



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JOÃO VICTOR CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE
BIÓPSIAS RENAIIS PRESERVADAS EM DIFERENTES
SOLUÇÕES E INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO
DO GENE *APOL1* EM PACIENTES COM
GLOMERULOPATIAS**

São Luís
2025

JOÃO VICTOR CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE
BIÓPSIAS RENAI PRESERVADAS EM DIFERENTES
SOLUÇÕES E INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO
DO GENE APOL1 EM PACIENTES COM
GLOMERULOPATIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

São Luís
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Victor Carvalho, João.

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE BIÓPSIAS
RENAIS PRESERVADAS EM DIFERENTES SOLUÇÕES E INVESTIGAÇÃO
DE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 EM PACIENTES COM
GLOMERULOPATIAS / João Victor Carvalho. - 2025.

71 p.

Orientador(a): Gyl Eanes Barros Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís - Ma, 2025.

1. Apol1. 2. Bouin. 3. Michel. 4. Biópsia. I.
Eanes Barros Silva, Gyl. II. Título.

JOÃO VICTOR CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA EXTRAÍDO DE BIÓPSIAS
RENAIS PRESERVADAS EM DIFERENTES SOLUÇÕES E
INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 EM
PACIENTES COM GLOMERULOPATIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós- Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Maranhão, como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovado em ____ de _____ de ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva

Livre Docente em Patologia e Medicina Legal
Universidade Federal do Maranhão
Orientador

Profa. Dra. Vanda Maria Ferreira Simões

Doutorado em Medicina
Universidade Federal do Maranhão
1º avaliadora

Prof. Dr. Precil Diego Miranda de Menezes Neves

Doutorado em Nefrologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
2º avaliador

Prof. Dr. Gisele Vajgel Fernandes

Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
3º avaliador

“Faça o teu melhor nas condições que tem
enquanto você não tem condições melhores
para fazer melhor ainda”
(Mario Sergio Cortella)

Dedico a minha querida avó Doralice

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois sem ele nada na minha vida seria possível, a minha mãe Vânia Carvalho que sempre me incentivou a continuar os estudos e se tornou minha fortaleza. Também agradeço a minha família, meu tio Ribamar, minhas tias Leana, Socorro e Inês por todo apoio e as minhas primas, Amanda e Alanna que são minhas irmãs e a minha sobrinha linda Emanuely por alegrar meus dias.

A minha namorada, Thaise Emanuelle por todo apoio, amor, carinho, atenção, companheirismo, também agradeço a minha cunhada Jéssica Gabrielle e minha sogra Rosilene pela convivência leve, amor, carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gyl Eanes Barros Silva pela orientação nesse período, além de toda a compreensão, conversas e apoio. Ao Augusto por todos os ensinamentos passados não só científico mas de vida tbm

Aos meus amigos, Ana, Denner, Letícia, Marta e Fran por todos os momentos especiais compartilhados dentro e fora do laboratório, cada risada, cada palavra de apoio, obrigado por tudo.

Aos meus amigos Ronald, Letícia, Emanuelle e Rafael que estão comigo desde a graduação e que compartilham dos mesmos sonhos que eu. Aos membros do Gepam, Kwang, Artur, Bruna, Gilvan, Juliana, Isabella, Cruz, obrigado por toda jornada compartilhada, por deixar nosso ambiente mais leve e tornar nossa convivência tão boa.

Agradeço ainda aos membros do LIME, Rayane, Victor, Arismar, Fernanda e Aryadna, muito obrigado por todo ensinamento passado a mim, ao Precil por toda a consultoria e por tirar minhas dúvidas no decorrer dessa jornada. Ainda agradeço ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), ao Hospital Universitário Presidente Dutra e à Universidade Federal do Maranhão.

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) representa um grave problema de saúde pública, frequentemente relacionada a glomerulopatias de curso progressivo. A identificação de variantes genéticas, como as do gene *APOL1*, tem sido fundamental para compreender a susceptibilidade e evolução dessas doenças, especialmente em populações de ancestralidade africana. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade e integridade do DNA genômico extraído de biópsias renais conservadas em diferentes meios (Michel, Bouin e formol) e investigar a presença das variantes G1 e G2 do gene *APOL1* em pacientes atendidos no serviço de Nefrologia do LIME-HUUFMA. Foram utilizadas amostras parafinadas, frescas e congeladas, com extração de DNA realizada por protocolos específicos para cada tipo de conservação. A qualidade do DNA foi avaliada por espectrofotometria (A260/A280), eletroforese em gel de agarose e testes de amplificação por PCR. Os resultados demonstraram uma clara influência do meio de conservação sobre o rendimento e a pureza do material genético extraído. As amostras armazenadas em solução de Michel apresentaram os melhores parâmetros de purificação, com concentrações variando de 3,3 ng/μL a 200,7 ng/μL e razões A260/A280 entre 1,8 e 1,9, valores ideais para DNA puro. Essas amostras também apresentaram maior taxa de sucesso na amplificação por PCR, com bandas visíveis e bem definidas. Fragmentos maiores e oriundos da região cortical do rim contribuíram significativamente para a obtenção de DNA com melhor qualidade, devido à maior densidade celular. Por outro lado, as amostras fixadas em Bouin mostraram-se extremamente degradadas, com baixas concentrações, ausência de bandas na eletroforese e razões de pureza fora da faixa ideal. A presença de ácido pícrico e a ação prolongada do fixador resultaram em modificações químicas no DNA, comprometendo as etapas de extração e purificação. Os dados reforçam que a escolha do meio de conservação e a área de origem do fragmento são determinantes para a recuperação de DNA viável. A padronização de protocolos de coleta e conservação, com preferência por amostras embebidas em Michel, pode otimizar estudos moleculares, especialmente aqueles voltados à genotipagem de variantes como as do gene *APOL1*, com implicações diagnósticas e prognósticas relevantes.

Palavras-chave: *APOL1*; Bouin; Michel; Biópsia.

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) represents a serious public health issue, often associated with progressive glomerulopathies. The identification of genetic variants, such as those in the *APOL1* gene, has been fundamental in understanding susceptibility and the progression of these diseases, particularly in populations of African ancestry. This study aimed to evaluate the quality and integrity of genomic DNA extracted from kidney biopsies preserved in different media (Michel, Bouin, and formalin) and to investigate the presence of the G1 and G2 *APOL1* gene variants in patients treated at the Nephrology Service of LIME-HUUFMA. Paraffin-embedded, fresh, and frozen samples were used, with DNA extraction performed using protocols specific to each preservation method. DNA quality was assessed by spectrophotometry (A260/A280), agarose gel electrophoresis, and PCR amplification tests. The results clearly demonstrated the influence of the preservation medium on the yield and purity of the extracted genetic material. Samples stored in Michel's solution showed the best purification parameters, with concentrations ranging from 3.3 ng/μL to 200.7 ng/μL and A260/A280 ratios between 1.8 and 1.9 ideal values for pure DNA. These samples also showed a higher success rate in PCR amplification, with visible and well-defined bands. Larger fragments derived from the renal cortex significantly contributed to obtaining higher quality DNA due to the greater cellular density. On the other hand, samples fixed in Bouin's solution were found to be highly degraded, with low concentrations, absence of bands in electrophoresis, and purity ratios outside the ideal range. The presence of picric acid and the prolonged action of the fixative resulted in chemical modifications to the DNA, compromising the extraction and purification steps. The data reinforce that the choice of preservation medium and the fragment's origin area are determining factors for the recovery of viable DNA. Standardizing collection and preservation protocols, with preference for Michel-embedded samples, can optimize molecular studies especially those focused on genotyping variants such as those of the *APOL1* gene with relevant diagnostic and prognostic implications.

Keywords: Bouin, michel, biopsy, *APOL1*

LISTA DE ABREVIações

DRC	Doença Renal Crônica
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
DM	Diabetes Mellitus
HDL	Lipoproteína de Alta densidade
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
GC	Glomerulopatia Colapsante
NL	Nefrite Lúpica
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
HIVAN	<i>HIV-associated nephropathy</i>
COVAN	<i>COVID-19-associated nephropathy</i>
FSR	Fator Sérico de Resistência
MO	Microscopia Óptica
ME	Microscopia Eletrônica
IF	Imunofluorescência
LIME	Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica
PAS	Periodic-Acid Schiff

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do gene <i>APOL1</i>	15
Figura 2	Mecanismo de ação do gene <i>APOL1</i> e suas variantes no controle do Trypanosoma.	24
Figura 3	Modelo de multímeros de <i>APOL1</i> em células renais que concilia a hipótese de ganho de função deletéria com o padrão recessivo de herança.	25
Figura 4	Eletroforese de amostras extraídas embebidas em meio transporte Michel.	47
Figura 5	Eletroforese das amostras parafinadas, previamente embebidas em formol e bouin	49

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Concentração e pureza das amostras extraídas do meio, previamente embebidas em Michel.	44
Tabela 2	Concentração e pureza das amostras extraídas de amostras parafinadas, previamente embebidas em formol e bouin.	47
Tabela 3	Identificação das variantes de risco do gene APOL1	49
Tabela 4	Tabela mostrando características do tecido e aspectos da biópsia renal.	50
Quadro 1	Descrição detalhada do processamento de extração de material genético de cartão FTA.	33
Quadro 2	Procedimentos para a extração de material genético.	34
Quadro 3	Procedimento para extração de DNA de material parafinado	35
Quadro 4	Procedimentos para a extração de DNA em amostra de tecido previamente embebidos em Bouin e Michel.	37
Quadro 5	Temperaturas de termociclagem da PCR da β -globina	39
Quadro 6	Procedimentos para a purificação de produtos de PCR.	41
Quadro 7	Temperaturas de termociclagem PCR do BigDye	42
Quadro 8	Purificação dos produtos de PCR do BigDye.	42

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Histologia.....	14
2.1.1 Bouin.....	14
2.1.2 Solução de Michel.....	15
2.1.3 Formol.....	16
2.2 Glomerulopatias.....	16
2.2.1 Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF).....	16
2.2.2 Colapsante.....	18
2.2.3 Nefrite Lúpica (NL).....	19
2.3.4 HIVAN e COVAN.....	20
2.3 Genética da APOL1.....	21
2.3 Variante da p.N264K.....	24
2.4 Mecanismos fisiopatológicos.....	26
2.5 Estudos populacionais.....	28
2.6 Potenciais terapias.....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Caracterização do estudo e coleta das amostras.....	32
4.2 Análise morfológica renal.....	32
4.2.1 Microscopia óptica (MO).....	32
4.2.2 Imunofluorescência (IF).....	32
4.2.3 Microscopia Eletrônica (ME).....	33
4.3.1 Extração de DNA de sangue.....	33
4.3.2 Extração de DNA de amostras parafinadas.....	35
4.3.3 Extração de tecido.....	37
4.3.4 Identificação de variantes de APOL1.....	40
4.3.5 Preparação do Gel de Agarose.....	40
4.3.6 Purificação das amostras.....	40
4.3.7 PCR do BigDye.....	41
4.3.8 Validação das variantes de APOL1.....	42
4.4 Análise de dados.....	43
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO 1.....	61
ANEXO 2.....	64
APÊNDICE 1.....	66
APÊNDICE 2.....	67
APÊNDICE 3.....	68
APÊNDICE 4.....	69

1 INTRODUÇÃO

As doenças renais crônicas representam um grande desafio para a saúde pública global, dada sua alta morbimortalidade e impacto socioeconômico. A investigação molecular tem desempenhado um papel crucial na compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos nessas doenças, permitindo a identificação de variantes genéticas associadas à sua evolução e prognóstico. Dentre essas variantes, as mutações no gene *APOL1* têm sido amplamente estudadas devido à sua relação com formas agressivas de glomerulopatias, especialmente em indivíduos de ascendência africana (Genovese *et al.*, 2010).

Para o diagnóstico dessas doenças, a biópsia renal é um procedimento diagnóstico essencial para a caracterização histopatológica das nefropatias, sendo comumente embebida em diferentes meios de fixação, como solução de Bouin, Michel e Formol. Cada uma dessas substâncias apresenta características distintas que influenciam a preservação do tecido e a integridade dos ácidos nucleicos (Najafian *et al.*, 2022). A solução de Bouin, por exemplo, é amplamente utilizada para melhorar a morfologia tecidual, mas pode induzir modificações químicas no DNA, sendo utilizada principalmente para a microscopia óptica (MO) (Melk, 2023).

A solução de Michel, segundo Moreno e colaboradores (2021), é frequentemente empregada para preservar antígenos em amostras destinadas à imunofluorescência (IF), enquanto o formol é o fixador de escolha para a microscopia eletrônica (ME), pois preserva ultraestruturas celulares, permitindo a avaliação de alterações submicroscópicas associadas a diferentes tipos de glomerulopatias (Howell & Herrera, 2020). Embora essas soluções sejam indispensáveis para o diagnóstico histopatológico, sua ação sobre os ácidos nucleicos pode comprometer a qualidade do DNA (Mielonen *et al.*, 2022).

A escassez de trabalhos comparando o impacto desses três fixadores na qualidade do DNA extraído de biópsias renais representa uma lacuna metodológica significativa (Azzalini *et al.*, 2019). A desparafinização, etapa necessária para acessar o tecido, introduz desafios adicionais, como a remoção completa de resíduos de parafina e a recuperação de fragmentos de DNA já potencialmente degradados. A qualidade do DNA extraído influencia diretamente no sucesso da amplificação por PCR, sequenciamento e consequentemente na confiabilidade dos testes moleculares (Yi *et al.*, 2020). Nesse cenário, compreender como os diferentes

métodos de fixação impactam a qualidade do DNA torna-se especialmente relevante quando se busca investigar variantes genéticas associadas à progressão das doenças renais.

Entre essas variantes de risco do gene *APOL1* (G1 e G2) destacam-se como determinantes críticos na patogênese de glomerulopatias agressivas, como a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF), a nefropatia associada ao Vírus da imunodeficiência humana (HIVAN) e a nefropatia relacionada à COVID-19 (COVAN) (Genovese *et al.*, 2010; Friedman *et al.*, 2021). Essas variantes, resultantes de seleção natural devido à resistência contra o *Trypanosoma brucei rhodesiense*, estão presentes em até 40% dos indivíduos de ascendência africana e conferem um risco até dez vezes maior de progressão para doença renal terminal quando em homozigose ou heterozigose composta (Tzur *et al.*, 2010).

Apesar do avanço no entendimento da biologia de *APOL1*, a aplicação clínica desses conhecimentos enfrenta obstáculos técnicos. A obtenção de DNA de alta qualidade a partir de biópsias renais fixadas em soluções como Bouin, Michel e formol, impactando estudos de associação genômica, essenciais para identificar novos biomarcadores e entender as interações do gene *APOL1*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histologia

2.1.1 Bouin

A solução de Bouin, composta por ácido pícrico, formaldeído e ácido acético, é amplamente utilizada em patologia renal devido à sua capacidade de preservar detalhes morfológicos finos, como a arquitetura glomerular e tubular (Ellenburg *et al.*, 2020). Sua fixação rápida (em torno de 4-6 horas) minimiza artefatos de autólise, sendo particularmente vantajosa para tecidos ricos em colágeno, como o rim (Martino *et al.*, 2022). No entanto, o ácido pícrico, componente oxidativo da solução, induz a desnaturação proteica e a fragmentação do DNA, comprometendo a qualidade do material genético extraído (Bonin *et al.*, 2005). Esse efeito é exacerbado em amostras armazenadas por longos períodos, limitando sua utilidade em estudos genômicos retrospectivos, como a genotipagem do gene *APOL1*, crucial para avaliação de risco em populações afrodescendentes.

A degradação do DNA em tecidos fixados com Bouin está intimamente ligada à formação de adutos entre o ácido pícrico e as bases nitrogenadas, gerando quebras na cadeia dupla e reduzindo a amplificabilidade de fragmentos maiores que 200 pares de bases (Azzalini et al., 2019). Estudos demonstram que, mesmo após desparafinização, o DNA residual apresenta altas taxas de oxidação, inviabilizando técnicas como o sequenciamento de nova geração (NGS) (Nagahashi et al., 2017). Para contornar esse obstáculo, protocolos de extração adaptados, como o uso de enzimas reparadoras de DNA (ex.: polimerases tolerantes a danos) e kits comerciais com etapas adicionais de descalcificação, têm sido propostos, embora com eficácia variável em amostras renais (Nagai et al., 2016).

2.1.2 Solução de Michel

A solução de Michel é um meio de transporte amplamente utilizado para a conservação de tecidos em biópsias destinadas à imunofluorescência direta, especialmente em doenças renais e dermatológicas. Sua composição original inclui sulfato de amônio (55 g/L), sulfato de magnésio (5 g/L), ácido cítrico (1 g/L) e monohidrogenofosfato de potássio (1 g/L), dissolvidos em água destilada, com o pH ajustado entre 7,0 e 7,2. Essa formulação permite a preservação da integridade dos antígenos e imunocomplexos, evitando a degradação das proteínas e garantindo a reatividade adequada dos anticorpos fluorescentes durante a análise microscópica (Michel, Milner, David, 1972).

