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. **Nature Medicine**, v. 23, n. 4, p. 429–438, 2017.
- BECKERMAN, P.; SUSZTAK, K. APOL1 The Balance Imposed by Infection, Selection, and Kidney Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 8, p. 682–695, ago. 2018.

BRUGGEMAN, L. A.; TOOLE, J. F. O.; SEDOR, J. R. APOL1 polymorphisms and kidney disease Loss-of-function or gain-of-function? **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 316, n. 1, p. F1–F8, 2019.

BURGOS, P. I. et al. US patients of Hispanic and African ancestry develop lupus nephritis early in the disease course data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXXIV). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 2, p. 393–394, 1 fev. 2011.

CERVERA, R. et al. Morbidity and Mortality in Systemic Lupus Erythematosus During a 10-Year Period. **Medicine**, v. 82, n. 5, p. 299–308, set. 2003.

CHEN, T. K. et al. Association between APOL1 genotypes and risk of cardiovascular disease in MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 12, 2017a.

CHEN, T. K. et al. APOL1 genetic variants are not associated with longitudinal blood pressure in young black adults. **Kidney International**, v. 92, n. 4, p. 964–971, 2017b.

CHENG, W. et al. Polymorphisms in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are associated with the progression of IgA nephropathy in Chinese. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 8, p. 2544–2549, 2011.

CHUNG, S. A. et al. Lupus Nephritis Susceptibility Loci in Women with Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 12, p. 2859–2870, dez. 2014.

CLYNES, R. Uncoupling of Immune Complex Formation and Kidney Damage in Autoimmune Glomerulonephritis. **Science**, v. 279, n. 5353, p. 1052–1054, 13 fev. 1998.

COELHO, A. V. C. et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 2876–2884, 2015.

COLARES, V. S. et al. MYH9 and APOL1 Gene Polymorphisms and the Risk of CKD in Patients with Lupus Nephritis from an Admixture Population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e87716, 2014.

CONTRERAS, G. et al. Outcomes in African Americans and Hispanics with lupus nephritis. **Kidney International**, v. 69, n. 10, p. 1846–1851, 2006.

COOKE, J. N. et al. Polymorphisms in MYH9 are associated with diabetic nephropathy in European Americans. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 4, p. 1505–1511, 2012.

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, 2017.

DANCHENKO, N.; SATIA, J. A.; ANTHONY, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus a comparison of worldwide disease burden. **Lupus**, v. 15, n. 5, p. 308–318, 2 maio 2006.

DANILA, M. I. et al. Renal damage is the most important predictor of mortality within the damage index data from LUMINA LXIV, a multiethnic US cohort. **Rheumatology**, v. 48, n. 5, p. 542–545, 2008.

DAVIDSON, A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? **Nature Reviews Rheumatology**, 2015.

DER, E. et al. Tubular cell and keratinocyte single-cell transcriptomics applied to lupus nephritis reveal type I IFN and fibrosis relevant pathways. **Nature Immunology**, 20 maio 2019.

DIVERS, J. et al. JC polyoma virus interacts with APOL1 in African Americans with nondiabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 84, n. 6, p. 1207–1213, 2013.

DOOLEY, M. A. et al. Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 20, p. 1886–95, 17 nov. 2011.

FOGO, A. et al. Accuracy of the diagnosis of hypertensive nephrosclerosis in African Americans a report from the African American Study of Kidney Disease (AASK) Trial. AASK Pilot Study Investigators. **Kidney international**, v. 51, n. 1, p. 244–252, 1997.

FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76–87, 2014.

FORNONI, A.; MERSCHER, S.; KOPP, J. B. Lipid biology of the podocyte-new perspectives offer new opportunities. **Nature reviews. Nephrology**, v. 10, n. 7, p. 379–88, jul. 2014.

FRANCESCHINI, N. et al. Generalization of Associations of Kidney-Related Genetic Loci to American Indians. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 1, p. 150–158, 7 jan. 2014.

FREEDMAN, B. I. et al. Familial clustering of end-stage renal disease in blacks with HIV-associated nephropathy. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 34, n. 2, p. 254–258, 1999.

FREEDMAN, B. I. et al. The Non-Muscle Myosin Heavy Chain 9 Gene (MYH9) Is Not Associated with Lupus Nephritis in African Americans. **American Journal of Nephrology**, v. 32, n. 1, p. 66–72, 2010a.

FREEDMAN, B. I. et al. The apolipoprotein L1 (APOL1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. **Journal of the American Society of Nephrology JASN**, v. 21, n. 9, p. 1422–6, set. 2010b.

FREEDMAN, B. I. APOL1 and Nephropathy Progression in Populations of African Ancestry. **Semin Nephrol.**, v. 29, n. 6, p. 997–1003, 2012.

FREEDMAN, B. I. et al. Association of APOL1 variants with mild kidney disease in the first-degree relatives of African American patients with non-diabetic end-stage renal disease. **Kidney International**, v. 82, n. 7, p. 805–811, 2012.

FREEDMAN, B. I. et al. End-Stage Renal Disease in African Americans With Lupus Nephritis Is Associated With APOL1. **Arthritis & Rheumatology**, 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. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 6, p. 1615–1622, jun. 2015.

FREEDMAN, B. I. et al. APOL1 Renal-Risk Variants Do Not Associate With Incident Cardiovascular Disease or Mortality in the Systolic Blood Pressure Intervention Trial. **Kidney International Reports**, v. 2, n. 4, p. 713–720, 2017.

FREEDMAN, B. I. et al. JC polyoma viruria associates with protection from chronic kidney disease independently from apolipoprotein L1 genotype in African Americans. **Nephrology Dialysis Transplantation**, n. February, p. 1960–1967, 2018.

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

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, 2016.

