

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO INTRA-RENAL DOS RNA MENSAGEIROS DE PROTEÍNAS  
ASSOCIADAS AO PODÓCITO E DE FATORES PRÓ FIBRÓTICOS EM  
GLOMERULOPATIAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MAYSA LUCENA DE SOUZA**

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EXPRESSÃO INTRA-RENAL DOS RNA MENSAGEIROS DE PROTEÍNAS  
ASSOCIADAS AO PODÓCITO E DE FATORES PRÓ FIBRÓTICOS EM  
GLOMERULOPATIAS PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS**

*Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Medicina, Ciências  
Médicas, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Médicas.*

MAYSA LUCENA DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese

PORTO ALEGRE

2015

Banca Examinadora

Claiton Viegas Brenol

Elvino Guardão Barros

Marcelo Casaccia Bertolucci

Themis Zelmanovitz

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por mais esta conquista, pois a ti, Senhor, devo tudo o que tenho e tudo o que sou. Sem o teu querer sei que nada disso seria possível.

À minha família, especialmente aos meus pais, Rosane e Maurício, pelo amor, carinho e dedicação a mim. Pelo exemplo de honestidade e responsabilidade. E, principalmente, pelo incentivo ao estudo, bem como pelo apoio necessário para a minha formação.

Ao meu orientador, Professor Doutor Francisco Veronese pela orientação, ensinamentos, paciência, confiança e oportunidade dada a mim para realização deste trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular aplicado à Nefrologia (LABMAN), que muito contribuiu para o meu crescimento científico e profissional desde a Iniciação científica durante meu período de faculdade até a realização do curso de Mestrado. Em especial aos meus colegas de laboratório Mariane dos Santos e João Teló Timm, pela paciência e parceria, ensinando as técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Universidade Federal do Rio Grande do Sul que forneceu a estrutura necessária para a realização deste projeto. Aos amigos, funcionários e residentes do Serviço de Nefrologia do HCPA que de uma forma ou outra participaram em partes de alguma etapa do trabalho.

A todos os pacientes que aceitaram participar deste trabalho e assim permitiram a realização desta pesquisa em prol do conhecimento.

## RESUMO

**Introdução:** A podocitopenia e a podocitúria são marcadores de injúria glomerular em podocitopatias (POD) e glomerulonefrites proliferativas (GNsP), e mesmo em fases iniciais destas doenças mecanismos pró-fibróticos indutores de glomerulosclerose e fibrose renal progressiva estão ativados.

**Objetivo:** Avaliar pacientes portadores de glomerulopatias biopsiados em diferentes tempos de evolução clínica, correlacionando lesões morfológicas dos compartimentos glomerular e túbulo-intersticial com a expressão dos RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores pró-fibróticos no tecido renal.

**Materiais e Métodos:** Foram incluídos no estudo oitenta e quatro pacientes adultos portadores de glomerulopatias de diferentes etiologias submetidos à biópsia renal por indicação clínica. As lesões histológicas foram individualizadas e a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular foi quantificada na coloração de Tricrômio de Masson. Foram mensurados no tecido renal o log 10 do RNAm pela reação em cadeia da polimerase em tempo real das proteínas associadas ao podócito alfa actinina-4, podocina e podocalixina e dos fatores pró-fibróticos fator de crescimento transformador  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e fator de crescimento derivado do endotélio A (VEGF-A). A secção livre de neoplasia de rins removidos por câncer renal foram usados como controles da expressão dos RNAm.

**Resultados:** No grupo POD, os diagnósticos histopatológicos foram: Glomerulosclerose segmentar e focal (n=20), GN membranosa (n=12), Nefropatia diabética (n=9) e Lesões mínimas (n=7); no grupo GNsP foram Nefropatia por IgA (n=15), GN membranoproliferativa (n=5), Nefrite lúpica (n=5) e GN proliferativa mesangial (n=4), e outros diagnósticos (n=7). O RNAm do tecido renal nos pacientes com POD e GNsP foi significativamente menor comparado ao dos controles para todos os genes estudados. A presença de crescentes, independente do estágio evolutivo, foi associada à maior expressão do RNAm de alfa actinina-4 (p=0,04), podocina (p=0,01) e podocalixina (p=0,038). O RNAm dos genes pró-fibróticos também estava inibido comparado a sua expressão no rim normal. Nas GNsP, o VEGF-A (p<0,001) e o CTGF (p<0,001) foram os genes com menor nível de expressão comparado aos controles. Em relação às biópsias com lesões crescênticas, tanto o RNAm do TGF $\beta_1$  (p=0,001) como do CTGF (p=0,041) tiveram maior expressão comparado ao RNAm das biópsias sem crescentes. Nas biópsias com fibrose intersticial superior a 30%, a expressão do RNAm de TGF $\beta_1$ , (p=0,038) e do VEGF-A (p=0,040) foi maior do que nas

biópsias com fibrose leve. O maior tempo entre o início da doença clínica e a realização da biópsia renal não teve influência detectável na expressão tecidual do RNAm dos biomarcadores estudados.

Conclusões: Pacientes com podocitopatias ou glomerulonefrites proliferativas apresentaram inibição da expressão do RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores indutores de fibrose renal, achados compatíveis com injúria podocitária e podocitopenia. Nas biópsias renais com maior grau de fibrose intersticial e atrofia tubular, assim também como naquelas com lesões crescênticas, a expressão do RNAm de fatores fibrogênicos como TGF- $\beta_1$  e CTGF foi significativamente aumentada, o que pode sugerir supra-regulação de moléculas associadas a mecanismos de fibrose renal e patologia glomerular.

Palavras-chave: glomerulonefrite, podocitopatia, fibrose renal, fatores pró-fibróticos, podocina, fator de crescimento transformador beta.

## ABSTRACT

**Introduction:** Both podocytopenia and podocyturia are markers of glomerular injury in podocytopathies (POD) and proliferative glomerulonephritis (PGNs), and even in the early stages of these diseases pro-fibrotic mechanisms leading to glomerulosclerosis and progressive renal fibrosis are running.

**Objective:** This study evaluated patients with glomerulopathies who were biopsied at different times of clinical evolution, correlating morphological lesions of the glomerular and tubulointerstitial compartments with renal messenger RNA (mRNA) expression of podocyte-associated proteins and pro-fibrotic factors.

**Materials and Methods:** The study included eighty-four adult patients with glomerulopathies of different etiologies undergoing kidney biopsy as clinically indicated. The histological lesions were individualized and the percentage of interstitial fibrosis and tubular atrophy was quantified on Trichrome Masson staining. Tissue log<sub>10</sub> mRNA of the podocyte proteins alpha-actinin-4, podocin and podocalyxin and of the pro-fibrotic factors transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), connective tissue growth factor (CTGF) and vascular endothelium growth factor A (VEGF-A) was measured by real time polymerase chain reaction. The sections free of neoplasia of kidneys removed for renal cancer were used as controls for the mRNA tissue expression.

**Results:** Results: In the POD group, the histopathological diagnoses were: focal segmental glomerulosclerosis (n=20), membranous (n=12), diabetic nephropathy (n=9) and minimal changes (n=7); in PGNs group were IgA nephropathy (n=15), membranoproliferative (n=5), lupus nephritis (n=5) and mesangial proliferative (n=4), and other diagnoses (n=7). Messenger RNA expression of POD and PGNs groups was significantly lower compared to controls for all the studied genes. The presence of crescents, regardless of their evolutive stage, was associated with higher mRNA expression of alpha-actinin-4 (p=0.04), podocin (p=0.01) and podocalyxin (p=0.038). The mRNA of pro-fibrotic genes was also inhibited compared to their expression in normal kidneys. In PGNs, VEGF-A (p<0.001) and CTGF (p<0.001) were the genes with lowest mRNA levels compared to controls. Regarding the biopsies with crescentic lesions, both the mRNA of TGF $\beta_1$  (p=0.001) and CTGF (p=0.041) were highly expressed as compared to those of biopsies without crescents. In biopsies with moderate to severe interstitial fibrosis (more than 30%), the mRNA expression of TGF $\beta_1$  (p=0.038) and VEGF-A (p=0.040) was highly expressed compared to biopsies with mild fibrosis. A longer interval between the clinical disease and the performance of kidney biopsy

did not have a detectable influence on tissue mRNA expression of the studied biomarkers.

Conclusions: Patients with POD or PGNs presented inhibition of the mRNA expression of podocyte-associated proteins and pro-fibrotic factors, findings that are consistent with podocyte injury and podocytopenia. In renal biopsies with a higher degree of interstitial fibrosis and tubular atrophy, as well as those with crescentic lesions, the mRNA expression of fibrogenic factors such as TGF- $\beta$ 1 and CTGF was significantly increased, which may suggest upregulation of molecules associated with mechanisms of renal fibrosis and glomerular pathology.

Keywords: glomerulonephritis, podocytopathy, renal fibrosis, pro-fibrotic factors, podocin, transforming growth factor  $\beta$ .

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura do podócito e principais proteínas associadas. 19

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

**Figura 1.** Expressão do RNAm das proteínas associadas ao podócito nos grupos controle podocitopatias e glomerulopatias proliferativas. 59

**Figura 2.** Expressão do RNAm dos fatores pró-fibróticos nos grupos controle podocitopatias e glomerulopatias proliferativas. 60

**Figura 3.** Expressão do RNA mensageiro das proteínas associadas ao podócito e dos fatores pró-fibróticos conforme a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular na biópsia renal. 61

**Figura 4.** Expressão do RNA mensageiro das proteínas associadas ao podócito e dos fatores pró-fibróticos conforme a porcentagem de glomérulos globalmente esclerosados na biópsia renal. 62

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Dados demográficos e clínicos dos pacientes estudados.	54
<b>Tabela 2.</b> Diagnósticos histopatológicos das biópsias renais.	55
<b>Tabela 3.</b> Achados histopatológicos das biópsias renais.	56
<b>Tabela 4.</b> Expressão do RNA mensageiro das proteínas do podócito e dos marcadores de fibrose de acordo com a presença ou não de crescentes na biópsia renal.	57
<b>Tabela 5.</b> Associação entre nível de expressão maior (positiva) ou menor (negativa) do RNAm dos fatores pró-fibróticos e a extensão da fibrose renal/atrofia tubular na biópsia renal.	58

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA - DNA complementar  
CD2AP - CD2 Associated Protein  
CKD-EPI - *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*  
CT - *threshold cycle*  
CTGF - *Connective Tissue Growth Factor*  
DP - Desvio padrão  
DRC - Doença renal crônica  
FIAT - Fibrose intersticial e atrofia tubular  
GESF - Glomeruloesclerose segmentar e focal  
GP - Glomerulopatia  
GNM - Glomerulonefrite membranosa  
GNMP - Glomerulonefrite membranoproliferativa  
HDL - High density lipoprotein  
HE - Hematoxilina e eosina  
IF - Imunofluorescência  
IPC - Índice proteinúria/creatinina em amostra isolada de urina  
LDL - Low density lipoprotein  
LM - Lesões mínimas  
MBG - Membrana basal glomerular  
MEC - Matriz extracelular  
MGB - *Minor groove binder*  
MO - Microscopia óptica  
ND - Nefropatia diabética  
NIgA - Nefropatia por IgA  
NL - Nefrite lúpica  
NEPH1 - Gene que codifica a proteína NEPH1  
NPHS1 - Gene que codifica a proteína nefrina  
NPHS2 - Gene que codifica a proteína podocina  
PAF-1 - Ativador de plasminogênio  
PCR-RT - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

PDGF - Fator derivado de plaquetas  
PIGF - Fator de crescimento de placenta  
PAS - Coloração ácido periódico de Shiff  
PAS-M - Coloração prata metenamina  
RAAS - Sistema renina angiotensina aldosterona  
RNAm - RNA mensageiro  
ROS - Espécies reativas de oxigênio  
TM - Coloração tricrômico de Masson  
TFG - Taxa de filtração glomerular  
TFGe - Taxa de filtração glomerular estimada  
TGF $\beta$  - *Transforming growth factor beta*  
TSP-1 - Trombospondina-1  
TRPC6 - *Transient receptor potential cation channel6*  
TSR - Terapia de substituição renal  
VEGF - *Vascular endothelial growth factor*

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1. Doença glomerular .....	17
2.2. A célula epitelial podocitária e as podocitopatias.....	17
2.3. Fatores de crescimento, fator derivado do endotélio e a fibrose renal .....	20
2.3.1. Fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ).....	20
2.3.2. Efeito do TGF- $\beta$ na patologia glomerular .....	21
2.3.3. Fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF) .....	22
2.3.4. Efeitos do CTGF na patologia glomerular.....	22
2.3.5. Fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF).....	23
2.3.6. Efeitos do VEGF na patologia glomerular.....	23
2.4. Resumo sobre doença glomerular e mecanismos pró-fibróticos .....	24
2.5. Estratégia para localizar e selecionar informações.....	24
3. JUSTIFICATIVA .....	25
4. OBJETIVOS .....	26
4.1. Objetivo Geral .....	26
4.2. Objetivos Específicos.....	26
5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	27
6. ARTIGO .....	35
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
8. PERSPECTIVAS .....	65
9. ANEXOS .....	66

## 1. INTRODUÇÃO

Os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano e a diminuição progressiva da função renal implica no comprometimento das funções metabólicas, excretora e de regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, além de afetar outros órgãos e sistemas. A função renal é mensurada pela taxa de filtração glomerular (TFG), e o desenvolvimento de dano crônico intra-renal estabelece um processo de perda progressiva de função renal que culmina na doença renal crônica (DRC), com manifestações clínicas e laboratoriais em geral tardias (1). O marcador mais acurado e precoce de dano renal continua sendo a albuminúria, que expressa a ruptura da barreira que o filtro glomerular impõe à passagem de macromoléculas para o espaço urinário (2).

O filtro glomerular, composto pelo endotélio fenestrado, membrana basal glomerular (MBG) e pelas células epiteliais denominadas podócitos, é o principal sítio de lesão que resulta no aumento da excreção urinária de proteínas (3). Particularmente, as células podocitárias têm sido foco de intensa investigação, pois esse segmento da barreira glomerular é crítico para o desenvolvimento da proteinúria (4-6) e pode ter importantes implicações diagnósticas e terapêuticas (7). O dano funcional e estrutural do podócito têm sido demonstrado em diferentes tipos de glomerulopatias (GPs), tanto primárias, como em lesões mínimas (LM), glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF), glomerulonefrite membranosa (GNM), nefropatia por IgA (NIgA) (8-10), como também nas formas secundárias, a exemplo da nefrite lúpica (NL) (11,12), nefropatia diabética (ND) (13,14), glomerulopatia associada a obesidade (15) e nefropatia hipertensiva (16), entre outras.