Essa composição mantém a integridade de alvos críticos para o diagnóstico renal, como IgG, IgA, C3 e C1q, permitindo a detecção precisa de depósitos imunes em doenças como nefrite lúpica e glomerulonefrite pós-infecciosa (Cassol, et al., 2020). A solução de Michel é preferida em biópsias renais de pacientes LES por manter a conformação espacial de complexos imunes, permitindo a diferenciação entre padrões de deposição, como os observados na nefrite lúpica classe IV (ativa) e classe V (membranosa) (Zickert et al., 2014).

A solução preserva eficazmente as proteínas da membrana basal (BMZ) em biópsias de pele por até 28 dias, sem redução na intensidade da coloração, garantindo a integridade dos epítomos. Comparado à criopreservação, o meio de Michel se mostrou uma alternativa viável e prática, facilitando a realização de análises imunofluorescência em contextos clínicos de rotina. (Woollons, Gratian,

Bhogal, 1999) (Boraiy et al., 2014).

2.1.3 Formol

O formol a 10% (formalina) é o fixador padrão em patologia renal, garantindo preservação morfológica detalhada por períodos prolongados. Sua capacidade de penetrar rapidamente no tecido e formar ligações cruzadas entre proteínas e DNA é essencial para manter a estrutura glomerular e tubular, facilitando diagnósticos de condições como GESF (Vitosevic et al., 2023). No entanto, essas mesmas ligações induzem fragmentação do DNA e modificações químicas (ex.: metilação de citosinas), comprometendo a eficiência das técnicas moleculares (Wen et al., 2017; Thirlwell et al., 2010). A fixação em formalina pode causar degradação do DNA, resultando em fragmentos menores que 100 pares de bases após 48 horas de fixação, o que é inadequado para a amplificação de éxons inteiros (Lehmann, Kreipe 2001; Masuda et al., 1999;).

Apesar desses desafios, a formalina continua sendo insubstituível na rotina diagnóstica, e o vasto acervo de amostras arquivadas representa um recurso valioso para pesquisas genéticas retrospectivas (Zhao et al., 2019). A otimização de protocolos de extração, combinada com técnicas de amplificação de DNA danificado, como a amplificação total do genoma, tem permitido recuperar informações genéticas mesmo de amostras com décadas de armazenamento (Maciejewska, Jakubowska, Pawlowski, 2013).

2.2 Glomerulopatias

2.2.1 Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF)

A GESF representa uma das principais causas de doença glomerular progressiva, caracterizada por lesões escleróticas segmentares nos glomérulos, associadas a dano podocitário e proteinúria significativa. Sua fisiopatologia centra-se na disfunção dos podócitos. Alterações em proteínas estruturais como a nefrina (codificada pelo gene *NPHS1*) e a podocina (*NPHS2*), ou em canais iônicos como o TRPC6, comprometem a arquitetura do *slit diaphragm*, permitindo a passagem anormal de proteínas para o filtrado urinário (Kawachi, et al., 2009). Além das mutações genéticas, fatores circulantes, como o receptor solúvel de ativador de

plasminogênio tipo uroquinase, têm sido implicados em formas primárias da doença, ativando vias de sinalização que induzem apoptose podocitária e remodelamento glomerular (Wei et al., 2012).

Epidemiologicamente, a GESF exibe disparidades marcantes. Indivíduos de ascendência africana apresentam risco até quatro vezes maior de desenvolver a doença, um fenômeno intimamente ligado às variantes de risco do gene *APOL1* (G1 e G2) (Genovese et al., 2010).

Além da predisposição genética, comorbidades como, obesidade, hipertensão arterial e infecções virais exacerbam a hiperfiltração glomerular, acelerando a perda de néfrons funcionais (Rivera et al., 2022). A forma secundária da doença também está associada a condições como diabetes, nefropatia por refluxo ou uso crônico de drogas nefrotóxicas, como heroína, refletindo na sua etiologia multifatorial (D'agati et al., 2016).

Histologicamente, a GESF é categorizada em cinco subtipos pela *Columbia Classification*, entidade responsável pela classificação dessa condição, sendo cada subtipo associado a implicações prognósticas distintas (Bonilla et al., 2024). A variante Tip, caracterizada por lesões na junção entre o túbulo proximal e o glomérulo, apresentou resposta geralmente favorável ao tratamento. Um estudo retrospectivo realizado na Índia com 30 pacientes mostrou que 87% apresentavam síndrome nefrótica no diagnóstico e, após tratamento com corticosteroides, 87% alcançaram alguma forma de remissão da proteinúria. No entanto, 13,3% duplicaram a creatinina sérica após um seguimento médio de 2 anos, indicando que, embora a resposta inicial seja boa, há risco de progressão em alguns casos (Trivedi et al., 2015).

A variante Perihilar, frequentemente associada à hipertensão e sobrecarga hemodinâmica, representou 15,3% dos casos em um estudo coreano com 111 pacientes. Entre os portadores dessa variante, 64,7% tinham hipertensão e 41,2% apresentavam síndrome nefrótica. A taxa de sobrevida renal em 5 anos foi de 66,7%, e apenas 11,8% atingiram o desfecho composto de duplicação da creatinina sérica ou progressão para doença renal terminal (Know et al., 2014).

A variante Celular se destaca pela presença de proliferação intracapilar e infiltrado inflamatório glomerular. Em um estudo com 225 pacientes com GESF, 22 tinham essa variante. Eles apresentaram taxas intermediárias de remissão (44,5%) e de progressão para doença renal terminal (27,8%) quando comparados às

variantes Tip e Colapsante. Essa variante esteve associada a quadros clínicos mais graves e síndrome nefrótica mais severa no momento da apresentação (Stokes et al., 2006).

No contexto genético a descoberta das variantes *APOL1* revolucionou a compreensão da GESF em populações afrodescendentes. Portadores de duas cópias de G1/G2 não apenas exibem risco elevado de desenvolver a doença, mas também apresentam resistência a terapias convencionais (Huang et al., 2014). Clinicamente, isso se traduz em lesões histológicas mais agressivas, como padrões colapsantes e fibrose tubulointersticial acentuada (Siemens et al., 2018).

2.2.2 Colapsante

A Glomerulopatia colapsante (GC) é uma forma rara e agressiva da doença glomerular, caracterizada por um curso clínico rapidamente progressivo. Clinicamente, manifesta-se predominantemente como uma síndrome nefrótica grave, com proteinúria intensa frequentemente superior a 10 g/dia, hipoalbuminemia acentuada, edema generalizado e rápida deterioração da função renal. É comum a presença de hipertensão arterial e anasarca nos estágios mais avançados da doença. Um aspecto que difere a GC em relação a outras variantes da GESF é a sua resposta limitada às terapias convencionais, como os corticosteroides, o que contribui significativamente para a evolução desfavorável, atingindo, em muitos casos, na progressão para a doença renal crônica terminal (Qamar et al., 2023).

A GC afeta de forma desproporcional pessoas de ascendência africana. Essa desigualdade está ligada a variantes de risco do gene *APOL1*, que aumentam a suscetibilidade dessa doença. Além disso, a GC pode ser desencadeada por uma série de fatores, incluindo infecções virais, principalmente por HIV e parvovírus B19 o uso de medicamentos, doenças autoimunes, alguns tipos de câncer, isquemias (microangiopatia trombótica, peri-infarto, embolia por colesterol) e até mesmo transplantes renais afetam o desenvolvimento da doença (Koira, Akileseh, Jefferson, 2024).

No contexto de infecção pelo HIV, a GC assume um papel importante, sendo conhecida como nefropatia associada ao HIV (Koira, Akileseh, Jefferson, 2024). A GC apresenta características histológicas marcantes sob microscopia óptica, incluindo a obliteração parcial ou total do lúmen capilar causada por hipertrofia e hiperplasia dos podócitos. Essas células podem conter depósitos

intracitoplasmáticos que indicam reabsorção de proteínas, enquanto pseudo crescentes, que se assemelham a crescentes glomerulares, frequentemente antecedem a esclerose glomerular (Cutrim et al., 2022).

Do ponto de vista histopatológico, embora menos frequentes nas fases iniciais, algumas alterações tornam-se mais frequentes à medida que a glomerulopatia colapsante (GC) progride. Entre os achados mais comuns nos estágios avançados, destacam-se a glomerulomegalia, a hialinose, a hiper celularidade e a formação de aderências glomerulares. O dano túbulo-intersticial é particularmente proeminente na GC, caracterizando-se por acentuada dilatação tubular, presença de microcistos e infiltração intersticial por células inflamatórias, com destaque para macrófagos e linfócitos, especialmente os subtipos CD4⁺ e CD8⁺ (Cutrim et al., 2022).

A análise por imunofluorescência (IF) , em geral, é inespecífica ou negativa, mas pode revelar depósitos de IgM e C3. Já a microscopia eletrônica (ME), apesar de não ser frequentemente requerida na prática diagnóstica, pode contribuir na confirmação de lesões em membranas capilares colapsadas e podócitos comprometidos, com perda severa da barreira de filtração. Nessas análises, a presença de inclusões intracelulares pode sugerir associações com infecções pelo HIV (Cutrim et al., 2022).

2.2.3 Nefrite Lúpica (NL)

A NL é uma das manifestações mais significativas do lúpus eritematoso sistêmico (LES), afetando os rins em até metade dos pacientes diagnosticados com a doença. Por ser uma condição autoimune, caracteriza-se pelo ataque do sistema imunológico às estruturas renais, comprometendo sua função e, em casos graves, podendo levar à insuficiência renal (Obrisca et al., 2021).

Clinicamente, a NL pode se manifestar de forma variada. Alguns pacientes apresentam sinais leves, como alterações em exames de urina com proteinúria e hematúria microscópica, enquanto outros podem desenvolver quadros mais severos, incluindo síndrome nefrótica, hipertensão arterial e insuficiência renal progressiva. Além das manifestações renais, é comum que pacientes apresentem sinais sistêmicos característicos LES, tais como febre, fadiga, artrite, rash cutâneo e outros indicativos de resposta inflamatória sistêmica (Gasparotto et al., 2020).

Ademais, é importante destacar que a NL acomete, com maior frequência, mulheres jovens, especialmente entre 20 e 40 anos, refletindo a predominância feminina no LES, com maior impacto em populações afrodescendentes, asiáticas e hispânicas, não apenas apresentam maior vulnerabilidade à doença, como também tendem a evoluir com formas mais agressivas. Nesse cenário, aspectos genéticos desempenham um papel importante na gravidade e no prognóstico da doença, sendo descrito mais recentemente a influência do gene *APOL1* (Parikh et al., 2020).

Em relação a sua morfologia, a biópsia renal é essencial para o diagnóstico e para a classificação da NL, que segue critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Nefrologia. Essas classificações variam desde lesões leves e limitadas ao mesângio (classe I e II) até formas mais graves, como a proliferação difusa (classe IV) e a esclerose avançada (classe VI). As alterações incluem inflamação e necrose nos glomérulos, depósitos imunes formados por imunoglobulinas e componentes do complemento (IgG, IgA, IgM, C3 e C1q) e, frequentemente, sinais de dano intersticial, como fibrose e atrofia tubular (Lech& Anders 2013).

O tratamento da NL exige uma abordagem cuidadosa, baseada no grau de atividade inflamatória e na extensão do dano renal. Medicamentos imunossupressores, como corticosteroides e micofenolato de mofetila, são usados para controlar a inflamação e preservar a função renal. Diagnóstico precoce e monitoramento constante, evitam complicações e melhoram o prognóstico a longo prazo (Yu et al., 2022).

2.3.4 HIVAN e COVAN

A *HIV-associated nephropathy* - nefropatia associada ao HIV (HIVAN) e a *COVID-19-associated nephropathy* - nefropatia associada à COVID-19, (COVAN) são complicações renais que ilustram como infecções virais podem impactar gravemente a função dos rins. Embora apresentem algumas semelhanças histológicas, cada uma tem características clínicas e epidemiológicas que refletem a natureza distinta de suas doenças subjacentes. A HIVAN, por exemplo, tende a acometer com maior frequência pessoas vivendo com HIV em estágios avançados da infecção ou com carga viral descompensada/descontrolada (Rivera et al., 2022).

Clinicamente, manifesta-se com sintomas como síndrome nefrótica, altos níveis de proteinúria, insuficiência renal progressiva e renomegalia, observados por

ultrassonografia. Essa condição é mais prevalente entre pessoas de ascendência africana devido a mutações específicas no gene *APOL1*, que aumentam a vulnerabilidade ao dano renal. A introdução da terapia antirretroviral de alta potência ajudou a reduzir a incidência, mas a HIVAN ainda afeta pacientes que não aderem ao tratamento ou que apresentam resistência aos medicamentos (Adanai et al., 2022).

Por sua vez, a COVAN é uma complicação renal emergente associada à COVID-19, sendo observada principalmente em pacientes gravemente afetados pelo SARS-CoV-2. Ela se manifesta com insuficiência renal aguda, proteinúria, e, em alguns casos, hematúria, sendo mais comum em pessoas negras ou em pacientes com condições preexistentes que os predispõem a maior risco de disfunção renal. Essas diferenças refletem a intensidade da resposta inflamatória e os danos endoteliais causados pelo vírus em pessoas suscetíveis (Klomjit et al., 2023).

No nível histológico, ambas as condições compartilham como característica central a glomerulopatia colapsante. Essa alteração é marcada pelo colapso dos capilares glomerulares, aumento de tamanho e proliferação anormal dos podócitos. Na HIVAN, além dessas características, há glomerulomegalia, fibrose no tecido intersticial, e dilatação dos túbulos com presença de cilindros proteicos. Já na COVAN, além de alterações similares, nota-se um componente inflamatório mais pronunciado, provavelmente impulsionado pela tempestade de citocinas desencadeada pelo SARS-CoV-2, que amplifica os danos estruturais e funcionais nos rins (Velez, Caza, Larsen 2020).

Essas condições reforçam a importância do diagnóstico precoce e do manejo adequado. Na HIVAN, o uso de medicamentos antirretrovirais é crucial para conter a progressão do dano renal. Já no caso da COVAN, o tratamento deve focar na estabilização da função renal, controle da resposta inflamatória e, quando necessário, suporte dialítico. Em ambas, a realização de biópsia renal desempenha um papel fundamental para confirmar o diagnóstico e orientar as estratégias terapêuticas, destacando o papel da medicina personalizada no cuidado de pacientes com condições complexas e multifatoriais (Adanai et al., 2022; Klomjit et al., 2023).

2.3 Genética da *APOL1*

Os locus de *APOL1* foram inicialmente identificados e estudados com o objetivo de reduzir e entender as disparidades raciais nas doenças renais. Nesse contexto, o projeto 1000 Genomas, lançado em janeiro de 2008, representou uma iniciativa de colaboração internacional para criar um catálogo abrangente da diversidade genética humana. Durante o estudo do cromossomo 22, foi observado que o gene *APOL1* possui 145 Kb e é composto por sete exons, os quais codificam uma apolipoproteína de 398 aminoácidos. Além disso, foram identificadas duas variantes de risco, denominadas G1 e G2, e uma variante selvagem, chamada G0 (Genovese et al., 2010).

O primeiro exon contém o "peptídeo sinal", que funciona enviando a proteína para o retículo endoplasmático, permitindo sua secreção. Já o segundo exon é responsável por partes do domínio hidrofóbico da proteína, uma região que facilita sua interação com membranas celulares, tornando possível sua atuação no transporte e modificação de lipídios (Sharma et al., 2016).

O exon 3 ajuda a formar o núcleo central da proteína, garantindo estabilidade estrutural para que ela desempenhe suas funções. Enquanto o 4 é mais especializado na ligação ao colesterol e a outros lipídios. O exon 5, por outro lado, está diretamente ligado à atividade citotóxica da proteína, protegendo contra parasitas como os tripanossomos. Já o exon 6 torna possível a interação da proteína com outras membranas celulares, permitindo a formação de poros (Sharma et al., 2016; Ultsch et al., 2021).

Por fim, o exon 7, que codifica a parte final da proteína, é essencial para regular sua atividade. Sendo nele que ocorrem as mutações conhecidas como variantes G1 e G2, associadas com o risco aumentado de doenças renais. Essas alterações destacam como pequenos detalhes na estrutura do gene podem ter impactos especialmente em populações específicas (Sharma et al., 2016; Ultsch, et al., 2021).