GRANADO, D. et al. Intracellular APOL1 Risk Variants Cause Cytotoxicity Accompanied by Energy Depletion. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 11, p. 3227–3238, nov. 2017.

HAWKINS, G. A. et al. Re-Sequencing of the APOL1 - APOL4 and MYH9 Gene Regions in African Americans Does Not Identify Additional Risks for CKD Progression. **American Journal of Nephrology**, v. 42, n. 2, p. 99–106, 2015.

HAYEK, S. S. et al. A tripartite complex of suPAR, APOL1 risk variants and α v β 3 integrin on podocytes mediates chronic kidney disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 8, p. 945–956, 2017.

HOUSSIAU, F. A. et al. Early response to immunosuppressive therapy predicts good renal outcome in lupus nephritis Lessons from long-term followup of patients in the euro-lupus nephritis trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 50, n. 12, p. 3934–3940,

2004.

HOUSSIAU, F. A. et al. The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 01, p. 61–64, 1 jan. 2010.

HOY, W. E. et al. APOL1 Risk Alleles Are Associated with Exaggerated Age-Related Changes in Glomerular Number and Volume in African-American Adults An Autopsy Study . **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 12, p. 3179–3189, 2015.

JAKES, R. W. et al. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region Prevalence, incidence, clinical features, and mortality. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 2, p. 159–168, fev. 2012.

JAMES, J. A. Clinical Perspectives on Lupus Genetics Advances and Opportunities. **Rheumatic Disease Clinics of NA**, v. 40, n. 3, p. 413–432, 2014.

KAO, W. H. L. et al. A genome-wide admixture scan identifies MYH9 as a candidate locus associated with non-diabetic end stage renal disease in African Americans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 10, p. 1185–1192, 14 out. 2008.

KASEMBELI, A. N. et al. African origins and chronic kidney disease susceptibility in the human immunodeficiency virus era. **World Journal of Nephrology**, v. 4, n. 2, p. 295–306, 2015a.

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, 2015b.

KAVERI, S. V; MOUTHON, L.; BAYRY, J. Basophils and Nephritis in Lupus. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1080–1082, 9 set. 2010.

KIDNEY DISEASE IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) GLOMERULONEPHRITIS WORK GROUP. KDIGO Clinical Practice Guideline for Glomerulonephritis. **Kidney International Supplements**, v. 2, n. 2, p. 139, jun. 2012.

KLAG, M. J. et al. End-stage renal disease in African-American and white men. 16-year MRFIT findings. **JAMA The Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 16, p. 1293–1298, 23 abr. 1997.

KLEIN-HESSLING, S. et al. NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8+ T cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 511, 11 dez. 2017.

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, 14 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 JASN**, v. 22, n. 11, p. 2129–37, nov. 2011.

KOPP, J. B.; HEYMANN, J.; WINKLER, C. A. APOL1 Renal Risk Variants_ Fertile Soil for HIV-Associated Nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 37, n. 6, p. 514–519, 2017.

KOPP, J. B.; WINKLER, C. A. Genetic Testing for APOL1 Genetic Variants in Clinical Practice. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 1, p. 126–128, 7 jan. 2020.

KRONBICHLER, A. et al. Refractory lupus nephritis When, why and how to treat. **Autoimmunity Reviews**, 2019.

LAN, X. et al. APOL1 risk variants enhance podocyte necrosis through compromising lysosomal membrane permeability. **AJP Renal Physiology**, v. 307, n. 3, p. F326–F336, 2014.

LANATA, C. M. et al. Genetic contributions to lupus nephritis in a multi-ethnic cohort of systemic lupus erythematosus patients. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–15, 2018.

LANGFELD, C. D. et al. Genome-wide association studies suggest that APOL1-environment interactions more likely trigger kidney disease in African Americans with nondiabetic nephropathy than strong APOL1–second gene interactions. **Kidney International**, v. 94, n. 3, p. 599–607, set. 2018.

LARSEN, C. P. et al. Apolipoprotein L1 risk variants associate with systemic lupus erythematosus-associated collapsing glomerulopathy. **Journal of the American Society of Nephrology JASN**, v. 24, n. 5, p. 722–5, 2013.

LARSEN, C. P. et al. Histopathologic findings associated with APOL1 risk variants in chronic kidney disease. **Modern pathology an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 28, n. 1, p. 95–102, 2014.

LEE, B. T. et al. The APOL1 genotype of African American kidney transplant recipients does not impact 5-year allograft survival. **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 7, p. 1924–1928, 2012.

LEWIS, M. J.; JAWAD, A. S. The effect of ethnicity and genetic ancestry on the epidemiology, clinical features and outcome of systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 56, n. 1, p. i67–i77, 2017.

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, 2014.

LIMOU, S. et al. APOL1 toxin, innate immunity, and kidney injury. **Kidney International**, v. 88, n. 1, p. 28–34, 2015.

LIN, C. P. et al. Role of MYH9 and APOL1 in African and non-African populations with lupus nephritis. **Genes & Immunity**, v. 13, n. 3, p. 232–238, 22 abr. 2012.

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**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.

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. 114–20, 2012.

LIU, E. et al. Profiling APOL1 Nephropathy Risk Variants in Genome-Edited Kidney Organoids with Single-Cell Transcriptomics. **Kidney360**, p. 10.34067/KID.0000422019, 1 jan. 2020.

MA, L. et al. Localization of APOL1 Protein and mRNA in the Human Kidney Nondiseased Tissue, Primary Cells, and Immortalized Cell Lines. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 2, p. 339–348, 2014.

MA, L. et al. APOL1 Renal-Risk Variants Induce Mitochondrial Dysfunction. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, p. 1–13, 2016.

MALAFRONTÉ, P. et al. Paulista registry of glomerulonephritis 5-year data report. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, p. 3098–3105, 2006.

