

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Avaliação da injúria podocitária em pacientes com diferentes graus de  
obesidade através da expressão urinária dos RNAm associados ao podócito**

Dissertação de Mestrado

Sane Vianna Pereira

Porto Alegre, 2014

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Avaliação da injúria podocitária em pacientes com diferentes graus de  
obesidade através da expressão urinária dos RNAm associados ao podócito**

*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.*

Autor: Sane Vianna Pereira

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese

Porto Alegre, 2014

## Agradecimentos

À Deus pela proteção, à minha família, especialmente minha mãe, pelo apoio e incentivo, a meu filhinho por acompanhar o andamento do mestrado da barriga até a defesa, ao meu namorado pela paciência e disponibilidade.

Ao meu orientador, professor Doutor Francisco Veronese, pela orientação, paciência, muita paciência e compreensão. Pelo exemplo de profissional dedicado, organizado e sistemático, que certamente contribuiu para meu crescimento profissional.

Aos colegas de laboratório, em especial à Patrícia Rodrigues e Mariane dos Santos, por toda paciência e disponibilidade em ensinar as técnicas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, àqueles que de uma forma ou de outra participaram da realização desse trabalho, em especial à Andrea Rambo, atendente do Centro de Pesquisa Clínica do HCPA, ao Rodrigo, coletador do Centro de Pesquisa Clínica, e à Aline Mancuso pela assistência estatística.

Ao Serviço de Endocrinologia do HCPA, em especial ao Professor Rogério Friedman, e também à Nutricionista Ciglea do Nascimento.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa pelo apoio financeiro (FIPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

A todos os pacientes, por aceitarem participar do trabalho e assim permitirem a realização desta pesquisa.

## Sumário

<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Revisão da literatura.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Obesidade .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Glomerulopatia associada à obesidade .....</b>	<b>16</b>
2.2.1. Alterações estruturais do rim na ORG .....	17
2.2.2. Fisiopatologia da ORG.....	18
2.2.3. Apresentação clínica da ORG .....	19
2.2.4. Tratamento da GESF associada à obesidade.....	20
<b>2.3. Componentes do filtro glomerular.....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Estrutura molecular do podócito.....	21
<b>2.4. Fatores de crescimento e sua relação com a podocitopatia .....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Fator de crescimento vascular derivado do endotélio.....	24
2.4.2. Fator de crescimento transformador beta.....	25
<b>2.5. Proteinúria e Glomeruloesclerose.....</b>	<b>26</b>
<b>2.6. Diagnóstico não invasivo da podocitúria .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>29</b>
3.1 Geral .....	29
3.2 Específicos.....	29
<b>4. Referências.....</b>	<b>30</b>
<b>5. Artigo em português.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Artigo em inglês.....</b>	<b>59</b>

<b>7. Considerações finais</b> .....	67
<b>8. Anexos</b> .....	70

## Lista de tabelas

<i>Tabela 1. Dados demográficos e clínicos de casos e controles.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 2. Perfil metabólico dos pacientes com obesidade ou sobrepeso e dos controles.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 3. Correlações de Spearman dos RNAm associados ao podócito com parâmetros metabólicos e inflamação nos pacientes com sobrepeso ou obesos..</i>	<i>59</i>

## Lista de Figuras

<i>Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas.....</i>	<i>54</i>
<i>Figura 2. Expressão do RNAm associadas ao podocito conforme índice de massa corporal (kg/m<sup>2</sup>).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 3. Expressão do RNAm associadas ao podocito conforme nível de insulina.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4. Expressão do RNAm associadas ao podocito conforme nível de proteína C reativa ultrasensível.....</i>	<i>64</i>



### **Lista de abreviaturas**

cDNA – DNA complementar

DF - Diafragma em fenda

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

DRC – Doença renal crônica

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ELISA - Imunoensaio enzimático

EQU – Exame qualitativo de urina

FcR - receptores Fc

FFR- Falência funcional renal

GESF – Glomeruloesclerose segmentar e focal

HbA1C - Hemoglobina glicada

HOMA-IR – Índice de resistência à Insulina

ICs – Imunocomplexos

IL - Interleucina

IMC - Índice de massa corporal

MBG – Membrana basal glomerular

ME – Microscopia eletrônica

MO – Microscopia ótica

OMS - Organização Mundial da Saúde

ORG – Obesidade relacionada à glomerulopatia

PAD – Pressão arterial diastólica

PAI-1- Inibidor da ativação plasminogênio

PAS - Pressão arterial sistólica

PCRus – Proteína C reativa ultrasensível

PDGF - fator derivado de plaquetas

PIGF – fator de crescimento placentário

RNA- Ácido ribonucléico

RNAm – RNA mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SRAA - Sistema renina angiotensina aldosterona

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF  $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta

TRPC6 - Transient receptor potential cation channel 6

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

## Resumo

**Objetivos:** A obesidade está associada a lesões glomerulares e injúria ao podócito. O objetivo deste estudo foi correlacionar diferentes graus de obesidade e sobrepeso com a expressão dos RNAm associados ao podócito, e determinar a relação entre podocitúria e parâmetros metabólicos e inflamatórios nesta população de pacientes.

**Material e Métodos:** Foram estudados 83 pacientes com obesidade grau I, II ou III ou sobrepeso, e como controles 18 indivíduos saudáveis. A expressão do RNA mensageiro (RNAm) urinário da nefrina podocina, podocalixina, alfa actinina-4,  $\alpha 3\beta 1$  integrina, e dos fatores de crescimento derivado do endotélio (VEGF-A) e transformador beta ( $TGF\beta_1$ ) foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT). O RNAm dos genes foi correlacionado com o índice de massa corporal (IMC), parâmetros de síndrome metabólica, albuminúria e inflamação.

**Resultados:** Vinte e um (20,8%) pacientes tinham sobrepeso, 12(11,9%) obesidade grau I, 10(9,9%) obesidade grau II e 40(39,6%) obesidade grau III. Obesos grau III tinham maiores níveis de lipídios, glicemia, HbA1C, resistência insulínica e proteína C reativa ( $p < 0,05$ ), com critérios de síndrome metabólica em 33% dos casos ( $p = 0,003$  vs. demais grupos). Albuminúria acima de 30 mg/g creatinina foi observada em 14%, 8%, 10% e 23% dos pacientes com sobrepeso, obesidade grau I, II e III respectivamente ( $p = 0,548$ ). A expressão de todos os RNAm associados ao podócito variou com o IMC, sendo significativamente maior nos obesos grau III em relação aos controles e demais pacientes ( $p < 0,05$ ); pacientes

com sobrepeso, obesidade grau I ou grau II, quando comparados aos controles, também tiveram maior expressão do RNAm de alguns genes: nefrina ( $p=0,021$ ), alfa actinina-4 ( $p=0,014$ ),  $\alpha 3\beta 1$ integrina ( $p=0,036$ ) e  $TGF\beta_1$  ( $p=0,005$ ). Pacientes hiperinsulinêmicos e aqueles com nível elevado de proteína C reativa, compatível com inflamação sistêmica, também tiveram maior grau de podocitúria.

Conclusão: Pacientes com obesidade mórbida apresentaram maior grau de podocitúria mesmo quando a albuminúria era normal, sugerindo que a detecção dos produtos do podócito na urina pode indicar injúria precoce às células epiteliais glomerulares na obesidade grave. Hiperinsulinemia e inflamação sistêmica também se correlacionaram com maior grau de podocitúria.

**Palavras-chave:** obesidade, lesão glomerular, podócito, albuminúria, síndrome metabólica, inflamação sistêmica

## Abstract

**Objective:** Obesity is associated with glomerular lesions and podocyte injury. This study aimed to correlate different degrees of obesity and overweight with expression of podocyte-associated messenger RNA (mRNA) and to search whether a relationship exists between podocyturia and metabolic and inflammatory parameters in this patient population.

**Materials and Methods:** The sample comprised 83 patients with overweight or class I, II, or III obesity and 18 healthy controls. Expression of nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin-4, integrin  $\alpha3\beta1$ , vascular endothelial growth factor (VEGF-A), and transforming growth factor-beta ( $TGF\beta_1$ ) mRNA in urine was quantified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). mRNA expression was correlated with body mass index (BMI), markers of the metabolic syndrome, albuminuria, and inflammation.

**Results:** Twenty-one patients (20.8%) were overweight, 12 (11.9%) had class I obesity, 10 (9.9%) had class II obesity, and 40 (39.6%) had class III obesity. Patients with class III obesity had higher serum lipid, plasma glucose, HbA1C, insulin resistance, and C-reactive protein levels ( $p<0.05$ ), with 33% of subjects in this group meeting criteria for the metabolic syndrome ( $p=0.003$  vs. other groups). Albuminuria  $>30$  mg/g creatinine was observed in 14%, 8%, 10%, and 23% of patients with overweight, class I, class II, and class III obesity respectively ( $p=0.548$ ). Expression of all podocyte-associated mRNAs varied with BMI. Patients with class III obesity had significantly higher levels than controls and other patients ( $p<0.05$ ). Patients with overweight, class I, or class II obesity, also had higher levels

of some mRNAs as compared with controls: nephrin ( $p=0.021$ ), alpha-actinin-4 ( $p=0.014$ ), integrin  $\alpha3\beta1$  ( $p=0.036$ ), and e TGF $\beta_1$  ( $p=0.005$ ). Hyperinsulinemic patients and those with C-reactive protein levels consistent with systemic inflammation also exhibited a higher degree of podocyturia.

Conclusion: Patients with morbid obesity exhibited greater podocyturia even at normal urinary albumin excretion rates, which suggests that detection of podocyte products in urine may indicate early glomerular epithelial cell injury in severe obesity. Hyperinsulinemia and systemic inflammation also correlated with a higher degree of podocyturia.

**Keywords:** obesity, glomerular injury, podocyte, albuminuria, metabolic syndrome, systemic inflammation

## 1. Introdução

A prevalência mundial da obesidade aumentou de forma acentuada de aproximadamente 200 milhões de adultos em 1995 para mais de 300 milhões de adultos no ano 2000. Atualmente, o número de adultos com excesso de peso ou obesos em nível mundial excede 1 bilhão de indivíduos (1). A obesidade acarreta uma sobrecarga metabólica e inicia uma série de mecanismos de lesão renal que incluem um metabolismo lipídico anormal, o papel das citocinas pró-inflamatórias e fatores hemodinâmicos potenciais que ainda são subdimensionados (2,3).

Nas últimas décadas, a epidemia de obesidade tem levado a um aumento progressivo do número de pacientes obesos com critérios clinico-laboratoriais para doença glomerular, em que a obesidade está etiopatogenicamente relacionada ao desenvolvimento da glomerulopatia (4-6). As características clínicas de indivíduos obesos com alterações sistêmicas e/ou renais aparentes tem sido agrupados no termo Glomerulopatia Associada à Obesidade (*Obesity Related Glomerulopathy*, ORG), que incluem inicialmente microalbuminúria e na sequência proteinúria patológica e perda lenta e progressiva de função renal secundária a glomeruloesclerose segmentar e focal. O paciente evolui para um quadro de doença renal crônica clinicamente manifestae algumas vezes necessidade de terapia de substituição da função renal (diálise ou transplante) (7-10).