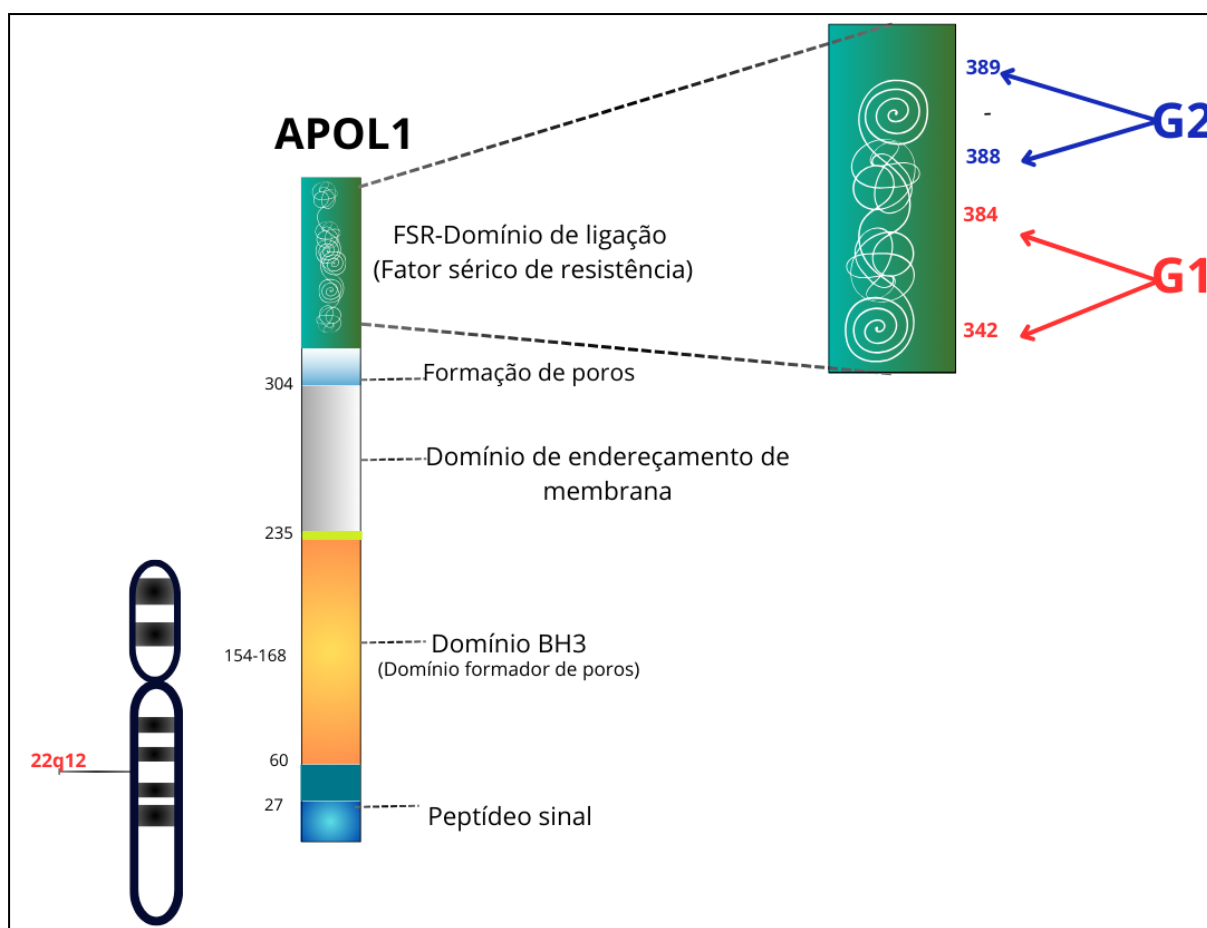


Figura 1. Estrutura do gene *APOL1*. Fonte: Autoria própria (2025).

A G1 possui dois polimorfismos (S342G e I384M), já a variante G2 trata-se das deleções de seis aminoácidos (N388 e Y389) (Genovese et al., 2010). A doença renal associada ao *APOL1* é uma condição genética com padrão de herança recessivo. Indivíduos com dois alelos de risco (genótipos G1/G1, G1/G2 e G2/G2) têm um alto risco de desenvolver doenças renais enquanto pacientes com somente um alelo de risco (G0/G1 G0/G2) são considerados pacientes de baixo risco, já pacientes G0/G0 não possui risco relacionado a essa condição genética (Wakashin et al., 2020).

Há descritos ainda outras variantes do gene *APOL1*, como a G3. Entretanto, estudos conduzidos por Limou e colaboradores (2015), realizaram o sequenciamento de todo o gene, e constatou que é improvável que outras variantes além de G1 e G2 cause quaisquer complicações renais.

Os mecanismos pelos quais a *APOL1* contribui para a lesão renal permanecem sendo investigados. Uma questão inicialmente levantada concernente

à possível influência desse gene no desenvolvimento renal foi abordada em um estudo de caso. Nesse estudo, um paciente do sexo masculino, portador de mutações inativadoras do gene, não apresentou evidências de comprometimento renal, o que sugere que a *APOL1* não desempenha papel no processo de desenvolvimento normal do sistema renal (Vanhollebeke et al., 2006).

Algumas das limitações em relação ao desenvolvimento de pesquisas utilizando o *APOL1* se dá por ele não estar presente na maioria dos mamíferos, incluindo os modelos animais mais comuns, como ratos e camundongos. Os chimpanzés possuem *APOL1*, entretanto, o gene no animal comporta-se de forma diferente. Isso somente reforça a tese de que o *APOL1* não é necessário para a função renal normal ou desenvolvimento renal em mamíferos (Pollak, Friedman 2023).

A apolipoproteína que circula no sangue ligada a partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL) tem um papel na imunidade inata, lise do parasita e resposta imune. Os níveis circulantes de *APOL1* estão correlacionados com lipídios plasmáticos, como colesterol total e triglicerídeos, mas não com o HDL específico ao qual está ligado (HDL3). Estudos sugerem uma possível associação entre as variantes de *APOL1* e alterações nas partículas de HDL, bem como sua concentração relativa (Madhavan, O'toole; 2014).

Alguns mecanismos podem levar ao aumento da expressão do RNA do *APOL1* dessas variantes de risco, como os interferon lipopolissacarídeos, agonistas de receptores toll-like, fator de necrose tumoral e citocinas.. Além disso, as associações entre infecções virais e a doença renal associada a *APOL1* sugerem que alguns vírus podem ativar a expressão de *APOL1* como o HIV, Citomegalovírus, parvovírus B19 (GOYAL, SINGHAL 2021), e o mais recente descrito o SARS-CoV-2 (HUNG, et al, 2022).

2.3 Variante da p.N264K

O conjunto de estudos destaca a importância da variante p.N264K (M1) no gene *APOL1* como um fator genético protetor contra doenças renais, especialmente a GESF (Gupta et al., 2023; Gbadegesin et al., 2024; Simeone et al., 2025; Narjoz et al., 2024) Essa variante reduz significativamente a penetrância dos genótipos G1/G2 e G2/G2, reclassificando-os como de baixo risco. Os dados mostraram que indivíduos com o genótipo G2/G2-N264K não apresentaram casos de FSGS,

sugerindo uma redução de risco próxima a 100% (OR = 0; IC 95%: 0–0.41), enquanto aqueles com G1/G2-N264K tiveram uma redução de 86% (OR = 0.14; IC 95%: 0.16–0.52). Isso demonstra que a variante p.N264K pode mitigar significativamente os efeitos negativos dos alelos de risco G1 e G2, impactando diretamente a modulação do risco genético associado ao *APOL1* (Gupta et al., 2023).

Outro estudo revelou que o haplótipo M1-G2 provavelmente surgiu de um evento de recombinação genética entre um haplótipo G0 e um haplótipo G2, em vez de eventos independentes. Isso sugere um mecanismo evolutivo complexo que influencia a suscetibilidade às doenças renais. Além disso, os pesquisadores destacaram que a presença de variantes adicionais do haplótipo G0, combinadas com M1, pode alterar a função ou expressão da proteína *APOL1*. Esses achados ressaltam a necessidade de avaliar não apenas variantes isoladas, mas todo o contexto haplotípico do gene para uma compreensão mais precisa do risco e da proteção contra doenças renais (Gbadegesin et al., 2024).

Outro achado importante foi a frequência da variante p.N264K, que foi identificada apenas em portadores dos genótipos de alto risco G1/G2 e G2/G2, sendo rara na população geral, com uma prevalência estimada de 3,2% entre os pacientes testados. A análise dos dados também revelou diferentes diagnósticos patológicos, como glomeruloesclerose segmentar focal e nefropatia associada ao HIV. Notavelmente, o único paciente do estudo que apresentou uma biópsia renal normal era portador da variante p.N264K no genótipo G2/G2, reforçando seu efeito protetor (Simeone et al., 2025).

Por fim, os estudos levantam a importância clínica dessa variante, especialmente no contexto de triagem genética para transplantes renais e na seleção de doadores de órgãos. Embora a identificação do p.N264K tenha ocorrido em um número limitado de casos, sua detecção pode ser custo-efetiva, permitindo uma abordagem mais precisa na avaliação do risco de doença renal em indivíduos com variantes do *APOL1*. Além disso, os achados sugerem que indivíduos com a variante p.N264K devem ser classificados como não de alto risco (não-HR), o que pode impactar diretamente estratégias de diagnóstico, tratamento e prevenção dessas doenças (Narjoz et al., 2024).

2.4 Mecanismos fisiopatológicos

A Apolipoproteína L1 desempenha um papel crucial na defesa contra o parasita *Trypanosoma brucei*, responsável pela doença do sono na África. Quando uma pessoa é infectada por esse parasita, a proteína é liberada e internalizada pelos tripanossomas através de um receptor específico. Dentro do parasita, atua formando poros na membrana lisossomal, levando à sua lise e morte do parasita. Essa capacidade de matar tripanossomas confere uma vantagem adaptativa significativa às populações humanas em áreas endêmicas da doença do sono (Friedman et al., 2011).

As variantes genéticas *APOL1* G1 e G2 surgiram como uma resposta evolutiva a essa pressão seletiva imposta pelo parasita, com o surgimento do *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Essas variantes apresentam alterações estruturais que reduzem sua afinidade com um fator sérico de resistência (FSR) produzido pelo tripanossoma, o qual neutraliza a ação da *APOL1* selvagem (Figura 2). Portanto, as pessoas que carregam as variantes G1 e G2 têm uma maior capacidade de resistir à infecção pelo tripanossoma (Genovese et al., 2010).

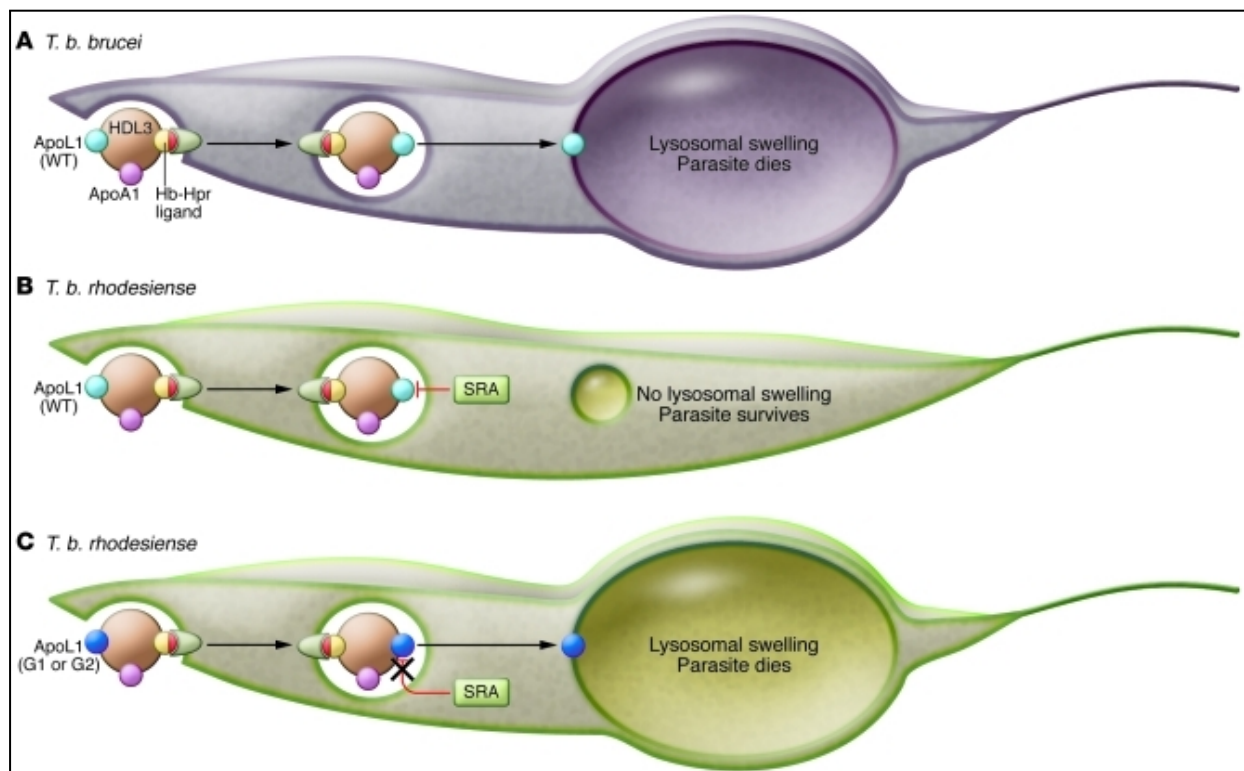


Figura 2. Mecanismo de ação do gene *APOL1* e suas variantes no controle do *Trypanosoma*

Legenda: (A) Em *T. brucei*, o *APOL1* selvagem (WT) presente nas lipoproteínas de alta densidade (HDL3) liga-se ao ligante Hb-Hpr, é internalizado no parasita e induz o inchaço lisossomal, levando à morte do parasita. (B) *T. brucei* rhodesiense sobrevive à ação do *APOL1* selvagem devido à expressão da proteína FSR, que inibe a função lisossomal, impedindo a morte do parasita. (C) Em *T. brucei* rhodesiense, as variantes de risco do *APOL1* (G1 ou G2) são resistentes à neutralização pela proteína FSR, restaurando a atividade lisossomal, causando o inchaço do lisossomo e levando à morte do parasita. **Fonte:** Friedman and Pollak (2011)

A maioria das doenças recessivas envolvem perda de função, contudo a nefropatia associada ao *APOL1* não é resultado da perda da função. As variantes G1 e G2 são consideradas mutações de ganho de função. Estudos em células cultivadas mostraram que a expressão dessas variantes causa aumento da morte celular. Acredita-se que o podócito, seja o principal alvo da toxicidade, devido à associação entre as alterações do podócito e a GESF (Friedman; Pollak, 2020).

Além de defesa contra o trypanosoma a apolipoproteína L1 é uma proteína envolvida em diversos processos fisiológicos, incluindo transporte de lipídios, resposta inflamatória e apoptose. As variantes de risco aumentam a suscetibilidade à podocitopatia (Figura 3), resultando assim na perda de podócitos, impactando assim a capacidade de filtração glomerular. Além disso, a formação de agregados tóxicos intracelulares danificam os podócitos, levando à disfunção da autofagia, o que causa o acúmulo de toxinas nos podócitos (Winkler, Nelson; 2017; Wakashi et al., 2020).

Outro mecanismo é a ativação da sinalização inflamatória nos podócitos, contribuindo para a lesão celular e amplificando a resposta inflamatória nos rins, o que exacerba a lesão renal. A ativação de macrófagos também ocorre, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres que danificam as células renais. Adicionalmente, a ativação do Complexo de Ataque à Membrana, pode causar lise celular e dano tecidual (Nichols et al., 2015).

Os podócitos também possuem suscetibilidade à apoptose, por meio da ativação da caspase-3, uma enzima executora da apoptose, e da perda da integridade mitocondrial, que induz a liberação de citocromo e a ativação da caspase-3, induzida pelas variantes. Além disso, essas variantes podem causar disfunção endotelial, prejudicando a função dos vasos sanguíneos renais, levando à constrição vascular renal e o aumento do estresse oxidativo nas células endoteliais (Olabisi et al., 2016).