MALVAR, A. et al. Histologic versus clinical remission in proliferative lupus nephritis. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 32, n. 8, p. 1338–1344, 1 ago. 2017.

MAROZ, N.; SEGAL, M. S. Lupus nephritis and end-stage kidney disease. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 346, n. 4, p. 319–323, 2013.

MCNICHOLAS, B. A.; NELSON, P. J. Immunity unmasks APOL1 in collapsing glomerulopathy. **Kidney International**, v. 87, n. 2, p. 270–272, 2015.

MEJIA-VILET, J. M. et al. Immune gene expression in kidney biopsies of lupus nephritis patients at diagnosis and at renal flare. **Nephrology Dialysis Transplantation**, n. May, p. 1–10, 2018.

MELO, F. A. F. et al. JC polyomavirus infection in candidates for kidney transplantation living in the Brazilian Amazon region. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 145–9, abr. 2013.

MERCADAL, L. et al. Factors affecting outcome and prognosis in membranous lupus nephropathy. **Nephrology, dialysis, transplantation official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 17, n. 10, p. 1771–1778, 2002.

MINA, R.; BRUNNER, H. I. Pediatric Lupus—Are There Differences in Presentation, Genetics, Response to Therapy, and Damage Accrual Compared with Adult Lupus? **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 53–80, fev. 2010.

MODY, P. G.; MODY, G. M.; ASSOUNGA, A. The clinical manifestations and response to treatment in South Africans with lupus nephritis. **Lupus**, v. 27, n. 7, p. 1207–1217, 2018.

MOHAN, C.; PUTTERMAN, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 6, p. 329–341, 31 mar. 2015.

MORONI, G. et al. “Nephritic flares” are predictors of bad long-term renal outcome in lupus nephritis. **Kidney International**, v. 50, n. 6, p. 2047–2053, dez. 1996.

MORONI, G.; DEPETRI, F.; PONTICELLI, C. Lupus nephritis When and how often to biopsy and what does it mean? **Journal of Autoimmunity**, v. 74, n. June, p. 27–40, 2016.

MUNROE, M. E.; JAMES, J. A. Genetics of Lupus Nephritis Clinical Implications. **Seminars in Nephrology**, v. 35, n. 5, p. 396–409, set. 2015.

NADKARNI, G. N. et al. Worldwide Frequencies of *APOL1* Renal Risk Variants. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 26, p. 2571–2572, 2018.

NELSON, G. W. et al. Dense mapping of MYH9 localizes the strongest kidney disease associations to the region of introns 13 to 15. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 9, p. 1805–1815, 1 maio 2010.

NICHOLS, B. et al. Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. **Kidney International**, v. 87, n. 2, p. 332–342, 2015.

O’SEAGHDHA, C. M. et al. The MYH9/APOL1 region and chronic kidney disease in European-Americans. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 12, p. 2450–2456, 2011.

OBRIȘCĂ, B. et al. Histological predictors of renal outcome in lupus nephritis the importance of tubulointerstitial lesions and scoring of glomerular lesions. **Lupus**, v. 27, n. 9, p. 1455–1463, 2018.

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.

OLABISI, O. A.; HENEGHAN, J. F. APOL1 Nephrotoxicity_ What Does Ion Transport Have to Do With It? **Seminars in Nephrology**, v. 37, n. 6, p. 546–551, 2017.

OSIO-SALIDO, E.; MANAPAT-REYES, H. Epidemiology of systemic lupus erythematosus in Asia. **Lupus**, v. 19, n. 12, p. 1365–1373, 14 out. 2010.

PARANJPE, I. et al. Association of APOL1 Risk Genotype and Air Pollution for Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, p. CJN.11921019, 20 fev. 2020.

PARIKH, S. V. et al. Renal flare as a predictor of incident and progressive CKD in patients with lupus nephritis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, n. 2, p. 279–284, 2014.

PARIKH, S. V. et al. Molecular imaging of the kidney in lupus nephritis to characterize response to treatment. **Translational Research**, v. 182, p. 1–13, 2017.

PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 177–82, 2003.

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, 2013.

PAYS, E. et al. The trypanolytic factor of human serum. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 477–486, jun. 2006.

PENA, S. D. J. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 870–876, 2009.

PENG, T.; WANG, L.; LI, G. The analysis of APOL1 genetic variation and haplotype diversity provided by 1000 Genomes project. **BMC nephrology**, v. 18, n. 1, p. 267, 2017.

PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2677–2686, ago. 2012.

PIRES, E. P. et al. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. **Transplant infectious disease an official journal of the Transplantation Society**, v. 13, n. 6, p. 633–7, 2011.

REEVES-DANIEL, A. M. et al. The APOL1 gene and allograft survival after kidney transplantation. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 5, p. 1025–1030, 2011.

REICH, H. N. et al. Persistent proteinuria and dyslipidemia increase the risk of progressive chronic kidney disease in lupus erythematosus. **Kidney international**, v. 79, n. 8, p. 914–920, 2011.

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

RIJNINK, E. C. et al. Clinical and Histopathologic Characteristics Associated with Renal Outcomes in Lupus Nephritis. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 5, p. 734–743, 8 maio 2017.

ROBINSON, T. W.; FREEDMAN, B. I. The Impact of APOL1 on Chronic Kidney Disease and Hypertension. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 26, n. 2, p. 131–136, 2019.

ROTHHAMMER, F.; DILLEHAY, T. D. The late pleistocene colonization of South America An interdisciplinary perspective. **Annals of Human Genetics**, v. 73, n. 5, p. 540–549, 2009.

ROVIN, B. H.; PARIKH, S. V.; ALVARADO, A. The Kidney Biopsy in Lupus Nephritis. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 537–552, ago. 2014.

RUCHI, R. et al. Copy number variation at the APOL1 locus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–11, 2015.