Ao longo das duas últimas décadas, a prevalência da doença renal crônica (DRC) teve um aumento superior a 100%, apesar da diminuição dos fatores de risco cardiovascular tradicionais, como tabagismo, dislipidemia e hipertensão arterial, conforme dados das coortes dos estudos NHANES I, II e III (11). Diversos estudos epidemiológicos indicam uma associação entre a obesidade e a DRC (12-



17). A perda de função renal, mensurada pela taxa de filtração glomerular (TFG), está associada à perda das funções regulatórias, excretórias e endócrinas do rim. Quando a TFG atinge valores muito baixos, inferiores a  $15 \text{ mL/min/1,73m}^2$ , estabelece-se o que denominamos falência funcional renal (FFR) ou doença renal crônica terminal (DRCT), ou seja, o estágio mais avançado do *continuum* de perda funcional progressiva observado na DRC (16).

Não existem estudos no Brasil que avaliaram a associação de obesidade e dano glomerular. Como em nosso país a prevalência de obesidade e de doença renal crônica são crescentes, a determinação precoce de glomerulopatia associada à obesidade na incidência de novos casos de DRC deve ter um impacto clínico relevante (17).

## 2. Revisão da literatura

### 2.1. Obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo. Sua prevalência aumentou acentuadamente nas últimas décadas, principalmente nos países em desenvolvimento. Sua causa é multifatorial e depende da interação de fatores genéticos, metabólicos, sociais, comportamentais e culturais (18,19).

A obesidade tornou-se um problema de saúde pública no mundo. Cerca de 1,6 bilhão de adultos com idade superior a 15 anos são considerados portadores de sobrepeso, definido por índice de massa corporal (IMC) entre 25 e 29,9 kg/m<sup>2</sup> e 400 milhões são obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>). Em 2015, espera-se que 2,3 bilhões de pessoas em todo o mundo estarão com sobrepeso e 700 milhões serão obesos (19).

A prevalência de obesidade nos Estados Unidos é alta, superior a 30% para ambos os sexos e em quase todos os grupos etários e étnicos (19). Esta proporção continua a aumentar gradualmente. Uma análise do Centro de Controle e Prevenção de Doenças americano (CDC) mostra que houve um aumento de 1,1% na prevalência entre 2007 e 2009, o que corresponderia a aproximadamente outros 2,4 milhões de indivíduos obesos. Este dado conduz à uma projeção para 2050 de que quase toda a população dos Estados Unidos estará sendo classificada com sobrepeso (IMC > 25 kg/m<sup>2</sup>) ou obesidade (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) (20).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a obesidade com base no índice de massa corporal (IMC) definido pelo cálculo do peso corporal, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros quadrados ( $IMC=kg/m^2$ ), e também pelo risco de mortalidade associada. A obesidade é caracterizada quando o IMC encontra-se acima de  $30 kg/m^2$ . A OMS define a gravidade da obesidade em grau I (leve) quando o IMC situa-se entre 30 e  $34,9 kg/m^2$ , em obesidade grau II (moderada) quando o IMC está entre 35 e  $39,9 kg/m^2$  e em obesidade grau III (mórbida) quando o IMC ultrapassa  $40 kg/m^2$  (18). O aumento no número de obesos na população mundial tem grandes implicações para os custos de saúde. Serviços de saúde públicos e privados nos Estados Unidos, em conjunto, gastam cerca de 147 bilhões de dólares por ano com as doenças relacionadas à obesidade (21).

O peso médio dos brasileiros também têm aumentado nos últimos anos, conforme dados da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) do período 2008-2009, que foi realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em parceria com o Ministério da Saúde (22). O peso elevado era considerado problema somente em países desenvolvidos, no entanto, o sobrepeso e a obesidade estão em dramática ascensão nos países em desenvolvimento. Em 2005, a OMS informou que 53,5 e 47,4% da população feminina e masculina brasileira encontrava-se com sobrepeso e 18,3 e 8,7% apresentavam obesidade, respectivamente. A projeção para 2015 é que esse índice eleve-se para 73,6 e 67,2% de sobrepeso e 39,7 e 21,6% de obesidade, respectivamente (18).

## 2.2. Glomerulopatia relacionada à obesidade

A obesidade é um fator de risco modificável que está associado a diversas condições metabólicas, incluindo hiperinsulinismo, hiperglicemia, intolerância à glicose, diabetes melito tipo 2, dislipidemia, hipertensão arterial e doença arterial coronariana, fatores potencialmente relacionados ao desenvolvimento de lesão renal e glomerular (23,24).

A prevalência na população de obesos da *Obesity Related Glomerulopathy* (ORG), termo que será utilizado nesta revisão, ainda é indefinida. A incidência de ORG em um estudo do grupo da Columbia, New York (3) mostrou um aumento de 0,2% (período 1990-1995) para 2% (período 1996-2000). Em outro estudo que incluiu 95 pacientes com obesidade severa ( $\text{IMC} \geq 35 \text{ kg/m}^2$ ) e filtração glomerular acima de  $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ , a prevalência de microalbuminúria foi de 41% e de macroalbuminúria 4% (25). A análise histopatológica através da biópsia renal destes pacientes foi compatível com Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) em 5,3% dos casos; em 73% deles havia hipertrofia podocitária e proliferação e aumento de matriz mesangial, e 38% apresentava aumento do volume glomerular caracterizando glomerulomegalia. Valensi et al (26) relataram uma prevalência de 12% de microalbuminúria em pacientes obesos não portadores de Diabetes Melito.

### 2.2.1 Alterações estruturais do rim na ORG

Várias alterações estruturais são observadas em biopsias de pacientes obesos com glomerulopatia. Na microscopia óptica (MO), glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) principalmente peri-hilar, e glomerulomegalia são as lesões mais comuns. Outras lesões descritas são aumento da matriz e da celularidade mesangial, hialinose, hipertrofia podocitária e espessamento focal da membrana basal glomerular (MBG). Em comparação com casos de GESF primária (não ORG), verifica-se menor grau de glomeruloesclerose, fibrose intersticial e arterioesclerose na ORG (3). Na imunofluorescência (IF) os achados são inconstantes e inespecíficos, com predominância de depósitos de IgM e C3, de forma granular nas áreas de glomeruloesclerose. Na microscopia eletrônica (ME) observam-se podócitos hipertrofiados com edema e vacuolização do citoplasma; a fusão podocitária é discreta e focal, e ocorre degeneração dos microvilos. Existem retração e degeneração do corpo celular do podócito, focalmente separado da MBG, e posteriormente descolamento da MBG com formação de uma capa de neo-membrana. Não se observam depósitos eletro-densos (27). As irregularidades da MBG são segmentares, diferentes da GESF primária onde são difusas, sugerindo mecanismos etiopatogênicos diferentes na ORG. A camada endotelial perde as fenestras, existe edema e descolamento da MBG com expansão das áreas subendoteliais (3,5,27). Em pacientes com obesidade mórbida grave (IMC médio de 53), Serra et al (24) descreveram lesões semelhantes às anteriormente descritas na MO, IF e ME, mas a porcentagem de glomeruloesclerose segmentar e focal ou esclerose glomerular global não diferiu dos casos de GESF primária.

Um estudo avaliou a influência da obesidade nas alterações estruturais do rim em obesos com outras glomerulopatias, como nefropatia por IgA,

nefroesclerose benigna e doença de membrana fina, comparando com obesos sem glomerulopatia e controles não obesos (27). Nos pacientes com obesidade moderada ou severa foi observado um maior índice de lesões de glomeruloesclerose focal e/ou global, glomerulomegalia e espessamento da MBG, o que não ocorreu nos controles ou em pacientes com obesidade leve. Em geral, a obesidade mais grave foi significativamente associada com estas alterações histológicas, independente do tipo de glomerulopatia.

### **2.2.2 Fisiopatologia da ORG**

Uma forte correlação entre IMC e glomerulomegalia tem sido descrita, sugerindo uma resposta mal-adaptativa da hemodinâmica renal à obesidade (5,9,26). O aumento do volume glomerular é usualmente consequência de uma hiperfiltração glomerular e pode estar associado com expansão e estresse mecânico (*shear stress*) sobre as alças capilares (5,9). Esta tensão altera a morfologia do podócito, provocando estiramento, edema e alargamento dos pedicelos e reorganização do citoesqueleto, na tentativa de cobrir uma área maior dos capilares glomerulares. Em um limiar crítico de estresse mecânico, ocorre descolamento do podócito, podocitúria e adesão da MBG desnuda à cápsula de Bowman, levando a formação de sinéquias e lesão de esclerose glomerular (9,26,28).

Os mediadores desse estresse mecânico são múltiplos, incluindo substâncias vasoativas e fatores de crescimento, como angiotensina II, TGF- $\beta$  e espécies ativas de oxigênio que inibem a expressão de nefrina, ZO-1,  $\alpha$ 3 $\beta$ 1

integrina e VEGF-1, e estimulam a apoptose, a hipertrofia e o descolamento dos podócitos que são excretados na urina (5,28-30).

Existem evidências que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia estimulam a expressão de TGF $\beta$ , e também estimulam a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona, promovendo apoptose dos podócitos (13, 14,28,30,31,32). A resistência à insulina ocorre na obesidade devido à deficiência de receptores de insulina e de adiponectina e níveis elevados de leptina sérica. A ocupação dos receptores por produtos da glicosilação avançada nos podócitos inibe a produção de energia na mitocôndria na célula epitelial, promove dano endotelial e inflamação (33). Adicionalmente, o tecido adiposo produz citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral, interleucina-1 e interleucina-6, as quais induzem injúria oxidativa no podócito e inibem a transcrição dos genes de proteínas do diafragma em fenda, como a nefrina (28,34). Um mecanismo recentemente descrito por Sharma et al (35) na ORG é a sinalização deficiente da adiponectina para os podócitos. Os podócitos expressam o receptor AdipoR1, e neste estudo experimental com camundongos a falta da ligação da adiponectina a esses receptores promoveu estresse oxidativo via estímulo da Nox4 (NADPH oxidase 4). O tratamento com adiponectina exógena normalizou a proteinúria nesses animais, sugerindo que a adiponectina exerce efeitos protetores sobre os podócitos, restaurando a função destas células.

### **2.2.3 Apresentação clínica da ORG**

Clinicamente, a ORG manifesta-se inicialmente por albuminúria ou proteinúria em nível subnefrótico ou nefrótico, mas mesmo com proteinúria nefrótica (> 3 g/24 h) raramente ocorre hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia, ou seja, é incomum a ORG se apresentar com síndrome nefrótica. Essa apresentação clínica é semelhante a outras formas de GESF secundária, como nefropatia do refluxo e redução da massa renal. Na fase inicial, a filtração glomerular é normal, mas após o desenvolvimento de albuminúria pode ocorrer perda lenta e progressiva da função renal e DRC (3,5,36,37). Os fatores clínicos de risco associados ao desenvolvimento de ORG são principalmente a idade (quinta década), peso corporal, IMC e resistência à insulina, mas IMC >30 kg/m<sup>2</sup> é o fator que se mantém independentemente associado à ORG em análise multivariada (24).