A biópsia renal constitui um método acurado para o diagnóstico, prognóstico e indicação de tratamento em diversos tipos de doenças renais, permitindo a detecção de danos nos compartimentos glomerular, túbulo-intersticial e vascular, em geral de forma associada, mas com diferentes intensidades (11,17). Em nível glomerular, o exame anátomo-patológico permite visualizar algumas alterações podocitárias, mas é na ultra-estrutura, definida pela microscopia eletrônica de transmissão, que se identifica a fusão, alargamento e menor densidade dos podócitos, alterações morfológicas que resultam de diferentes agressões ao glomérulo. No tecido renal, denomina-se podocitopenia a redução do número e densidade dos podócitos no filtro glomerular, cujos mecanismos fisiopatogênicos foram propostos inicialmente por Kritz et al (4) e posteriormente aprofundados por outros grupos (3,5,6,18-20).

O podócito apresenta uma multiplicidade de proteínas dispostas em um arranjo arquitetônico em diferentes domínios. Paralelo a podocitopenia tecidual, o descolamento dos podócitos da MBG no espaço urinário de Bowman, tanto viáveis como em apoptose, desencadeiam a podocitúria, permitindo que técnicas não invasivas possam identificar de forma indireta a injúria podocitária que ocorre no tecido renal, como demonstrado em diversos estudos em humanos e em modelos animais (21-27). A quantificação dos RNA mensageiros (RNAm) dos subprodutos do podócito no tecido renal e na urina em indivíduos saudáveis e em pacientes com doença renal tem sido uma ferramenta importante para o entendimento da expressão normal e anormal que reflete diferentes fases da doença glomerular primária e secundária (28).

Mecanismos de progressão para dano crônico intra-renal são ativados nas glomerulonefrites (GNs) não diagnosticadas e não tratadas precocemente (4,29). Lesões glomerulares como glomeruloesclerose segmentar e global, fibrose intersticial e atrofia tubular se estabelecem, e manifestam-se clinicamente por perda progressiva da função renal, DRC estabelecida e necessidade de terapia de substituição renal (TSR) no futuro (30). A glomeruloesclerose global frequentemente está presente na maioria das nefropatias crônicas, e caracteriza-se inicialmente pela formação de sinéquias de segmentos dos tufo capilares que aderem à Cápsula de Bowman, e depois pela esclerose glomerular inicialmente segmentar e focal, com acúmulo e expansão da matriz mesangial (4,5).

Fatores pró-fibróticos participam ativamente deste processo. O fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma citocina pró-fibrótica e antiinflamatória que regula a produção de matriz extracelular (MEC), pois sua ativação resulta na secreção de angiotensina II, potente hormônio vasoconstrictor (31), do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de outros fatores vasoativos, que resultam em isquemia, secreção de fibroblastos e deposição de colágeno, produzindo acúmulo da matriz mesangial e inibição das metaloproteinases que reabsorvem a MEC (21,32-34).

Pode-se dizer que os mecanismos de fibrose renal ainda não são totalmente claros, apesar de intensamente estudados. Estudos recentes têm demonstrado o valor preditivo dos RNAm urinários específicos do podócito para progressão da doença renal, sendo mais específicos que a variação da proteinúria para prever a sobrevida renal em diversos tipos de GPs (23,35). Entretanto, a mensuração intra-renal dos RNAm do podócito e principalmente dos fatores de crescimento associados a fibrose renal em diferentes fases da evolução da doença glomerular, e especificamente a sua correlação com o grau de

podocitúria, proteinúria, variação da função tem sido pouco investigada. Neste contexto, desenvolvemos este estudo transversal para avaliar a associação entre marcadores histológicos de lesão glomerular, como glomeruloesclerose global, sinéquias e expansão de matriz mesangial, e de lesão tubulo-intersticial, como porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular, com o RNAm de proteínas específicas do podócito e de fatores pró-fibróticos em diferentes tipos de doença glomerular, diagnosticada com diferentes tempos de evolução clínica.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Doença glomerular**

As doenças glomerulares podem ser divididas em primárias, quando não há uma doença sistêmica associada, ou secundárias, quando outra doença afeta os rins, como diabetes mellitus, doenças autoimunes e infecções virais, entre outras. As GNs são patologias que acometem os glomérulos de diferentes formas, mas possuem em comum a lesão do filtro glomerular e das três camadas que o compõe. Nas GNs o compartimento túbulo-intersticial também está afetado, assim como a vasculatura intra-renal, comprometendo artérias e arteríolas (16,36). São doenças com etiopatogenias variadas, algumas de natureza aguda, em geral inflamatórias e proliferativas, e outras subagudas ou de curso mais crônico, mais frequentemente associadas à síndrome nefrótica idiopática sem elementos inflamatórios (29).

Em ordem decrescente, a prevalência do tipo histológico das glomerulopatias primárias no adulto é: GESF, GNM, NIgA, LM e glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP). Do ponto de vista clínico, a GESF, a LM e GNM manifestam-se mais frequentemente por síndrome nefrótica (edema, proteinúria acima de 3 g/24 horas e hipoalbuminemia), a NIgA por alterações urinárias assintomáticas como hematúria e proteinúria não nefrótica, e a GNMP por síndrome nefrótica e/ou síndrome nefrítica, muitas vezes acompanhada de insuficiência renal aguda (37).

Nas GPs em geral, a lesão inicial ao filtro capilar glomerular parece ter mecanismos comuns de injúria às células epiteliais podocitárias e a seus prolongamentos, os pedicelos. Após a injúria, os podócitos se descolam MBG provocando o seu desnudamento e a adesão do tufo capilar à cápsula de Bowman, produzindo sinéquias que irão se estender no glomérulo e progredir para glomeruloesclerose progressiva (5,36). A estrutura e função dos podócitos serão abordadas a seguir.

### **2.2. A célula epitelial podocitária e as podocitopatias**

Os podócitos são células epiteliais altamente diferenciadas e especializadas, sem capacidade proliferativa. Possuem prolongamentos primários e secundários, denominados pedicelos, os quais cobrem a superfície externa da membrana basal glomerular. Kerjaschki (38) descreveu o podócito como uma estrutura com quatro diferentes domínios, baseado na anatomia molecular de cada segmento: diafragma em fenda, domínio da membrana luminal, domínio basal e citoesqueleto.

Um conjunto de proteínas associadas ao podócito, representadas na figura 1, desempenha múltiplas e diferentes funções como: a) manutenção da integridade de barreira (tamanho e carga) às proteínas e outras macromoléculas; b) manutenção da forma da alça capilar glomerular; c) manter oposição à pressão gerada dentro do glomérulo; d) síntese e manutenção da membrana basal glomerular; e) produção e secreção do VEGF necessário para a integridade da célula endotelial do capilar glomerular (2,3,5,6,39).

Embriologicamente os podócitos derivam das células mesenquimais. O corpo celular do podócito maduro situa-se no espaço urinário no lado luminal e seus pedicelos estão situados no lado oposto, ancorados à MBG por  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e  $\alpha$ - $\beta$ -dístroglicanos que pertencem ao domínio basal do podócito (40). Os pedicelos estão conectados entre si através de uma estrutura especializada de junção célula-célula, denominada diafragma em fenda. O diafragma em fenda situa-se entre dois podócitos adjacentes, e atualmente considera-se ser um segmento importante para barreira de filtração de proteínas (41,42).

Este primeiro domínio, o diafragma em fenda, é composto por proteínas como a nefrina, a podocina, NEPH-1, CD2AP e zona occludens-1, entre outras. A nefrina é o produto do gene NPHS1 que participa das funções do citoesqueleto do podócito, interagindo com a actina, através de proteínas adaptadoras Nck, e com a proteína NEPH-1, formando cis-oligômeros heterogêneos (43-45). A podocina é codificada pelo gene NPHS2 que está associada ao componente lipídico e apresenta forma de “grampo de cabelo”, esta proteína interage com a nefrina e com a CD2AP, resultando em uma relação com filamentos de actina, facilitando a sinalização da nefrina e a estabilização estrutural do diafragma em fenda (10,44).

No domínio de membrana luminal situam-se as sialoproteínas podocalixina, podoplanina e o *Transient Receptor Potential Cation Channel Member 6* (TRPC6), cuja função principal é manter a separação física dos podócitos adjacentes. São moléculas sinalizadoras, ao mesmo tempo em que mantêm a arquitetura do podócito e a integridade do filtro glomerular (25,46).

No domínio basal é que ocorre o ancoramento do podócito na MBG, através das  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e dos  $\alpha$ - $\beta$ -dístroglicanos. Essas proteínas ligam-se a diversos componentes da membrana, como colágeno IV, fibronectina, laminina e endactina, assim como às proteínas do citoesqueleto do podócito, como a alfa actinina-4 e a sinaptopodina, o que permite que as alterações da pressão intra-capilar glomerular causem adaptação através de mudança de forma e movimento do podócito (15,47).

No domínio citoesqueleto os principais componentes moleculares são a F-actina, sinaptopodina, alfa actinina-4 e podoplanina. Rico em microfilamentos de F-actina e miosina, o citoesqueleto é constituído por três elementos ultraestruturais: microfilamentos (7-9nm), filamentos intermediários (10nm) e microtúbulos (24nm). A sinaptopodina interage diretamente com a alfa actinina-4, modulando a sua expressão e promovendo o alongamento dos filamentos de actina, assim modificando a forma do podócito e produzindo achatamento ou simplificação dessas células (32,48-50).

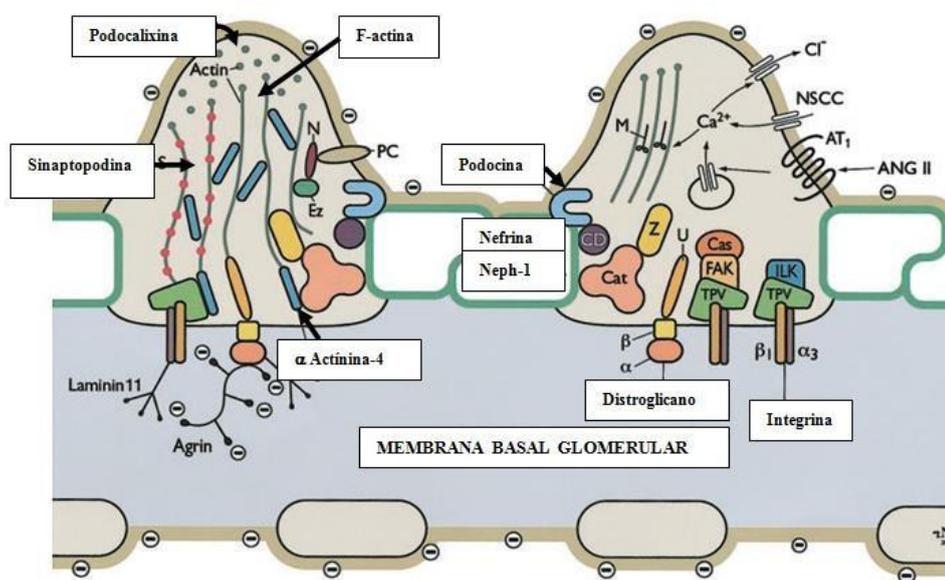


Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas dos diferentes domínios. Adaptado de Barisoni et al (3).

A análise da expressão gênica das moléculas associadas ao podócito tem contribuído para o entendimento da patogênese da proteinúria. Parâmetros clínicos, laboratoriais e histológicos muitas vezes não distinguem os diferentes tipos de GNs, e tem se investigado o valor diagnóstico e prognóstico destas moléculas em estudos clínicos e experimentais (18,19,22,23,35). A análise molecular das proteínas associadas ao podócito no tecido renal tem sido o método de referencia para determinar lesão podocitária (18,29,51), e mais recentemente a identificação de podocitúria e a quantificação do RNAm das proteínas do podócito em células do sedimento urinário em diferentes nefropatias (22,52-55) tem sido uma ferramenta não invasiva útil para determinar atividade e progressão de doenças glomerulares (19,23,35).

A fisiopatologia das podocitopatias varia conforme o tipo de injúria que ocorre em nível glomerular. Ainda é controverso como estes mecanismos se desenvolvem nas diferentes GPs proteinúricas, cuja etiopatogenia envolve fusão podocitária, fatores de permeabilidade glomerular circulantes, deposição de imuno-complexos, estresse oxidativo, ação de proteases e/ou inflamação (29). Entretanto, o mecanismo comum que se segue à injúria podocitária é o descolamento da MBG e a excreção de podócitos na urina, viáveis ou em apoptose (56). Diferenças na expressão intra-renal e urinária do RNAm de moléculas do podócito tem sido descritas em GPs não inflamatórias, como GESF, LM e GNM (7,22,36,57). Poucos estudos avaliaram a expressão destas moléculas simultaneamente nos dois compartimentos, tecido e urina, apresentando resultados heterogêneos (51,58). Na NL ativa foi descrito redução da expressão dos podócitos glomerulares e aumento da podocitúria (59), o que não foi observado na doença inativa. Na ND, o RNAm intra-renal das proteínas do podócito correlacionou-se com redução do número de podócitos glomerulares, função renal e aumento da fibrose túbulo-intersticial, mas estes parâmetros não se correlacionaram com a expressão o RNAm na urina (58).

Entretanto, a quantificação da podocitopenia intra-renal através da expressão dos RNAm associados ao podócito em diferentes fases de evolução das glomerulonefrites, e especificamente a sua associação com parâmetros histológicos de dano crônico (ex., glomeruloesclerose e grau de fibrose renal) e com fatores pró-fibróticos, ainda tem sido pouco investigada.

### **2.3. Fatores de crescimento, fator derivado do endotélio e a fibrose renal**

#### **2.3.1. Fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ )**

O TGF- $\beta$  é um fator de crescimento secretado por uma ampla variedade de tecidos, sendo encontrado principalmente como formas homodímeras de distintos produtos dos genes TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ou TGF- $\beta$ 3. O TGF- $\beta$  desempenha um papel no desenvolvimento embrionário, na diferenciação celular, na secreção de hormônios e na função imunológica. Nas células mesangiais, é liberado dentro de um complexo latente, o qual é estocado na MEC para promover a estabilidade de sua atividade molecular e também como fonte de ativação dos componentes da matriz (60).

Esta ativação do TGF- $\beta$  mediada por plasmina nas células mesangiais, no entanto, pode ser neutralizada por um sistema de feedback negativo, desde que TGF- $\beta$  ativo induza a produção do inibidor-1 do ativador de plasminogênio (PAF-1) que diminui a formação de

plasmina ativa nas células mesangiais (61). Entre as moléculas conhecidas como ativadoras do TGF- $\beta$  latente citam-se a plasmina, o trombospondina-1 (TSP-1), espécies reativas de oxigênio (ROS) e as integrinas  $\alpha v\beta 6$  e  $\alpha v\beta 8$  (62-64).