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**, p. 1–10, 2015.

SCHWARTZMAN-MORRIS, J.; PUTTERMAN, C. Gender Differences in the Pathogenesis and Outcome of Lupus and of Lupus Nephritis. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

SESSO R, LOPES AA, THOMÉ FS, LUGON J, WATANABE Y, S. D. **Diálise Crônica no Brasil - Relatório do Censo de Diálise, 2013**. Disponível em <http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013-14-05.pdf>.

SKORECKI, K. L. et al. A null variant in the apolipoprotein L3 gene is associated with non-diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 33, n. 2, p. 323–330, 2018.

SMITH, E. E.; MALIK, H. S. The apolipoprotein L family of programmed cell death and immunity genes rapidly evolved in primates at discrete sites of host-pathogen interactions. **Genome Research**, v. 19, n. 5, p. 850–858, 1 maio 2009.

SOUYRIS, M. et al. TLR7 escapes X chromosome inactivation in immune cells. **Science Immunology**, v. 3, n. 19, p. eaap8855, 26 jan. 2018.

TAMIROU, F. et al. A proteinuria cut-off level of 0.7 g/day after 12 months of treatment best predicts long-term renal outcome in lupus nephritis data from the MAINTAIN Nephritis Trial. **Lupus Science & Medicine**, v. 2, n. 1, p. e000123–e000123, 12 nov. 2015.

TAMIROU, F. et al. Long-term follow-up of the MAINTAIN Nephritis Trial, comparing azathioprine and mycophenolate mofetil as maintenance therapy of lupus nephritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 3, p. 526–531, 2016.

TEKTONIDOU, M. G.; DASGUPTA, A.; WARD, M. M. Risk of End-Stage Renal Disease in Patients With Lupus Nephritis, 1971-2015 A Systematic Review and Bayesian Meta-Analysis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, n. 6, p. 1432–1441, jun. 2016.

THOMSON, R. et al. Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 20, p. E2130-9, 20 maio 2014.

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, 16 set. 2010.

TZUR, S. et al. APOL1 allelic variants are associated with lower age of dialysis initiation and thereby increased dialysis vintage in African and Hispanic Americans with non-diabetic end-stage kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. February, p. 1498–1505, 2012.

UDLER, M. S. et al. Effect of Genetic African Ancestry on eGFR and Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 7, p. 1682–1692, 2015.

USRDS 2012 ANNUAL DATA REPORT. **U.S. Renal Data System, USRDS 2012 Annual Data Report Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases**. Disponível em <<http://www.usrds.org/qtr/default.aspx>>.

VANDEPAPELIERE, J. et al. Prognosis of proliferative lupus nephritis subsets in the Louvain Lupus Nephritis inception Cohort. **Lupus**, v. 23, n. 2, p. 159–165, 1 fev. 2014.

VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, n. 8, p. 528–532, 29 ago. 2002.

VOLKOVA, N. et al. Neighborhood Poverty and Racial Differences in ESRD Incidence. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 2, p. 356–364, 2007.

WEENING, J. J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Journal of the American Society of Nephrology JASN**, v. 15, n. 2, p. 241–50, 1 fev. 2004.

WHITTLE, J. C. et al. Does Racial Variation in Risk Factors Explain Black-White Differences in the Incidence of Hypertensive End-Stage Renal SUMMARIES

Commentaries. **Diabetes Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 113–130, 1993.

WINSTON JA, BRUGGEMAN LA, ROSS MD, JACOBSON J, ROSS L, D'AGATI VD, KLOTMAN PE, K. M. NEPHROPATHY AND ESTABLISHMENT OF A RENAL RESERVOIR OF HIV TYPE 1 DURING PRIMARY INFECTION. **NEJM**, v. 344, n. 26, p. 1979–84, 2001.

YADAV, A. K. et al. APOL1 risk allele variants are absent in Indian patients with chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 90, n. 4, p. 906–907, out. 2016.

YANG, J. et al. Long-term renal outcomes in a cohort of 1814 Chinese patients with biopsy-proven lupus nephritis. **Lupus**, v. 24, n. 14, p. 1468–1478, 2 dez. 2015.

YOKOYAMA, H. et al. The outcome and a new ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis in Japanese. **Kidney international**, v. 66, n. 6, p. 2382–2388, 2004.

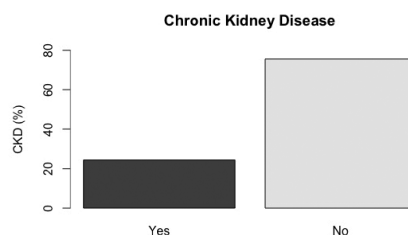
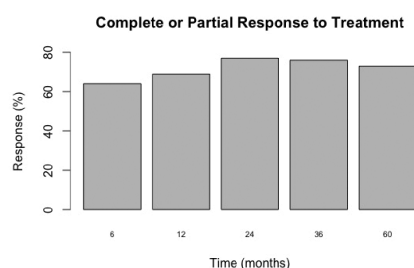
YU, F. et al. Redefining lupus nephritis Clinical implications of pathophysiologic subtypes. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 8, p. 483–495, 2017.

APÊNDICE A - ABSTRACT PUBLICADO (NDT)

Vajgel, G., Oliveira, C., Costa, D., Cavalcante, M. A., Valente, L., Kirsztajn, G., & Sandrin-Garcia, P. (2018). *SP193 FOLLOW UP OF LUPUS NEPHRITIS PATIENTS COHORT IN NORTHEASTERN BRAZIL*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 33(suppl_1), i408–i408. doi10.1093/ndt/gfy104.sp193

60ml/min, and end stage renal disease were the final outcome for 24% and 7%, respectively. Two patients (1%) died during follow-up due to infection.