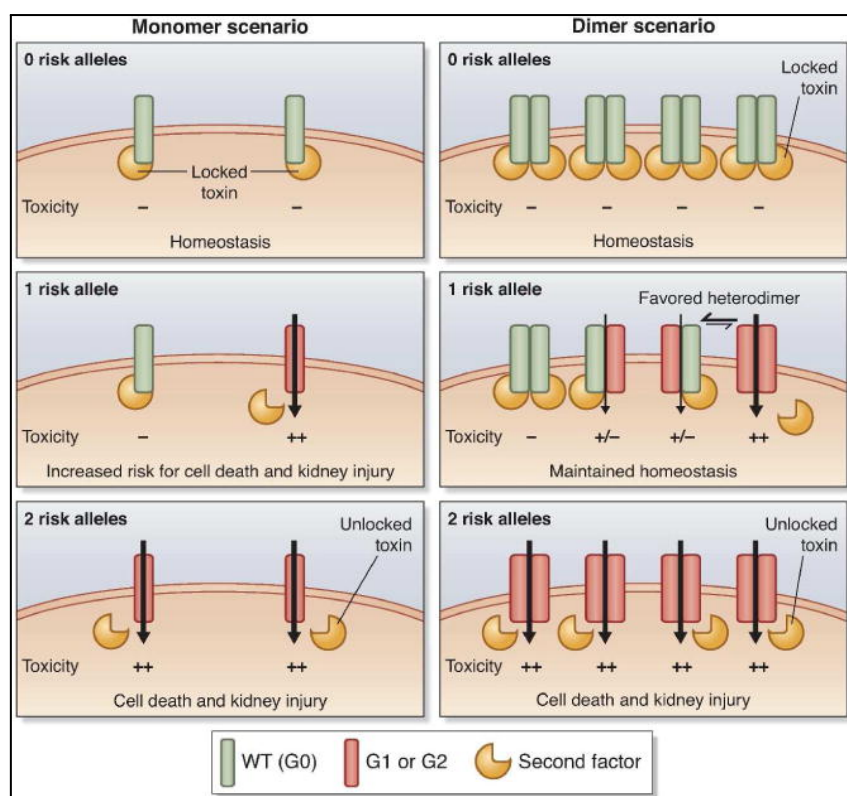


Figura 3. Modelo de multímeros de *APOL1* em células renais que concilia a hipótese de ganho de função deletéria com o padrão recessivo de herança. **Legenda:** Mecanismos propostos para a toxicidade renal associada às variantes de risco do gene *APOL1* nos cenários monomérico e dimérico. À esquerda, o cenário monomérico demonstra como a presença de um ou dois alelos de risco (G1 ou G2) leva ao desbloqueio de toxinas intracelulares e aumento progressivo da toxicidade, culminando em morte celular e lesão renal. À direita, o cenário dimérico ilustra que, em heterozigose (1 alelo de risco), a formação preferencial de heterodímeros mantém a homeostase renal, enquanto em homozigose (2 alelos de risco) ocorre ativação completa da via tóxica e dano renal significativo. A figura destaca o papel central dos alelos de risco e de um "segundo fator" (estressor) no desencadeamento da toxicidade. **Fonte:** Limou, *et al.*, 2016

2.5 Estudos populacionais no Brasil

A história migratória do Brasil reflete uma trajetória geográfica distinta no fluxo de escravizados. Contudo, estudos de ancestralidade demonstram que grande parte da herança genética da população afrodescendente brasileira está relacionada a regiões da África com alta prevalência das variantes de risco do gene *APOL1*, como Camarões, Gana e Senegal (Siemens et al., 2018).

Pesquisas específicas sobre correlações genético-moleculares envolvendo pacientes com glomerulopatias permanecem limitadas e, frequentemente, baseiam-se em amostras reduzidas. Kopp et al. (2021) investigaram a prevalência dos alelos de risco do *APOL1* em pacientes com GESF. Neste estudo, os alelos de alto risco foram identificados em 28,7% dos participantes, com predominância de

afro-americanos. Por sua vez, Gribouval et al. (2019) avaliaram 152 pacientes de 139 famílias europeias com diferentes ancestralidades africanas e diagnóstico de síndrome nefrótica corticorresistente e/ou GESF. Os pesquisadores identificaram variantes de risco do *APOL1* em 43,1% dos casos.

No Brasil, poucos estudos analisaram a distribuição dos alelos de risco em indivíduos com glomerulopatias. Uma investigação realizada em Salvador (BA) examinou a prevalência dessas variantes em pacientes dialíticos, mas o foco principal foi a análise do traço falciforme, outra condição associada aos alelos de risco.

Já Vajgel et al., (2020) estudaram 201 pacientes não brancos com nefrite lúpica, comparando-os entre si e com um grupo controle saudável. Os alelos de risco do *APOL1* foram detectados em 4 (2%) pacientes com nefrite lúpica e em apenas 1 (0,4%) indivíduo do controle. A presença dessas variantes foi associada ao maior risco de evolução para doença renal crônica terminal (DRC-TRS) e a maior dano no compartimento túbulo-intersticial renal. Os autores sugeriram ainda que a presença de apenas um alelo de risco pode estar relacionada a um prognóstico renal desfavorável.

Outro estudo caso-controle analisou 106 pacientes em hemodiálise com ancestralidade africana e 106 familiares saudáveis de primeiro grau. Os alelos mutantes do *APOL1* foram cerca de 10 vezes mais frequentes entre os pacientes em hemodiálise (9,4% vs. 0,9%, $p=0,001$).

Um estudo multicêntrico mais recente, conduzido pela Rede Brasileira de Síndrome Nefrótica na Infância, investigou o impacto dos alelos de risco em 318 pacientes pediátricos com síndrome nefrótica (Watanabe, 2021). Variantes de risco do *APOL1* foram detectadas em 19 (6%) crianças, incluindo autodeclaradas brancas. Crianças portadoras dos alelos de risco apresentaram pior prognóstico renal, independentemente do padrão histológico da glomerulopatia. Este estudo sugeriu, ainda, que a presença de um único alelo de risco pode impactar negativamente o desfecho renal de crianças com síndrome nefrótica corticorresistente.

2.6 Potenciais terapias

Novas terapias dirigidas contra o espectro de doenças renais associadas ao gene *APOL1* estão sendo desenvolvidas. Um ensaio clínico usando um inibidor de pequena molécula *APOL1* está em andamento em pacientes com GESF e proteinúria com resultados iniciais promissores, trata-se dos oligonucleotídeos antisense. Entretanto esse tratamento possui altos custos associados (Friedman, Freedman 2022).

Além desse tratamento, possuem estudos com fármacos sendo conduzidos, uma droga chamada inaxaplina. Em estudos pré-clínicos, a inaxaplina mostrou ter a capacidade de inibir seletivamente a função do canal *APOL1* em ambiente de laboratório, além de reduzir a presença de proteínas na urina em um modelo de camundongo (Egbuna 2023).

Dentre os treze participantes que receberam o tratamento com inaxaplina e aderir corretamente ao protocolo, observou-se uma diminuição média de -47,6% (com um intervalo de confiança de 95% entre -60,0 e -31,3) na relação entre proteína e creatinina urinária na semana 13, em comparação com os valores iniciais (Egbuna 2023).

Uma análise que considerou todos os participantes, independentemente da adesão ao tratamento com inaxaplina, constatou reduções semelhantes às da análise principal na maioria dos casos, exceto em um participante. Os eventos adversos relatados foram de gravidade leve a moderada, e nenhum deles resultou na interrupção do estudo (Egbuna 2023).

Um outro estudo foi de Eadon (2022) que avaliou o impacto da revelação de informações genéticas relacionadas ao gene *APOL1* em pacientes hipertensos de ascendência africana. Os resultados mostraram que indivíduos com variantes de alto risco tiveram uma redução significativa na pressão arterial sistólica, além de maior adesão a medicamentos anti-hipertensivos, mudanças no estilo de vida e aumento no monitoramento da função renal. Esses achados sugerem que a inclusão de testes genéticos pode melhorar o manejo clínico da hipertensão, especialmente em populações de alto risco, influenciando comportamentos de saúde e desfechos clínicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a qualidade e a integridade do DNA genômico extraído de biópsias renais de pacientes com glomerulopatias atendidos no Serviço de Nefrologia do LIME-HUUFMA, vinculado à Rede EBSEH.

3.2 Específicos

3.2.1 Padronizar protocolos de extração de DNA genômico a partir de biópsias renais embebidas em diferentes soluções de preservação e fixação (Michel, Bouin e formol);

3.2.2 Comparar a eficiência dos métodos de extração de DNA quanto à pureza e rendimento do material genético extraído de tecidos conservados em diferentes soluções.

3.2.3 Verificar a integridade do DNA extraído para aplicação em testes moleculares,

3.2.4 Investigar a presença dos alelos de risco G1 (rs73885319, rs71785313), G2 (rs60910145) de *APOL1* em pacientes com glomerulopatias por qPCR.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização do estudo e coleta das amostras

Trata-se de um estudo experimental de amostragem não probabilística. Foram avaliados biópsia de pacientes atendidos no Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão HU-UFMA. Os kits para a coleta de material histológico e da molecular são previamente enviados para os centros parceiros (**Apêndices 1 e 2**). As amostras foram recebidas no Laboratório de Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica (LIME-HUUFMA).

4.2 Análise morfológica renal

4.2.1 Microscopia óptica (MO)

As amostras armazenadas em solução de Bouin foram desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram realizados cortes de 2,5 µm de espessura em micrótomo e dispostos em lâminas de vidro. As lâminas foram incubadas em estufa a 65°C por 20 min para remoção do excesso de parafina. Posteriormente, foram submetidas a banhos de xilol e álcool para reidratação. As lâminas foram lavadas em água destilada e coradas com hematoxilina-eosina (HE), com intuito de observação do núcleo e citoplasma, já o tricrômico de Masson, *Periodic-Acid Schiff* (PAS), foram coradas além do núcleo e citoplasma as fibras colágenas e a impregnação com prata metenamina (PAMS), corando membranas. Posteriormente, foram montadas em meio Entellan® e recobertas por lamínulas para análise em microscópio óptico.

4.2.2 Imunofluorescência (IF)

As amostras armazenadas em Solução de Michel foram lavadas por 20 min em tampão PBS (pH 7,4). Após a lavagem, as amostras foram dispostas em meio de congelamento, congeladas e cortadas em criostato à 2,5 µm. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro específicas para IF, as quais foram incubadas por 30 min com anticorpos policlonais marcados com fluoróforos (isotiocianato de fluoresceína). Seguindo a técnica de IF direta, foram utilizados anticorpos anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, anti-fibrinogênio, anti-Kappa, anti-Lambda e anti-C1q, para diagnóstico das glomerulopatias. Após a incubação, as lâminas foram

montadas em meio Entellan® e recobertas por lamínulas para análise em microscópio universal Zeiss com sistema de filtros para imunofluorescência.

4.2.3 Microscopia Eletrônica (ME)

As amostras armazenadas em formol modificado foram fixadas em tetróxido de ósmio a 1% em tamponado com cacodilato de sódio 0,2 ml por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de acetona (30%, 50%, 90% e 95%) por 10 min em cada e em seguida em três banhos de acetona 100% por 20 min em cada. O material foi infiltrado com uma mistura de resina e acetona 3:1, 1:1, 1:3 (60 min /cada), resina pura (3 trocas de 60 min/cada) e incluído em resina Araldite (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA).

Em seguida, foram feitos cortes finos (0,5 µm), que foram dispostos nas lâminas, corados em solução azul de toluidina, montados em meio Entellan® e analisados em microscópio óptico para escolha da área de estudo para microscopia eletrônica. Selecionada a área, o fragmento foi cortado novamente de forma a preservar somente a área desejada. Foi realizado um novo corte a 80 a 90 nanômetros em ultramicrotomo (LEICA, modelo EMUCC7). O novo corte é então disposto em uma grade de cobre, colocado no porta amostras de ME e analisado em um microscópio eletrônico de transmissão no LIME.

4.3 Processamento e Análise Molecular

4.3.1 Extração de DNA de sangue

As amostras de sangue coletadas em FTA Micro Card (Whatman) foram realizadas por punções capilares com lancetas, colocadas em papel FTA, aguardando secar por 15 minutos e armazenadas em temperatura ambiente de acordo com as instruções de coleta disponibilizadas (Apêndice 3), a extração foi realizada por meio do kit FTA Purification Reagent (Whatman), seguindo as seguintes orientações do fabricante descritas no quadro 1:

Quadro 1: Descrição detalhada do processamento de extração de material genético de cartão FTA.

1	Retirar um disco de amostra utilizando bisturi;
---	---

2	Adicionar amostra diretamente no tubo
3	Adicionar 200µL do FTA Wash Buffer;
4	Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente;
5	Remover e descartar todo o reagente de purificação com uma pipeta;
6	Repetir etapas 3-5 por mais duas vezes, totalizando três ou até o líquido ficar translúcido;
7	Adicionar 200µL de tampão TE;
8	Incubar durante cinco minutos à temperatura ambiente;
9	Remover e descartar o tampão TE com uma pipeta;
10	Repetir as etapas 7-9 totalizando três lavagens;
11	Certifique-se que todo líquido foi removido;
12	Adicionar 50µL de água;
13	Deixar as amostras over night;
14	Quantificar através do líquido por Nanodrop;
15	Armazenar o material eluído em caixa devidamente registrada no freezer-20°

Já as amostras de sangue periférico foram coletadas com punção venosa periférica, coletadas em tubo de EDTA, posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Logo após foram extraídas plasma e leucócitos. A extração do material genético foi realizada utilizando o *kit QIAamp Blood DNA Mini kit* (Qiagen), seguindo as seguintes etapas:

Quadro 2: Procedimentos para a extração de material genético.

1	Pipetar 20 µl de proteinase K em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml ou 2 ml (não fornecido);
2	Adicionar 75 µl de sangue anticoagulado.
3	Adicionar 220 µl de PBS (Pode ser substituído por 125ul de água);
4	Adicionar 200 µl de tampão AL (sem etanol adicionado). Misture bem, agitando em vórtex;
5	Incubar a 56°C por 10 minutos;

6	Adicionar 200 µl de etanol (96-100%) à amostra e misture bem com um vórtex por 1 min. É importante que a amostra e o etanol sejam bem misturados para produzir uma solução homogênea;
7	Pipetar a mistura da etapa 6 para a coluna de centrifugação DNeasy Mini colocada em um tubo de coleta de 2 ml (fornecido).;
8	Centrifugar a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) por 1 minuto. Descarte o fluxo e o tubo de coleta;
9	Coloque a coluna de centrifugação DNeasy Mini em um novo tubo de coleta de 2 ml (fornecido).;
10	Adicionar 500 µl de Tampão AW1 e centrifugue por 1 min a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Descarte o fluxo e o tubo de coleta.
11	Coloque a coluna de centrifugação DNeasy Mini em um novo tubo de coleta de 2 ml (fornecido), adicione 500 µl de Buffer AW2 e centrifugue por 3 min $20,000 \times g$ (14,000 rpm).
12	Coloque a coluna de centrifugação DNeasy Mini em um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 ml ou 2 ml (não fornecido) e pipete 100 µl de Buffer AE diretamente sobre a membrana DNeasy. ;
13	Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, centrifugue por 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) para eluir.
14	Quantificar através do líquido por NanoDrop One (Thermo Fisher).
15	Armazenar o material eluído em caixa devidamente registrada no freezer-20°

4.3.2 Extração de DNA de amostras parafinadas

A extração das amostras em parafina foram realizadas em amostras incluídas que foram fixadas em bouin e formol, a extração do material genético foi realizada utilizando o kit *ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System* (Promega), todos os reagentes utilizados foram fornecidos pelo fabricante e as estão descritas abaixo:

Quadro 3: Procedimento para extração de DNA de material parafinado.

1	Realizar cortes de 3 um em blocos de parafina utilizando uma lâmina estéril;
2	Adicionar diretamente os fragmentos cortados no Oléo Mineral
3	Incubar a 80°C por 2 minutos

4	Vortexar para mistura
5	Adicionar 200µL de Lysis Buffer á amostra
6	Centrifugar por 15 s em temperatura ambiente
7	Adicionar 20µl de Proteinase K diretamente na fase azul inferior; misturar a fase inferior por pipetagem
8	Incubar a 56°C durante 1 hora
9	Incubar a 80°C por 4 horas.
10	Deixe a amostra esfriar até a temperatura ambiente e centrifugar brevemente à temperatura ambiente para coletar a condensação. OBS: Após a incubação a 80°C, as amostras podem ser armazenadas durante a noite a 2–10°C. Se as amostras foram armazenadas a 2–10°C, deixe-as aquecer até à temperatura ambiente antes de adicionar RNase e prosseguir com o protocolo.
11	Adicionar 10µl de RNase diretamente à amostra lisada na fase azul inferior e misture a fase inferior por pipetagem.
12	Incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos
13	Adicionar 220µl de BL Buffer à amostra lisada
14	Adicionar 240 µl de etanol (95–100%) e vortex brevemente para misturar.
15	Centrifugar a 10.000×g (4.009,62 rpm) por 15 segundos em temperatura ambiente. OBS: Duas fases serão formadas, uma fase inferior azul (aquosa) e uma fase superior (óleo).
16	Para cada amostra a ser processada, coloque uma coluna de Ligação em um dos Tubos de Coleta fornecidos
17	Transfira toda a fase azul inferior (aquosa) da amostra, incluindo qualquer precipitado que possa ter se formado, para o conjunto da coluna de Ligação/Tubo de Coleta e tampe a coluna e descarte o óleo mineral restante. OBS: O óleo mineral é inerte e não interferirá no procedimento de extração se parte da fase oleosa for transportada para a Coluna de ligação
18	Centrifugue o conjunto a 10.000×g (4.009,62 rpm) por 30 segundos em temperatura ambiente.
19	Descarte o fluxo e reinsira a Coluna de Ligação no Tubo de Coleta.
LAVAGEM E ELUIÇÃO DA COLUNA	

20	Adicionar 500 µl de solução de lavagem 1X (com etanol adicionado, consulte a Seção 7) à Coluna de Ligação e tampe a coluna
21	Centrifugar a 10.000×g (4.009,62 rpm) por 30 segundos em temperatura ambiente.
22	Descartar o fluxo e reinserir a coluna de ligação no mesmo tubo de coleta usado para ligação de ácido nucleico.
23	Adicionar 500µl de solução de lavagem 1X à coluna de ligação e tampe a coluna.
24	Centrifugar a 10.000×g ou (4.009,62 rpm) por 30 segundos em temperatura ambiente.
25	Descartar o fluxo e reinsira a Coluna de Ligação no Tubo de Coleta usado para Ligação de Ácido Nucleico
26	Abra a tampa na coluna de ligação e centrifugue o conjunto coluna de ligação/Tubo de Coleta em 16.000×g ou (6.415,40 rpm) durante 3 minutos à temperatura ambiente para secar a coluna.
27	Transfira a coluna de ligação para um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml (não fornecido) e descarte o Tubo de Coleta.
28	Adicionar 30–50µl de tampão de eluição à coluna e tampe a coluna
29	Deixar em temperatura ambiente por 5 minutos
30	Centrifugar a 16.000 ×g por 1 minuto em temperatura ambiente. Remova e descarte a coluna de ligação
31	Quantificar através do líquido por NanoDrop One (Thermo Fisher).
32	Armazenar o material eluído em caixa devidamente registrada no freezer-20°

4.3.3 Extração de tecido

A extração do tecido foi feita das amostras utilizadas para a IF previamente embebidas em solução de Michel. A extração do material genético foi realizada através de uma adaptação do *kit QIAamp Blood DNA Mini kit* seguindo as etapas descritas no quadro 4:

Quadro 4: Procedimentos para a extração de DNA em amostra de tecido previamente embebidos em Bouin e Michel.