Além das células mesangiais, o TGF- $\beta$  latente também pode ser ativado pelas células epiteliais podocitárias. Esta ativação talvez seja mediada pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), pois o RAAS induz estresse oxidativo e assim injúria podocitária, como demonstrado em estudos experimentais (65-67). O uso do antioxidante metalotionina induziu recuperação funcional dos podócitos em modelo experimental, sugerindo que o dano oxidativo ao podócito é etiopatogenicamente importante ND (68). Em geral, a lesão podocitária mediada pelo RAAS parece induzir a produção de ROS, as quais podem ativar o TGF- $\beta$  latente localizado em sua superfície pela ativação de enzimas proteolíticas, o que foi demonstrado na DRC (69).

### **2.3.2. Efeito do TGF- $\beta$ na patologia glomerular**

O TGF- $\beta$  está supra-regulado na doença podocitária, o que resulta do aumento da pressão de cadeias biomecânicas sobre o podócito. O TGF- $\beta$  atua no tecido renal por diversos mecanismos, como depósito mesangial de proteínas e espessamento da MBG, inibição da degradação das proteínas da matriz (metaloproteinases), apoptose do podócito e indução da transição epitélio-mesenquimal podocitária. Adicionalmente, o TGF- $\beta$  induz a secreção de CTGF e do VEGF pelos podócitos, os quais têm efeito parácrino necessário para o acúmulo de matriz mesangial. Estas alterações, em conjunto, resultam no desenvolvimento de fibrose renal progressiva (69,70). Ao contrário das células mesangiais, os podócitos não expressam TGF- $\beta$  em resposta a um estímulo metabólico comum, o que sugere que estas células respondam ao efeito do TGF- $\beta$  produzido pela célula mesangial (71).

Ainda em modelos experimentais, verificou-se que a super-expressão de TGF- $\beta$  em camundongos transgênicos produz expansão mesangial, glomeruloesclerose, fibrose intersticial e insuficiência renal (72), que é atenuada pela administração de anticorpo monoclonal anti-TGF- $\beta$  em GN proliferativa experimental (73). Além disso, foi constatado que as células mesangiais secretam TGF- $\beta$  em resposta a estímulos fibrogênicos em modelo *in vitro* que resulta, principalmente, na produção de proteínas de MEC em doença glomerular crônica (74).

Apesar disso, a marcação imunohistoquímica de TGF- $\beta$  no mesângio é frequentemente negativa na doença glomerular crônica em humanos, sugerindo que os complexos de TGF- $\beta$  latente secretados pelas células mesangiais podem ser estocados na matriz mesangial e assim não ser detectáveis por técnicas de imunopatologia. Em contraste com as células mesangiais, os podócitos presentes em segmentos escleróticos do glomérulo exibem expressão elevada do RNAm de TGF- $\beta$  e de sua proteína, como demonstrado em pacientes com NIgA e GESF (75,76).

### **2.3.3. Fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF)**

O CTGF é o mais importante fator de crescimento autócrino induzido por TGF- $\beta$ . Faz parte da família CCN de proteínas de matriz celular. Entre as proteínas CCN, apenas a CCN2 (CTGF) tem propriedades pró-fibróticas, agindo em conjunto com o TGF- $\beta$ 1 (77). A ação do CTGF é promover adesão celular através da indução de integrinas e proteoglicanos na superfície celular, facilitando a interação com a MEC. Além disso, sabe-se que o CTGF é induzido durante a reparação tecidual, pois a modificação experimental do citoesqueleto de F-actina é um estímulo potente para induzir a expressão de CTGF (78,79).

### **2.3.4. Efeitos do CTGF na patologia glomerular**

Durante a injúria podocitária, ocorre secreção ativa de CTGF para reparação das alterações estruturais das fibras de actina no citoesqueleto. A persistência da injúria acarreta danos estruturais e funcionais à célula epitelial, mantendo uma expressão elevada de CTGF, que por sua vez leva ao acúmulo progressivo de MEC e inicia o processo de glomerulosclerose (80). O CTGF é então um marcador de fibrose renal em diversos tipos de nefropatias crônicas, incluindo as GPs, e também em outras doenças crônicas não renais (81-85).

A indução de CTGF por TGF- $\beta$  em podócitos se restringe às linhagens de células mesenquimais (86). Um estudo com modelo *in vitro* demonstrou que a exposição do podócito ao CTGF recombinante modifica o citoesqueleto de actina e induz a fosforilação da quinase, produzindo adesão focal e sinalização extracelular para a produção de fibroblastos, fibronectina e colágeno tipo I, III e IV (87).

Na doença glomerular crônica o CTGF parece ter um efeito parácrino sobre a sua expressão em células mesangiais. Em pacientes com NIgA, NL e outras GNs proliferativas observa-se positividade imunohistoquímica para CTGF no mesângio, cuja intensidade

depende da progressão da lesão mesangial (85). A expansão da matriz mesangial é produzida, em sequência, pela via de sinalização do TGF- $\beta$ /Smad em podócitos e indução de CTGF, cujos efeitos parácrinos em células mesangiais criam uma alça de retroalimentação positiva, estimulando a expressão de mais CTGF. Nas células mesangiais, o CTGF induz a expressão do receptor da  $\alpha 5\beta 1$ -integrina ao qual se liga a fibronectina, a qual se polimeriza em uma matriz fibrilar. Esta matriz promove mais deposição de fibronectina e de colágeno, resultando na acumulação da matriz mesangial, deposição de colágeno e fibrose renal progressiva (88).

### **2.3.5. Fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF)**

O VEGF se expressa em glomérulos normais, particularmente no podócito e nas células endoteliais. Pertence a superfamília do fator derivado de plaquetas (PDGF), e é composta por cinco membros: VEGF (também chamado de VEGF-A), fator de crescimento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Essas proteínas ligam-se a receptores específicos, na sequência VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGF é uma glicoproteína dimérica quase que exclusivamente expressa por podócitos em desenvolvimento e em glomérulos maduros, e tem um papel essencial na formação e manutenção do funcionamento da barreira do filtro glomerular (89). A isoforma mais abundante de VEGF expressa no rim é a VEGF165, a qual sinaliza predominantemente para o receptor VEGFR-2 (39).

O VEGF é um mediador de vários tipos de neovascularização e do aumento da permeabilidade vascular, além de proteger a célula endotelial de apoptose em vasos neoformados. Em modelos experimentais, o VEGF acelera a regeneração renal na microangiopatia trombótica, e na insuficiência renal crônica a excreção urinária de VEGF aumenta em proporção indireta com a queda da filtração glomerular (90,91). O VEGF estimula a expressão do receptor VEGF-1 e VEGF-2 em células mesangiais, e desta ligação resulta a síntese de fibronectina e colágeno, os quais constituem a base estrutural da fibrose renal identificadas por técnicas de imunopatologia (92).

### **2.3.6. Efeitos do VEGF na patologia glomerular**

O VEGF expresso nos podócitos exerce uma regulação parácrina sobre as células endoteliais adjacentes e sobre as células mesangiais. Além disso, possui uma regulação autócrina em podócitos (39). Assim como o CTGF, o VEGF é induzido por TGF- $\beta$  e possui um importante papel no desenvolvimento da fibrose glomerular.

Um estudo experimental em ratos diabéticos avaliando a expressão renal de VEGF mostrou aumento desta expressão em podócitos, o que foi associado ao espessamento da MBG e à expansão mesangial (91). Quando ocorre perda progressiva de podócitos como nas doenças glomerulares crônicas, a expressão de VEGF reduz significativamente, o que foi demonstrado em pacientes com GNM primária (92).

#### **2.4. Resumo sobre doença glomerular e mecanismos pró-fibróticos**

O TGF- $\beta$  é o fator regulador chave da MEC, mediando o desenvolvimento de acúmulo da matriz mesangial e glomeruloesclerose. As células mesangiais secretam TGF- $\beta$  em resposta a estímulos fibrogênicos. Mesmo que a marcação imunohistoquímica seja frequentemente negativa para TGF- $\beta$ , a sua expressão e ativação por podócitos agredidos por diversos insultos (ex.: hemodinâmicos, autoimunes, metabólicos ou tóxicos) já está bem demonstrada em estudos que utilizaram análise molecular para quantificação do RNA do TGF- $\beta$  em biópsias renais. A sinalização da via TGF- $\beta$ /Smad pelos podócitos induz a expressão tanto de CTGF quanto de VEGF. O CTGF parece ter efeitos parácrinos sobre as células mesangiais para estimular a sua própria expressão, estimulando a secreção de fibronectina via ligação com  $\alpha 5\beta 1$ -integrina expressa na superfície das células mesangiais. A hiper-expressão de VEGF-A também parece ter uma ação parácrina sobre as células mesangiais que supra-regulam os receptores de VEGF, produzindo aumento da MEC. Assim, o CTGF e o VEGF contribuem para o acúmulo da matriz mesangial em doenças glomerulares crônicas, culminando no desenvolvimento de glomeruloesclerose. Em revisão recente, Lee (70) sugere que em conjunto, esses mecanismos são críticos para a formação de MEC, deposição de colágeno, glomeruloesclerose e fibrose renal progressiva.

#### **2.5. Estratégia para localizar e selecionar informações**

Esta revisão da literatura focou nos aspectos relacionados às proteínas associadas ao podócito e aos fatores pró-fibróticos com base na sua participação na etiopatogênese das GPs primárias e secundárias e no desenvolvimento de fibrose renal e DRC. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SciELO, LiLaCs, no período de 1990 a 2015. Foram realizadas buscas através dos termos “Glomerular disease”, “Glomerulonephritis”, “Podocytopathy”, “Chronic Kidney Disease”, “Kidney Fibrosis”, “Podocin”, “Podocalyxin”, “Alpha actinin-4”, “Connective Tissue Growth Factor”, “Transforming growth factor beta”, “Vascular endothelial growth factor”.

### 3. JUSTIFICATIVA

As doenças glomerulares constituem a terceira causa de doença renal crônica terminal no Brasil e no mundo, tendo um grande impacto nos elevados custos derivados da diálise e do transplante renal.

Na última década, o papel crítico do podócito na etiopatogenese da proteinúria foi bem estabelecido e diversos estudos têm mostrado que a camada epitelial do filtro glomerular é determinante para a retenção de proteínas de maior peso molecular e contribui significativamente para o processo de filtração. Evidências apontam que a redução da expressão do RNAm das proteínas do podócito no tecido renal – podocitopenia - é uma evidência de dano glomerular, tanto nas podocitopatias primárias quanto nas lesões proliferativas e inflamatórias, comuns nas doenças sistêmicas com envolvimento renal. O tempo de evolução clínica até a biópsia renal, quando a glomerulopatia é definida histologicamente, pode ter associação com uma redução progressiva da transcrição gênica e intensificação da podocitopenia, pois os mecanismos de injúria glomerular muitas vezes se mantêm independente do tratamento anti-proteinúrico e/ou imunossupressor instituído. Adicionalmente, após a indução de remissão pode ocorrer recidiva da doença, com um novo surto nefrótico ou nefrítico. Neste contexto, os fatores de crescimento *transforming growth factor  $\beta$* , *connective tissue growth factor* and *vascular endothelial growth factor* tem sido associados ao desenvolvimento de fibrose renal progressiva e doença renal crônica, afetando um grande número de indivíduos portadores de diferentes nefropatias crônicas.

A associação entre parâmetros histológicos de dano crônico, como glomeruloesclerose segmentar ou global, sinéquias, grau de fibrose renal túbulo-intersticial e crescentes fibrocelulares ou fibrosas, e a expressão do RNAm tecidual de proteínas associadas ao podócito e de fatores pró-fibróticos tem sido pouco investigada. Este estudo tem como objetivo mensurar, em pacientes com glomerulopatias cujo diagnóstico histológico ocorreu em diferentes tempos de evolução da doença, a expressão molecular intra-renal de proteínas do podócito e de fatores pró-fibróticos, e avaliar a sua associação com o tipo de glomerulopatia e parâmetros histológicos de dano tecidual.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo Geral

Avaliar a associação entre a expressão intra-renal do RNA mensageiro de proteínas associadas ao podócito e de fatores pró-fibróticos em biópsias renais de pacientes com glomerulopatias primárias e secundárias e parâmetros histológicos de dano tecidual e de fibrose renal.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão intra-renal do RNAm da podocina (diafragma em fenda), alfa actinina-4 (citoesqueleto) e podocalixina (membrana luminal) em pacientes portadores de glomerulopatias cujo diagnóstico histológico inicial ocorreu em diferentes tempos de evolução da doença.
- Quantificar a expressão intra-renal do RNAm dos fatores indutores de fibrose renal *transforming growth factor  $\beta$* , *connective tissue growth factor* and *vascular endothelial growth factor* em pacientes portadores de glomerulopatias cujo diagnóstico histológico inicial ocorreu em diferentes tempos de evolução da doença.
- Comparar a expressão do RNAm dos biomarcadores de injúria tecidual em biópsias renais de pacientes com podocitopatias primárias, glomerulonefrites proliferativas e rim histologicamente normal.
- Avaliar a associação entre a expressão gênica dos biomarcadores do podócito e dos fatores pró-fibróticos com parâmetros histológicos de dano glomerular e com a porcentagem de fibrose renal da biópsia inicial do paciente.

## 5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Thomé FS, Manfro RC, Barros EJG, Prompt CA, Karohl C. Insuficiência Renal Crônica. In: Barros E MR, Thomé FS, Gonçalves LFS, ed. Nefrologia, Rotinas, Diagnóstico e Tratamento. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 2006:423-440.
2. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: 579-596.
3. Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Disease. *Am J Nephrol* 2003; 23(5): 353-360.
4. Kritz W. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech* 2002; 15: 189-195.
5. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role of proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69: 2131-2147.
6. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 271-82.
7. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the Biology and Genetics of the Podocytopathies Implications for Diagnosis and Therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 201-16.
8. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* 2006; 11:274-81.
9. Wagner N, Morrison H, Pagnotta S, Michiels J-F, Schwab Y, Tryggvason K, et al. The podocyte protein nephrin is required for cardiac vessel formation. *Hum Mol Gen* 2011; 20: 2182-94.
10. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002; 160: 131-9.
11. Fraser IR, Fairley KF. Renal biopsy as an outpatient procedure. *Am J kidney Dis* 1995; 25: 876-8.
12. Dos Santos M, Bringhenti RN, Rodrigues PG, Do Nascimento JF, Pereira SV, Zancan R, et al. Podocyte-associated mRNA in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 4600-4613.
13. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990; 111: 1255-63.