Em um estudo com diabéticos albuminúricos, Zheng et al (38) observaram uma excreção urinária significativamente maior de podocina, podocalixina, alfa-actinina 4, sinaptopodina e CD2-AP em correlação positiva com maior nível de albuminúria e creatinina sérica. Do ponto de vista fisiopatológico, é possível estabelecer a hipótese de que essas alterações também ocorram na ORG, na qual sabidamente ocorre injúria ao podócito, manifestando-se pela redução da expressão dos RNAm associados dos domínios subcelulares do podócito no tecido renal e aumento de sua excreção nas células do sedimento urinário.

#### **2.2.4. Tratamento da GESF associada à obesidade**



O prognóstico da ORG é melhor do que o da GESF primária, mas em longo prazo permanece uma doença de mau prognóstico pelo potencial de evolução para DRCT (23). O principal alvo do tratamento é a redução da injúria ao podócito e da proteinúria, com medidas que incluem perda de peso e controle da hipertensão arterial sistêmica e intra-glomerular, utilizando-se bloqueadores da enzima conversora da angiotensina ou inibidores do receptor da angiotensina (39).

Outras estratégias de terapêuticas incluem redução da insulina circulante e de fatores de crescimento, e também o controle glicêmico (40).

### **2.3. Componentes do filtro glomerular**

O filtro glomerular tem uma seletividade para macromoléculas baseada em carga elétrica e tamanho molecular. Proteínas de alto peso molecular são excluídas do filtrado glomerular, e proteínas pequenas são parcialmente filtradas, podendo ser reabsorvidas no túbulo proximal. A ultrafiltração glomerular ocorre através de três camadas, o endotélio fenestrado (fenestras de 50-100 nm), a membrana basal glomerular (MBG, com espessura de 300 nm) e as células epiteliais ou podócitos, interligados pelo diafragma em fenda (40 nm) adjacente à MBG (12).

Os podócitos são células epiteliais altamente diferenciadas e especializadas, sem capacidade proliferativa, e que tem prolongamentos primários e secundários, denominados pedicelos, os quais cobrem a superfície externa da membrana basal glomerular. Embriologicamente derivam das células mesenquimais, e o corpo celular do podócito maduro situa-se no espaço urinário no

lado luminal, e seus pedicelos (processos podocitários) estão situados no lado oposto estão ancorados à MBG por  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e  $\alpha,\beta$ -dístroglicanos. 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 (13,14). O endotélio fenestrado parece ser muito grande para impor perme-seletividade à macromoléculas, mas em que proporção a camada endotelial, a MBG e os podócitos contribuem para o processo de filtração ainda não é claro (12-15).

### **2.3.1 Estrutura molecular do podócito**

Os podócitos são células polarizadas, carregadas negativamente, e sua forma peculiar e dinamicamente modificável deve-se ao citoesqueleto rico em microfilamentos de F-actina e miosina. O citoesqueleto é constituído por três elementos ultraestruturais: microfilamentos (7-9 nm), filamentos intermediários (10 nm) e microtúbulos (24 nm). Diversas proteínas mantêm a arquitetura podocitária através de ligações com a actina, como a sinaptopodina, que conecta-se com a membrana luminal, e a alfa actinina-4, próxima à membrana basal. A alfa actinina-4 atua na regulação da morfologia e da motilidade do podócito, e também na cascata de sinalização intracelular (16).

Kerjaschki (17) caracterizou os domínios do podócito com base na anatomia molecular de cada segmento, conforme ilustrado no figura 1.

Os espaços entre os processos podocitários são poros de filtração altamente organizados, medindo entre 25 a 60 nm, onde o diafragma em fenda serve de “ponte” entre dois podócitos. Esse diafragma tem 6 nm de espessura e localiza-se 60 nm acima da membrana basal glomerular. Na ultraestrutura, descrita inicialmente por Karnovsky (41), observa-se séries de retângulos que medem 4x14 nm de área que configuram uma estrutura tipo “zíper”, que anatomicamente constituiria uma barreira de tamanho à macromoléculas na função de filtro do glomérulo.

A estrutura molecular do diafragma em fenda inclui um número crescente de proteínas, que estão organizadas em microdomínios funcionais dentro de um componente lipídico e se prendem ao citoesqueleto através de interações com outras proteínas como a CD2 (CD2AP), um ligante da molécula de adesão CD2 (13-15). A seguir são caracterizadas as proteínas mais importantes da célula podocitária.

## 1. Diafragma em fenda

a) Nefrina: descoberta inicialmente por Tryggvason (42), a nefrina é o produto do gene NPHS1, uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas. Contém um domínio extracelular longo com oito repetições tipo imunoglobulina e um módulo de fibronectina tipo III, e um pequeno domínio intracelular. A nefrina interage com a actina, através de proteínas adaptadoras Nck, e com a proteína NEPH1, formando cis-oligômeros heterogêneos. Uma mutação autossômica recessiva da nefrina causa síndrome nefrótica congênita tipo Finlandês, com surgimento de proteinúria ainda intra-útero, que é histologicamente

caracterizada por esclerose mesangial, perda progressiva de função renal e evolução para DRC terminal (42,43).

b) Podocina: o gene NPHS2 codifica a podocina, uma proteína de 42-kDa da família das estomatinas, de localização intracitoplasmática que está associada a componente lipídico e apresenta forma de “grampo de cabelo”. A podocina interage com a nefrina e com a CD2AP, facilitando a sinalização da nefrina. A interação entre nefrina e podocina resulta em uma estreita relação com filamentos de actina, o que deve ocasionar estabilização estrutural do diafragma em fenda (44,45). A mutação do gene NPHS2 está presente em famílias com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) hereditária, expressando-se frequentemente na infância, mas também em adultos. Sua apresentação fenotípica é síndrome nefrótica córtico-resistente com baixo risco de recorrência em transplante renal (46,47).

## 2. Domínio de membrana apical

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devida à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônicas, como a podocalixina, podoplanina e podoendina. Essa carga negativa limita a passagem de albumina, molécula carregada negativamente, e mantém a separação física dos podócitos adjacentes (30).

a) A podocalixina é a maior das sialoproteínas e é uma proteína transmembrana (165-kDa) que pertence a família das sialomucinas, e tem uma importância crítica para a formação e preservação da arquitetura celular dos podócitos, impedindo a adesão das células parietais da cápsula de Bowman aos podócitos (48).

b) O *Transient Receptor Potential Cation Channel Member 6* (TRPC6) está localizado na membrana luminal do podócito. Comunica-se com a alfa-actinina do citoesqueleto sendo assim uma molécula sinalizadora, ao mesmo tempo que mantém a arquitetura do podócito e a integridade do filtro glomerular (49). Múltiplas injúrias renais resultam na desregulação das funções do TRPC6, induzindo proteinúria em glomerulopatias proteinúricas adquiridas (50). Recentemente, Nascimento et al (51) demonstraram em pacientes diabéticos e pré diabéticos aumento da expressão urinária do RNAm de TRPC6 e de outras moléculas específicas do podócito comparado a indivíduos saudáveis. Nos pacientes diabéticos, a nefrinúria foi preditiva de albuminúria patológica, e houve uma correlação positiva e significativa entre o estágio da nefropatia diabética e a nefrinúria.

### 3) Domínio basal

Neste domínio ocorre o ancoramento do podócito na MBG adjacente, através de duas proteínas,  $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e  $\alpha,\beta$ -dístroglicanos. Essas proteínas ligam-se a diversos componentes da membrana, como colágeno IV, fibronectina, laminina e endactina, e também à proteínas do corpo podocitário, como a alfa actinina-4 e a sinaptopodina do citoesqueleto, permitindo que as alterações da membrana basal repercutam na forma e no movimento do podócito (30). A sinaptopodina interage diretamente com a alfa actinina-4 no citoesqueleto, 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 e protegendo a célula epitelial das variações da pressão hidráulica transcápsular glomerular (52).

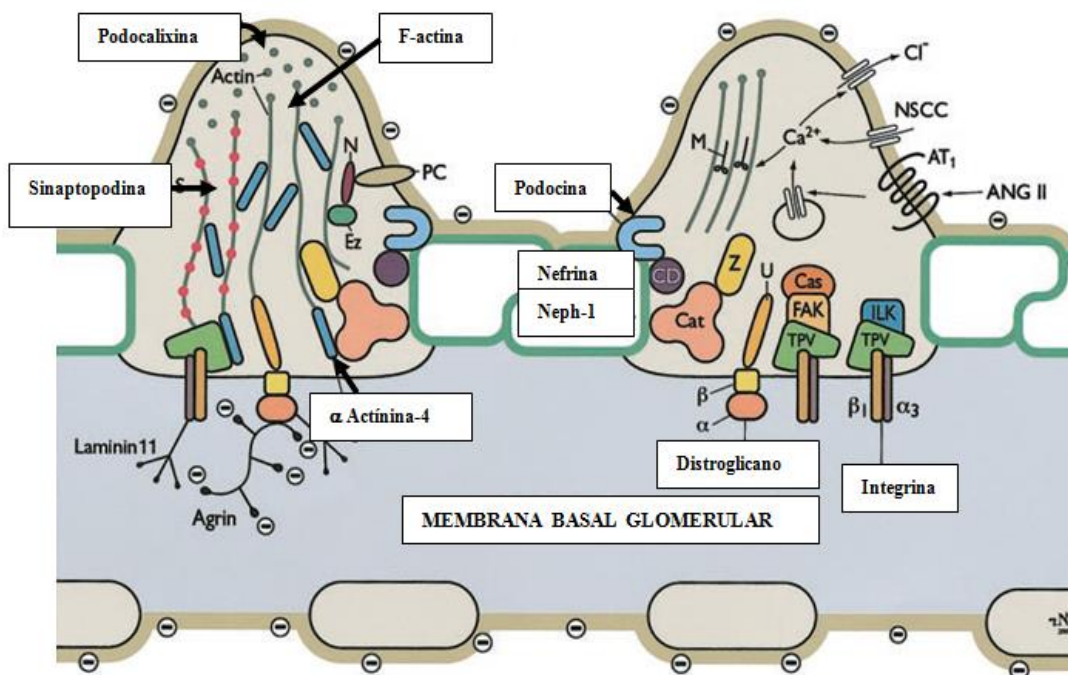


Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas (adaptado de Barisoni e Mundel, referencias 13 e 16).