CONCLUSIONS: In this cohort predominantly of young females from the Northeastern Brazil progressive CKD occurred in a quarter of the patients and ESRD in 7%. At presentation, NL Classes III and IV were the most biopsy findings, as well as reduced glomerular filtration, elevated proteinuria and hypoalbuminemia. Despite treatment, remission was not achieved by a significant number of patients and almost half of them relapsed during follow-up.



SP193 FOLLOW UP OF LUPUS NEPHRITIS PATIENTS COHORT IN NORTHEASTERN BRAZIL

Gisele Vajgel^{2,4}, Camila Oliveira^{2,3}, Denise Costa^{2,3}, Maria Alina Cavalcante², Lucila Valente², Gianna Kirsztajn¹, Paula Sandrin-Garcia⁴

¹Nephrology, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil, ²Nephrology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, ³Nephrology, Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira, Recife, Brazil and ⁴Genetics, Keiso Azami Immunopathology Laboratory (LIKA/UFPE), Recife, Brazil

INTRODUCTION AND AIMS: Lupus nephritis (LN) affects almost 70% of Lupus patients, it is a very prevalent secondary glomerulonephritis (GN) and may lead to chronic kidney disease (CKD). The aim of this study is to show the clinical picture of a LN cohort in two GN clinics from Recife, Northeastern Brazil.

METHODS: Adults with Lupus according to SLICC criteria, kidney biopsy of LN class III, IV or V and follow-up of more than 6 months were included in the study. Data from charts was retrospectively analyzed using RStudio software.

RESULTS: Between January and December of 2017, 202 patients were included in the study. The mean age was 36y (± 10), 92% were female, 75% non-white and 70% has completed high school. They had median of Lupus diagnosis and LN follow-up of 81 months (48-131) and 60 months (31-114), respectively. At LN diagnosis they presented with mean SCr 1.5mg/dL (± 1.2), SAlb 2.8mg/dL (± 0.8) and median proteinuria 3.7g/24h (2-6.8). The initial kidney biopsy revealed proliferative III or IV class ($\pm V$) in 81.3% of cases. Dialysis was needed in 17.4% of cases during flares. As induction therapy, besides steroids, Cyclophosphamide and Mycophenolate Mophetil were the drugs of choice in 72% and 21% of cases, respectively. Partial or complete remission at 6, 12, 24, 36, 60 months and at end of follow-up were achieved in 64%, 69%, 77%, 76%, 73% and 70% of cases, respectively. Relapse was found in 48% and refractory disease in 17%, despite two different treatments. Chronic kidney disease, with GFR less than

Patient's baseline characteristics and end points.

Mean age (SD)	36 (± 10)
Female	92%
Non white	75%
Body mass index (SD)	25 (± 5)
Median Lupus vintage, months (25th-75th)	81 (48-131)
Mean SLICC (SD)	7 (± 1.8)
ANA positive	97%
SCr mg/dL (SD)	1.5 (± 1.2)
GFR (CKD-EPI), mL/min (SD)	78 (± 44)
SAlb mg/dL (SD)	2.8 (± 0.8)
Proteinuria, g/24h (25th-75th)	3.7 (2-6.8)
Proliferative LN (class III,IV ± 5)	81%
Median follow-up, mo (25th-75th)	60 (31-114)
Remission at 6 months	64%
Remission at 12 months	69%
Remission at 24 months	77%
Remission at 36 months	76%
Remission at 60 months	73%
Remission at last consult	70%
Relapse	48%
Refractory disease	17%
CKD (GFR <60mL/min)	24%
End Stage Renal Disease	7%

APENDICE B - RESUMOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

- FOLLOW-UP OF LUPUS NEPHRITIS PATIENTS COHORT IN PERNAMBUCO IS IT POSSIBLE TO PREDICT OUTCOMES? (VII SINATER, Recife, Setembro, 2017)
- FOLLOW-UP OF LUPUS NEPHRITIS PATIENTS COHORT IN NORTHEASTERN BRAZIL (55th ERA EDTA Congress, Copenhagen, Maio, 2018)
- APOL1 Renal Risk Alleles in a Brazilian Lupus Nephritis Cohort (IX SINATER, Recife, Setembro, 2018).
- APOL1 Risk Variants in Brazilians with Lupus Nephritis (Kidney Week, San Diego, Novembro, 2018)

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INTERAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA APOL1 E MYH9 COM JC POLIOMA VIRUS E EVOLUÇÃO PARA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GLOMERULOSCLEROSE SEGMENTAR E

Pesquisador: Gisele Vajgel Fernandes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56719116.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.712.037

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B - PARECER CONEP (EMENDA APROVADA)**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA****PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: INTERAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA APOL1 E MYH9 COM JC POLIOMA VIRUS E EVOLUCAO PARA DOENCA RENAL CRONICA EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GLOMERULOSCLEROSE

Pesquisador: Gisele Vajgel Fernandes

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

Versão: 4

CAAE: 56719116.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.568.450

Continuação do Parecer: 2.568.450

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido_emenda1.pdf	11/03/2018 23:56:35	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Brochura Pesquisa	Emenda1_Projeto_completo_correcao_marco18.pdf	11/03/2018 23:56:16	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda1_Projeto_para_CEP_fev18.pdf	12/02/2018 19:51:15	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_APOL1_MYH9_LES.pdf	12/05/2016 17:49:18	Gisele Vajgel Fernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 29 de Março de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “INTERAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA APOL1 E MYH9 COM JC POLIOMA VIRUS E EVOLUCAO PARA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GLOMERULOSCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Gisele Vajgel Fernandes, endereço Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Universidade Federal de Pernambuco - Hospital das Clínicas, 5º. andar - CEP 50.670-901 - Recife-PE, Tel. (81) 21263734, (81) 21263733 e (81) 988695568, e-mail giselevajgel@hotmail.com. Também participam desta pesquisa Dra. Lucila Maria Valente Lopes -Tel 21263734; Dra Alina Cavalcante -Tel 21263734; Dra Denise Costa – tel (81) 988798767; Dra Camila Barbosa – tel (81) 99691600 ; Dra Nadja Asano – tel (81) 987662698; Dra Gianna Mastroianni – tel (11) 55764848.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