14. Do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. *BMC Nephrol* 2013; 14: 214-224.
15. Pereira SV, dos Santos M, Rodrigues PG, do Nascimento JF, Timm JT, Zancan R, et al. Increased Urine Podocyte-Associated Messenger RNAs in Severe Obesity Are Evidence of Podocyte Injury. *Obesity* 2015; 23: 1643-1649.
16. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1448-56.
17. Korbert SM, Percutaneous renal biopsy. *Semin Nephrol* 2002; 22: 254-7.
18. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, et al: Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 2958-2966.
19. Yu D, Peterman A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1733-1741.
20. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002; 1475-1485.
21. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2013; 3: 1-150.
22. Szeto C-C, Lai K-B, Chow K-M, Wharram B, Wiggling J, Holzman L, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chem Acta* 2005; 361: 182-190.
23. Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine Podocyte mRNAs, Proteinuria, and Progression in Human Glomerular Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 2081-2095.
24. Skoberne A, Konieczny A, Schiffer M. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile? *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F230-41.
25. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 2001; 108:289-301
26. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects

- disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2:231-8.
27. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 2000; 15: 1379-83.
  28. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am j Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-8
  29. William G. Couser. Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 381–399.
  30. Bastos MG, Kirsztajn GM. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. *J Bras Nefrol* 2011; 33(1): 93-108.
  31. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Sato Y, Chowdhury MA, Wang SQ, et al. Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney Int* 2012; 81: 40-55.
  32. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-6.
  33. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000; 57: 147-58.
  34. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 271-81.
  35. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine Podocyte mRNAs Mark Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1041-1052.
  36. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 2007; 71: 1205-14.
  37. Veronese FV, Morales DD, Barros EJG, Morales JV. Síndrome Nefrótica Primária em Adultos. *Rev HCPA* 2010; 30: 131-139.
  38. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular basis of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-87.

39. Ferrara N, Gerber HP, and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
40. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83 (1): 253-307.
41. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S, et al. Nephrin stands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 2004; 114: 1475-1483
42. Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459-66.
43. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 2006; 440: 818-23.
44. Schwarz K, Simons MS, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1621-9
45. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to nephrin. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4829-36.
46. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, *et al.* Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 29–36.
47. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei cas A, Thomas SM, Viberti G, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha-3-beta1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2645-55.
48. Kato T, Mizuno S, Nakamura T. Preservations of nephrin and synaptopodin by recombinant hepatocyte growth factor in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. *Nephrology* 2011; 16: 310-8.
49. Cin H, Lee TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 2003; 111: 1683-90.
50. Kimura M, Toyoda M, Kato M, Kobayashi K, Abe M, Kobayashi T, et al. expression of Alpha-actinin-4 in Human Diabetic Nephropathy. *Int Med* 2008; 47: 1099-106.
51. Rodrigues PG, Bringhenti RN, do Nascimento JP, Joelsons G, dos Santos M, Pereira S, Veronese FV. Expression patterns of podocyte-associated mRNAs in patients with

- proliferative or non-proliferative glomerulopathies. *Int J Clin Exp Pathol* 2014.
52. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Pérez V, Ara J, Espinal A, López D, et al. Messenger RNA expression of B7-1 and NPHS1 in urinary sediment could be useful to differentiate between minimal-change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adult patients. *Nephrol Dial Transpl* 2011; 26: 3914-23.
  53. Wang G, Lai FM-M, Tam L-S, Li K-M, Lai K-B, Chow K-M, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007; 34: 2358-64.
  54. Zheng M, Lv L-L, Ni J, Ni H-F, Li Q, Ma K-L, et al. Urinary Podocyte-Associated mRNA profile in Various Stages of Diabetic Nephropathy. *Plos One* 2011 31; 6.
  55. Wang G, Lai FM, Kwan BC, Lai KB, Chow KM, Li PK, et al. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens* 2009; 22: 300-6.
  56. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007; 106: c61-6.
  57. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, et al. Nephric redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723-31.
  58. Wang G, Lai FM, Lai K-B, Chow K-M, Kwan BC, Li K-T, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for estimation of glomerular filtration loss. *Ren Fail* 2010; 32: 372-379.
  59. Bollain-y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011; 21: 166-171.
  60. Lawrence DA. Latent TGF- $\beta$ : An overview. *Mol. Cell Biochem* 2001; 219: 163-170.
  61. Baricos WH, Reed JC and Cortez SL. Extracellular matrix degradation by cultured mesangial cells: mediators and modulators. *Exp Biol Med* 2003; 228: 1018-1022.
  62. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- $\beta$ 1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-1170.
  63. Barcellos-Hoff MH, and Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- $\beta$ 1. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1077-1083.

64. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin  $\alpha v\beta 6$  binds and activates latent TGF $\beta 1$ : a mechanism for regulating lung inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96: 319-328.
65. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T and Fujita T. Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 2006; 47: 1084-1093.
66. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, and Fujita T. Podocyte as the target for aldosterone. Roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* 2007; 49: 355-364.
67. Whaley-Connell AT, Chowdhury NA, Hayden MR, Stump CS, Habibi J, Wiedmeyer CE, et al. Oxidative stress and glomerular filtration barrier injury: role of the renin-angiotensin system in the Ren2 transgenic rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 291: F1308-F1314.
68. Zheng S, Carlson EC, Yang L, Kralik PM, Huang Y, and Epstein PN. Podocyte-specific overexpression of the antioxidant metallothionein reduces diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 2077-2085.
69. Lee HS and Song CY. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF- $\beta$ -induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histol Histopathol* 2009; 24: 901-908.
70. Lee HS. Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol* 2011; 26: 107-116.
71. Wolf G, Chen S, and Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626-1634.
72. Koop JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Boettinger EP, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF- $\beta 1$  develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996; 74: 991-1003.
73. Yu L, Border WA, Anderson L, McCourt M, Huang Y, and Noble NA. Combining TGF- $\beta$  inhibition and angiotensin II blockade results in enhanced anti-fibrotic effect. *Kidney Int* 2004; 66: 1774-1784.
74. Lee HS and Song CY. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis. *Am J. Nephrol* 2009; 29: 62-70.
75. Kim HW, Moon KC, Park SY, Hong HK and Lee HS. Differential expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta$  in relation to progression of IgA nephropathy. *Nephrology* 2002; 7: S131-S139.

76. Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, and Lee HS. Activation of the TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003; 64: 1715-1721.
77. Gortendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- $\beta$  action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8: 171-179.
78. Heusinger-Ribeiro J, Eberlin M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1853-1861.
79. Muehlich S, Cicha I, Garlich CD, Krueger B, Posern G, Goppelt-Struebe M. Actin-dependent regulation of connective tissue growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: 11732-1738.
80. Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck LF, Baumann M, Junglas B, Tamm ER. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem Cell Biol* 2011; 136: 301-319.
81. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, et al. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 280-284.
82. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149-154.
83. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53: 853-861.
84. Yoki H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F933-F942.
85. Ito Y, Goldschmeding, Kasuga H, Claessen N, Nakayama M, Yuzawa Y, et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and TGF- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: 545-558.

86. Kantarci A, Black SA, Xydas CE, Murawel P, Uchida Y, Yucekal-Tuncer B, et al. Epithelial and connective tissue cell CTGF/CCN2 expression in gingival fibrosis. *J Pathol* 2006; 210: 59-66.
87. Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck LF, Baumann M, Junglas B, and Tamm ER. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem Cell Biol* 2011; 136: 301-319.
88. Lee HS. Paracrine role for TGF- $\beta$ -induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1131-1141.
89. Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression. Lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111: 707-716.
90. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomika K. Glomerular endothelial cell are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 43-54.
91. Sung SH, Ziyadeh FN, Wang A, Pyagay PE, Kanwar YS, and Chen S. Blockade of vascular of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3093-3104.
92. Honkanen E, Von Willebrand E, Koskinen P, Teppo AM, Tomroth T, Ruutu M, et al. Decreased expression of vascular endothelial growth factor in idiopathic membranous glomerulonephritis: relationships to clinical course. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 1139-1148.

## 6. ARTIGO

### *Expressão dos RNAm associados ao podócito e de fatores pró-fibróticos em pacientes com glomerulopatias primárias e secundárias*

*Expression of the podocyte-associated mRNAs and pro-fibrotic factors in patients with primary and secondary glomerulopathies*

---

Maysa Lucena de Souza<sup>1</sup>, Mariane dos Santos<sup>1</sup>, João Rodolfo Teló Timm<sup>1</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>2</sup>Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

**Autor para correspondência:** Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Serviço de Nefrologia, sala 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, CEP 90035-003, RS, Brasil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.edu.br

**Título resumido:** Análise dos RNAm do podócito em glomerulopatias

Fontes de financiamento: Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por concessão de bolsa de pós-graduação à Maysa Lucena de Souza.

## RESUMO

**Introdução:** A podocitopenia e a podocitúria são marcadores de injúria glomerular em podocitopatias (POD) e glomerulonefrites proliferativas (GNsP), e mesmo em fases iniciais destas doenças mecanismos pró-fibróticos indutores de glomeruloesclerose e fibrose renal progressiva estão ativados.

**Objetivo:** Avaliar pacientes portadores de glomerulopatias biopsiados em diferentes tempos de evolução clínica, correlacionando lesões morfológicas dos compartimentos glomerular e túbulo-intersticial com a expressão dos RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores pró-fibróticos no tecido renal.

**Materiais e Métodos:** Foram incluídos no estudo oitenta e quatro pacientes adultos portadores de glomerulopatias de diferentes etiologias submetidos à biópsia renal por indicação clínica. As lesões histológicas foram individualizadas e a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular foi quantificada na coloração de Tricrômio de Masson. Foram mensurados no tecido por renal o log 10 do RNA mensageiro (RNAm) pela reação em cadeia da polimerase em tempo real das proteínas associadas ao podócito alfa actinina-4, podocina e podocalixina e dos fatores pró-fibróticos fator de crescimento transformador  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e fator de crescimento derivado do endotélio A (VEGF-A). A secção livre de neoplasia de rins removidos por câncer renal foram usados como controles da expressão dos RNAm.

**Resultados:** No grupo POD, os diagnósticos histopatológicos foram: Glomeruloesclerose segmentar e focal (n=20), GN membranosa (n=12), Nefropatia diabética (n=9) e Lesões mínimas (n=7); no grupo GNsP foram Nefropatia por IgA (n=15), GN membranoproliferativa (n=5), Nefrite lúpica (n=5) e GN proliferativa mesangial (n=4), e outros diagnósticos (n=7). O RNAm do tecido renal nos pacientes com POD e GNsP foi significativamente menor comparado ao dos controles para todos os genes estudados. A presença de crescentes, independente do estágio evolutivo, foi associada à maior expressão do RNAm de alfa actinina-4 (p=0,04), podocina (p=0,01) e podocalixina (p=0,038). O RNAm dos genes pró-fibróticos também estava inibido comparado a sua expressão no rim normal. Nas GNsP, o VEGF-A (p<0,001) e o CTGF (p<0,001) foram os genes com menor nível de expressão comparado aos controles. Em relação à biópsias com lesões crescênticas, tanto o RNAm do TGF $\beta_1$  (p=0,001) como do CTGF (p=0,041) tiveram maior expressão comparado ao RNAm das biópsias sem crescentes. Nas biópsias com fibrose intersticial superior a 30%, a expressão do RNAm de TGF $\beta_1$ , (p=0,038) e do VEGF-A (p=0,040) foi

maior do que nas biópsias com fibrose leve. O maior tempo entre o início da doença clínica e a realização da biópsia renal não teve influência detectável na expressão tecidual do RNAm dos biomarcadores estudados.

Conclusões: Pacientes com podocitopatias ou glomerulonefrites proliferativas apresentaram inibição da expressão do RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores indutores de fibrose renal, achados compatíveis com injúria podocitária e podocitopenia. Nas biópsias renais com maior grau de fibrose intersticial e atrofia tubular, assim também como naquelas com lesões crescênticas, a expressão do RNAm de fatores fibrogênicos como TGF- $\beta_1$  e CTGF foi significativamente aumentada, o que pode sugerir supra-regulação de moléculas associadas a mecanismos de fibrose renal e patologia glomerular.

Palavras-chave: glomerulonefrite, podocitopatia, fibrose renal, fatores pró-fibróticos, podocina, fator de crescimento transformador beta.

## ABSTRACT

**Introduction:** Both podocytopenia and podocyturia are markers of glomerular injury in podocytopathies (POD) and proliferative glomerulonephritis (PGNs), and even in the early stages of these diseases pro-fibrotic mechanisms leading to glomerulosclerosis and progressive renal fibrosis are running.

**Objective:** This study evaluated patients with glomerulopathies who were biopsied at different times of clinical evolution, correlating morphological lesions of the glomerular and tubulointerstitial compartments with renal messenger RNA (mRNA) expression of podocyte-associated proteins and pro-fibrotic factors.

**Materials and Methods:** The study included eighty-four adult patients with glomerulopathies of different etiologies undergoing kidney biopsy as clinically indicated. The histological lesions were individualized and the percentage of interstitial fibrosis and tubular atrophy was quantified on Trichrome Masson staining. Tissue log<sub>10</sub> mRNA of the podocyte proteins alpha-actinin-4, podocin and podocalyxin and of the pro-fibrotic factors transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), connective tissue growth factor (CTGF) and vascular endothelium growth factor A (VEGF-A) was measured by real time polymerase chain reaction. The sections free of neoplasia of kidneys removed for renal cancer were used as controls for the mRNA tissue expression.

**Results:** Results: In the POD group, the histopathological diagnoses were: focal segmental glomerulosclerosis (n=20), membranous (n=12), diabetic nephropathy (n=9) and minimal changes (n=7); in PGNs group were IgA nephropathy (n=15), membranoproliferative (n=5), lupus nephritis (n=5) and mesangial proliferative (n=4), and other diagnoses (n=7). Messenger RNA expression of POD and PGNs groups was significantly lower compared to controls for all the studied genes. The presence of crescents, regardless of their evolutive stage, was associated with higher mRNA expression of alpha-actinin-4 (p=0.04), podocin (p=0.01) and podocalyxin (p=0.038). The mRNA of pro-fibrotic genes was also inhibited compared to their expression in normal kidneys. In PGNs, VEGF-A (p<0.001) and CTGF (p<0.001) were the genes with lowest mRNA levels compared to controls. Regarding the biopsies with crescentic lesions, both the mRNA of TGF $\beta_1$  (p=0.001) and CTGF (p=0.041) were highly expressed as compared to those of biopsies without crescents. In biopsies with moderate to severe interstitial fibrosis (more than 30%), the mRNA expression of TGF $\beta_1$  (p=0.038) and VEGF-A (p=0.040) was highly expressed compared to biopsies with mild fibrosis. A longer interval between the clinical disease and the performance of kidney biopsy did not have a detectable influence on tissue mRNA

expression of the studied biomarkers.

Conclusions: Patients with POD or PGNs presented inhibition of the mRNA expression of podocyte-associated proteins and pro-fibrotic factors, findings that are consistent with podocyte injury and podocitopenia. In renal biopsies with a higher degree of interstitial fibrosis and tubular atrophy, as well as those with crescentic lesions, the mRNA expression of fibrogenic factors such as TGF- $\beta$ 1 and CTGF was significantly increased, which may suggest upregulation of molecules associated with mechanisms of renal fibrosis and glomerular pathology.

Keywords: glomerulonephritis, podocytopathy, renal fibrosis, pro-fibrotic factors, podocin, transforming growth factor  $\beta$ .