## 2.4. Fatores de crescimento e sua relação com a podocitopatia

### 2.4.1. Fator de crescimento vascular derivado do endotélio

O fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) expressa-se no glomérulo normal, no podócito e nas células endoteliais. O VEGF pertence a superfamília do fator derivado de plaquetas (PDGF), e é composta por cinco

membros: VEGF (também chamado VEGF-A), PlGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D. Essas proteínas ligam-se a receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) de sinalização intracelular. A sinalização via VEGFR-2 é considerada a mais angiogênica, e o VEGFR-1 é um regulador negativo da angiogênese. O VEGF-B tem um potencial angiogênico muito limitado e está associado ao metabolismo dos lipídios(53).

O VEGF apresenta uma expressão variável no tecido renal em nefropatias como na síndrome nefrótica idiopática: aumentada nas alterações glomerulares mínimas e reduzida na glomerulosclerose segmentar e focal em relação a controles normais; a sua redução confere uma pior evolução clínica aos pacientes com síndrome nefrótica (54).

A administração de VEGF está associada com estabilização da função renal em vários modelos de fibrose renal. Em sua forma endógena o VEGF é relacionado à sobrevivência, proliferação e diferenciação de células endoteliais glomerulares. Essa ação protetora se deve, principalmente, à preservação das estruturas dos capilares glomerulares e peritubulares (55).

#### 2.4.2 Fator de crescimento transformador beta

O fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) está supra-regulado na doença podocitária progressiva, o que resulta do aumento da pressão mecânica das cadeias biomecânicas sobre o podócito. O TGF $\beta$  desencadeia diversos mecanismos pró-fibróticos, entre os quais citam-se os depósitos de proteínas na matriz extra-celular e espessamento da MBG, inibição da degradação das proteínas da matriz, apoptose do podócito e a transição epitélio-mesênquima do

podócito, que em conjunto resultam no desenvolvimento de fibrose renal progressiva (56).

## 2.5. Proteinúria e Glomeruloesclerose

A proteinúria é consequência da fusão e achatamento das células epiteliais podocitárias decorrente da disfunção de diversos segmentos do podócito. A desagregação ou mutação das proteínas do diafragma em fenda (nefrina, podocina, CD2AP, Neph1) (57,58), da interação podócito-MBG (intergrinas, distroglicanos) (59), a reorganização do citoesqueleto ( $\alpha$  actinina-4, sinaptopodina) (60,61) e a perda das cargas negativas (podocalixina) (62) são mecanismos de proteinúria já demonstrados em modelos experimentais e em estudos clínicos.

Após uma injúria sobre o podócito de qualquer natureza (hemodinâmica, imunológica, tóxica, infecciosa ou isquêmica), o podócito maduro apresenta uma capacidade limitada para se dividir e proliferar *in situ*. A depleção podocitária ocorre por três mecanismos: a) necrose, apoptose ou perda de adesão à MBG; b) hipertrofia glomerular e podocitopenia relativa; c) mudança fenotípica do podócito, que torna-se incapaz de manter a sua estrutura e função (65). Em modelos experimentais a reposição da célula podocitária poderia ocorrer, por migração sanguínea de células tronco da medula óssea ou mesmo das células parietais da cápsula de Bowman ao tufo glomerular (30,63).

O mecanismo de glomerulosclerose da forma segmentar e focal não colapsante foi descrito por Kritz e cols (65). A depleção do número de podócitos



resulta em áreas de desnudamento da MBG, e a pressão intracapilar elevada faz com que essas áreas se desloquem em direção à cápsula de Bowman, levando a formação de sinéquias entre as células parietais e as áreas desnudas. O processo de glomerulosclerose segmentar e após esclerose global aí se inicia associado à filtração de proteínas dentro do interstício, contribuindo para a fibrose intersticial que acompanha esse processo, o qual culmina na DRC terminal.

## **2.6. Diagnóstico não invasivo da podocitúria**

Antes de 1995 as proteínas do podócito eram identificadas exclusivamente no tecido renal obtido por biópsia, através de técnicas muito laboriosas como imunofluorescência, imunohistoquímica, TUNEL e hibridização in situ, entre outras. Entretanto, a biópsia renal percutânea é um procedimento invasivo não isento de riscos. O reconhecimento do descolamento dos podócitos da MBG após estabelecida a lesão podocitária e seu “escoamento” na urina abriu novas possibilidades de diagnóstico não invasivo para a detecção de células podocitárias no sedimento urinário, primeiro em modelos experimentais e depois em humanos. Hara e cols. (66-69) detectaram podócitos viáveis e seus produtos proteicos em diversos tipos de glomerulonefrites. Lemley e cols. (70) correlacionaram podocitúria com atividade da nefropatia por IgA, e Patari e cols. (71) detectaram nefrina por Western blot em urina de pacientes diabéticos. Yu e cols. (72), em estudo experimental, sugeriram que a podocitúria não seria apenas um reflexo da proteinúria, mas um marcador ainda mais sensível e específico do que esta para detectar atividade de doença e dano glomerular.

Posteriormente foi possível quantificar o RNA mensageiro (RNAm) de proteínas do podócito em células do sedimento urinário em modelos experimentais (73) e em pacientes com glomerulopatias proteinúricas (74). Nesse estudo, a expressão do RNAm da nefrina e podocina correlacionou-se com o declínio da função renal. Em trabalho experimental recente, Sato e cols. (75) demonstraram a utilidade clínica e a acurácia da podocitúria seriada para diagnóstico e monitorização da progressão da doença glomerular. A podocitúria elevada e persistente apresentou uma correlação positiva com proteinúria e com dano glomerular histologicamente comprovado.

Trabalhos do nosso grupo tem demonstrado a existência de inibição da transcrição gênica de proteínas específicas do podócito no tecido renal (podocitopenia) e aumento da excreção urinária dos RNAm associados ao podócito (podocitúria) em diferentes glomerulopatias primárias e secundárias (Rodrigues et al, *IntJ ClinExp Pathol* 2014: in press). Adicionalmente, o uso de drogas imunossupressoras no tratamento das doenças glomerulares tem efeitos sobre a podocitúria. Neste estudo, verificamos a redução dos níveis urinários dos RNAm associados ao podócito após 6 meses de tratamento imunossupressor, os quais se mantiveram em níveis baixos ao final de um ano de seguimento. Em pacientes com nefropatia diabética e em indivíduos com pré diabetes, demonstramos que a podocitúria apresenta boa correlação com o estágio de doença e tem valor preditivo para proteinúria patológica (51), corroborando o achado de outros autores que também correlacionaram a podocitúria com atividade de doença, evolução clínica pós tratamento e progressão para doença renal crônica (76-78).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Geral**

Avaliar a associação entre obesidade ou sobrepeso e a injúria podocitária, manifestada pelo aumento da expressão urinária do RNA mensageiro (RNAm) de moléculas associadas do podócito.

#### **3.2. Específicos**

1. Quantificar a expressão do RNAm de proteínas associadas ao podócito em células do sedimento urinário de pacientes obesos ou com excesso de peso em relação a indivíduos normais.

2. Determinar a prevalência de glomerulopatia associada à obesidade em uma amostra de pacientes obesos ou com sobrepeso.

3. Correlacionar a expressão urinária do RNAm de proteínas do podócito como nível de albuminúria e taxa de filtração glomerular desses pacientes.

4. Correlacionar a expressão do RNAm de proteínas do podócito com a insulinemia, o índice de resistência à insulina (HOMA), o nível de HbA1C e o marcador de inflamação proteína C reativa.

#### 4. Referências

1. World Health Organization. The World Health Report 2002: Reducing Risk, Promoting Healthy Life, 2002.
2. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2:550-62.
3. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D' Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney Int* 2001; 59:1498-1509.
4. Weinsinger JR, Kempson RL, Eldridge FL, Swenson RS. The nephritic syndrome: a complication of massive obesity. *Ann Intern Med* 1974;81:440-7.
5. Valensi P, Assayag M, Busby M, Pariès J, Lormeau B, Attali JR. Microalbuminuria in obese patients with and without hypertension. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1998; 20: 574-79.
6. Daroucih S, Goucha R, Jaafoura MH, Zekri S, Maiz HB, Kheder A. Clinicopathological Characteristics of Obesity-associated Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Ultrastruct Pathol* 2011; 35: 176-182.
7. Praga M, Morales E. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006Sep(15)5:481-6.
8. Sasatomi Y, Tada M, Uesugi N, Hisano S, Takebayashi IS. Obesity associated with hypertension or hiperlipidemia accelerates renal damage. *Pathobiology* 2001;69:113-8.

9. Ejerblad E, Fored CM, Lindblad P, Fryzek J, McLaughlin JK, Nyrén O. Obesity and risk for chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006;Jun17(6):1695-702.
10. Henegar JR, Bigler AS, Henegar LK, Tyagi SC, Hall JE. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol*.2001;12:1211-7.
11. Levin A, Hemmelgarn B, Culeton B, Tobe S, McFarlane P, Ruzicka M, et al. Guidelines for the management of chronic diseases. *CMAJ*. 2008; 179:1154-62. Disponível em: <http://www.cmaj.ca/cgi/content/full/179/11/1154/DC1>. Acessado em 02 de abril de 2012.
12. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: 579-596.
13. Barisoni L, Mundel P. Podocyte Biology and the Emerging Understanding of Podocyte Disease. *Am J Nephrol* 2003; 23(5): 353-360.4.
14. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83 (1): 253-307.
15. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 271-282.
16. Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997 Oct 10; 236(1): 248-258.

17. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1583-1587.
18. Tavares T, Nunes S, Santos M. Obesidade e qualidade de vida: revisão da literatura. *Rev Med Minas Gerais* 2010; 10: 2027-32.
19. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010; 303:235-41.
20. Yanovski SZ, Yanovski JA. Obesity prevalence in the United States- up, down, or sideways? *N Engl J Med* 2011;364:987-9.
21. Trogdon JG, Finkelstein EA, Feagan CW, Cohen JW. State- and Payer-Specific Estimates of Annual Medical Expenditures Attributable to Obesity. *Obesity* (Silver Spring) 2011, Jun 16. [Epub ahead of print].
22. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. POF 2008-2009: desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional. Available from: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1699&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_pagina=1). Acessado em 12 de julho de 2012.
23. Praga M. Obesity - a neglected culprit in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:1157-1159.
24. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-359.

25. Serra A, Romero R, Lopez DE, Navarro M, Esteve A, Perez N, et al. Renal injury in the extremely obese patients with normal renal function. *Kidney Int.* 2008; 73:947-955.
26. Goumenos DS, Kawar B, El Nahas M, Conti S, Wagner B, Spyropoulos C, et al. Early histological changes in the kidney of people with morbid obesity. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:3732-3738.
27. Kato S, Nazneen A, Nakashima Y, Razzaque MS, Nishino T, Furuu A, et al. Pathological influence of obesity on renal structural changes in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13: 332-40.
28. D'Elia JA, Roshan B, Maski M, Weinrauch LA. Manifestation of renal disease in obesity: pathophysiology of obesity-related dysfunction of the kidney. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2009; 2: 39-49.
29. Benigni A, Gagliardini E, Remuzzi G. Changes in glomerular permselectivity induced by angiotensin II imply podocyte dysfunction and slit diaphragm protein rearrangement. *Semin Nephrol* 2004; 24: 131-140.
30. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei Cas A, Thomas SM, Viberti G, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2645-55.
31. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role of proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69: 2131-2147.