1	Adicionar 180 uL de Buffer ATL a um microtubo de 1.5 mL.
---	--

2	Deixe o tecido descongelar naturalmente ou descongele o meio utilizando o Buffer de lavagem.
3	Cortar até 25 mg de tecido em pedaços pequenos utilizando uma placa de petri estéril. Coloque o tecido triturado no tubo contendo 180uL de Buffer ATL
4	Adicionar 20 µl de Proteinase K. Misture bem agitando em vórtex por 5 segundos. Dê um leve spin para certificar-se que não há líquido e tecido na parede ou tampa do tubo.
5	Incubar em termobloco a 56°C 1000 rpm por 1h30
6	Deixe a amostra na bancada por 3 min para equilibrá-la para temperatura ambiente.
7	Adicionar 4 µl de RNase A, vortexar e incubar por 2 min em temperatura ambiente
8	Vortexar por 15s.
9	Em um novo tubo, adicione 200 uL de buffer AL e 200 uL de etanol absoluto.
10	Transfira os 400 uL da mistura (buffer AL + etanol) para o tubo de sua amostra e misture bem em vórtex.
11	Transfira toda sua amostra (incluindo qualquer precipitado) para uma coluna devidamente identificada (DNeasy Mini Spin Column) e inserida em um tubo de coleta (collection tube).
12	Centrifugar a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) por 1 minuto. Retire a coluna do tubo coletor e coloque em um novo (fornecido pelo kit). Descarte o tubo de coletor utilizado contendo o fluxo que passou pela coluna.
13	Adicionar 500 µl do tampão AW1 a coluna e centrifugue por 1 min a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Retire a coluna do tubo coletor e coloque em um novo (fornecido pelo kit). Descarte o tubo de coletor utilizado contendo o fluxo que passou pela coluna.
14	Adicionar 500 µl Tampão AW2 e centrifugue por 3 min a $20.000 \times g$ (14.000 rpm). Retire a coluna do tubo coletor e coloque em um novo (fornecido pelo kit). Descarte o tubo de coletor utilizado contendo o fluxo que passou pela coluna.
15	Centrifugar novamente por 1 min a $20.000 \times g$ (14.000 rpm) com a tampa da coluna aberta.
16	Coloque a coluna em um microtubo de 1.5 mL devidamente identificado.

17	Adicionar 35µl de Tampão AE ou água RNase-Free diretamente no centro da membrana da coluna, mas sem encostar nela. Certifique-se que o líquido foi pipetado no centro da coluna, caso não seja, isso poderá impactar o rendimento
18	Incubar em temperatura ambiente por 5 min e depois centrifugar por 1 min a 12.000 rpm.
19	Quantifique a amostra no NanoDrop e certifique-se de depositar as informações de quantificação na planilha de controle geral ou específica do seu projeto.
20	Quantificar através do líquido por NanoDrop One (Thermo Fisher).
21	Armazenar o material eluído em caixa devidamente registrada no freezer-20°

4.3.4 PCR da β -globina

A PCR da Beta Globina foi realizada utilizando primers específicos que amplificam material genético de até 100 pares de bases. Os primers utilizados foram o GH20 F: 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' e PC04 R: 5' CAACTTCATCCACGT TCACC 3', adicionando os reagentes nas seguintes concentrações: Tampão 10X 2,5 µL; MgCl₂ 50 mM: 0,75 µL, dNTP 10 mM: 0,5 µL, GH20 (10 uM): 0,5 uL, PC04 (10 uM): 0,5 uL, Taq Platinum: 0,1 µL, H₂O RNase-free: 18,15 µL. DNA (~50 ng/uL): 2,0 µL. As temperaturas de termociclagem estão descritas no quadro abaixo (Quadro 5)

Quadro 5: Temperaturas de termociclagem da PCR da β -globina

Desnaturação inicial	94°C	2 min	
Desnaturação	94°C	30 s	40 x
Anelamento	55°C	30 s	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	5 min	

4.3.4 Identificação de variantes de *APOL1*

A identificação das variantes foi feita através de PCR convencional, utilizando primers comerciais específicos para o gene *APOL1*: *APOL1-F* (5' TGAGGGAGTTTTTGGGTGAGA3') e *APOL1-R* (5'AGAGCTTGCAGTGAGCTGAGA 3'). Para a reação foram adicionados H₂O RNase-free: 15,3 µL; Tampão (10X): 5 µL; MgCl₂ (50 mM): 1 µL; dNTP (10 mM): 0,5 µL; Primer F (10 µM): 1 uL; Primer R (10 µM): 1 uL; Taq Platinum: 0,2 µL; DNA 1µL. Logo após as amostras foram levadas para o termociclador submetido às variações de temperaturas descritas no quadro 5.

Quadro 5: Temperaturas de termociclagem.

Desnaturação inicial	95°C	2 min	
Desnaturação	95°C	1 min	35 x
Anelamento	61°C	1 min	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	5 min	

4.3.5 Preparação do Gel de Agarose

As amostras foram submetidas a teste de eletroforese. O gel foi preparado com 075 g de Agarose com 150 de tampão TBE (10X), levado ao micro-ondas por 1:30 ou até o líquido ficar translúcido. A reação é realizada com 1 µL de BlueJuice, 5 µL de amostra e 4 µL de H₂O RNase-free numa corrente de 100, voltagem 60 por 15 min, logo após uma corrida com uma corrente de 100, voltagem de 120 por 30. Analisado pelo transluminador.

4.3.6 Purificação das amostras

Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, seguindo as seguintes etapas:

Quadro 6: Procedimentos para a purificação de produtos de PCR.

1	Adicione um volume igual de MBS à amplificação de PCR.
2	Coloque uma Mini Coluna SV em um tubo de coleta para cada amplificação de PCR.
3	Transfira o produto de PCR preparado para o conjunto da mini coluna de SV e incube por 1 minuto em temperatura ambiente.
4	Centrifugue o conjunto da mini coluna de SV em uma microcentrífuga a $16.000 \times g$ (14.000 rpm) por 1 minuto. Remova a mini coluna de SV do conjunto da coluna de centrifugação e descarte o líquido no tubo de coleta. Retorne a Mini Coluna SV ao tubo de coleta.
5	Lave a coluna adicionando 700 μ l de MWS, previamente diluída com etanol 95%, à mini coluna SV. Centrifugue o conjunto da mini coluna de SV por 1 minuto a $16.000 \times g$ (14.000 rpm). Esvazie o tubo de coleta como antes e coloque a mini coluna de SV de volta no tubo de coleta.
6	Repita a lavagem com 500 μ l de MWS e centrifugue o conjunto da mini coluna de SV por 5 minutos a $16.000 \times g$.
7	Remova o conjunto da mini coluna de SV da centrífuga, tomando cuidado para não molhar o fundo da coluna com o fluxo. Esvazie o tubo de coleta e volte a centrifugar o conjunto da coluna por 1 minuto para evaporar qualquer etanol residual.
8	Transfira cuidadosamente a Mini Coluna SV para um tubo de microcentrífuga limpo de 1,5 ml (fornecido).
9	Aplique 35 μ l de água livre de nuclease diretamente no centro da coluna, sem tocar a membrana com a ponta da pipeta. Incube em temperatura ambiente por 1 minuto.
10	Centrifugue por 1 minuto a $16.000 \times g$ (14.000 rpm).
11	Quantificar através do líquido por Nanodrop .
12	Armazene em uma temperatura de -20°C ;

4.3.7 PCR do BigDye

A identificação das variantes foi feita através de PCR convencional, utilizando primers comerciais específicos para o gene APOL1: APOL1-F (5' TGAGGGAGTTTTTGGGTGAGA3') e APOL1-R (5'AGAGCTTGACAGTGAGCTGAGA 3') sendo realizada um mix para cada primer. Para a reação foram adicionados H₂O RNase-free: 6.0 μ L; Tampão 5X: 1,5 μ L; BigDye terminator v3.1: 1,0 μ L; Primers (10

uM); 0,5 uL; DNA 1µL. As temperaturas de termociclagem estão descritas no quadro 6

Quadro 7: Temperaturas de termociclagem PCR do BigDye

Desnaturação inicial	95°C	1 min	
Desnaturação	95°C	15 s	30 x
Anelamento	61°C	15 s	
Extensão	72°C	15 s	

4.3.8 Validação das variantes de *APOL1*

Os amplicons foram purificados por meio do kit BigDye XTerminator Purification (Thermo Fisher) e quantificados utilizando espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher).

Quadro 8 : Purificação dos produtos de PCR do BigDye.

1	Adicione 40 uL de Isopropanol 75% na reação de sequenciamento no mesmo tubo onde a reação de sequenciamento foi realizada.
2	Vortexar as amostras por 1 minuto
3	Deixe os tubos na bancada à temperatura ambiente por 20 min;
4	Centrifugar os tubos a 13000 xG (ou a velocidade máxima da centrífuga) por 20 min;
5	Desprezar o sobrenadante por inversão NOTA: se utilizar um papel absorvente, encoste o tubo investido e dê leve batidas para forçar a saída do líquido do tubo. Ao retornar o tubo à posição inicial, se ainda houver resto de reação do fundo do tubo, siga com a purificação normalmente
6	Adicione 200 uL de Etanol 70% nos tubos;
7	Centrifugar os tubos a 13000 RPM (ou velocidade máxima da centrífuga) por 5 min;
8	Desprezar o sobrenadante por inversão; NOTA: Não é necessário sacudir o tubo, apenas inverta e deixe sair o sobrenadante.
9	Disponha papel absorvente na centrífuga de placas. Coloque os tubos abertos um uma rack branca, e posicione a rack de modo que os tubos

	fiquem com a abertura (ainda abertas) viradas para baixo. Lembre-se que a centrífuga deve estar balanceada, então coloque metade dos tubos de cada lado.
10	Dar um spin na placa até 1000 RPM (quando atingir esta velocidade, desligar). NOTA: selecionar a rotina SEQ2, já cadastrada na centrífuga)
11	Retire os tubos da centrífuga e coloque-os no termobloco. Deixe os tubos com as tampas abertas à 60°C por 10 min.
12	Adicione 10 uL de HiDi Formamide e vortexar os tubos por 10 segundos. NOTA: Caso não vá sequenciar imediatamente, após retirar os tubos do termobloco, os tubos podem ficar guardados, envolvidos em papel alumínio, no freezer -20°C.
13	Dê um spin rápido nos tubos na minicentrífuga (é realmente rápido, caso contrário, os tubos podem abrir durante a centrifugação);
14	Coloque o material na placa de sequenciamento de acordo com o desenho de placas feito previamente. ATENÇÃO: Cuidado para não pipetar amostras diferentes no mesmo poço
15	Passe adesivo laminado tapando a abertura dos poços utilizados da placa
16	Dê um spin rápido na placa na centrífuga de placas.
17	Aqueça a termociclador a 95°C e deixe o material por 3 minutos (ATENÇÃO: não feche a tampa do termociclador. Ao término, coloque imediatamente na rack refrigerada para choque térmico(rack roxa).
18	Retire o papel laminado e coloque a septa em cima da placa e coloque a placa no Equipamento Seq Studio.

Posteriormente, as amostras foram sequenciadas por meio do equipamento Seq Studio (Thermo Fisher), utilizando o SeqStudio Cartridge v.2 e BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit. As sequências obtidas foram processadas utilizando o software Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) e comparadas às sequências de referência disponíveis no GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4.4 Análise de dados

Os dados foram organizados em planilhas no Microsoft Excel (versão 2019) e submetidos à análise estatística por meio do software SPSS® versão 26 (IBM Corp.). As associações entre variáveis foram avaliadas por testes bivariados, utilizando-se o teste do Qui-quadrado ou, quando apropriado, o teste exato de

Fisher. A análise dos dados de sequenciamento foi conduzida no software FinchTV® versão 1.4.0. Para todas as análises estatísticas, adotou-se um nível de significância de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS [BioRender object]

Os resultados apresentados nas tabelas e figuras revelam dados sobre a qualidade do DNA extraído de amostras preservadas em meio Michel e fixadas em Bouin/formol, além da genotipagem do gene *APOL1*. A análise da integridade do DNA extraído a partir de amostras embebidas no meio de transporte de Michel (Tabela 1) demonstrou uma ampla variação na concentração do material genético, com valores oscilando entre 3,3 ng/μL e 200,7 ng/μL. Apesar dessa variação quantitativa, a razão A260/A280 não variou muito. Já o parâmetro A260/A230, por sua vez, apresentou maior variabilidade. A eletroforese representada na figura 4 demonstrou a integridade do DNA.

Tabela 1. Concentração e pureza das amostras extraídas do meio, previamente embebidas em Michel.

Caso	Kit utilizado	[] ng / μL	A260 / A280	A260 / A230	A260	A280	Tipo de material
RP001	FTA Purification Reagent (Whatman)	49.597	1.818	2.298	0,992	0,546	FTA
RP002	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	23.515	1.852	2.360	0.470	0.254	Michel
RP003	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	20.857	1.853	1.942	417	225	Michel
RP004	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	78.380	1.869	2.609	1.568	839	Michel
RP005	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	56.519	1.878	1.594	1.130	602	Michel
RP006	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	29.084	1.864	1.283	582	312	Michel
RP007	DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)	6.155	1.903	432	123	65	Michel

RP008	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	139.340	1.847	2.371	2.787	1.509	Michel
RP009	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	23.389	1.776	4.010	468	263	Michel
RP010	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	24.469	1.824	1.073	489	268	Michel
RP011	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	35.441	1.802	1.741	709	393	Michel
RP012	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	14.608	1.719	3.792	292	170	Michel
RP013	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	110.387	1.845	2.314	2.208	1.196	Michel
RP014	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	14.534	1.856	742	291	157	Michel
RP015	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	50.077	1.854	2.838	1.002	540	Michel
RP016	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	19.028	1.795	3.863	381	212	Michel
RP017	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	10.937	1.986	694	219	110	Michel
RP018	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	3.304	1.936	-963	0.066	0.034	Michel
RP019	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	61.737	1.862	2.617	1.235	663	Michel
RP020	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	65.507	1.919	1.648	1.310	683	Michel
RP021	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	12.892	1.824	-15.582	258	141	Michel
RP022	69504) DNeasy Blood Tissue (Cat n°	28.452	1.871	2.248	569	304	Michel

RP023	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	200.717	1.866	2.484	4.014	2.151	Michel
RP024	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	4.649	1.739	-3.106	93	53	Michel
RP025	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	70.555	1.857	1.853	1.411	760	Michel
RP026	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	120.851	1.864	2.285	2.417	1.297	Michel
RP027	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	29.463	1.821	1.793	589	324	Michel
RP028	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	100.709	1.885	2.859	2.014	1.069	Michel
RP029	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	39.693	1.888	3.872	794	420	Michel
RP030	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	28.813	1.864	12.001	576	309	Michel
RP031	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	174.313	1.875	3.115	3.486	1.859	Michel
RP032	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	118.342	1.876	3.211	2.367	1.261	Michel
RP 033	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	142.133	1.857	1.947	2.843	1.531	Michel
RP034	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	186.535	1.884	2.650	3.731	1.981	Michel
RP035	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	61.479	1.915	3.656	1.230	642	Michel
RP036	<i>DNeasy Blood Tissue (Cat n° 69504)</i>	83.318	1.908	3.510	1.666	0.874	Michel
RP037	<i>FTA Purification Reagent (Whatman)</i>	13.210	0.229	0.031	0.264	1.152	FTA

Legenda: [] ng/μL: concentração de DNA; A260/A280: razão de pureza do DNA, indicando possível contaminação por proteínas; A260/A230: razão adicional de pureza, associada à

presença de compostos orgânicos ou reagentes; A260: absorvância a 260 nm, relacionada aos ácidos nucleicos; A280: absorvância a 280 nm, associada a proteínas.