A nefrite é uma complicação do lúpus Eritematoso Sistêmico e a GESF são tipos de doença dos glomérulos, estrutura microscópica dos rins que são responsáveis pela filtração do sangue. Quando estão comprometidos pode haver perda de proteína ou sangue para urina. Os pacientes pode apresentar inchaço, pressão alta ou até mesmo não sentir nada. O diagnóstico atualmente é feito através

de exames de sangue, urina e biópsia renal. Se o problema não for devidamente tratado pode ocorrer a perda da função dos rins e risco de precisar de hemodiálise, diálise peritoneal ou transplante renal.

O presente estudo tem como objetivo pesquisar a presença de alguns genes que podem influenciar na evolução da NL e da GESF e correlacioná-los com a evolução da doença. Serão coletados, no ambulatorio onde ocorre a presente entrevista, cerca de 10 ml de sangue (quase 1 colher de sopa) e 5ml de urina (uma colher de chá) que serão encaminhados para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) para armazenamento em refrigeração. Os testes genéticos no sangue (polimorfismos dos genes APOL1 e MYH9, implicados no maior risco de doença renal crônica) e os testes na urina (pesquisa dos Poliomias vírus) serão realizados no LIKA-UFPE (sangue e urina) e no laboratório da Escola de Medicina da Wake Forest, localizada na Carolina do Norte, nos Estados Unidos (sangue).

Esse documento tem como objetivo pedir permissão ao senhor(a) para coleta de sangue e urina, bem como depósito, armazenamento e utilização dessas amostras no exterior (Estados Unidos). A retirada do consentimento de guarda das amostras biológicas humanas e dos dados genéticos humanos armazenados no estudo deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, e que poderaá acontecer a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão, sendo necessária a devolução/ destruição de TODAS as amostras biológicas coletadas durante o estudo, bem como a retirada dos dados genéticos do banco onde se encontrem armazenadas.

Os possíveis riscos que este tipo de estudo pode trazer são constrangimento durante as respostas das questões da entrevista e desconforto (dor/mancha roxa) durante a coleta do material de sangue. Para minimizar os riscos de constrangimento, a pesquisadora explicará cuidadosamente a importância da coleta, os possíveis desconfortos durante a mesma, considerados leves e temporários e caso persistam, a coleta será interrompida.

Como benefício direto, a entrevista proporcionará ao participante uma melhor reflexão sobre a sua própria doença, à medida que for sendo esclarecidas as suas dúvidas. Como benefício indireto, este trabalho pretende um maior aprofundamento

dos conhecimentos a respeito desta doença e um melhor entendimento de como ocorre o desenvolvimento da mesma.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os resultados dos exames, com as devidas explicações, serão entregues ao paciente (que deseje saber dos dados obtidos) durante a consulta ambulatorial, por carta ou email. Os dados coletados nesta pesquisa através da ficha de avaliação ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Hospital das Clínicas, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida assistência integral e gratuita, além de indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço (**Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP 50740-600, Tel. (81) 2126.8588 – e-mail cepccs@ufpe.br**).

Gisele Vajgel Fernandes

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar como voluntário (a) do estudo “INTERAÇÃO DO POLIMORFISMO DO GENE DA APOL1 E MYH9 COM JC POLIOMA VIRUS E EVOLUCAO PARA DOENCA RENAL CRONICA EM PACIENTES COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GLOMERULOSCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL” que está sob a responsabilidade da pesquisadora Gisele. Fui devidamente informado (a) e

esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Desejo ser informado dos resultados da pesquisa ()Sim ()Não

Recife, ____/____/____

Assinatura do participante _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome	Nome
Assinatura	Assinatura

ANEXO D - FICHA CLÍNICA

DATA ENTREVISTA ____/____/____ DATA COLETA SANGUE ____/____/____

A- DADOS GERAIS

NOME _____

N° FICHA GN _____ N° PESQUISA _____ SEXO M (1) F (2)

NASCIMENTO ____/____/____ IDADE ____ PESO ____ KG ALT ____ M IMC

RG HC _____ TELEFONES _____

ENDEREÇO _____

BAIRRO _____ CEP _____ CIDADE _____

ESTADO _____ EMAIL _____

RAÇA (REPORTADA PELO PACIENTE) BRANCA (1) NEGRA (2) PARDA (3)
INDÍGENA (4) AMARELA (5)

ESCOLARIDADE ☐ Analfabeto (a) (1) ☐ 1° Grau Completo (2) ☐ 1° Grau Incompleto
(3) ☐ 2° Grau Completo (4) ☐ 2° Grau Incompleto (5) ☐ 3° Grau Completo (6) ☐ 3°
Grau Incompleto (7)

Comorbidade ☐ SIM _____ ☐ NÃO

Presença de HAS (uso de antihipertensivo atual ou PAS > 140/ PAD > 90 mmHg) Sim ()
Não () Tempo de HAS _____ Presença de DM Sim () Não () Tempo de DM
_____ Insulina ☐ SIM ☐ NÃO Intolerante a glicose? Sim () Não ()

História familiar

LES na família? Não () Sim () Parentesco _____ Nefropatia Sim () Tipo
_____ Parentesco _____ Não ()

B- HISTÓRIA DA DOENÇA

Diagnostico de LES ____/____ Δt Lupus= _____ Data do

diagnóstico nefrite ____/____/____ Δt diagn nefrite até bx=
 _____(anos, meses) Data da indução ____/____/____