32. Sarafidis PA, Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol* 2006; 26: 232-44.
33. Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, et al. Glucose, glycation, and RAGE: Implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1383-95.
34. Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, Hiramatsu N, Kasai A, Okamura M, et al. Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS letter* 2007; 581:3 421-6.
35. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1645-1656.
36. Praga M, Hernández E, Morales E, Campos AP, Valero MA, Martínez MA, et al. Clinical features and long-term outcome of obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:1790-1798.
37. Adelman RD, Restaino IG, Alon USA, Blowey DL. Proteinuria and focal segmental glomerulosclerosis in severely obese adolescents. *J Pediatr* 2001; 138: 481-485.
38. Zheng M, Lv LL, Ni JJ, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* 2011; 6: e20431.



39. Praga M, Hernández E, Andrés A, León M, Ruilope LM, Rodicio JL. Effects of body-weight loss and captopril treatment on proteinuria associated with obesity. *Nephron* 1995; 70: 35-41.
40. Reiser J, Gupta V, Kistler AD. Toward the development of podocyte-specific drugs. *Kidney Int* 2010; 77: 662-68.
41. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1972; 2: 35-60.
42. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: Nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2440-2445.
43. 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.
44. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm. *Am J Pathol* 2002; 161: 1459 -1466.
45. Schwarz K, Simons M, 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: 1583-1587.
46. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2 encoding the glomerular protein podocin is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-354.

47. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tête MJ, Legendre C, et al. NPHS2 mutation analysis show genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post transplant recurrence. *Kidney Int* 2004; 65:1026-1030.
48. 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.
49. Dryer SE, Reiser J: TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299:689–701.
50. 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.
51. 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.
52. Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 2005; 115: 1188-1198.
53. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. Glomerular Endothelial Cells Are Maintained by Vascular Endothelial Growth Factor in the Adult Kidney. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 43-54.

54. Ostalska-Nowicka D, Malinska A, Zabel M, Witkiewicz, Nowicki M. Nephrotic syndrome unfavorable course correlates with downregulation of podocyte vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2. *Folia Histochem Cytobiol* 2011; 49: 472-478.
55. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 1996; 7: 661-666.
56. Lee HS. Pathogenic role of TGF- $\beta$  in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol* 2011; 26:107-16.
57. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 946-956.
58. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of Podocyte-Associated Molecules in Acquired Human Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2063-2071.
59. Kretzler M. Regulation of adhesive interaction between podocytes and glomerular basement membrane. *Microsc Res Technol* 2002; 57: 247-253.
60. Kos CH, Le 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: 1683-1690.

61. Kimura M, Toyoda M, Kato M, Kobayashi K, Abe M, Kobayashi T, et al. Expression of Alpha-actinin 4 in Human Diabetic Nephropathy. *Intern Med* 2008; 47: 1099-1106.
62. Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, Panagopoulou E, Marinos E, Kershaw DB, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci* 2004; 117: 3281-3294.
63. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 2007; 71: 1205-1214.
64. Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffrey R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport's syndrome. *Stem Cells* 2006; 24: 2448-2455.
65. Kritz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Koepfen-Hageman I, et al. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1994; 45: S64-S72.
66. Haram M, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Matsumoto M, Yamamoto T, et al. Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 43-48.
67. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebiara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-1383.

68. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal glomerulosclerosis. *Nephron* 2001; 89: 342-347.
69. 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: 231-238.
70. 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.
71. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthöfer H. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969-2974.
72. 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.
73. Kim YH, Goyal M, Kurnit DM, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 2001; 60: 957-968.
74. 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.

75. 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.
76. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007; 106:61-66;
77. 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;
78. 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.

## 6. Artigo em português

### **Obesidade mórbida, hiperinsulinemia e inflamação estão associados a injúria podocitária em indivíduos obesos**

Sane Vianna Pereira<sup>1</sup>, Mariane dos Santos<sup>1</sup>, Patrícia Garcia Rodrigues<sup>1</sup>, Jonathan Fraportti do Nascimento<sup>2</sup>, João Rodolfo Teló Timm<sup>1</sup>, Rogério Friedman<sup>2</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,3</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 Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>3</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, RS, CEP 90035-003, Brasil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.ufrgs.br

Título resumido: Obesidade e injúria podocitária

Número de tabelas: 3

Número de figuras: 3

## Resumo

**Objetivos:** A obesidade está associada a lesões glomerulares e injúria ao podócito. O objetivo deste estudo foi correlacionar diferentes graus de obesidade e sobrepeso com a expressão dos RNAm associados ao podócito, e determinar a relação entre podocitúria e parâmetros metabólicos e inflamatórios nesta população de pacientes.

**Material e Métodos:** Foram estudados 83 pacientes com obesidade grau I, II ou III ou sobrepeso, e como controles 18 indivíduos saudáveis. A expressão do RNA mensageiro (RNAm) urinário da nefrina podocina, podocalixina, alfa actinina-4,  $\alpha 3\beta 1$  integrina, e dos fatores de crescimento derivado do endotélio (VEGF-A) e transformador beta ( $TGF\beta_1$ ) foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT). O RNAm dos genes foi correlacionado com o índice de massa corporal (IMC), parâmetros de síndrome metabólica, albuminúria e inflamação.

**Resultados:** Vinte e um (20,8%) pacientes tinham sobrepeso, 12(11,9%) obesidade grau I, 10(9,9%) obesidade grau II e 40(39,6%) obesidade grau III. Obesos grau III tinham maiores níveis de lipídios, glicemia, HbA1C, resistência insulínica e proteína C reativa ( $p < 0,05$ ), com critérios de síndrome metabólica em 33% dos casos ( $p = 0,003$  vs. demais grupos). Albuminúria acima de 30 mg/g creatinina foi observada em 14%, 8%, 10% e 23% dos pacientes com sobrepeso, obesidade grau I, II e III respectivamente ( $p = 0,548$ ). A expressão de todos os RNAm associados ao podócito variou com o IMC, sendo significativamente maior nos obesos grau III em relação aos controles e demais pacientes ( $p < 0,05$ ); pacientes



com sobrepeso, obesidade grau I ou grau II, quando comparados aos controles, também tiveram maior expressão do RNAm de alguns genes: nefrina ( $p=0,021$ ), alfa actinina-4 ( $p=0,014$ ),  $\alpha 3\beta 1$ integrina ( $p=0,036$ ) e  $TGF\beta_1$  ( $p=0,005$ ). Pacientes hiperinsulinêmicos e aqueles com nível elevado de proteína C reativa, compatível com inflamação sistêmica, também tiveram maior grau de podocitúria.

Conclusão: Pacientes com obesidade mórbida apresentaram maior grau de podocitúria mesmo quando a albuminúria era normal, sugerindo que a detecção dos produtos do podócito na urina pode indicar injúria precoce às células epiteliais glomerulares na obesidade grave. Hiperinsulinemia e inflamação sistêmica também se correlacionaram com maior grau de podocitúria.

**Palavras-chave:** obesidade, lesão glomerular, podócito, albuminúria, síndrome metabólica, inflamação sistêmica

## Introdução

Nas últimas décadas, a epidemia de obesidade tem levado a um aumento da incidência da glomerulopatia associada à obesidade (ORG), manifestada clinicamente por proteinúria e perda de função renal, e histologicamente por glomerulomegalia e esclerose glomerular (1).

Tem sido descrita a correlação entre índice de massa corporal e glomerulomegalia, o que sugere uma resposta mal-adaptativa da hemodinâmica renal à obesidade. A hiperfiltração e o estresse mecânico sobre o capilar glomerular alteram a morfologia e a função do podócito, que se descola da membrana basal glomerular (MBG) e é excretado na urina. O desnudamento da MBG leva à formação de sinéquias e esclerose glomerular na forma de glomeruloesclerose segmentar e focal (1-3). São mediadores desse estresse mecânico fatores de crescimento, como TGF- $\beta$  e VEGF-1, que inibem a expressão do RNAm de proteínas dos microdomínios do podócito, como a nefrina, podocina, podocalixina, alfa actinina-4 e  $\alpha 3\beta 1$  integrina (1,4).

Existem evidências que a resistência à insulina e a hiperinsulinemia em indivíduos obesos estimulam a expressão de TGF $\beta$  e ativam o sistema renina-angiotensina-aldosterona, promovendo lesão e apoptose dos podócitos (5). Adicionalmente, o tecido adiposo produz citocinas pró-inflamatórias que induzem injúria oxidativa podocitária e inibem a transcrição dos RNAm associados ao podócito (4,6).

O grau de injúria podocitária pode ter correlação com a gravidade da obesidade, ou em uma fase mais precoce da doença, com sobrepeso, o que ainda

não foi estudado em nosso meio. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi correlacionar diferentes graus de obesidade e sobrepeso com a expressão dos RNAm associados ao podócito na urina, buscando evidenciar dano podocitário na ausência de glomerulopatia clinicamente manifesta. A relação entre podocitúria e albuminúria, função renal e síndrome metabólica também foi estudada nestes indivíduos obesos e com sobrepeso.

## **Materiais e Métodos**

### *Pacientes*

Este estudo transversal incluiu 83 pacientes portadores de obesidade ou sobrepeso procedentes das unidades ambulatoriais do Serviço de Nefrologia e Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de março de 2012 a setembro de 2013. Utilizou-se a classificação do Índice de Massa Corporal da Organização Mundial da Saúde (7) em kg/m<sup>2</sup>: sobrepeso (25 à 29,9), obesidade grau I (30 à 34,9), obesidade grau II (35 à 39,9) e obesidade grau III (acima de 40). considerando controles os pacientes com IMC de (18,5 à 24,9). Pacientes com diagnóstico de diabetes mellitus ou com evidência clínica e laboratorial de nefropatia prévia foram excluídos do estudo.

Foram incluídos no grupo controle indivíduos saudáveis com IMC  $\leq 24,9$  kg/m<sup>2</sup>, sem história pessoal ou familiar de doença renal, com pressão arterial <149x90 mmHg, taxa de filtração glomerular estimada maior que 90 e ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, e ausência de hematúria ou proteinúria no exame comum de urina. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, em conformidade com a

Declaração de Helsinki de 1975, e todos os participantes assinaram, previamente a sua inclusão, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### *Dados demográficos e clínicos*

Foram coletados dados de idade, sexo, raça, nível de pressão arterial sistólica (PAS) e de pressão arterial diastólica (PAD), existência de edema periférico, medicações em uso. Síndrome metabólica foi definida pela presença de obesidade central (circunferência da cintura > 88 cm para mulheres ou > 102 cm para homens), colesterol HDL <40 mg/dL (homens) ou < 50 mg/dL (mulheres), triglicerídeos >150 mg/dL e glicemia de jejum alterada (100-125 mg/dL) (8). Os níveis séricos de insulina foram mensurados por quimioluminescência, com valores de referência entre 3,0 a 25,0  $\mu$ U/mL. O Índice de Resistência à Insulina (HOMA-IR) foi calculado através da fórmula:  $(\text{glicemia de jejum (mg/dL)}/18) \times (\text{insulina de jejum } (\mu\text{gU/mL}))/22,5$ , considerando-se resistência insulínica como valores de HOMA-IR superiores a 2,5 (9).