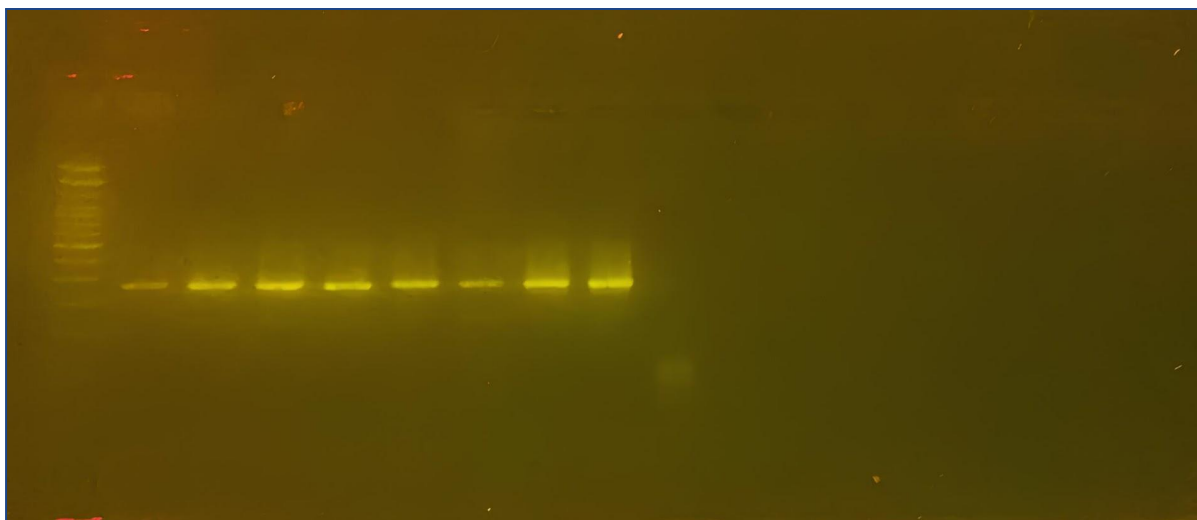


Figura 4. Eletroforese de amostras extraídas embebidas em meio transporte Michel.
Fonte: Autoria própria (2025).

Já na Tabela 2 mostra dados das amostras fixadas em parafina previamente embebidas em Bouin e extraídas do formol, apresentaram concentrações extremamente baixas, algumas inferiores a 1 ng/μL, além de razões A260/A280 e A260/A230 com valores negativos. A figura 5 mostra a PCR da β-globina realizada.

Tabela 2. Concentração e pureza das amostras extraídas de amostras parafinadas, previamente embebidas em formol e bouin

Caso	Kit utilizado	[] ng / μL	A260 / A280	A260 / A230	A260	A280	Tipo de material
TF 001	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	2.286	1.479	2.174	46	31	Bouin
TF 002	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	0.99	2.305	4.014	0.02	9	Bouin
TF 003	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N°	11.202	1.86	418	224	0.12	Formol

TF 004	de catálogo: A2352 ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	15.654	1.764	2.983	313	177	Michel
TF 005	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	0,782	797	161	16	0.02	Bouin
TF 006	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	8.319	1.625	95	166	102	Bouin
TF 007	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	0,201	-0.32	191	4	-13	Bouin
TF 008	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	0,492	6.866	-774	0.01	1	Bouin
TF 009	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	38.088	1.651	2029	762	461	Formol
TF 010	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System N° de catálogo: A2352	41.35	1.663	1984	827	497	Formol

Legenda: [] ng / µL: Concentração de DNA, A260 / A280: Razão de pureza do DNA, A260 / A230: Razão adicional de pureza A260: Absorbância a 260 nm, A280: Absorbância a 280 nm [] ng / µL: Concentração de DNA, A260 / A280: Razão de pureza do DNA, A260 / A230: Razão adicional de pureza A260: Absorbância a 260 nm A280: Absorbância a 280 nm

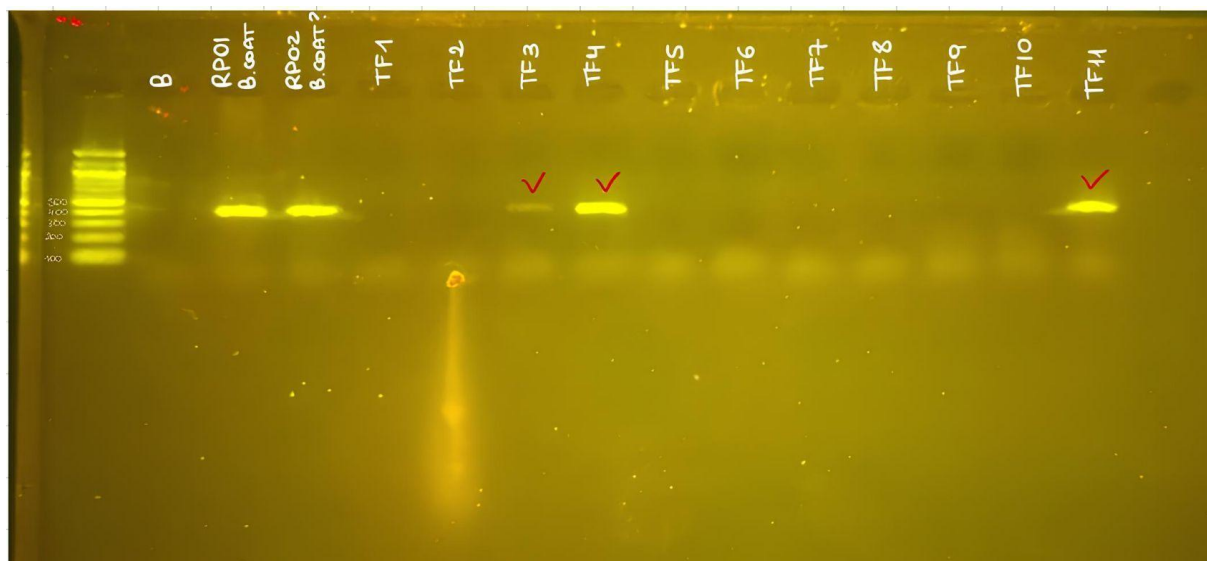


Figura 5. Eletroforese das amostras parafinadas, previamente embebidas em formol e bouin. Fonte: Autoria própria (2025).

A tabela 3 apresenta a relação entre os casos analisados e seus respectivos genótipos para o gene *APOL1*, além do diagnóstico histopatológico associado a cada amostra. A tabela 3 traz informações técnicas sobre as amostras de biópsia renal analisadas, incluindo: Tamanho do fragmento coletado (em mm), região anatômica atingida e tipo de análise realizada.

Tabela 3. Identificação das variantes de risco do gene *APOL1*

Identificação	Diagnóstico	Genótipo
RP001	GESF	G1/G2
RP005	Material inadequado	G0/G0
RP006	Nefrite lúpica	G0/G0
RP007	GESF	G0/G0
RP008	GESF	G0/G0
RP010	Nefrite Lúpica	G0/G0

RP013	Glomeruloesclerose segmentar e focal	G0/G0
RP014	Parênquima renal	G0/G0
RP016	GESF	G1/G1
RP018	Nefropatia crônica	G0/G0
RP019	Nefrite Lúpica	G0/G0
RP020	Glomerulonefrite do C3	G0/G0
RP021	Nefrite Lúpica	G0/G0
RP022	GESF	G0/G0
RP023	GESF	G0/G0
RP024	Nefrite Lúpica	G0/G0

Fonte: Elaboração própria (2025).

Tabela 4: Tabela mostrando características do tecido e aspectos da biópsia renal.

Identificação	Tamanho	A biópsia atingiu	Material
RP002	10,0x 0,5mm	Principalmente medula	MO e IF
RP003	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP004	10x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP005	08x0,5mm	Sem informação	MO, IF e ME
RP006	06x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP007	15,0x0,5mm	Principalmente medula renal	MO, IF e ME
RP008	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP009	14,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP010	3,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP011	10,0x0,5mm	Só medula renal	MO, IF e ME
RP012	8,0x0,5mm	Córtex renal	MO, IF e ME

RP013	15,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP014	5,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP015	14,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP016	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP017	13,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP018	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP019	9,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP020	9,0x0,5mm	Somente medula renal	MO e IF
RP021	4,0x0,5mm	Sem informação	MO e IF
RP022	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP023	10,0x0,5mm	Principalmente o córtex renal	MO, IF e ME
RP024	10,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP025	10,0x0,5mm	Sem informação	MO, IF e ME
RP026	16x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP027	5,0x0,5mm	Sem informação	MO e IF
RP028	10,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP029	15,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP030	10,0x0,5mm	Principalmente o córtex renal	MO, IF e ME
RP031	7,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP032	5,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME
RP033	10,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP034	12,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP035	9,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP036	12,0x0,5mm	Principalmente medula renal	MO e IF
RP037	5,0x0,5mm	Principalmente medula renal	MO e IF
RP038	10,0x0,5mm	Somente medula renal	MO, IF e ME
RP039	12,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO, IF e ME, FTA
RP040	5,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP041	7,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF
RP042	8,0x0,5mm	Córtex e medula renal	MO e IF

Fonte: Elaboração própria (2025).

6. DISCUSSÃO

A solução de Michel demonstrou uma concentração de DNA que variou significativamente entre as amostras conservadas pelo meio, com valores indo de 3,3 ng/μL até 200,7 ng/μL. Essas variações são relevantes do ponto de vista técnico, pois impactam diretamente a eficiência das análises moleculares subsequentes, como a PCR. Amostras com concentrações muito baixas (<10 ng/μL), embora por vezes amplificáveis, tendem a resultar em produtos fracos ou ausentes na eletroforese, além de estarem mais suscetíveis a erros por contaminação ou degradação.

Além da concentração, outro aspecto importante observado na tabela foi a razão A260/A280, um indicador da pureza do DNA em relação à contaminação proteica. A maioria das amostras embebidas em Michel apresentou valores próximos de 1,8 a 1,9, intervalo considerado adequado para DNA puro. Entretanto, algumas amostras ultrapassaram esse limite ou ficaram abaixo, sugerindo a presença de contaminantes proteicos, fenóis ou excesso de RNA. Essa contaminação pode ser explicada pelo fato de o meio de Michel não ser um fixador propriamente dito, mas sim uma solução de transporte rica em substâncias orgânicas, cuja interferência nos processos de purificação de DNA já foi descrita na literatura (Boraiy et al., 2014).

As amostras conservadas em Bouin demonstraram os piores resultados de integridade, com bandas ausentes ou extremamente degradadas nas figuras, além de concentrações extremamente baixas e índices de pureza inadequados. Essa constatação está alinhada com a literatura, que frequentemente contraindica o uso de Bouin para estudos moleculares. O ácido pícrico presente nesse fixador causa retração e intensa modificação das bases nitrogenadas, prejudicando tanto a extração quanto a amplificação do DNA (Bonin et al., 2005 e Howat, Wilson, 2014).

A análise dos dados da Tabela 4, quando associada ao tamanho dos fragmentos de tecido utilizados para extração do DNA, revela uma relação clara entre a quantidade de material biológico disponível e a qualidade do DNA obtido. Observou-se que amostras oriundas de fragmentos maiores tendem a apresentar concentrações mais altas de DNA e valores de pureza mais próximos do ideal, enquanto os menores fragmentos frequentemente resultaram em baixo rendimento e valores de A260/A280 fora da faixa ótima (1,8–2,0).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas análises realizadas, é possível concluir que a eficiência na extração e pureza do DNA genômico a partir de tecidos renais é profundamente influenciada por uma série de fatores técnicos e biológicos. A escolha do meio de conservação é um dos aspectos mais determinantes: amostras armazenadas na solução de Michel apresentaram maior variabilidade na concentração de DNA, mas ainda assim mantiveram, em muitos casos, índices de pureza aceitável para análises moleculares.

Por outro lado, amostras conservadas em Bouin demonstraram desempenho significativamente inferior, com baixa integridade molecular, concentração reduzida e pureza comprometida. Outro fator relevante foi o tamanho dos fragmentos utilizados na extração. Fragmentos maiores resultaram em maior rendimento e melhor qualidade do DNA. Já os fragmentos menores foram associados a menores concentrações e a maiores índices de contaminação.

Finalmente, também se observou que a região anatômica de onde o tecido foi obtido impacta diretamente a qualidade do DNA extraído. Fragmentos provenientes do córtex renal apresentaram melhor desempenho, tanto em concentração quanto em pureza. Esses dados ressaltam a importância de cuidados metodológicos criteriosos, desde a coleta até a extração do DNA, especialmente em estudos que visam análises moleculares sensíveis como a PCR e sequenciamento. A adequação do tipo de fixador ou conservante, o tamanho e a origem do fragmento, bem como o tempo decorrido até o processamento, devem ser cuidadosamente considerados para garantir a viabilidade e a reprodutibilidade das análises genéticas em tecidos renais.

REFERÊNCIAS

- ABID, Qassim et al. APOL1-associated collapsing focal segmental glomerulosclerosis in a patient with stimulator of interferon genes (STING)-associated vasculopathy with onset in infancy (SAVI). **American Journal of Kidney Diseases**, v. 75, n. 2, p. 287-290, 2020.
- ADNANI, Harsha et al. Impact of antiretroviral therapy on kidney disease in HIV infected individuals—a qualitative systematic review. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care (JIAPAC)**, v. 21, p. 23259582221089194, 2022.
- ALLADAGBIN, Dona J. et al. The sickle cell trait and end stage renal disease in Salvador, Brazil. **PloS one**, v. 13, n. 12, p. e0209036, 2018.
- AZZALINI, Eros et al. Reliability of miRNA analysis from fixed and paraffin-embedded tissues. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4819, 2019.
- BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. **Comprehensive Physiology**, v. 2, n. 2, p. 1303–1353, 2012.
- BLANTZ, R. C. et al. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 118, p. 23–43, 2007.
- BLAZER, Ashira D.; CLANCY, Robert M. ApoL1 and the immune response of patients with systemic lupus erythematosus. **Current rheumatology reports**, v. 19, p. 1-7, 2017.
- BONILLA, Marco et al. A review of focal segmental glomerulosclerosis classification with a focus on genetic associations. **Kidney medicine**, p. 100826, 2024.
- BONIN, Serena et al. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 3, p. 313-316, 2005.
- BORAIY, Logeina; FONTAO, Lionel. Michel's transport medium as an alternative to liquid nitrogen for PCR analysis of skin biopsy specimens. **Dermatopathology**, v. 1, n. 2, p. 70-74, 2014.
- CASSOL, Clarissa A. et al. Immunostaining for galactose-deficient immunoglobulin A is not specific for primary immunoglobulin A nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. 12, p. 2123-2129, 2020.
- CORNELISSEN, Anne et al. APOL1 Genetic Variants Are Associated With Increased Risk of Coronary Atherosclerotic Plaque Rupture in the Black Population. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 41, n. 7, p. 2201-2214, 2021.

CUTRIM, Érico Murilo Monteiro et al. Collapsing glomerulopathy: a review by the collapsing Brazilian consortium. *Frontiers in Medicine*, v. 9, p. 846173, 2022.

D'AGATI, Vivette et al. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. **American journal of kidney diseases**, v. 43, n. 2, p. 368-382, 2004.

D'AGATI, Vivette D. et al. Obesity-related glomerulopathy: clinical and pathologic characteristics and pathogenesis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 12, n. 8, p. 453-471, 2016.

EADON, Michael T. et al. Design and rationale of GUARDD-US: a pragmatic, randomized trial of genetic testing for APOL1 and pharmacogenomic predictors of antihypertensive efficacy in patients with hypertension. *Contemporary clinical trials*, v. 119, p. 106813, 2022.

EGBUNA, Ogo et al. Inaxaplin para doença renal proteinúrica em pessoas com duas variantes de APOL1. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 11, pág. 969-979, 2023. See More

ELLENBURG, James L. et al. Formalin versus bouin solution for testis biopsies: which is the better fixative?. **Clinical Pathology**, v. 13, p. 2632010X19897262, 2020.

FILLER, Guido et al. Is there really an increase in non-minimal change nephrotic syndrome in children?. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, n. 6, p. 1107-1113, 2003.

FRIEDMAN, David J.; POLLAK, Martin R. APOL1 e doença renal: da genética à biologia. **Revisão anual de fisiologia**, v. 82, p. 323-342, 2020.

FRIEDMAN, David J. et al. Genetics of kidney failure and the evolving story of APOL1. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 9, p. 3367-3374, 2011.

FRIEDMAN, David J.; MA, Lijun; FREEDMAN, Barry I. Potencial de tratamento na nefropatia associada a APOL1. **Opinião atual em nefrologia e hipertensão**, v. 31, n. 5, pág. 442-448, 2022.