DROGA DE INDUÇÃO () CF NIH () CF EUROLUPUS () CF<6PULSOS MMF ()
 CORTICOIDE ISOLADO () RITUXIMAB () SEM INFO

CRITÉRIOS SLICC

Critérios Clínicos	
1. Lúpus cutâneo agudo	Representado clinicamente principalmente pelo rash malar em “asa de borboleta” e pela fotossensibilidade.
2. Lúpus cutâneo crônico	Lúpus discoide (lesão cutânea que costuma deixar cicatrizes, incluindo alopecia irreversível).
3. Alopecia (não fibrótica)	Alopecia não discoide, reversível com o controle da atividade da doença.
4. Úlceras orais ou nasais	As úlceras mucosas no LES são indolores.
5. Doença articular	Artralgia ou artrite não erosiva.
6. Serosite	A pleurite e a pericardite são manifestações comuns no LES.
7. Nefrite	Representada pelos achados proteinúria > 500 mg/dia ou encontro de cilindros hemáticos no EAS.
8. Manifestações neurológicas	Convulsão, psicose, confusão mental, neurite periférica, outros.
9. Anemia hemolítica	Mas atenção o encontro de anemia de doença crônica é comum no doente lúpico. Entretanto, apenas a anemia hemolítica é critério diagnóstico.
10. Leucopenia ou linfopenia	Leucócitos < 4.000/ml ou linfócitos < 1.000/ml.
11. Plaquetopenia	Plaquetas < 100.000/ml
Critérios Imunológicos	
12. FAN	Positividade para a pesquisa do FAN (fator antinuclear), positivo em mais de 98% dos casos.
13. Anti-DNA dupla hélice (Anti-	Boa especificidade para o LES, presente

DNAds)	em 75% dos casos.
14. Anti-Sm	Autoanticorpo de maior especificidade, mas presente em apenas 30% dos casos.
15. Anticorpos Antifosfolípido	Presente em 50% dos pacientes lúpicos.
16. Hipocomplementemia	C3 baixo, C4 baixo ou CH50 baixo.
17. Coombs direto positivo	Teste de Coombs direto positivo.

Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI (COLETA)

Entrar com o peso específico na coluna do Score do SLEDAI se a alteração estiver **presente na visita ou nos últimos 10 dias antes**

Factor de ponderação	SLEDAI SCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8		Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro/desorganizado ou catatônico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8		Síndrome órgão-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes distúrbios da percepção, discurso incoerente, insónia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da actividade psicomotora Excluir causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios visuais	Alterações da retina ligados ao LES, incluindo corpos coróides, hemorragias retinianas, exsudado seroso ou hemorragia no coróide ou nevríte óptica Excluir HTA ou causa infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os pares cranianos

8		Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente; pode ser tipo migranoso mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8		AVC	Instalação recente de AVC Excluir arteriosclerose
8		Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungueal, hemorragias sub-ungueais, ou biópsia ou angiograma compatíveis com vasculite
4		Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios
4		Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da CK/aldolase ou eletromiografia ou biópsia compatível com miosite
4		Cilindros urinários	Cilindros de Eritrócitos ou de granulose
4		Hematuria	> 5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4		Proteinúria	> 0.5g/24h. Instalação recente ou aumento > 0.5g/24h
4		Piúria	> 5 leucócitos por campo. Excluir, infecção
2		Novo rash	Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório
2		Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2		Ulcerações nasais	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais
2		Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural derrame ou espessamento pleural
2		Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma
2		Hipocomplementémia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2		Aumento do DNA	>25 % no ligando pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
1		Trombocitopénia	<100.000 plaquetas/mm ³
1		Leucopénia	<3.000 leucócitos/mm ³ Excluir causas farmacológicas
1		Febre	>38° C excluir causa infecciosa
		SCORE SLEDAI TOTAL (1-105)	

C- DADOS CLÍNICOS ATUAIS

MEDICAMENTOS EM USO OBS. (no dia da coleta de sangue)

DROGA	DOSE ATUAL	TEMPO (MESES)
1. Prednisona		
2. Micofenolato de mofetil		

3. Cloroquina		
4. Hidroxicloroquina		
5. Ciclofosfamida		
6. Azatioprina		
8. BRA/IECA		

A() manutenção	B() indução
C() sem terapia imunossupressora	D() má aderência

D - EXAMES LABORATORIAIS (iniciais)

Hb/Ht = Leuc = B/S = Linf = Plaquetas = Coombs direto () pos () neg	Sumário de urina Proteínas = Hemácias = Piócitos = Dismorfismo eritrocitário? ()sim () nao () desconhecido
Creatinina = Glicose	Anti-DNA =()pos () neg ()NT Anti-Sm=()pos () neg ()NT
Alb=	FAN= ()pos () neg ()NT Padrão
CT= LDL= TGL=	pANCA=()pos () neg ()NT c ANCA= ()pos () neg ()NT
Relação albumina/creatinina na urina e/ou Proteinúria de 24 horas =	C3= ()normal ()baixo ()NT C4 = ()normal () baixo ()NT HBsAg ()pos () neg ()NT antiHCV ()pos () neg ()NT anti HIV ()pos () neg ()NT pico monoclonal()sim () nao ()NT

CL CR= _____(CKD-EPI) e _____(MDRD)

EXAMES LABORATORIAIS (coleta sangue)

Hb/Ht = Leuc = B/S =	Sumário de urina Proteínas = Hemácias =
----------------------------	---