## Introdução

As doenças glomerulares constituem a terceira causa de doença renal crônica terminal com ingresso em diálise no Brasil (1) e na América do Norte (2). A glomeruloesclerose e a fibrose intra-renal são a expressão histológica de dano crônico decorrentes de diferentes mecanismos etiopatogênicos, comuns em diversas nefropatias crônicas. Na fase inicial da injúria renal, a proteinúria é o biomarcador de dano tecidual mais utilizado na clínica, associando-se a desfechos renais adversos (3,4). Ainda não é totalmente claro como estes mecanismos se desenvolvem nas glomerulopatias proteinúricas, mas fatores circulantes e hemodinâmicos intra-glomerulares, deposição de imuno-complexos, inflamação, distúrbios metabólicos e isquemia renal estão envolvidos (5-7).

A célula podocitária que compõe a barreira glomerular tem sido alvo de intensa investigação nas últimas duas décadas. A análise molecular das proteínas dos diferentes domínios do podócito, como nefrina, podocina, podocalixina e alfa actinina-4 tem contribuído para o entendimento da patogênese da proteinúria, uma vez que parâmetros clínicos, laboratoriais e histológicos muitas vezes não distinguem os diferentes tipos de glomerulonefrites (GNs) (8,9). A redução da expressão do RNA mensageiro (RNAm) das proteínas do podócito no tecido renal (10,11) e o aumento do seu RNAm urinário (12-14) são evidências indiretas de injúria podocitária, indicando atividade de doença (15), mas também evolução para dano crônico progressivo (16). Entretanto, a intensidade da lesão inicial, o estágio da doença, a atividade imunológica e o tratamento imunossupressor podem ser determinantes de maior ou menor grau de lesão e suas sequelas.

A podocitopenia intra-renal e podocitúria são marcadores de injúria glomerular recente, tanto em glomerulopatias (GPs) primárias (10,17,18) como nas formas secundárias (10,19,20). Contudo, já na fase aguda da doença glomerular ocorre supra-regulação no podócito de fatores pró-fibróticos como o fator de crescimento transformador  $\beta_1$  (TGF $\beta_1$ ), o qual induz expansão de matriz extracelular (MEC), espessamento da membrana basal glomerular (MBG), apoptose e transição epitélio-mesenquimal dos podócitos, mecanismos que culminam em glomeruloesclerose e fibrose túbulo-intersticial (21). A ativação da sinalização da via do TGF $\beta$ /Smad induz supra-regulação do fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e do fator de crescimento derivado do endotélio (VEGF). Ambos atuam por mecanismo parácrino sobre as células mesangiais, estimulando a síntese de proteínas da MEC e mais tardiamente induzindo glomeruloesclerose e fibrose renal progressiva (22,23).

A injúria podocitária aguda e a ativação de mecanismos pró-fibróticos intra-renais são eventos patológicos sequenciais que refletem diferentes fases de evolução das GNs.

Postula-se que a quantificação do RNAm de moléculas do podócito e de marcadores de fibrose renal na biópsia realizada em fase inicial ou mais tardia da doença glomerular possa refletir diferentes eventos intra-renais. Neste estudo avaliamos pacientes portadores de GPs biopsiados em diferentes tempos de evolução clínica, correlacionando lesões morfológicas dos compartimentos glomerular e túbulo-intersticial com a expressão dos RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores pró-fibróticos no tecido renal.

## **Materiais e Métodos**

### *Delineamento*

Estudo transversal, com enfoque fisiopatológico.

### *Pacientes*

Foram incluídos no estudo oitenta e quatro pacientes adultos portadores de GNs de diferentes etiologias submetidos à biópsia renal por indicação clínica no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de março de 2012 à junho de 2015. Os pacientes apresentavam GNs primárias ou secundárias e foram estratificados de acordo com o diagnóstico histológico em: GNs não proliferativas, correspondendo às podocitopatias (n=49), GN proliferativas (n=29), e outros diagnósticos (GPO, n=6). O material para análise histológica e molecular foi derivado da primeira biópsia do paciente, indicada por seu médico assistente.

Para o grupo controle foram incluídos 12 pacientes submetidos à nefrectomia por tumor renal localizado, e que não apresentavam evidência de outra doença renal ou qualquer doença sistêmica, utilizando-se somente o tecido livre de neoplasia. Este estudo está em conformidade com a Declaração de Helsinki de 1975, e todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram avaliados os seguintes dados demográficos e clínicos coletados do prontuário eletrônico: idade, sexo, raça, nível de pressão arterial sistólica e diastólica, tempo entre o início das manifestações clínicas da GP e a realização da biópsia renal em meses, creatinina sérica, albumina sérica, colesterol total, HDL e LDL, triglicerídeos, proteinúria derivada do índice proteinúria/creatininúria (IPC) em amostra aleatória de urina, e taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) pela equação do CKD-EPI. Considerou-se como manifestações clínicas de GP a presença de edema, proteinúria não nefrótica, síndrome nefrótica, hematuria e cilindros celulares no exame qualitativo de urina, síndrome nefrítica, e injúria renal aguda ou doença renal crônica (DRC) atribuíveis à doença glomerular.

### *Biópsia renal*

A biópsia renal foi realizada mediante orientação por ultrassonografia, com pistola automatizada (Pro Magnum™), agulha 16G, submetido à rotina de processamento para microscopia óptica (MO) e imunofluorescência (IF). Foram obtidos dois fragmentos, e um quarto do segundo fragmento foi congelada a  $-80^{\circ}$  C para as análises moleculares. As lâminas foram submetidas a colorações de hematoxilina e eosina, ácido periódico de Schiff, prata metenamina e tricrômio de Masson. O diagnóstico histopatológico foi por nefropatologista na rotina de atendimento assistencial. Foram determinados na biópsia: número total de glomérulos na amostra, número total de glomérulos globalmente esclerosados, hiper celularidade endocapilar, mesangial ou extracapilar, presença de crescentes (celulares, fibrocelulares ou fibrosas), espessamento da cápsula de Bowman, ruptura do membrana basal glomerular e/ou da cápsula de Bowman, espessamento da MBG, expansão de matriz mesangial, infiltrado inflamatório intersticial, fibrose da camada íntima dos vasos, hipertrofia da camada muscular dos vasos e porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular (FIAT) semi-quantificada somente em córtex renal na coloração tricrômio de Masson. Considerou-se o ponto de corte de 30% para separar fibrose leve de fibrose moderada a severa, com base na estratificação convencional de fibrose leve (<25%), moderada (25-50%) e severa (>50%) (24). Em relação ao tecido renal dos controles, para ser considerado um tecido normal, os glomérulos deviam ter normocelularidade, capilares e MBG normais, matriz e celularidade mesangial normais, ter segmento tubular e intersticial normais, ausência de alterações vasculares e não haver evidência de tumor no fragmento examinado.

### *Quantificação da expressão gênica no tecido renal*

A quantificação do RNAm das proteínas do podócito e de fatores pró-fibróticos foi realizada no tecido renal pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT). Foram quantificados os genes da podocina (diafragma em fenda), alfa actinina-4 (citoesqueleto) e da podocalixina (membrana apical). Como fatores indutores de fibrose renal foram quantificado o RNAm de TGF- $\beta_1$ , CTGF e VEGF.

### *Extração do RNA mensageiro e transcrição do DNA complementar*

Para a extração do material foi utilizado QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O tecido renal foi triturado, macerado e processado para a extração do RNA. A urina foi centrifugada a 1800

rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em solução salina tamponada, e centrifugado por 10 minutos e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado. A quantificação do RNA total foi feita com Nano'Drop<sup>®</sup> 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a pureza do RNA foi determinada como razão de absorbâncias em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 260/280 nm. A transcrição reversa do RNA total foi feita utilizando-se o cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, a um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *PCR em tempo real*

A PCR-RT foi realizada usando o Taqman Universal PCR Master Mix, composto pelo AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase, Amperase UNG, referência passiva (ROX), tampão e dNTP's (Applied Bioystems, Foster City, CA, USA) e primers específicos para a amplificação do RNAm dos seguintes genes (todos provenientes da Applied Bioystems, Foster City, CA, USA): CTGF (ID: Hs00170014\_m1); TGF $\beta_1$  (ID: HS00998133\_m1), VEGF-A (ID:HS00173626\_m1); NPSH2, podocina (ID: Hs00387817\_m1); alfa actinina-4 (ID:Hs00245168\_m1) e podocalixina (ID:Hs01574644\_m1), de acordo com as instruções do fabricante. O controle endógeno utilizado foi o 18s rRNA (Taqman<sup>®</sup> PDAR) para normalização das amostras. As sondas FAM (6-carboxyfluorescein) e VIC Taqman *minor groove binder* (MGB) foram utilizadas como *reporters* e conjugadas com as terminações 5' para detecção dos produtos de amplificação. A quantidade de fluorescência de FAM ou VIC em cada reação liberada pela degradação da exonuclease durante a amplificação da PCR foi medida como função do ciclo de PCR-RT usando o ABI PRISM 7000 (Applied Bioystems, Foster City, CA, USA).

A PCR-RT foi realizada em duplicata em placas com 96 poços com 2 $\mu\text{L}$  de cDNA. As condições térmicas dos ciclos foram  $50^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos,  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos seguido por  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, e 40 ciclos usando temperaturas de  $94^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos e  $62^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos. Os dados foram coletados no termociclador ABI PRISM 7000 SDS (Applied Bioystems). A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi realizada usando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde o valor do CT (*threshold cycle*) é definido pelo ponto onde ocorre um aumento estatisticamente significativo da fluorescência.

### *Análise estatística*

Os dados são apresentados como análise descritiva, média  $\pm$  desvio padrão (DP), ou mediana e percentis (P25-P75). A normalidade das variáveis foi estabelecida pelo teste de Shapiro Wilk. A associação entre variáveis categóricas foi medida pelo teste do Qui-quadrado e Exato de Fisher. Os valores do RNAm foram logaritmizados para redução da assimetria. A comparação de variáveis contínuas foi feita pelo Teste t independente, ANOVA ou Kruskal Wallis, quando apropriado. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para a análise de correlações entre a expressão dos RNAm no tecido renal com os parâmetros histopatológicos por compartimento e com o grau de fibrose renal. Todas as análises foram realizadas pelo software SPSS for Windows (versão 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL). O nível de significância foi estabelecido como P menor que 0,05.

## **Resultados**

### *Características clínicas e achados da histopatologia renal*

As características demográficas e clínicas da amostra estudada estão apresentadas na tabela 1. Os pacientes tinham em média 46 anos, em sua maioria mulheres (58%) e da raça branca (89%), com uma TFGe média de 59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> mas com ampla variação (12 a 148 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>), envolvendo pacientes com função renal normal até aqueles com uma perda funcional grave. A mediana do tempo entre o início das manifestações clínicas e a realização da biópsia renal foi 4 (2-18) meses.

No grupo podocitopatias, os diagnósticos histopatológicos foram: Glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF, n=20), GN membranosa (GNM, n=12), Nefropatia diabética (ND, n=9) e Lesões mínimas (LM, n=7); no grupo GNs proliferativas foram Nefropatia por IgA (NIgA, n=15), GN membranoproliferativa (GNMP, n=5), Nefrite lúpica (NL, n=5) e GN proliferativa mesangial (GNPM, n=4); os diagnósticos do grupo GPO (n=7) são apresentados na tabela 2.

A frequência das alterações morfológicas dos compartimentos glomerular, túbulo-intersticial e vascular é mostrada na tabela 3. A mediana da porcentagem de glomeruloesclerose global foi 13 (0-30), sendo que em 30% dos casos havia esclerose global em mais de 30% dos glomérulos. As alterações mesangiais foram prevalentes: expansão da matriz (58%) e hiper celularidade (44%), seguidas de espessamento da MBG (43%) e sinéquias (41%). FIAT com extensão superior a 30% do compartimento túbulo-intersticial ocorreu em 31% das biópsias.

### *Expressão do RNAm das proteínas associadas ao podócito no tecido renal*

O RNAm do tecido renal nos pacientes com podocitopatias e GNs proliferativas foi significativamente menor comparado ao dos controles para todos os genes estudados, como mostra a figura 1. Apesar de não atingir significância estatística, o nível de expressão do RNAm nas GNs proliferativas foi sistematicamente menor quando comparado às podocitopatias. A presença de crescentes, independente do estágio evolutivo, foi associada à maior expressão do RNAm de alfa actinina-4 ( $p=0,04$ ), podocina ( $p=0,01$ ) e podocalixina ( $p=0,038$ ), como mostra a tabela 4. Houve também associação entre a presença de hipertrofia da camada muscular dos vasos e aumento de expressão de podocalixina no tecido renal ( $p=0,018$ ). Quanto aos demais parâmetros morfológicos da biópsia não foram detectadas associações com o RNAm tecidual dos genes estudados. Também não houve correlação da expressão gênica com a proteinúria ou a taxa de filtração glomerular.

A extensão da fibrose renal não se correlacionou com o RNAm de alfa actinina-4 e podocalixina, mas houve correlação com o RNAm da podocina ( $p=0,046$ ). Nos pacientes com porcentagem de FIAT superior a 30% do compartimento túbulo-intersticial, a expressão de podocina foi significativamente maior do que naqueles com menos de 30% de fibrose e atrofia (figura 3A). Entretanto, a porcentagem de glomeruloesclerose global superior a 30% não se correlacionou com nenhum dos genes estudados ( $p>0,05$ ), e embora a alfa actinina-4 tenha tido a menor expressão no tecido renal, a diferença não foi estatisticamente significativa.

### *Expressão do RNAm dos fatores pró-fibróticos no tecido renal*

A diferença de expressão do RNAm de  $TGF\beta_1$ , VEGF e CTGF no tecido renal comparando pacientes com podocitopatias ou GNs proliferativas com os controles foi ainda mais acentuada que das moléculas do podócito, conforme mostra a figura 2. O RNAm dos genes de fibrose nos pacientes com GPs estava inibido comparado a sua expressão no rim normal. Nas GNs proliferativas, o VEGF-A ( $p<0,001$ ) e o CTGF ( $p<0,001$ ) foram os genes com menor nível de expressão comparado aos controles. Em relação a biópsias com lesões crescênticas, tanto o RNAm do  $TGF\beta_1$  ( $p=0,001$ ) como do CTGF ( $p=0,041$ ) tiveram maior expressão comparado ao RNAm das biópsias sem crescentes (tabela 4). Houve associação entre hipertrofia da camada muscular dos vasos e aumento de expressão de  $TGF\beta_1$  ( $p=0,003$ ), VEGF-A ( $p=0,026$ ) e CTGF ( $p=0,024$ ) no tecido renal. Os demais parâmetros morfológicos da biópsia não tiveram associação com o RNAm tecidual destes genes. A

proteinúria e a taxa de filtração glomerular não se correlacionaram com a magnitude do RNAm dos genes expressos no tecido.