A creatinina sérica e urinária foram mensuradas pelo método de Jaffe automatizado (Modular P Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), e a taxa de filtração glomerular foi estimada (TFGe) pela equação do CKD-EPI. Hiperfiltração glomerular foi considerada como TFGe superior a 130 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>(10). A concentração urinária de albumina em uma amostra casual foi mensurada por imunoturbidimetria, e os resultados da albuminúria são apresentados como albumina em mg/grama de creatinina (normal: < 30 mg/g creat; microalbuminúria: 30-300 mg/g creat; macroalbuminúria: > 300 mg/g creat). A hemoglobina glicada

(HbA1C) foi dosada por *High Performance Liquid Chromatography* e expressa em porcentagem, conforme o *National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)*, e foi utilizada como medida do controle glicêmico. O colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram mensurados por ensaio enzimático colorimétrico e o colesterol LDL pela fórmula de Friedwald. A proteína C reativa ultra-sensível foi mensurada pelo método de imunoturbidimetria, e a presença de inflamação sistêmica foi definida por valores superiores a 3 mg/L.

#### *Quantificação dos RNAm associados ao podócito*

A quantificação do RNAm das proteínas associadas ao podócito foi feita pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT) em células do sedimento urinário, provenientes de uma amostra matinal de urina (toda a micção), conforme previamente descrito (11). Foram analisados os genes da nefrina, podocina, podocalixina, alfa actinina-4 e  $\alpha 3\beta 1$  integrina. O RNAm do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e do fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- $\beta_1$ ) foi utilizado como marcador de proliferação endotelial e de fibrose intra-renal, respectivamente. O aumento da expressão dos RNAm na urina destas moléculas foi definido em relação ao nível do RNAm detectado nas amostras do grupo controle (12).

Em resumo, para a extração do RNAm foi utilizado QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA total foi feita com Nano'Drop® 1000

Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a pureza do RNA foi determinada como razão de absorvâncias 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 uL. Para a PCR-RT foi utilizado o Taqman Universal PCR Master Mix, composto pelo AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA polymerase, Amperase UNG, referencia 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): NPSH1, nefrina (ID:HS00190446\_m1); NPSH2, podocina (ID: Hs00387817\_m1); podocalixina (ID:Hs01574644\_m1);  $\alpha$ 3 $\beta$ 1integrina (ID: Hs00989190\_m1); alfa actinina-4 (ID:Hs00245168\_m1); VEGF-A (ID:HS00173626\_m1) e TGF $\beta$ <sub>1</sub> (ID: HS00998133\_m1), de acordo com as instruções do fabricante. O controle endógeno utilizado foi o 18s rRNA (Taqman<sup>®</sup> PDAR) para normalização das amostras. A técnica do PCR em tempo renal foi realizada em duplicata em placas com 96 poços com 2 uL de cDNA. As condições térmicas dos ciclos foram 50°C por 2 minutos, 60°C por 30 minutos seguidos por 95°C por 5 minutos, e 40 ciclos usando temperaturas de 94°C por 20 segundos e 62°C por 60 segundos. Os dados foram coletados no termociclador ABI PRISM 7000 SDS (Applied Bioystems, Foster City, CA, USA). A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi realizada usando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde o valor do CT (*threshold cycle*) corresponde ao ponto onde ocorre um aumento estatisticamente significativo da fluorescência.

### *Análise estatística*

Os dados são apresentados como frequência absoluta e porcentagem, média±desvio padrão (DP), ou mediana e percentis (P25-P75). A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste do Qui-quadrado ou exato de Fisher. Os valores do RNA foram logaritmizados para redução da assimetria. A comparação de variáveis contínuas foi feita por ANOVA ou Kruskal Wallis. O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para estabelecer o grau de correlação dos RNAm associados ao podócito entre si, e dos RNAm com parâmetros metabólicos, albuminúria, função renal e inflamação. Todas as análises foram realizadas pelo software SPSS for Windows (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). O nível de significância foi estabelecido como P menor que 0,05.

## **Resultados**

### *Perfil clínico e metabólico dos pacientes com sobrepeso ou obesidade*

A amostra foi constituída por 101 indivíduos, sendo 83 casos e 18 controles. Os dados demográficos e clínicos dos casos e controles são apresentados na tabela 1. Pela classificação do IMC, 21(20,8%) pacientes tinham sobrepeso, 12(11,9%) obesidade grau I, 10(9,9%) obesidade grau II e 40(39,6%) obesidade grau III. Quinze (18%) pacientes com obesidade apresentaram edema discreto (+ a ++/4+). Estavam em uso de inibidores da angiotensina 33(40%) pacientes com sobrepeso ou obesidade, sendo que 22(27%) eram obesos grau III ( $p=0,001$ ).

Houve diferença significativa entre pacientes com obesidade grau II ou III em relação aos controles quanto a pressão arterial sistólica e diastólica. A TFG<sub>e</sub> não diferiu entre casos e controles; nenhum indivíduo obeso apresentou doença renal crônica, definida por TFG<sub>e</sub> <60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, e três obesos grau III apresentaram TFG<sub>e</sub> superior a 130 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, sendo considerados hiperfiltrantes. Albuminúria acima de 30 mg/g creatinina foi observada em 14%, 8%, 10% e 23% dos pacientes com sobrepeso, obesidade grau I, II e III respectivamente (p=0,548). Dez pacientes apresentavam microalbuminúria e quatro macroalbuminúria (665, 955, 1034 e 2022 mg/g creatinina), sendo estes obesos grau III.

A prevalência do estado microinflamatório variou de 50% a 88% nas três categorias de obesidade (p<0,001). Os maiores níveis de PCR<sub>us</sub> foram nos casos de obesidade mórbida, com mediana de 12,6(6,3-18,0) mg/L (tabela 1).

Os dados do perfil metabólico são mostrados na tabela 2. Síndrome metabólica foi diagnosticada em 0, 25, 10 e 33% dos pacientes com sobrepeso, obesidade grau I, II e III respectivamente (p=0,003). Para fins de comparação, os pacientes com sobrepeso, obesos grau I ou II foram agrupados, pois não houve diferenças significativas nos parâmetros metabólicos entre estes pacientes. Obesos grau III diferiram significativamente dos controles (exceto TFG<sub>e</sub> e albuminúria) em todos os parâmetros metabólicos (p<0,05), e do grupo do sobrepeso, obesidade I ou II na glicemia, HbA1C, insulinemia, HOMA-IR e PCR<sub>us</sub> (p<0,05), o que demonstra o perfil metabólico mais grave dos obesos mórbidos. O grupo do sobrepeso, obesidade I ou II em comparação com os controles tiveram níveis maiores de colesterol total, HDL e LDL colesterol, insulina sérica, HOMA-IR e PCR<sub>us</sub> (p<0,05), mas não diferiram na glicemia, HbA1C e triglicérides.



*Expressão dos RNAm associados ao podócito na urina dos pacientes com sobrepeso ou obesos*

Como a expressão dos RNAm associados ao podócito na urina não diferiu significativamente entre pacientes com sobrepeso, obesos grau I ou II (exceto maior expressão de nefrina, podocina e podocalixina nos obesos grau II), estes casos foram agrupados para fins de comparação. Nas figuras 1, 2 e 3 são apresentadas as medianas e percentis dos RNAm do podócito grupo composto, obesos grau III e indivíduos saudáveis. A expressão dos RNAm associados ao podócito na urina foi associada com três parâmetros: maior índice de massa corporal, hiperinsulinemia e inflamação. Comparando obesos mórbidos com os demais grupos, o nível de podocitúria foi significativamente maior para todos os genes estudados, incluindo o fator de crescimento endotelial (VEGF-A) e o gene associado a fibrose ( $TGF\beta_1$ ). Os obesos mórbidos apresentaram os maiores índices de RNAm, tanto em relação ao grupo composto quanto aos controles. Quatro genes foram mais expressos na urina dos pacientes com obesidade menos severa (I ou II) ou sobrepeso em relação aos controles: nefrina ( $p=0,021$ ), alfa actinina-4 ( $p=0,014$ ),  $\alpha 3\beta 1$  integrina ( $p=0,036$ ) e  $TGF\beta_1$  ( $p=0,005$ ). Nos pacientes inflamados, foram observados maiores níveis do RNAm de todos os genes (com uma tendência para podocalixina e VEGF-A). Pacientes com hiperinsulinemia tiveram maiores níveis urinários de nefrina ( $p<0,001$ ), podocina ( $p=0,026$ ), podocalixina ( $p=0,16$ ) e VEGF-A ( $p=0,027$ ). Não houve associação entre expressão gênica das moléculas associadas ao podócito com função renal e HOMA-IR. Em

relação a albuminúria, somente a nefrinúria associou-se com níveis maiores que 30 mg/g creatinina ( $p=0,039$ ).

*Correlações de Spearman dos RNAm associados ao podócito com parâmetros metabólicos e inflamação nos pacientes com sobrepeso ou obesos*

A correlação da expressão urinária dos genes entre si foi forte, variando entre 0,635 e 0,861, com valores de  $p$  sempre inferiores a 0,001. Na tabela 3 são apresentados os valores do coeficiente de Spearman e respectivos valores de  $p$  para as correlações dos RNAm do podócito com glicemia, HbA1C, insulina e PCRus. Estas correlações dos RNAm do podócito com o perfil metabólico dos pacientes e inflamação foram fracas, mas significativas.

## **Discussão**

O aumento dramático da incidência de obesidade em todo mundo tem direcionado a atenção da comunidade científica para as complicações desta doença, não só cardiovasculares e metabólicas, mas também renais como a doença renal crônica (3). A ligação entre obesidade mórbida, proteinúria e doença glomerular foi estabelecida por Weisinger et al em 1974 (13). Esta condição, posteriormente denominada Obesity-related glomerulopathy (ORG), foi caracterizada em adultos obesos como tendo incidência crescente, proteinúria usualmente não nefrótica, fusão dos pedicelos do podócito, glomerulomegalia seguida de esclerose segmentar e focal e progressão para insuficiência renal

crônica (14). Com o aumento do IMC ocorre hipertrofia e hiperfiltração glomerular decorrente da grande demanda metabólica, gerando estresse mecânico sobre a parede do capilar glomerular e injúria às células epiteliais podocitárias. Quando a hipertrofia do podócito torna-se desproporcional à glomerulomegalia, ocorre descolamento do podócito da membrana basal glomerular e sua excreção na urina (2,4). A redução do número e densidade dos podócitos pela fusão e alargamento dos pedicelos, com redução da frequência dos poros do diafragma em fenda, são as principais alterações ultra-estruturais descritas na ORG (15,16).