Linf = Plaquetas = Coombs direto () pos () neg	Plócitos = Dismorfismo eritrocitário? () sim () nao () desconhecido
Creatinina = Glicose	Anti-DNA =() pos () neg () NT Anti-Sm=() pos () neg () NT
Alb=	FAN= () pos () neg () NT Padrão
CT= LDL= TGL=	pANCA=() pos () neg () NT c ANCA= () pos () neg () NT
Relação albumina/creatinina na urina e/ou Proteinúria de 24 horas =	C3= () normal () baixo () NT C4 = () normal () baixo () NT 25-OH-vitD

CL CR= _____(CKD-EPI) e _____(MDRD)

E- Histopatologia

1. Resultado da 1ª biópsia (lamina _____/ data ____/____/____)

- _____glomerulos/_____esclerosados globalmente(____%)
- Esclerose segmentar/sinéquias a cáps de Bowman?() sim () não
- Proliferação endocapilar(____/____)
- Crescentes _____(____/____) () não
- Necrose fibrinóide?() sim () não () não descrito
- Trombo hialino/deposito hialino? () sim () não () não descrito
- Lesões sugestivas de MAT? () sim () não () não descrito
- Espículas ou espessamento de MB? () sim () não () não descrito
- Colapso glomerular?() sim () não () não descrito
- Dilatação microcísticas dos túbulos?() sim () não () não descrito
- Nefrite Túbulointersticial () sim () não
- AT () focal () leve () mod () grave
- FI () discreta () leve () mod () grave
- IF IgG ()+ ()++ IgA()+ ()++ IgM()+ ()++ C1q()+ ()++
C3()+ ()++ Kappa () Lambda() fibrinogênio () negativa()

- o) Fullhouse? () sim
- p) Índice de atividade ____/24
- q) Índice de cronicidade ____/12

Conclusao NL classe _____

ME _____

Resultado da 2ª biópsia (lamina _____ / Data ____/____/____)

- a) ____glomerulos/____esclerosados globalmente(____%)
- b) Esclerose segmentar/sinéquias a cáps de Bowman?() sim () não
- c) Proliferação endocapilar(____/____)
- d) Crescentes____(____/____) () não
- e) Necrose fibrinóide?() sim () não () não descrito
- f) Trombo hialino/deposito hialino? () sim () não () não descrito
- g) Lesões sugestivas de MAT? () sim () não () não descrito
- h) Espículas ou espessamento de MB? () sim () não () não descrito
- i) Colapso glomerular?() sim () não () não descrito
- j) Dilatação microcísticas dos túbulos?() sim () não () não descrito
- k) Nefrite Túbulointersticial () sim () não
- l) AT () ausente () focal () leve () mod () grave
- m) FI () ausente () discreta () leve () mod () grave

- n) IF IgG ()+ ()++ IgA()+ ()++ IgM()+ ()++ C1q()+ ()++
C3()+ ()++ Kappa () Lambda() fibrinogênio () negativa()
- o) Fullhouse? () sim
- p) Índice de atividade ____/24
- q) Índice de cronicidade ____/12

Conclusao NL classe _____

ME _____

CLASSIFICAÇÃO

- **Classe I – Nefrite Lúpica mesangial mínima**
- **Classe II – Nefrite Lúpica mesangial proliferativa**
- **Classe III – Nefrite Lúpica focal** (<50% dos glomérulos)
 - III A – com lesões ativas
 - III A/C – com lesões ativas e crônicas
 - III C – com lesões crônicas
- **Classe IV – Nefrite Lúpica Difusa** (> 50% dos glomérulos)
 - IV-s (segmentar)
 - IV-g (global)
 - IV A – com lesões ativas
 - IV A/C – com lesões ativas e crônicas
 - IV C – com lesões crônicas
- **Classe V – Nefrite membranosa**
- **Classe VI – Nefrite esclerosante avançada** (90%) de esclerose sem atividade residual)

F- DESFECHO CLÍNICO

1. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO 6M () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO () NT Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
2. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO 1A () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO () NT Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
3. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO 2A () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO () NT Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
4. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO 3A () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO () NT Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
5. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO 5A () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO () NT Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
6. RESPOSTA À TERAPIA DE INDUÇÃO(ATUAL) () RC () RP () NR ()
 DETERIORIZAÇÃO DATA ____/____/____ (TEMPO APÓS início indução
 _____) Remissão imunológica? ☐ SIM ☐ NÃO ☐ NT
7. Nefrite lúpica refratária? () Sim () Não
8. Atingiu CLCR <60ml/min? () Sim () Não DATA ____/____/____ (TEMPO APÓS
 início indução _____)

9. Duplicou Cr basal? () Sim () Não DATA ___/___/___ (TEMPO APÓS início indução _____)

10. DRCT (estagio V)? () Sim () Não DATA ___/___/___ (TEMPO APÓS início indução _____)

G – RECORRÊNCIA

1. () SIM 2. () NÃO 3. () NT 4. () LES refratario

a. QUANTOS EPISÓDIOS DE FLARES? _____

b. Δt de flares _____ meses

c. Δt de follow-up geral _____

d. Δt sem flare _____

LEGENDA

RC resp completa (retorno da cr ao basal + REDUÇÃO RPC < 0,5)

RP estabilização da cr (+/- 25%) ou melhora da Cr + redução da RPC $\geq 50\%$, se RPC > 3, deve reduzir > 50% e RPC < 3.

Deteriorização Aumento sustentado $\geq 25\%$ da Cr

Flare Aumento agudo da Cr em $\geq 25\%$, independente da proteinúria, mas decorrente de atividade lúpica, e/ou Proteinúria ou RA/Cr > 1g/d (confirmada de 2 exames) após atingir RC ou Dobrar Proteinúria para > 2g/d (confirmada) após atingir RP.

NL refrataria ausência de RC ou RP após pelo menos 2 esquemas de tratamento diferentes (incluindo CF), período mínimo 12m (classes 3-4) e min 18m (classe 5)