Houve associação entre extensão da fibrose renal e expressão do RNAm do TGF $\beta_1$ , VEGF-A e CTGF (tabela 5). A proporção de pacientes com maior magnitude de expressão (valores de RNAm positivos) de TGF $\beta_1$ , VEGF-A e CTGF e área de fibrose superior a 30% foi significativamente maior em relação àqueles com menos de 30% de fibrose na biópsia ( $p=0,016$ ,  $p=0,040$  e  $p=0,036$ , respectivamente). Da mesma forma, quando a porcentagem de FIAT era superior a 30% do compartimento túbulo-intersticial, observou-se uma expressão do log 10 do RNAm de TGF $\beta_1$ , ( $p=0,038$ ) e do VEGF-A ( $p=0,040$ ) significativamente maior do que nos pacientes com menos de 30% de fibrose e atrofia na biópsia (figura 3B). Entretanto, a porcentagem de glomerulosclerose global superior a 30% não se correlacionou com nenhum dos fatores pró-fibróticos ( $p>0,05$ ), que apresentaram uma distribuição aleatória dos log10 do RNAm, conforme ilustrado na figura 4B.

#### *Influência do tempo de doença na expressão do RNAm dos biomarcadores*

O tempo entre o início das manifestações clínicas e a biópsia renal foi dividido em três períodos:  $\leq 3$  meses ( $n=31$ ), 3 a 12 meses ( $n=25$ ) e  $> 12$  meses ( $n=21$ ). A média da TFGe nestes períodos foi  $64\pm 38$ ,  $61\pm 37$  e  $56\pm 32$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, respectivamente ( $p=0,041$ ), mas não houve diferença estatística no nível de proteinúria ou porcentagem de FIAT entre os períodos ( $p>0,05$ ). A expressão do RNAm tecidual de alfa actinina-4, podocina, podocalixina, TGF $\beta_1$ , VEGF-A e CTGF no tecido renal também não foi diferente nos três períodos considerados ( $p>0,05$  para todas as comparações).

## **Discussão**

O podócito tem diversas funções que incluem filtração glomerular, biossíntese e manutenção da arquitetura do capilar glomerular. Apesar de seu complexo papel na função glomerular, as manifestações clínicas da disfunção podocitária são limitadas a proteinúria e insuficiência renal. A injúria glomerular promove ruptura e destabilização do diafragma em fenda e rearranjos dos feixes contráteis do citoesqueleto do podócito, formando uma rede epitelial densa com perda do padrão interdigital dos pedicelos o que resulta, em proteinúria (25). O podócito maduro não prolifera exceto em condições específicas, e é incapaz de repor o epitélio visceral sobre a MBG tornando o capilar glomerular sem “cobertura” susceptível a insultos variados (6,9). Nas glomerulopatias proteinúricas, independente do insulto inicial, ocorre descolamento de podócitos da MBG, podocitopenia e excreção de podócitos

apoptóticos na urina. Postula-se que esse seja o mecanismo mais importante de progressão da glomerulopatia crônica, envolvendo um denominador comum que culmina em glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial (7,11,12,15,16). Neste estudo envolvendo pacientes com podocitopatias e glomerulonefrites proliferativas observamos podocitopenia intra-renal, detectada pela redução expressiva do RNAm das moléculas intrínsecas do podócito. Concomitantemente, a presença de fibrose intersticial de maior magnitude comparado a fibrose de grau leve, foi associada a maiores níveis do RNAm de fatores parácrinos indutores de fibrose renal, sugerindo já nesta fase da doença ativação de mecanismos fibrogênicos e uma resposta mal-adaptativa à injúria glomerular. A glomerulosclerose global considerada isoladamente, entretanto, não teve associação com a distribuição dos RNAm no tecido.

Histologicamente, a fibrose como expressão de dano crônico renal consiste em alterações como glomerulosclerose, fibrose túbulo-intersticial, hialinose e esclerose vascular. A patologia podocitária na fibrose renal desenvolve-se por desdiferenciação do podócito, disfunção endotelial e transição epitélio-mesenquimal mediadas pelo epitélio visceral. Segue-se proliferação de fibroblastos, acúmulo de constituintes da MEC e deposição de colágeno, principalmente colágeno IV (26). Em modelos experimentais e em estudos clínicos, a supra-regulação de TGF- $\beta$  produz expansão e acúmulo de matriz mesangial, glomerulosclerose, fibrose intersticial e insuficiência renal progressiva (21-23,27).

Em nosso estudo, mais de dois terços dos pacientes foram biopsiados nos primeiros seis meses das manifestações clínicas (mediana de 4 meses), podendo-se considerar ainda período de fase aguda de doença. Provavelmente deve-se a isso o fato das lesões histológicas predominantes expressarem mais uma reação aguda do glomérulo à injúria, como expansão da matriz mesangial, hiper celularidade mesangial, espessamento de MBG e infiltrado celular inflamatório, do que dano crônico. Apenas 30% e 31% das biópsias respectivamente tinham mais de 30% de glomerulosclerose global e de fibrose intersticial. Globalmente, não detectamos supra-regulação dos fatores pro-fibróticos TGF- $\beta_1$ , CTGF e VEGF-A nestas biópsias, nem separando as podocitopatias das lesões proliferativas. Assim, deduzimos que esses achados são mais compatíveis com supressão do RNAm tecidual das proteínas específicas do podócito em fase aguda de doença, como tínhamos demonstrado previamente em glomerulopatias primárias e secundárias (18,28). Entretanto, nos rins com maior grau de fibrose e atrofia, o aumento da expressão de TGF- $\beta_1$  e VEGF-A foi estatisticamente significativo; e também de CTGF, embora sem atingir significância (figura 3B). É

pertinente considerar, no entanto, que por limitações da técnica utilizada não tenhamos detectado de forma mais precoce a supra-regulação de fatores pró-fibróticos nestas biópsias que já apresentavam expansão de matriz mesangial e espessamento de MBG, como descrito em outros estudos (21-23,26,29).

Interessante observar que na presença de crescentes celulares ou fibrocelulares, detectadas em 12% dos casos, os níveis de RNAm das proteínas do podócito, de TGF- $\beta_1$  e de CTGF estavam significativamente aumentados em comparação com as biópsias sem crescentes. O RNAm dos marcadores do podócito alfa actinina-4, podocina e podocalixina também foi mais expresso nas lesões crescênticas. A crescente decorre de uma agressão severa ao glomérulo comum a podocitopatias proliferativas e vasculites, caracterizada por ruptura da cápsula de Bowman, extravasamento de proteínas do plasma, proliferação e hipertrofia podocitária exuberante e uma reação inflamatória vigorosa. Segue-se secreção de fibrina, fibroblastos e deposição de colágeno, que culmina na crescente fibrosa (5-7). Os podócitos na crescente sofrem desdiferenciação celular e expressam fortemente TGF- $\beta_1$  já na fase inicial de sua formação, induzindo hiperplasia podocitária através de vias anti-apoptóticas de sinalização como *Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)*, *Phosphatidyl Inositol-3-Kinase (PI3K)* e *Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)* (26,30). A supra-regulação de TGF- $\beta_1$  e secundariamente do CTGF também induz apoptose do podócito pela via *Smad*, o que o descola o podócito e desnuda a MBG, resultando em podocitopenia, sinéquias e progressão da glomeruloesclerose e fibrose intersticial reparativa (30). Nesta fase da doença, como demonstrado nos nossos pacientes com podocitopatias e lesões proliferativas e perda de função renal, a expressão do RNAm está inibida em relação aos indivíduos com rim normal, o que é compatível com podocitopenia.

Neste estudo não foi possível demonstrar diferenças de expressão gênica de acordo com o tempo de evolução da doença glomerular, definindo-se arbitrariamente como fase aguda até 3 meses, sub-aguda de 3 a 12 meses e crônica mais que 12 meses de manifestações clínicas até a realização da biópsia renal. Consideramos que o método de quantificação da fibrose renal utilizado não é suficientemente acurado para capturar a extensão do processo reparativo de fibrose do compartimento túbulo-intersticial (24). A utilização de técnicas mais sensíveis e específicas, como imunohistoquímica do anticorpo monoclonal anti-HFF35 que marca miofibroblastos (31), ou também a coloração de *Sirius Red* (32) que mostra alta afinidade para fibras do colágeno, podem fornecer uma análise quantitativa mais acurada da fibrose renal.

Este estudo apresenta limitações, pois seria necessário considerar a influência que outros fatores exercem sobre a lesão podocitária e a consequente fibrose renal. Dentre estes, podemos citar a melhor definição de parâmetros de intensidade da injúria glomerular inicial, a atividade ou inatividade imunológica no momento da biópsia e principalmente o efeito de agentes imunossupressores sobre doença glomerular. A evolução da lesão podocitária depende da interrupção do insulto agudo e da restituição da arquitetura glomerular e do fenótipo primário do podócito. Assim, o efeito de drogas imunossupressoras sobre a morfologia e restauração da função do podócito na barreira do filtro glomerular pode influenciar o desfecho da lesão (33,34). Em estudo anterior do nosso grupo em pacientes glomerulopatas, a podocitúria foi seriada aos 0, 6 e 12 meses da terapia imunossupressora. O RNAm urinário da nefrina, podocina, podocalixina e alfa actinina-4 reduziu significativamente ao longo do tempo, de forma mais marcada nas glomerulopatias proliferativas (18).

Em conclusão, pacientes com podocitopatias ou glomerulonefrites proliferativas apresentaram inibição da expressão do RNAm de proteínas associadas ao podócito e de fatores indutores de fibrose renal, compatíveis com injúria podocitária e podocitopenia. Nas biópsias renais com maior grau de fibrose intersticial e atrofia tubular, assim também como naquelas com lesões crescênticas, a expressão do RNAm de fatores fibrogênicos como TGF- $\beta_1$  e CTGF foi significativamente aumentada, o que pode sugerir supra-regulação de moléculas associadas a mecanismos de fibrose renal e patologia glomerular.

### **Reconhecimentos**

Ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à Nefrologia do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte técnico. Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte financeiro e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por conceder bolsa de pós-graduação a Maysa Lucena de Souza.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo Brasileiro de Diálise, 2014. [http://www.sbn.org.br/pdf/censo\\_2014\\_publico.pdf](http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2014_publico.pdf). Acessado em 01/10/2015.
2. United States Renal Data System. 2014 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014. Disponível em: <http://www.usrds.org/2014/view/>. Acessado em 01/10/2015
3. Bastos MG, Kirsztajn GM. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. J Bras Nefrol 2011; 33(1): 93-108.
4. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int 2013; 3:1-150.
5. William G. Couser. Basic and Translational Concepts of Immune-Mediated Glomerular Diseases. J Am Soc Nephrol 2012; 23: 381–399.
6. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role of proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int 2006; 69: 2131-2147.
7. Barisoni L. Podocyte Biology in Segmental Sclerosis and Progressive Glomerular Injury. Adv Chronic Kidney Dis 2012; 19:76-83.
8. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. Nephron Clin Pract 2007; 106:c169-79.
9. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. Kidney Int 2007; 71:1205-14.
10. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2958-66.
11. Wang G, Lai FM, Lai K-B, Chow K-M, Kwan BC, Li K-T, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for estimation of glomerular filtration loss. Ren Fail 2010; 32: 372-379.

12. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F40-8.
13. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta* 2005; 36: 182-90.
14. Zheng M, Lv L-L, Ni J, Ni H-F, Li Q, Ma K-L, et al. Urinary Podocyte-Associated mRNA profile in Various Stages of Diabetic Nephropathy *Plos One* 2011 31; 6 42.
15. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007; 106: c61-6.
16. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine Podocyte mRNAs Mark Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1041-1052.
17. Clement LC, Kiu G, Perez-Torres I, Kanwar YS, Avila-Casado, Chugh SS. Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease. *Kidney Int* 2007; 72: 337-347.
18. Rodrigues PG, Bringhenti RN, do Nascimento JP, Joelsons G, dos Santos M, Pereira S, Veronese FV. Expression patterns of podocyte-associated mRNAs in patients with proliferative or non-proliferative glomerulopathies. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(5): 2185-98.
19. Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine Podocyte mRNAs, Proteinuria, and Progression in Human Glomerular Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 2081-2095.
20. Pereira SV, dos Santos M, Rodrigues PG, do Nascimento JF, Timm JT, Zancan R, et al. Increased Urine Podocyte-Associated Messenger RNAs in Severe Obesity Are Evidence of Podocyte Injury. *Obesity* 2015; 23: 1643-1649.
21. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF- $\beta$  overexpression by podocytes in progressive podocyte disease. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 129-140.

22. Lee HS. Paracrine role for TGF- $\beta$ -induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease. *Histol Histopathol* 2012; 27: 1131-1141.
23. Lee HS and Song CY. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF- $\beta$ -induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histol Histopathol* 2009; 24: 901-908.
24. Farris AB, Alpers CE. What is the best way to measure renal fibrosis?: A pathologist's perspective. *Kidney Int Suppl* 2014; 4: 9-15.
25. Schwartz MM. The role of podocyte injury in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Renal Failure* 2000; 22: 663-684.
26. Ito Y, Goldschmeding, Kasuga H, Claessen N, Nakayama M, Yuzawa Y, et al. Expression patterns of connective tissue growth factor and TGF- $\beta$  isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: 545-558.
27. Koop JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Boettinger EP, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF- $\beta$ 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 1996; 74: 991-1003.
28. Dos Santos M, Brighenti RN, Rodrigues PG, Do Nascimento JF, Pereira SV, Zancan R, et al. Podocyte-associated mRNA in kidney tissue and in urine of patients with active lupus nephritis. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:4600-4613.
29. Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck LF, Baumann M, Junglas B, Tamm ER. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. *Histochem Cell Biol* 2011; 136: 301-319.
30. Lee HS, Song CY. Effects of TGF- $\beta$  on Podocyte Growth and Disease Progression in Proliferative Podocytopathies. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33: 24-29.
31. Tsukada T, Tippens D, Gordon D, Ross R, Gown AM. *Am J Pathol* 1987; 126: 51-60.
32. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11: 447-455.

33. Moysiadis DK, Perisynakis G, Bertias G, Stratakis S, Kyriacou K, Nakopoulou, et al. Early treatment with glucocorticoids or cyclophosphamide retains the slit diaphragm proteins nephrin and podocin in experimental lupus nephritis. *Lupus* 2012; 21: 1196-1207.
34. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008; 14: 931-938.

**Tabela 1.** Dados demográficos e clínicos dos pacientes estudados

	<b>Casos (N=84)</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
Idade (anos)	46±15 <sup>1</sup>	18	81
Sexo (feminino)	49 (58)	-	-
Raça (branca)	75 (89)	-	-
Tempo entre sintomas/biópsia (meses)	4 (2-18) <sup>2</sup>	1	228
Taxa de filtração glomerular (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	59±36	12	148
Índice proteinúria/creatininúria <sup>4</sup>	3,5 (1,5-5,7)	0,20	19,4
Albumina sérica (g/dl)	3,3±0,7	1,5	4,6
Colesterol total (mg/dl)	241±63	79	404
Glicemia (mg/dl)	96±22	68	219

<sup>1</sup>média ±DP; <sup>2</sup>mediana e intervalo interquartil; <sup>3</sup>equação estimada pela CKD-EPI; <sup>4</sup>em amostra isolada de urina.