FREEDMAN, Barry I. et al. APOL1-associated nephropathy: a key contributor to racial disparities in CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 72, n. 5, p. S8-S16, 2018.

FREIRE, Kenia Machado Souza et al. Lesão renal aguda em crianças: incidência e fatores prognósticos em pacientes gravemente enfermos. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 22, p. 166-174, 2010.

FOGO, Agnes B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 2, p. 76-87, 2015.

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

GASPAROTTO, Michela et al. Lupus nephritis: clinical presentations and outcomes in the 21st century. **Rheumatology**, v. 59, n. Supplement_5, p. v39-v51, 2020.

GBADEGESIN, Rasheed et al. APOL1 genotyping is incomplete without testing for the protective M1 modifier p. N264K variant. *Glomerular diseases*, v. 4, n. 1, p. 43-48, 2024.

GENOVESE, Giulio et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 841-845, 2010.

GRIBOUVAL, Olivier et al. APOL1 risk genotype in European steroid-resistant nephrotic syndrome and/or focal segmental glomerulosclerosis patients of different African ancestries. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 34, n. 11, p. 1885-1893, 2019.

GOYAL, Rohan; SINGHAL, Pravin C. Variantes de risco APOL1 e o desenvolvimento de nefropatia associada ao HIV. **Revista da FEBS**, v. 288, n. 19, pág. 5586-5597, 2021.

GUPTA, Yask et al. Strong protective effect of the APOL1 p. N264K variant against G2-associated focal segmental glomerulosclerosis and kidney disease. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 7836, 2023.

HOWAT, William J.; WILSON, Beverley A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. **Methods**, v. 70, n. 1, p. 12-19, 2014

HUANG, Xiaoyan; CARRERO, Juan Jesus. Better prevention than cure: optimal patient preparation for renal replacement therapy. **Kidney international**, v. 85, n. 3, p. 507-510, 2014.

HUNG, Adriana M. et al. Variantes de risco APOL1, lesão renal aguda e morte em participantes com ascendência africana hospitalizados com COVID-19 do programa de milhões de veteranos. **JAMA medicina interna**, v. 182, n. 4, pág. 386-395, 2022.

JOHNSTONE, Duncan B. et al. Os alelos nulos APOL1 de uma vila rural na Índia não se correlacionam com a glomeruloesclerose. **PloS um**, v. 7, n. 12, pág. e51546, 2012.

JOHANSEN, Kirsten L. et al. US renal data system 2022 annual data report: epidemiology of kidney disease in the United States. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 81, n. 3, p. A8-A11, 2023.

KAWACHI, Hiroshi et al. Slit diaphragm dysfunction in proteinuric states: identification of novel therapeutic targets for nephrotic syndrome. **Clinical and experimental nephrology**, v. 13, p. 275-280, 2009.

KWON, Young Eun et al. Clinical Outcomes of Focal Segmental Glomerulosclerosis Pathologic Variants in Korean Adult Patients. *대한내과학회 추계학술발표논문집*, v. 2013, n. 1, p. 222-222, 2013.

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

KOPP, Jeffrey B. et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 11, p. 2129-2137, 2011.

KOIRALA, Abbal; AKILESH, Shreeram; JEFFERSON, J. Ashley. Collapsing Glomerulopathy. **Advances in Kidney Disease and Health**, v. 31, n. 4, p. 290-298, 2024.

KLOMJIT, Nattawat et al. COVID-19 and glomerular diseases. **Kidney International Reports**, v. 8, n. 6, p. 1137-1150, 2023.

LARSEN, Christopher P. et al. Collapsing glomerulopathy in a patient with COVID-19. **Kidney international reports**, v. 5, n. 6, p. 935-939, 2020.

LECH, Maciej; ANDERS, Hans-Joachim. The pathogenesis of lupus nephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 24, n. 9, p. 1357-1366, 2013.

LEHMANN, Ulrich; KREIPE, Hans. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 409-418, 2001.

LIMOU, Sophie et al. APOL1 toxin, innate immunity, and kidney injury. **Kidney international**, v. 88, n. 1, p. 28-34, 2015.

MACIEJEWSKA, Agnieszka; JAKUBOWSKA, Joanna; PAWŁOWSKI, Ryszard. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes. **International journal of legal medicine**, v. 127, p. 309-319, 2013.

MARINHO, Ana Wanda Guerra Barreto et al. Prevalence of chronic renal disease among Brazilian adults: a systematic review. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 379-388, 2017.

MARTINO, Eleonora et al. Impact of standardization in tissue processing: The performance of different fixatives. **New Biotechnology**, v. 71, p. 30-36, 2022.

MASUDA, Norikazu et al. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 22, p. 4436-4443, 1999.

M MADHAVAN, Sethu; O'TOOLE, John F. The biology of APOL1 with insights into the association between APOL1 variants and chronic kidney disease. **Clinical and experimental nephrology**, v. 18, p. 238-242, 2014.

MELK, Anette. Tools for Kidney Tissue Analysis. In: **Pediatric Kidney Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 171-185

MICHEL, Beno; MILNER, Yoram; DAVID, Kathy. Preservation of tissue-fixed immunoglobulins in skin biopsies of patients with lupus erythematosus and bullous diseases—preliminary report. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 59, n. 6, p. 449-452, 1972.

MIELONEN, Outi I. et al. Detection of low-copy human virus DNA upon prolonged formalin fixation. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 133, 2022.

MORENO, Vanessa; SMITH, Elizabeth A.; PIÑA-OVIEDO, Sergio. Fluorescent immunohistochemistry. In: **Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2021. p. 131-146.

NAGAI, Momoko et al. Extraction of DNA from human embryos after long-term preservation in formalin and Bouin's solutions. **Congenital anomalies**, v. 56, n. 3, p. 112-118, 2016.

NAJAFIAN, Behzad et al. Approach to kidney biopsy: core curriculum 2022. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 80, n. 1, p. 119-131, 2022.

NARJOZ, Céline et al. Diagnostic Yield of APOL1 p. N264K Variant Screening in Daily Practice. **Kidney International Reports**, v. 9, n. 6, p. 1916-1918, 2024.

NAGAHASHI, Masayuki et al. Formalin-fixed paraffin-embedded sample conditions for deep next generation sequencing. **journal of surgical research**, v. 220, p. 125-132, 2017.

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

O'SHAUGHNESSY, Michelle M. et al. Glomerular disease frequencies by race, sex and region: results from the International Kidney Biopsy Survey. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 33, n. 4, p. 661-669, 2018.

OLABISI, Opeyemi 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, 2016.

OBRIȘCĂ, Bogdan et al. Advances in lupus nephritis pathogenesis: from bench to bedside. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 7, p. 3766, 2021.

PARIKH, Samir V. et al. Update on lupus nephritis: core curriculum 2020. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 76, n. 2, p. 265-281, 2020.

POLLAK, Martin R.; FRIEDMAN, David J. APOL1 e APOL1-Associated Kidney Disease: A Common Disease, an Unusual Disease Gene—Proceedings of the Henry Shavelle Professorship. **Doenças Glomerulares**, v. 3, n. 1, p. 75-87, 2023.

QAMAR, Mohammad A. et al. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis secondary to COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 85, n. 2, p. 92-101, 2023.

RIVERA, Frederick Berro et al. HIV-associated nephropathy in 2022. **Glomerular Diseases**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2023.

ROSS, Michael J. Novos insights sobre APOL1 e doença renal em crianças africanas e brasileiras que vivem com doença renal em estágio terminal. **Kidney International Reports**, v. 7, pág. 908-910, 2019.

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

SALGADO-FILHO, Natalino et al. Prevalence of chronic kidney disease and comorbidities in isolated African descent communities (PREVRENAL): methodological design of a cohort study. **BMC Nephrology**, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2018.

SIEMENS, Tobias August et al. APOL1 risk variants and kidney disease: what we know so far. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 40, p. 388-402, 2018.

SIMEONE, Christopher A. et al. The APOL1 p. N264K variant is co-inherited with the G2 kidney disease risk variant through a proximity recombination event. G3: **Genes, Genomes, Genetics**, v. 15, n. 2, p. jkae290, 2025.

SHAH, P. B. et al. APOL 1 Polymorphisms in a Deceased Donor and Early Presentation of Collapsing Glomerulopathy and Focal Segmental Glomerulosclerosis in Two Recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 16, n. 6, p. 1923-1927, 2016.

STOKES, M. B. et al. Cellular focal segmental glomerulosclerosis: clinical and pathologic features. **Kidney international**, v. 70, n. 10, p. 1783-1792, 2006.

ULTSCH, Mark et al. Structures of the ApoL1 and ApoL2 N-terminal domains reveal a non-classical four-helix bundle motif. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 916, 2021.

THIRLWELL, Christina et al. Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. **Methods**, v. 52, n. 3, p. 248-254, 2010.

TZUR, Shay 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**, [s.l.], v. 128, n. 3, p. 345-350, 2010.

TRIVEDI, Mayuri et al. Tip variant of focal segmental glomerulosclerosis: is it truly a benign variant?. **Renal Failure**, v. 37, n. 5, p. 763-768, 2015.

VAJGEL, Gisele et al. Effect of a single apolipoprotein L1 gene nephropathy variant on the risk of advanced lupus nephritis in Brazilians. **The Journal of rheumatology**, v. 47, n. 8, p. 1209-1217, 2020.

VANHOLLEBEKE, Benoit et al. Infecção humana por Trypanosoma evansi ligada à falta de apolipoproteína LI. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, pág. 2752-2756, 2006.

VELEZ, Juan Carlos Q.; CAZA, Tiffany; LARSEN, Christopher P. COVAN is the new HIVAN: the re-emergence of collapsing glomerulopathy with COVID-19. **Nature Reviews Nephrology**, v. 16, n. 10, p. 565-567, 2020.

VITOŠEVIĆ, Katarina et al. The quality of DNA isolated from autopsy formalin-fixed and formalin-fixed paraffin-embedded tissues: study of 1662 samples. **Molecular Biology Reports**, v. 50, n. 8, p. 6323-6336, 2023.

WATANABE, Andreia et al. APOL1 in an ethnically diverse pediatric population with nephrotic syndrome: implications in focal segmental glomerulosclerosis and other diagnoses. **Pediatric Nephrology**, v. 36, n. 8, p. 2327-2336, 2021.

WAKASHIN, Hidefumi et al. As variantes de risco renal APOL1 exacerbam a lesão podocitária aumentando o estresse inflamatório. **BMC nefrologia**, v. 21, n. 1, pág. 1-13, 2020.

WEN, Xianyu et al. Improved results of LINE-1 methylation analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with the application of a heating step during the DNA extraction process. **Clinical Epigenetics**, v. 9, p. 1-9, 2017.

WEI, Changli et al. Circulating suPAR in two cohorts of primary FSGS. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 12, p. 2051-2059, 2012.

WINKLER, Cheryl A.; NELSON, George W. A mouse recapitulating APOL1-associated kidney disease. **Nature Medicine**, v. 23, n. 4, p. 411-412, 2017.

WOOLLONS; GRATIAN; BHOGAL. Michel's medium: a potential alternative to cryoprotection for tissue transport in the investigation of genetic skin disease. **Clinical and experimental dermatology**, v. 24, n. 6, p. 487-489, 1999.

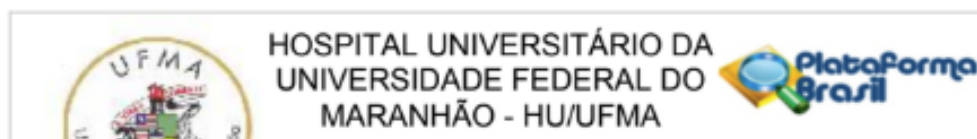
YI, Qing-qing et al. Efeito do tempo de preservação de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina na quantidade extraível de DNA e RNA. **Jornal de Pesquisa Médica Internacional**, v. 48, n. 6, p. 0300060520931259, 2020.

YU, Chen et al. Lupus nephritis: new progress in diagnosis and treatment. **Journal of autoimmunity**, v. 132, p. 102871, 2022.

ZHAO, Yongmei et al. Robustness of RNA sequencing on older formalin-fixed paraffin-embedded tissue from high-grade ovarian serous adenocarcinomas. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0216050, 2019.

ZICKERT, A. et al. Role of early repeated renal biopsies in lupus nephritis. **Lupus science & medicine**, v. 1, n. 1, p. e000018, 2014.

ANEXO 1
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO DO GENE APOL1 EM PORTADORES DE GLOMERULOPATIAS NO ESTADO DO MARANHÃO

Pesquisador: NATALINO SALGADO FILHO

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

Versão: 2

CAAE: 67835822.3.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO MARANHÃO - FAPEMA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.980.785

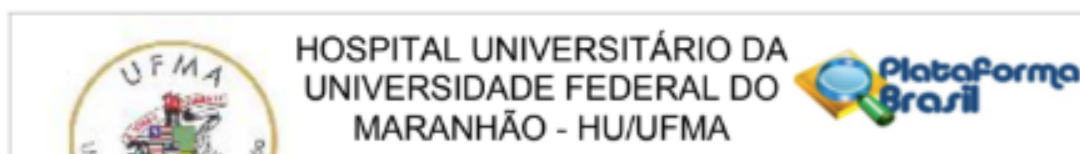
Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa: Data de Submissão do Projeto: 24/03/2023 Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1928020.pdf Versão do Projeto: 2

RESUMO

As doenças renais crônicas (doenças persistentes que afetam os rins) são consideradas um grave problema de saúde no Brasil e no mundo. Dentre essas doenças, destacam-se as glomerulopatias, que são doenças que afetam os glomérulos, estruturas responsáveis pela filtração do sangue e produção de urina no rim. Dentre os fatores que contribuem para o surgimento dessas doenças, estão os genéticos (ligados ao DNA das nossas células). As mutações (alterações no nosso DNA) no gene APOL1 (parte do nosso DNA que desempenha que fornece informações para produção de uma proteína importante) constituem o principal mecanismo genético atrelados à glomerulopatias. Diante disso, o principal objetivo desta pesquisa é estudar o gene APOL1 em portadores de doenças renais crônicas. Os pacientes serão abordados por um pesquisador da equipe durante o

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227 4º andar
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1002 **E-mail:** cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 5.900.785

Cronograma	cronograma.pdf	08/03/2023 17:00:35	NATALINO SALGADO FILHO	Aceito
Declaração do Patrocinador	Financiamento_FAPEMA.pdf	08/03/2023 17:00:16	NATALINO SALGADO FILHO	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	08/03/2023 17:00:10	NATALINO SALGADO FILHO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_anuencia_Patologia_HUUFMA.PDF	08/03/2023 16:59:28	NATALINO SALGADO FILHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_HUUFMA.docx	08/03/2023 16:55:12	NATALINO SALGADO FILHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 03 de Abril de 2023

Assinado por:
Camiliane Azevedo Ferreira
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227 4º andar
Bairro: CENTRO CEP: 65.020-070
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 Fax: (98)2109-1002 E-mail: cep@huufma.br

ANEXO 2

Comprovantes de submissão de artigo

Collapsing Glomerulopathy in Brazil: a Nationwide Descriptive Study

Journal:	<i>Kidney International Reports</i>
Manuscript ID	KIR-02-25-0163
Article Type:	Clinical Research
Date Submitted by the Author:	02-Feb-2025
Complete List of Authors:	Campos, Marcos; Duke University Global Health Institute, Neves, Precil; Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo Cutrim, Érico; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu Sodré, Andressa; HU-UFMA Carvalho, João; HU-UFMA Wanderley, David; Federal University of Minas Gerais; Nephropathology Institute Araujo, Stanley; Instituto de Nefropatologia, Patologia; Universidade Federal de Minas Gerais, Centro de Microscopia Eletronica Borges, Ricardo; USP Onuchic, Luiz; Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Department of Medicine, Division of Nephrology Watanabe, Andreia; Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Pediatrics; Instituto da Criança, Hospital das Clinicas - University of São Paulo Medical School (USP), cDepartment of Pediatrics, Pediatric Nephrology Unit Noronha, Irene; Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Nephrology Silva, Vanessa; UNESP Marques, Igor; Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Nephrology Guedes, Felipe; Federal University of Rio Grande do Norte Almeida, José ; Federal University of Rio Grande do Norte Health Sciences Centre, Department of Integrated Medicine Vasco, Rafael ; Universidade Federal de Alagoas, Nephrology Division Monteiro, Antônio; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Faculdade de Medicina, Nephrology Division Ladchumananandasivam, Francisco Gomes, Orlando; UNIVASF Curso de Medicina, Teixeira Junior, Antonio; USP Ribeirao Preto Israel, Karla Cristina; Universidade Federal do Amazonas, Department of Clinical Medicine (UFAM) - Postgraduate Program in Tropical Medicine FMT/UEA), Costa, Denise; Federal University of Pernambuco, Nephrology Tapioca, Fernanda; Ana Nery Hospital da Luz Neto, Eptácio ; Hospital Ana Nery, Lages, Joyce; HU-UFMA