**Tabela 2.** Diagnósticos histopatológicos das biópsias renais

	<b>n(%)</b>
<b>Podocitopatias</b>	
Glomeruloesclerose segmentar e focal	20(24)
Membranosa	13(15)
Nefropatia diabética	9(11)
Lesões mínimas	7(8)
<b>GPs<sup>1</sup> Proliferativas</b>	
Nefropatia por IgA	15(18)
Membranoproliferativa	5(6)
Nefrite lúpica	5(6)
Proliferativa mesangial	4(5)
<b>Outros<sup>2</sup></b>	6(7)
Total	84(100)

<sup>1</sup>GPs: Glomerulopatias. <sup>2</sup>Outros: nefrosclerose hipertensiva (n=3), microangiopatia trombótica (n=1); amiloidose renal (n=1); Nefropatia do C1q (n=1).

**Tabela 3.** Achados histopatológicos das biópsias renais

	<b>Casos (N=84)</b>
Número total de glomérulos	16±8 <sup>1</sup>
Esclerose glomerular global (%)	13(0-30) <sup>2</sup>
Glomeruloesclerose global	
<30%	59(70) <sup>3</sup>
≥30%	25(30)
Expansão de matriz mesangial	49(58)
Hiper celularidade mensagial	37(44)
Espessamento da membrana basal glomerular	36(43)
Sinéquias	35(41)
Crescentes	10(12)
Infiltrado celular focal ou difuso	46(55)
Fibrose intersticial/atrofia tubular	
<30%	58(69)
≥30%	26(31)

<sup>1</sup>média±DP; <sup>2</sup>mediana e intervalo interquartil; <sup>3</sup>n(%).

**Tabela 4.** Expressão do RNA mensageiro das proteínas do podócito e dos marcadores de fibrose de acordo com a presença ou não de crescentes na biópsia renal.

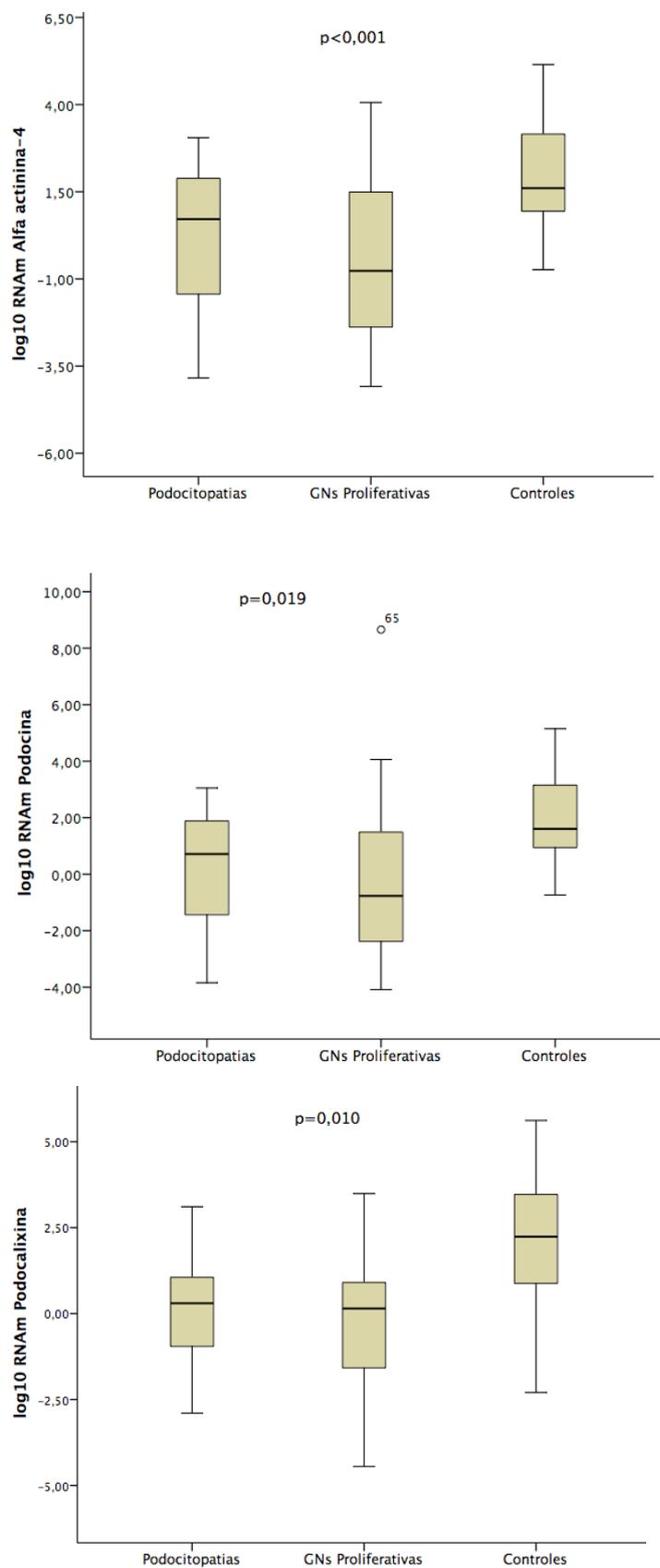
<b>Gene</b>	<b>Biópsia com crescentes (n=10)</b>	<b>Biópsia sem crescentes (n=74)</b>	<b>p-valor<sup>1</sup></b>
Alfa actinina-4	0,71(-0,64 - 1,60) <sup>2</sup>	-0,09(-1,37 - 0,72)	0,04
Podocina	1,56(0,07 - 1,90)	0,03(-1,93 - 1,53)	0,01
Podocalixina	1,04(-0,07 - 2,07)	0,14(-1,60 - 1,03)	0,038
TGFβ <sub>1</sub>	1,53(0,11 - 1,96)	-0,38(-1,88 - 0,96)	0,001
VEGF-A	0,94(0,04 - 1,40)	0,25(-1,65 - 1,35)	0,290
CTGF	1,13(-0,50 - 1,90)	-0,46(-1,35 - 0,94)	0,041

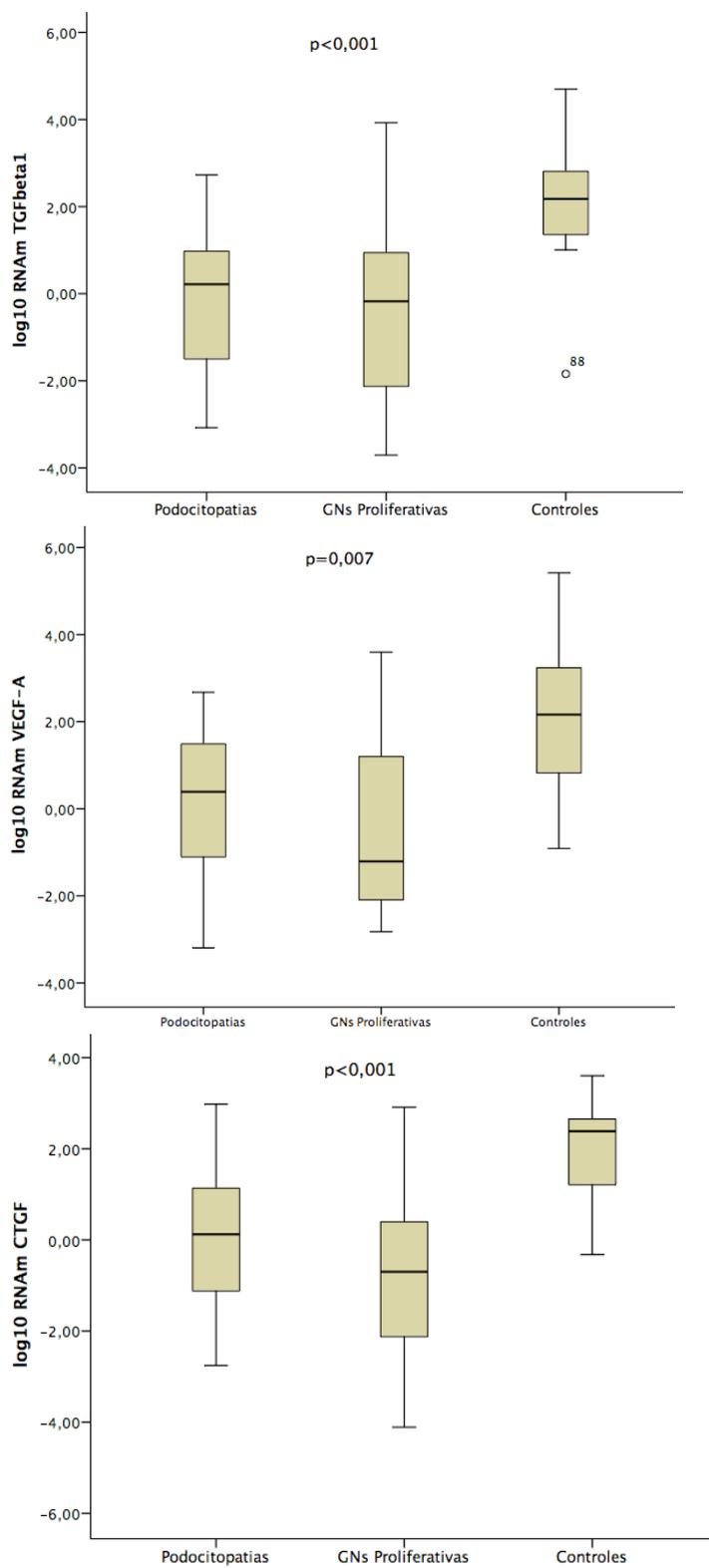
TGFβ<sub>1</sub>: Transforming growth factor β<sub>1</sub>; VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A; CTGF: Connective tissue growth factor; <sup>1</sup>Teste de Mann-Whitney; <sup>2</sup>mediana e intervalo interquartil.

**Tabela 5.** Associação entre nível de expressão maior (positiva) ou menor (negativa) do RNAm dos fatores pró-fibróticos e a extensão da fibrose renal/atrofia tubular na biópsia renal

<b>Gene</b>	<b>Expressão positiva de RNAm(%)</b>	<b>Expressão negativa de RNAm(%)</b>	<b>p-valor<sup>1</sup></b>
<b>TGFβ<sub>1</sub></b>			
FIAT<30%	41	59	0,016
FIAT≥30%	71	29	
<b>VEGF-A</b>			
FIAT<30%	51	49	0,040
FIAT≥30%	75	25	
<b>CTGF</b>			
FIAT<30%	41	59	0,036
FIAT≥30%	68	32	

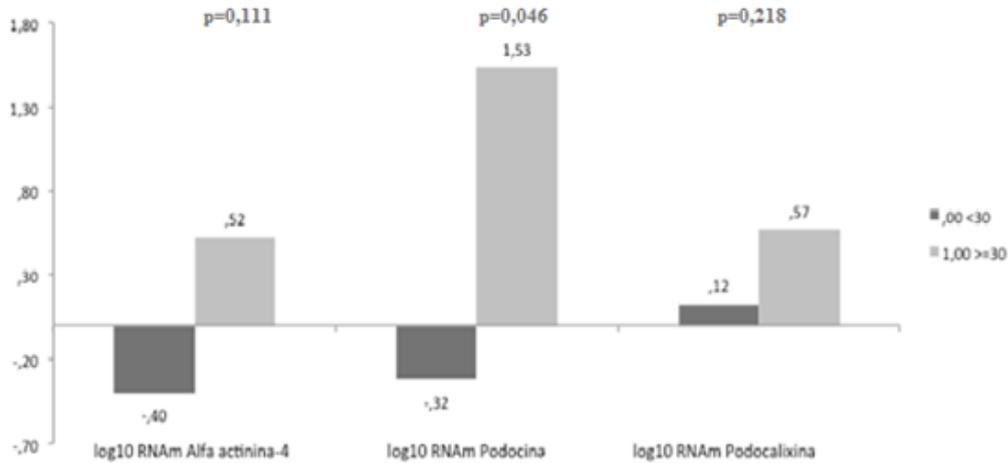
TGFβ<sub>1</sub>: Transforming growth factor β<sub>1</sub>; FIAT: Fibrose intersticial/atrofia tubular; VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A; CTGF: Connective tissue growth factor; <sup>1</sup>Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher.

**Figura 1.** Comparação da expressão do RNAm entre glomerulopatas e controles

**Figura 2.** Comparação da expressão do RNAm entre glomerulopatas e controles

**Figura 3.** Magnitude da expressão do RNAm de acordo com a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular na biópsia renal

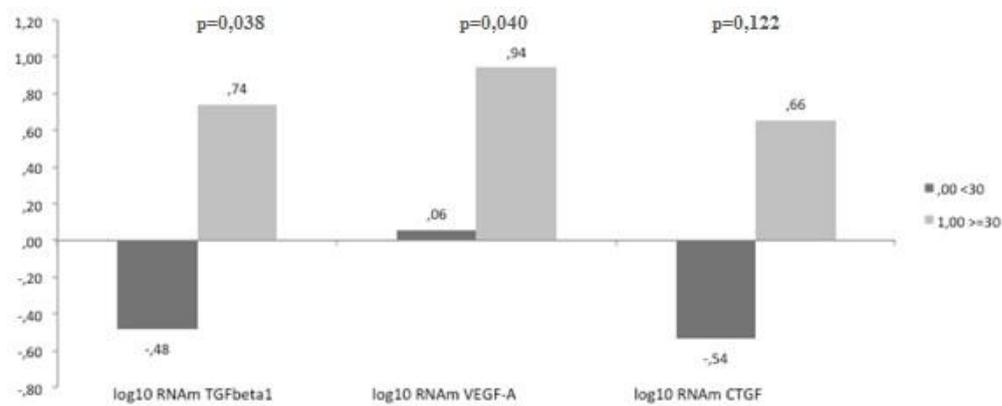
**A**



Eixo vertical: escala do log10 do RNAm das proteínas do podócito no tecido renal.

Grupo 0: <math>< 30\%</math>; Grupo 1: <math>\geq 30\%</math>.