	Salgado-Filho, Natalino; Universidade Federal do Maranhao
	Barros Silva, Gyl Eanes; USP FMRP, Pathology; HU-UFMA, Pathology
Keywords:	Collapsing Glomerulopathy, Epidemiology, Cohort, Chronic Kidney Disease, Renal Replacement Therapy, Kidney Biopsy
Subject Area:	Glomerular Disease, ESRD and Dialysis, Renal Pathology

Collapsing Glomerulopathy in Brazil: a Nationwide Descriptive Study

Running Headline: Collapsing Glomerulopathy in Brazil

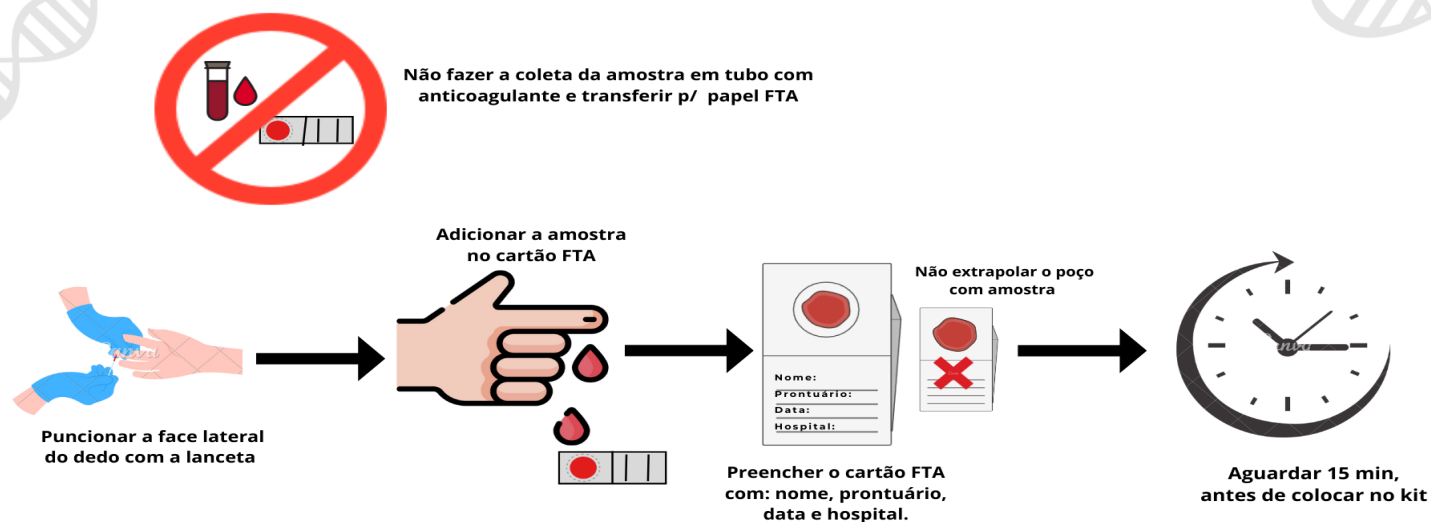
Keywords: Collapsing Glomerulopathy; Epidemiology, Cohort; Chronic Kidney Disease; Renal Replacement Therapy; Kidney Biopsy

Marcos AG Campos¹, MD; Precil DMM Neves², PhD; Érico MMC¹, MD; Andressa M Sodré³, MS; João V Carvalho³, MSc; Davi C Wanderley⁴, MSc; Stanley dA Araújo⁴, MSc; Ricardo M Borges², MD; Luiz F Onuchic², PhD; Andréia Watanabe², PhD; Irene de L Noronha², PhD; Vanessa dS Silva¹, PhD; Igor DB Marques⁵, PhD; Felipe L Guedes⁶, MSc; José Bd Almeida⁶, PhD; Rafael FV Vasco⁷, MSc; Antônio Monteiro⁸, MD; Francisco R Ladchumananandasivam⁹, MD; Orlando V Gomes¹⁰, PhD; Antonio AL Teixeira Júnior¹¹, PhD; Karla CP Israel¹², PhD; Denise MN Costa¹³, PhD; Fernanda PM Tapioca¹⁴, MSc; Eptácio Rafael da Luz Neto¹⁴, PhD; Joyce Santos Lages³; Natalino S Filho³, PhD; Gyl EB Silva^{3,11}, PhD

Author's affiliations: ¹Duke Global Health Institute, Duke University, Durham, United States; ²Nephrology Division, Medical School, University of São Paulo (FM-USP), São Paulo, Brazil; ³Laboratory Immunofluorescence and Electronic Microscopy, University Hospital, Federal University of Maranhão (HU-UFMA), São Luís, Brazil; ⁴Nephropathology Institute, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; ⁵Nephrology Service, University Hospital, Federal University of Piauí (HU-UFPI), Teresina, Brazil; ⁶Nephrology Service, Onofre Lopes University Hospital, Federal University of Rio Grande do Norte (HUOL-UFRN), Natal, Brazil; ⁷Division of Nephrology, University Hospital, Federal University of Alagoas (UFAL); ⁸Division of Nephrology, Maria Aparecida Pedrossian University Hospital, Federal University of Mato Grosso do Sul (HUMAP-UFMS), Campo Grande, Brazil; ⁹Nephrology Service, Lauro Wanderley University Hospital, Federal University of Paraíba (HULW-UFPB), João Pessoa, Brazil; ¹⁰Division of Nephrology, University Hospital, Federal University of Vale do São Francisco (HU-UNIVASF), Petrolina, Brazil; ¹¹Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (PGGEN-FMRP-USP), Ribeirão Preto, Brazil; ¹²Department of Clinical Medicine, Federal University of Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil; ¹³Nephrology Service, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil; ¹⁴Nephrology Service, Ana Nery Hospital, Salvador, Brazil.

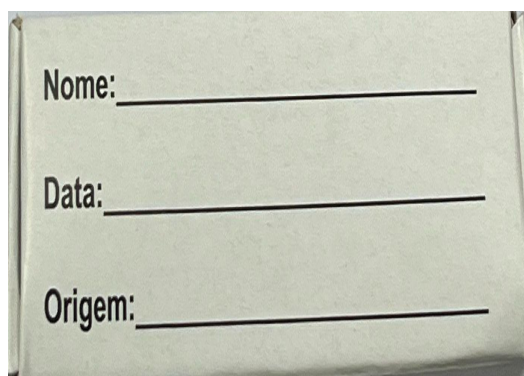
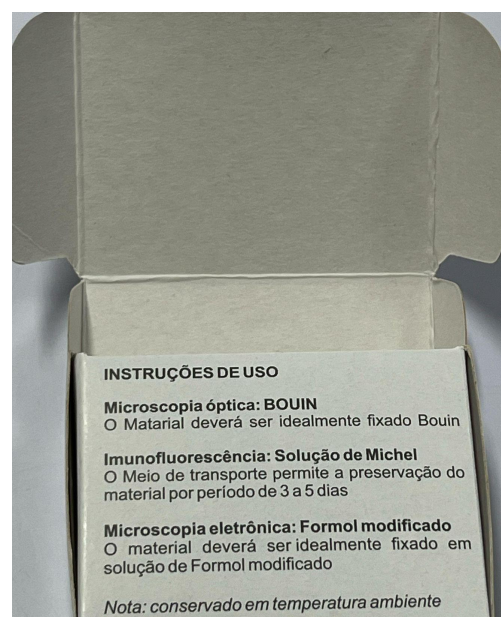
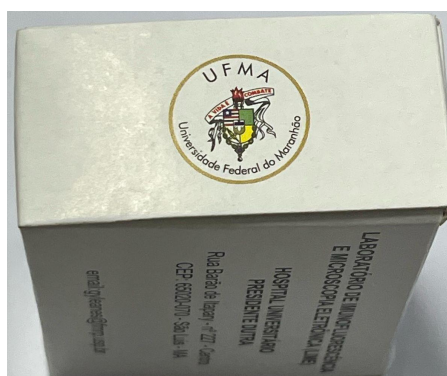
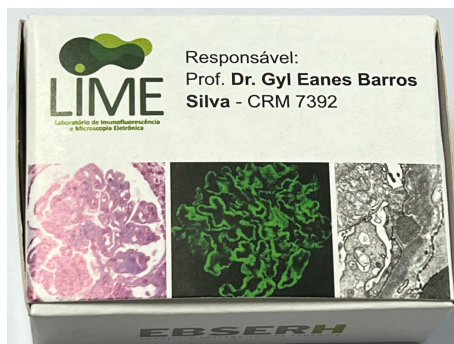
APÊNDICE 1

KIT DE INSTRUÇÃO DE COLETA DE SANGUE EM PAPEL FTA



APÊNDICE 2

Kits de biópsia



APÊNDICE 3

Kit molecular



APÊNDICE 4

Contribuições Acadêmicas



Genética 2024
69^º CBG
International Congress of the Brazilian Genetics Society
20 a 23 | 08 | 2024 ★ Campos do Jordão Convention Center | SP
HONORED: Maria Paula Cruz Schneider

CERTIFICADO

Papéis emergentes do RNA
Emerging roles of RNA

Certificamos que o trabalho intitulado **Establishment of amplicon-based sequencing for identification of high-risk apol1 gene variants in a national reference center in renal pathology.** de autoria de João Victor Carvalho ,; Antonio Augusto Lima Teixeira Júnior ,; Leticia Milene Silva da Silva; Denner Rodrigo Diniz Duarte; Kwang II Marciaga Teófilo; João Pedro Cruz Nascimento; Precil Diego Miranda de Menezes Neves; Bruna Larissa Nolêto Sousa; Andressa Monteiro Sodré; Marcos Adriano Garcia Campos; Rayane Araújo Pessoa; Victor Eduardo Maulen Contreras; Aryadna Lima de Araújo; Arismar Almeida Tavares Junior; Natalino Salgado Filho; Gyl Eanes Barros Silva ,,, foi apresentado na sessão de Pôsteres durante o 69^a Congresso Brasileiro de Genética, evento realizado de 20 à 23 de Agosto 2024, na cidade de Campos do Jordão - SP.


Célia Maria de Almeida Soares
Presidente da SBG

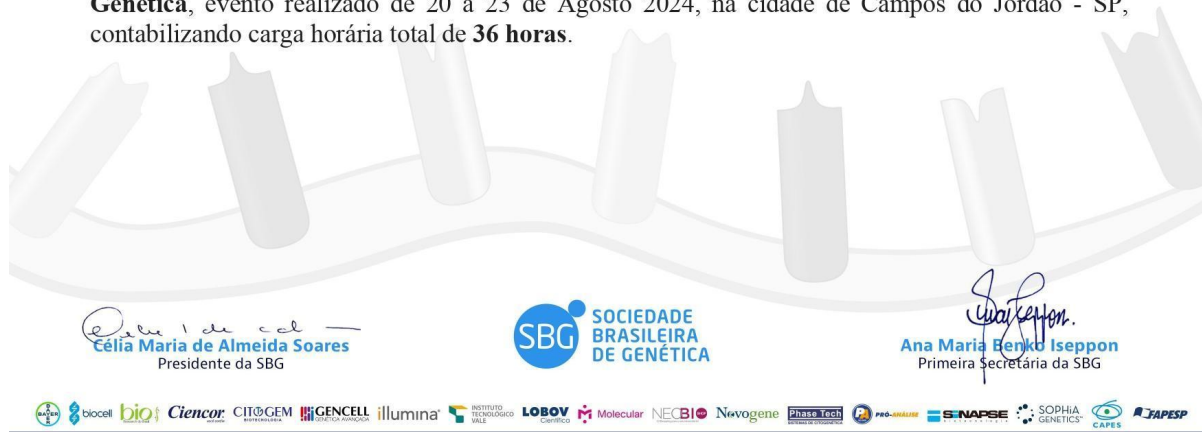
 **SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA**


Ana Maria Benko Iseppon
Primeira Secretária da SBG





Certificamos que **João Victor Carvalho**, participou como **ouvinte** do **69º Congresso Brasileiro de Genética**, evento realizado de 20 à 23 de Agosto 2024, na cidade de Campos do Jordão - SP, contabilizando carga horária total de **36 horas**.



Certificamos que **João Victor Carvalho**, participou com êxito do evento **II Simpósio Nacional em Ciências da Saúde e I Simpósio de Animais de Laboratório e Ciências da Saúde** realizado no Auditório Central da Universidade Federal do Maranhão, na cidade de São Luís - MA, no período de 11 a 13 de dezembro de 2024, contabilizando carga horária total de 24 horas.

São Luís (MA), 13 de dezembro de 2024.

Verifique o código de autenticidade 28296995.0546432.5.8.8219116360907268 em <https://www.even3.com.br/documentos>


 Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
 Presidente do II Simpósio Nacional em
 Ciências da Saúde


 Profa. Dra. Rachel Melo Ribeiro
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Ciências da Saúde


 Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
 Presidente do I Simpósio Nacional em Ciências
 de Animais de Laboratórios e Ciências da Saúde



CERTIFICADO



XXII Congresso Paulista de Nefrologia
Integrando Gerações na Era da Inteligência Artificial
18 A 21 OUT/2023
BOURBON ATIBAIA

CERTIFICAMOS que o trabalho

GLOMERULOPATIA COLAPSANTE NO BRASIL: DADOS DE COORTE RETROSPECTIVA DO "COBRAZ - COLLAPSING GLOMERULOPATHY BRAZILIAN CONSORTIUM"

foi apresentado no **XXII Congresso Paulista de Nefrologia 2023**, realizado no Hotel Bourbon Atibaia - SP, de 18 a 21 de outubro de 2023, na qualidade de Trabalho Científico.

Autores: PRECIL DIEGO MIRANDA MENEZES NEVES, MARCOS ADRIANO GARCIA CAMPOS, ÉRICO MURILO MONTEIRO CUTRIM, STANLEY ALMEIDA ARAÚJO, DAVID CAMPOS WANDERLEY, ANDRESSA MONTEIRO SODRÉ, JOÃO VICTOR CARVALHO, RICARDO MIRANDA BORGES, ANDREIA WATANABE, VANESSA SANTOS SILVA, IGOR DENIZARDE BACELAR MARQUES, FELIPE LEITE GUEDES, JOSÉ BRUNO ALMEIDA, RAFAEL FERNANDES VANDERLEY VASCO, FRANCISCO RASIAH LADCHUMANANANDASIVAM, ORLANDO VIEIRA GOMES, ANTONIO AUGUSTO LIMA TEIXEIRA-JÚNIOR, KARLA CRISTINA PETRUCCELLI ISRAEL, DENISE MARIA DO NASCIMENTO COSTA, NATALINO SALGADO-FILHO, IRENE LOURDES NORONHA, LUIZ FERNANDO ONUCHIC, GYL EANES BARROS SILVA

Instituição: COBRAZ - Collapsing Glomerulopathy BRAZilian Consortium - São Paulo - Brasil

Atibaia, 21 de outubro de 2023.

Daniela Ponce
Presidente do Congresso CPN 2023

Rosa Maria Affonso Moyses
Presidente da Comissão Científica CPN 2023

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.iweventos.com.br> e use o código: 2b931942b2

Realização:



SONESP
Sociedade de Nefrologia do Estado de São Paulo



XXII Congresso Paulista de Nefrologia
Integrando Gerações na Era da Inteligência Artificial

CERTIFICADOS

PREMIADOS MAGALDI

1º lugar:

Predictive Model for Acute Kidney Rejection: A Machine Learning Analysis

Autores: Fábio Moreira Campos, Arthur Cesar dos Santos Minato, Pedro Guilherme Coelho Harman, Abner Maciel Pacheco Barbosa, Naila Camila da Rocha, Juliana Machado-Rugolo, Marília Mastrocchia de Almeida Cardoso e Luis Gustavo Modelli de Andrade

2º lugar

Identificação de potenciais biomarcadores salivares para diagnóstico e monitoramento da doença renal crônica

Autores: Bianca Uliana Picolo, Nathalia Rabello Silva, Luiz Ricardo Goulart Filho (in memoriam), Mário Machado Martins, Hebréia Oliveira Almeida Souza, Leticia Cristina Machado de Sousa, Richard Costa Poveiro, Robinson Sabino da Silva, Vivian Alonso Goulart e Luciana Saraiva da Silva

3º lugar

Glomerulopatia colapsante no Brasil: Coorte retrospectiva

Autores: Precil Diego Miranda de Menezes Neves, Marcos Adriano Garcia Campos, Érico Murilo Monteiro Cutrim, Andressa Monteiro Sodré, João Victor Carvalho, Davi Campos Wanderley, Stanley de Almeida Araújo, Ricardo Miranda Borges, Luiz Fernando Onuchic, Andreia Watanabe, Irene de Lourdes Noronha, Vanessa dos Santos Silva, Igor Denizarde Bacelar Marques, Felipe Leite Guedes, José Bruno de Almeida, Rafael Fernandes Vanderlei Vasco, Francisco Rasiah Ladchumananandasivam, Orlando Vieira Gomes, Antônio Augusto Lima Teixeira Júnior, Karla Cristina Petrucci Israel, Denise Maria do Nascimento Costa, Natalino Salgado Filho e Gyl Eanes Barros Silva