**B**

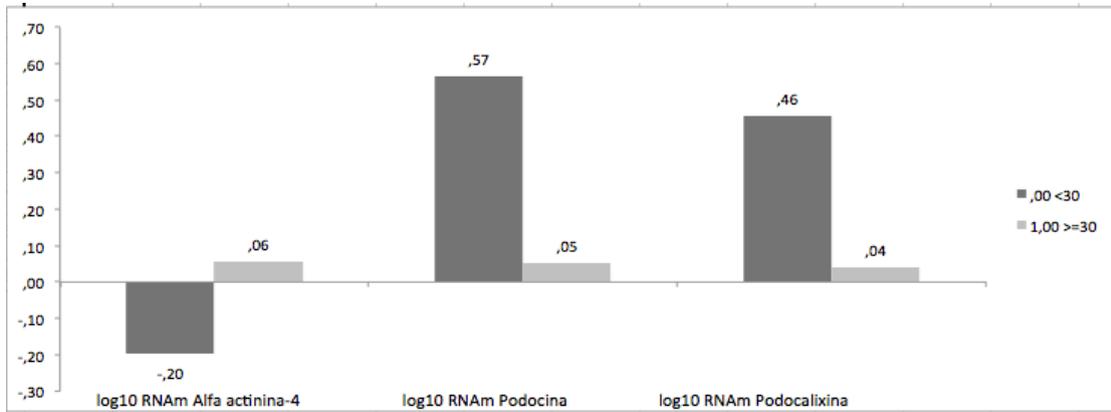


Eixo vertical: escala do log10 do RNAm dos fatores pró-fibróticos no tecido renal.

Grupo 0: <math>< 30\%</math>; Grupo 1: <math>\geq 30\%</math>.

**Figura 4.** Magnitude da expressão do RNAm de acordo com a porcentagem de glomeruloesclerose global na biópsia renal

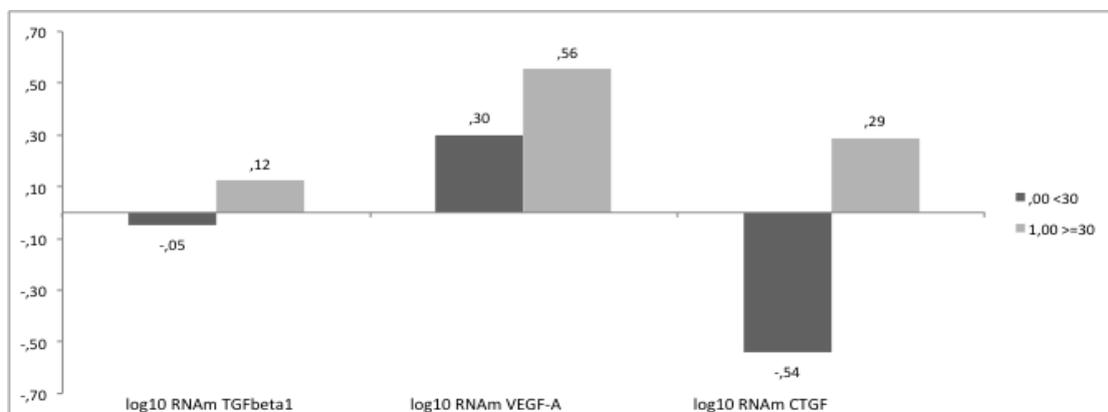
**A**



Eixo vertical: escala do log10 RNAm das proteínas do podócito no tecido renal.

Grupo 0: <math>< 30\%</math>; Grupo 1: <math>\geq 30\%</math>;  $p > 0,05$  para todas as comparações.

**B**



Eixo vertical: escala do log10 do RNAm dos fatores pró-fibróticos no tecido renal.

Grupo 0: <math>< 30\%</math>; Grupo 1: <math>\geq 30\%</math>;  $p > 0,05$  para todas as comparações.

### **Legenda das figuras**

Figura 1. Expressão do log10 do RNAm das proteínas associadas ao podócito nas podocitopatias, glomerulonefrites proliferativas e nos controles sem doença glomerular. Os controles diferem das podocitopatias e das glomerulonefrites proliferativas, que não diferem entre si ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

Figura 2. Expressão do log10 do RNAm dos marcadores de fibrose nas podocitopatias, glomerulonefrites proliferativas e nos controles sem doença glomerular. Os controles diferem das podocitopatias e das glomerulonefrites proliferativas, que não diferem entre si ( $p < 0,05$  para todas as comparações).

Figura 3. Expressão do log10 do RNA mensageiro das proteínas associadas ao podócito (Painel A) e dos fatores pró-fibróticos (painel B) conforme a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular (FIAT) na biópsia renal,  $<30\%$  versus  $\geq 30\%$ . Pacientes com maior extensão de área de fibrose na biópsia apresentaram maior nível de expressão de podocina ( $p=0,046$ ), de  $TGF\beta_1$  ( $p=0,038$ ) e de VEGF-A ( $p=0,040$ ) no tecido renal.

Figura 4. Expressão do log10 do RNA mensageiro das proteínas associadas ao podócito (Painel A) e dos fatores pró-fibróticos (painel B) conforme a porcentagem de glomérulos globalmente esclerosados na biópsia renal,  $<30\%$  versus  $\geq 30\%$  ( $p > 0,05$  para todas as comparações).

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A glomerulonefrite crônica é a terceira causa de doença renal crônica terminal no Brasil e no mundo, e um problema de relevância clínico- epidemiológica que exige múltiplas abordagens no seu manejo. Entre os fatores prognósticos estão a albuminúria, a proteinúria e a perda da função renal que evoluem progressivamente para necessidade de diálise ou transplante renal. Em meio a diversas medidas nefroprotetoras comprovadamente eficazes, essa evolução ainda é inevitável pela incapacidade de se modificar o curso evolutivo das doenças glomerulares.

As podocitopatias são consideradas hoje a base fisiopatológica da proteinúria, e derivam de insultos hemodinâmicos, tóxicos, auto-imunes, inflamatórios e metabólicos, ainda não totalmente claros apesar de intensamente investigados. Neste contexto, a mensuração acurada do dano podocitário e da sua participação no processo de fibrose renal progressiva em glomerulopatias de diferentes etiologias, e de diferentes tempos de evolução, é primordial para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos que auxiliem no controle destas doenças.

Neste estudo avaliamos a expressão gênica de moléculas associadas ao podócito em biópsias renais em dois grupos de glomerulopatias proteinúricas, as podocitopatias e as glomerulonefrites proliferativas. Em acordo com os dados da literatura, nosso estudo demonstrou inibição da expressão do RNAm de podocina, podocalixina e alfa actinina-4 no tecido renal indicando injúria podocitária e podocitopenia, e aumento concomitante da expressão do RNAm de fatores pró-fibróticos - TGF $\beta$ <sub>1</sub>, VEGF-A e CTGF - em biópsias com fibrose renal moderada a severa, sugerindo que mecanismos de fibrogênes operam já nos meses iniciais da doença glomerular. O RNAm das proteínas do podócito, bem como dos fatores pró-fibróticos foi também associado a uma forma grave de lesão glomerular, a crescente, que pode ocorrer em virtualmente todas as glomerulonefrites.

Os resultados deste estudo não são conclusivos e apenas suscitam a busca de mais evidências, principalmente porque métodos mais acurados de quantificação da fibrose renal, como imunohistoquímica ou colorações especiais como o Picrosirius, precisam ser empregados para capturar com mais precisão associações entre os genes de fibrose e o estágio evolutivo da doença glomerular, o que não foi possível com o método adotado neste trabalho.

## 8. PERSPECTIVAS

Neste estudo não foi possível demonstrar diferenças de expressão gênica de acordo com o tempo de evolução da doença glomerular. Assim, necessitamos empregar um método de quantificação da fibrose renal suficientemente acurado para capturar com precisão a extensão do processo reparativo de fibrose do compartimento túbulo-intersticial. A próxima etapa deste trabalho vai envolver a utilização de técnicas mais sensíveis e específicas de quantificação da fibrose renal, como, por exemplo, a imunohistoquímica do anticorpo monoclonal anti-HFF35 que marca miofibroblastos, ou também a coloração de *Sirius Red* que mostra alta afinidade para fibras do colágeno. Estas técnicas, preferencialmente mensuradas por método digital, devem auxiliar na melhor elaboração de nossa hipótese de trabalho.

## 9. ANEXOS

### **Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes)**

Estamos convidando o(a) Sr.(a) \_\_\_\_\_ a participar do estudo “CORRELAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE INTRA-RENAL COM A EXPRESSÃO DOS RNAm ASSOCIADOS AO PODÓCITO E DE FATORES PRÓ FIBRÓTICOS EM DIFERENTES TIPOS DE GLOMERULONEFRITE” que será realizado com o objetivo de identificar alterações em células importantes para o bom funcionamento dos rins que podem levar a perda de função e insuficiência renal.

Como parte do seu atendimento, seu médico indicou uma biópsia renal para avaliar o seu rim e definir um diagnóstico. Por meio deste documento, solicitamos a sua autorização para utilizar um pequeno pedaço deste fragmento, que será retirado do seu rim, para nossa pesquisa. Este pedaço será analisado posteriormente no Laboratório do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através de técnicas específicas que avaliarão níveis de fatores que induzem a fibrose e o dano às células importantes dos rins. Também será necessário o acesso ao seu prontuário para coleta de resultados de exames laboratoriais. Os pesquisadores deste projeto se comprometem a manter confidencial os seus dados de identificação pessoal e a divulgação dos resultados da pesquisa será feita de maneira agrupada e sem nome dos participantes.

Não são conhecidos riscos aplicados a este projeto de pesquisa, uma vez que o procedimento da biópsia renal será realizado por indicação do seu médico. Somente será utilizado para pesquisa o material dos pacientes que apresentarem algum tipo de glomerulonefrite. Após a divulgação do resultado da biópsia, caso não seja identificado qualquer tipo de glomerulonefrite, o seu material não será utilizado para esta pesquisa. O(a) Sr(a) tem a liberdade de retirar a qualquer momento o seu consentimento, sem que isto traga prejuízo à continuação de seu tratamento. A participação no estudo não envolve custos aos participantes e não está previsto nenhum tipo de remuneração. Sendo assim, não há benefícios diretos, mas sua colaboração será muito importante para o aumento do conhecimento sobre danos renais e ajudará o tratamento e o controle de futuros pacientes com glomerulonefrite.

O participante receberá uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinada pelo pesquisador responsável. Para esclarecimento de dúvida sobre o presente estudo a qualquer momento ou em caso de necessidade o(a) Sr.(a) poderá entrar em contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia, procurando os

pesquisadores responsáveis Dr. Francisco Veronese ou Maysa Lucena pelos telefones (51) 3395-8295 ou (51) 3395-8121, e também em caso de dúvidas sobre os direitos e deveres dos participantes desta pesquisa poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (51) 3359.7640, 2º andar HCPA, sala 2227, de segunda à sexta-feira das 8h às 17h.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar do estudo  
\_\_\_\_\_ e  
declaro que fui bem informado.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (controle)**

Estamos convidando o (a) Sr.(a) \_\_\_\_\_ a participar do estudo “CORRELAÇÃO DO GRAU DE FIBROSE INTRA-RENAL COM A EXPRESSÃO DOS RNAm ASSOCIADOS AO PODÓCITO E DE FATORES PRÓ FIBRÓTICOS EM DIFERENTES TIPOS DE GLOMERULONEFRITE” que será realizado com o objetivo de identificar alterações em células importantes para o bom funcionamento dos rins que podem levar a perda de função e insuficiência renal.

Embora o(a) Sr.(a) não apresente evidência de glomerulonefrite, mas necessita remover um rim por um tumor renal como indicado pelo seu médico, estamos lhe convidando a participar da pesquisa e fazer parte de um grupo de comparação. Durante o procedimento ao qual o(a) Sr.(a) será submetido para retirada de um rim, será coletado um pequeno fragmento deste rim através de uma biópsia. Isto não lhe causará qualquer prejuízo, pois todo o seu rim será retirado como tratamento de sua doença.

Por meio deste documento, solicitamos a sua autorização para utilizar este pequeno fragmento para nossa pesquisa. Um pedaço deste fragmento livre de neoplasia indicado pelo patologista será analisado posteriormente no Laboratório do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre através de técnicas específicas que avaliarão níveis de fatores que induzem a fibrose e o dano às células importantes dos rins. Também será necessário o acesso ao seu prontuário para coleta de resultados de exames laboratoriais. Os pesquisadores deste projeto se comprometem a manter confidencial os seus dados de identificação pessoal e a divulgação dos resultados da pesquisa será feita de maneira agrupada e sem nome dos participantes.

Não são conhecidos riscos aplicados a este projeto de pesquisa, uma vez que o procedimento da biópsia renal será realizado por indicação do seu médico. O(a) Sr(a) tem a liberdade de retirar a qualquer momento o seu consentimento, sem que isto traga prejuízo à continuação de seu tratamento. A participação no estudo não envolve custos aos participantes e não está previsto nenhum tipo de remuneração. Sendo assim, não há benefícios diretos, mas sua colaboração será muito importante para o aumento do conhecimento sobre danos renais e ajudará o tratamento e o controle de futuros pacientes com glomerulonefrite.

O participante receberá uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinada pelo pesquisador responsável. Para esclarecimento de dúvida sobre o presente estudo a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr.(a) poderá entrar em

contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia, procurando os pesquisadores responsáveis Dr. Francisco Veronese ou Maysa Lucena pelos telefones (51) 3395-8295 ou (51) 3395-8121, e também em caso de dúvidas sobre os direitos e deveres dos participantes desta pesquisa poderão entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (51) 3359.7640, 2º andar HCPA, sala 2227, de segunda à sexta-feira das 8h às 17h.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar do estudo  
\_\_\_\_\_ e  
declaro que fui bem informado.

Nome do participante: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do responsável: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Anexo 3: Protocolo de Coleta de Dados

#### Identificação

Nome					Protocolo n°	
Idade		Sexo	<input type="checkbox"/> 1=Masc <input type="checkbox"/> 2=Fem	Etnia	<input type="checkbox"/> 1=Branco <input type="checkbox"/> 2=Negro	Registro HCPA

#### Dados clínicos e exames laboratoriais

Hipertensão arterial: ( ) Sim ( ) Não PAS: ___/___mmHg PAD: ___/___mmHg	Medicações em uso e doses (incluir data de início)
Albumina sérica (mg/dl):	1.
Creatinina sérica (mg/dl):	2.
TFGe (ml/min/1,73 m <sup>2</sup> ):	3.
Índice proteinúria/creatininúria na urina:	4.
	5.
Colesterol total: HDL: LDL: Triglicerídeos:	6.

#### Histopatologia: biópsia renal.

Porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular na biópsia \_\_\_\_\_ %

Nº total de glomérulos/nº total de glomérulos globalmente esclerosados: \_\_\_\_\_

Hiperplasia endocapilar ( ) Hiperplasia mesangial ( )

Crescentes: celulares ( ) fibrocelulares ( ) fibrosas ( )

Espessamento da membrana basal glomerular ( )

Expansão da matriz mesangial ( ) Infiltrado intersticial: focal ( ) difuso ( )

Fibrose da camada íntima dos vasos ( ) Hipertrofia da camada muscular dos vasos ( )

**Análises Moleculares: tecido renal.**

<b>Gene/RNAm</b>	<b>Quantificação do RNAm (<math>2^{-\Delta\Delta C_t}</math>)</b>
CTGF	
TGF-beta	
VEGF-A	
Podocina	
Alfa actinina-4	
Podocalixina	