A análise molecular dos produtos subcelulares do podócito na urina na obesidade e na síndrome metabólica tem sido pouco estudada. Em estudo prévio (11), observamos que indivíduos obesos com pré-diabetes mas sem microalbuminúria, com média de IMC de 32 kg/m<sup>2</sup> e glicemia de 107 mg/dL, tiveram maior expressão urinária de podocina, podocalixina, alfa actinina-4 e TGFβ<sub>1</sub> comparado a indivíduos saudáveis, suscitando a hipótese que uma injúria podocitária precoce poderia estar associada a alterações metabólicas. No presente estudo, em 73% dos obesos grau III com albuminúria normal foram detectados RNAm de produtos do podócito na urina. Na sua maioria, estes pacientes tinham maiores níveis de lipídios e HbA1C, resistência insulínica e inflamação sistêmica. Wu et al (17) demonstraram aumento da expressão de micro-RNAs de genes candidatos associados a ORG, relacionados ao metabolismo dos lipídios, citocinas inflamatórias e resistência insulínica. Interessante observar que genes associados a modulação da matriz extracelular e do endotélio vascular, como o TGFβ<sub>1</sub> e o VEGF respectivamente, também estavam supra-regulados no tecido renal daqueles pacientes com ORG.

Estudos tem mostrado uma forte associação entre IMC e doença renal crônica (DRC). Dados da coorte de Framingham (18) mostraram que, para cada aumento de 1 desvio padrão do IMC, controlando para idade, diabetes mellitus, tabagismo e TFGe basal, a incidência de TFGe  $<60$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> aumentava em 21%. Hsu et al (19) avaliaram 320 mil indivíduos adultos, constatando que, em relação ao IMC ideal, o risco relativo de DRC terminal para obesidade grau I, II e III era de 3,57, 6,12 e 7,07 respectivamente, ajustado para pressão arterial basal e diabetes mellitus. Nosso estudo mostrou uma nítida relação entre IMC e podocitúria, definida pelo aumento do RNAm de proteínas específicas do podócito na urina em relação a indivíduos saudáveis. Entretanto, não houve associação entre podocitúria e hiperfiltração glomerular, albuminúria ou nível de TFGe, o que pode ser explicado por estas alterações terem sido detectadas em uma fase muito precoce e subclínica da lesão glomerular. O seriamento longitudinal da proteinúria, da função renal e da podocitúria nesta amostra de pacientes é fundamental para sustentar a existência de uma potencial associação.

Um estado microinflamatório de baixa intensidade está presente na obesidade, que tem sido associado a deficiência de adiponectina e ativação do Fator Nuclear Kappa B (NFkB) pró-inflamatório. O NFkB ativa os genes da cascata inflamatória produzindo citocinas pró-inflamatórias como TNF $\alpha$ , IL-6 e a PCR, e adipocinas como a leptina e a resistina (4). Citocinas produzidas por macrófagos, como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , inibem a transcrição gênica de nefrina no podócito glomerular instabilizando o diafragma em fenda (20). Também é possível que a inflamação sistêmica contribua para a expansão do mesângio glomerular e acelere o processo de glomeruloesclerose e a insuficiência renal. Dois estudos clínicos sugerem que

pacientes obesos com glomerulopatias primárias evoluem pior que pacientes glomerulopatas não obesos (21,22). No estudo de Bonnett et al (22), pacientes obesos portadores de Nefropatia por IgA apresentaram maior grau de proteinúria, dano histológico crônico e evolução para diálise comparado aos pacientes com IgA não obesos.

A PCR, marcador de inflamação e lesão vascular, está sabidamente elevada na obesidade visceral. Em nosso estudo, 76% dos pacientes com IMC  $>30$  kg/m<sup>2</sup> tiveram PCRus  $>3$  mg/L, mostrando uma clara associação da obesidade com inflamação. Estes pacientes, que não eram portadores de glomerulopatias prévias, tiveram os produtos do podócito significativamente mais elevados na urina do que os pacientes não inflamados. É difícil interpretar esse achado no contexto clínico da obesidade mórbida, pois pode representar apenas um epifenômeno sem associação direta com a fisiopatogenia da lesão glomerular que ocorre na ORG. O que parece evidente, entretanto, é a relação quantitativa entre IMC e injúria podocitária.

A associação entre podocitúria e hiperinsulinismo, embora não tão marcada, também foi observada em nosso estudo. A resistência insulínica exerce um papel essencial na proteinúria relacionada à obesidade (23), mas não é claro como a intolerância a glicose e a hiperinsulinemia ocasionam dano ao podócito. A insulina estimula a expressão de TGF $\beta$  e aumenta a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona promovendo apoptose de podócitos, mas por vias de sinalização ainda desconhecidas (5). Postula-se que o efeito da resistência insulínica sobre o podócito seja mediado pela secreção de fatores de crescimento e

hipertrofia glomerular, ou indiretamente pela redução dos níveis de adiponectina (24). No presente estudo, pacientes obesos grau III apresentavam hiperinsulinemia e resistência insulínica, que foi associada a maior excreção urinária de nefrina, podocina, podocalixina e VEGF-A. Em conjunto com outros fatores metabólicos e alterações hemodinâmicas glomerulares intrínsecas da obesidade mórbida, é possível que estes achados sinalizem a ação deletéria que a insulina exerce sobre o podócito. Em modelos experimentais é possível demonstrar a reversibilidade destas alterações. Por exemplo, o uso de rosiglitazona (25) estimulou a captação de glicose pelo podócito e aumentou a sua estabilidade na MBG. Em outro estudo, a rosuvastatina melhorou a permeabilidade do filtro glomerular reduzindo a albuminúria, o que talvez esteja associado à redução da resistência insulínica e do estresse oxidativo sobre o podócito (26).

A hiperglicemia modula a adesão celular e as subunidades das integrinas, desregulando a interação do podócito com a MBG, a qual é mantida pela  $\alpha 3\beta 1$  integrina e pelos distroglicanos. A síndrome metabólica induz ruptura deste contato e consequente descolamento do podócito para o espaço de Bowman (27). Na obesidade, o estresse mecânico sobre a parede capilar estimula a secreção de TGF $\beta$ , citocina indutora de fibrogênese, a qual inibe a expressão tecidual de  $\alpha 3\beta 1$  integrina promovendo o descolamento do podócito para a urina (28). No presente estudo, o aumento do RNAm da  $\alpha 3\beta 1$  integrina e do TGF $\beta$  na urina, detectado em pacientes com sobrepeso e em obesos de qualquer grau, pode ser o resultado desses mecanismos operando ativamente nos capilares glomerulares. Outros fatores humorais associados à obesidade, como leptina e hiperinsulinemia,

também contribuem para o aumento da matriz extracelular e glomerulomegalia através do estímulo de fatores de crescimento como o VEGF e TGF $\beta$  (29).

Limitações deste estudo incluem um número relativamente pequeno de pacientes em cada categoria de IMC, o que potencialmente influencia correlações que não foram significativas, por exemplo com outros parâmetros da síndrome metabólica, albuminúria e taxa de filtração glomerular. Por questões éticas, não pudemos determinar a prevalência de ORG nesta população de pacientes, uma vez que não existe indicação clínica de biópsia renal. Para o estudo da podocitopatia da ORG, é fundamental correlacioná-la com as alterações histológicas e da ultraestrutura do rim, que definem a presença da doença em obesos. Por outro lado, o diagnóstico não invasivo da podocitúria nestes pacientes, através da identificação de produtos do podócito na urina, pode permitir um diagnóstico precoce de dano glomerular e sinalizar novos alvos terapêuticos a serem explorados para prevenção da ORG.

Em conclusão, pacientes com obesidade mórbida apresentaram maior grau de podocitúria mesmo com níveis normais de albuminúria, sugerindo que a detecção dos produtos do podócito na urina pode indicar injúria precoce às células epiteliais glomerulares na obesidade grave. Parâmetros metabólicos e inflamatórios, como hiperinsulinemia e proteína C reativa, também se correlacionaram com maior grau de podocitúria, mesmo nos pacientes com sobrepeso ou obesidade grau I e II.

Reconhecimentos

Os autores agradecem ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) pelo suporte financeiro, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado destinada a Sane Vianna Pereira, e ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à Nefrologia do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte técnico.

Conflitos de interesse: Não há conflitos de interesse.

## **Referencias**

1. Darouich S, Goucha R, Jaafoura MH, Zekri S, Maiz HB, Kheder A. Clinicopathological Characteristics of Obesity-associated Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Ultrastruct Pathol* 2011; 35: 176-182.
2. Praga M. Sinergy of low nephron number and obesity: a new focus on hyperfiltration nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2594-2597.
3. Wickman C, Kramer H. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. *Semin Nephrol* 2013; 33: 14-22.
4. D'Elia JA, Roshan B, Maski M, Weinrauch LA. Manifestation of renal disease in obesity: pathophysiology of obesity-related dysfunction of the kidney. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2009; 2: 39-49.



5. Sarafidis PA, Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol* 2006; 26: 232-244.
6. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1645-1656.
7. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: 1-253.
8. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, valuation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.
9. Guiringhello MT, Vieira JG, Tachibana TT, Ferrer C, Maciel RMB, Amioka PHC et al. Distribution of HOMA-IR in brazilian subjects with different body mass indexes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50:573-574.
10. Soares AA, Prates AB, Weinert LS, Veronese FV, de Azevedo MJ, Silveiro SP. Reference values for glomerular filtration rate in healthy Brazilian adults. *BMC Nephrol* 2013; 14:54.doi: 10.1186/1471-2369-14-54.
11. 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.

12. 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.

13. Weisinger JR, Kempson RL, Eldridge FL, Swenson RS. The nephrotic syndrome: a complication of massive obesity. *Ann Int Med* 1974; 81: 440-447.

14. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D' Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney Int* 2001; 59:1498-1509.

15. Chen HM, Liu ZH, Zeng CH, Li SJ, Wang QW, Li LS. Podocyte Lesions in Patients With Obesity-Related Glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 2006; 48:722-729.

16. Goumenos DS, Kawar B, El Nahas M, Conti S, Wagner B, Spyropoulos C, et al. Early histological changes in the kidney of people with morbid obesity. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3732-3738.

17. Wu Y, Liu Z, Xiang Z, Zeng C, Chen Z, Xiaojing M, et al. Obesity-Related Glomerulopathy: Insights from Gene Expression Profiles of the Glomeruli Derived from Renal Biopsy Samples. *Endocrinology* 2006; 147: 44-50.

18. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culleton B, Wilson PW, Levy D. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* 2004; 291: 844-850.

19. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 2006; 144: 21-28.
20. Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, Hiramatsu N, Kasai A, Okamura M, et al. Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS Lett* 2007; 581: 421-426.
21. Kato S, Nazneen A, Nakashima Y, Razzaque MS, Nishino T, Furuu A, et al. Pathological influence of obesity on renal structural changes in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13: 332-340
22. Bonnett F, Deprele C, Sassolas A, Moulin P, Alamartine E, Berthezène F, et al. Excessive body weight as a new risk factor for clinical and pathological progression in primary IgA nephritis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 1-12.
23. Matsumoto H, Nakao T, Okada T, et al. Insulin resistance contributes to obesity-related proteinuria. *Intern Med* 2005; 44: 548-553.
24. Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and hemodynamic factors in podocyte injury in diabetes. *Diabetes Metab Res rev* 2011; 27: 207-215.
25. Lennon R, Welsh GI, Singh A, et al. Rosiglitazone enhances glucose uptake in glomerular podocytes using the glucose transporter GLUT1. *Diabetologia* 2009; 52: 1944-1952.

26. Whaley-Connell A, DeMARco VG, Lastra G, Manrique C, Nistala R, Cooper SA et al. Insulin resistance, Oxidative Stress, and Podocyte Injury: Role of Rosuvastatin Modulation of Filtration Barrier Injury. *Am J Nephrol* 2008; 28: 67-75.
27. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 2345-2353.
28. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei Cas A, Thomas SM, Viberti G, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2645-2655.
29. Chen S, Kasama Y, Lee JS, jim B, Marin M, Ziyadeh FN. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor -beta1 in mouse podocytes. *Diabetes* 2004; 53: 2939-2949.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos de casos e controles

	<i>Sobrepeso</i>	<i>Obesidade Grau I</i>	<i>Obesidade Grau II</i>	<i>Obesidade Grau III</i>	<i>Controles</i>	<i>p</i>
N	21	12	10	40	18	
Idade (anos)	46 ± 9	50 ± 15	50 ± 10	44 ± 11	41±9	0,102
Sexo (feminino)	11 (52)	10 (83)	9 (90)	33 (83)	12 (67)	0,072
Raça (branca)	18 (86)	12 (100)	8 (80)	38 (95)	18 (89)	0,312
PAS (mmHg)	121 ± 6	120 ± 3	132 ±21	127 ±10	110 ± 5	0,010
PAD (mmHg)	77 d± 7	80 ± 1	85 ± 8	82 ± 6	71 ±3	0,003
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 ± 1,5	32, 1 ± 1,3	37,3 ± 1,7	47,3 ± 6,7	22,5 ± 1,3	0,001
TGFe	97 ± 12	94 ± 15	101 ± 16	104 ± 14	100 ±10	0,062
Albumina sérica	4,2 ± 0,4	4,2 ±0,3	4,1 ± 0,2	4,0 ± 0,3	4,5 ±0,2	0,242
Albuminúria	8,8 (5,3-12,2)	5,2 (4,3-7,7)	8,5(3,4-12,4)	10,0 (4,5-18,1)	6,5 (4,6-8,9)	0,248
Albuminúria ≥30	3 (14)	1 (8)	1 (10)	9 (23)	0 (0)	0,548
PCRus (mg/L)	1,0 (0,4-4,1)	3,8 (1,9-7,4)	4,1(0,5-16,3)	12,6(6,3-18,0)	0,8(0,5-1,0)	<0,001
PCRus> 3mg/L	6 (29)	6 (50)	6 (60)	35 (88)	0 (0)	<0,001

PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica; IMC: Índice de massa corporal; TFG<sub>e</sub>: taxa de filtração glomerular estimada (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>); PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; albumina sérica: g/dL; albuminúria: mg/g creatinina.

Tabela 2. Perfil metabólico dos pacientes com obesidade ou sobrepeso e dos controles

	<i>Sobrepeso</i>	<i>Obesidade Grau I</i>	<i>Obesidade Grau II</i>	<i>Obesidade Grau III</i>	<i>Controles</i>	<i>p</i>
CA (cm)						
Homens	97,1 ± 12,1	113,0 ± 2,8	108,5 ± 0	144,6 ± 11,8	71,7 ± 6,5	<0,001
Mulheres	91,0 ± 11,8	105,5 ± 13,6	112,1 ± 6,8	123,8 ± 13,7	78,5 ± 7,0	<0,001
Colesterol Total	172,8 ± 24,7	203,3 ± 51,2	195,3 ± 43,4	195,8 ± 44,4	160,3 ± 30,2	0,007
Colesterol HDL	48,1 ± 8,9	43,2 ± 5,0	45,2 ± 11,6	43,0 ± 9,3	51,4 ± 11,0	0,021
Colesterol LDL	100,7 ± 27,6	131,7 ± 47,0	125,8 ± 39,7	121,4 ± 36,9	85,4 ± 25,7	0,001
Triglicerídeos	120,2 ± 25,6	142,6 ± 43,8	121,6 ± 49,9	157,0 ± 70,6	117,7 ± 41,8	0,036
Glicemia de jejum	84 ± 4	92 ± 7	95 ± 10	96 ± 11	83 ± 5	0,001
Glicemia de jejum >99 mg/dL	0 (0)	1 (8)	1 (10)	15 (38)	-	0,001
HbA1C (%)	5,0 ± 0,2	5,3 ± 0,4	5,4 ± 0,6	5,9 ± 1,3	4,8 ± 0,2	0,016
HbA1C>6%	0 (0)	1 (8)	1 (10)	8 (20)	-	0,158
Insulina (µU/mL)	11,0 ± 3,8	14,4 ± 8,1	17,0 ± 8,5	23,0 ± 12	9,1 ± 3,2	<0,001
Insulina >25	0 (0)	0 (0)	1 (10)	11 (28)	-	0,005
HOMA-IR	2,4 ± 0,8	3,0 ± 1,7	3,1 ± 1,1	4,2 ± 1,8	1,9 ± 0,5	<0,001
HOMA-IR >2,5	9 (43)	7 (58)	6 (60)	35 (88)	-	<0,001
S. Metabólica	0 (0)	3 (25)	1 (10)	13 (33)	-	0,003

CA: circunferência abdominal; HbA1C: hemoglobina glicada; HOMA-IR: índice de resistência à insulina; lipídios e glicose de jejum: mg/dL

S. Metabólica: Síndrome metabólica definida pela presença de obesidade central (circunferência da cintura > 88 cm para mulheres ou > 102 cm para homens), colesterol HDL <40 mg/dL (homens) ou < 50 mg/dL (mulheres), triglicerídeos >150 mg/dL e glicemia de jejum alterada (100-125 mg/dL).

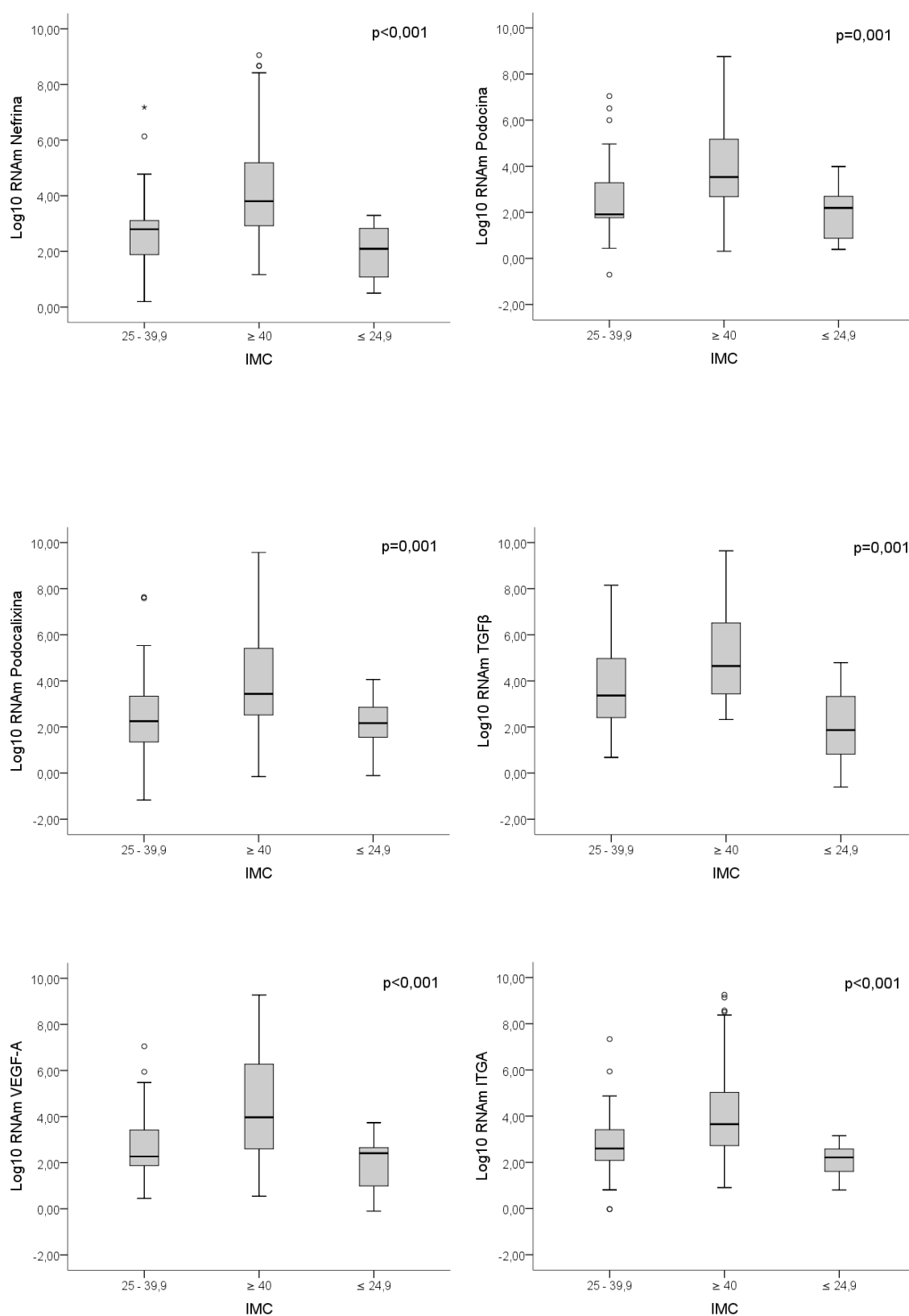
Tabela 3. Correlações de Spearman dos RNAm associados ao podócito com parâmetros metabólicos e inflamação nos pacientes com sobrepeso ou obesos

Gene (log10 RNAm)	Glicemia (mg/dl)	HbA1C (%)	Insulina ( $\mu$ U/mL)	PCRus (mg/L)
Nefrina	r=0,244 p=0,026	r=0,292 p=0,007	NS	r=0,244 p=0,026
Podocina	r=0,309 p=0,005	r=0,296 p=0,006	r=0,239 p=0,029	NS
Podocalixina	r=0,233 p=0,034	r=0,285 p=0,009	r=0,325 p=0,003	NS
Alfa-actinina 4	r=0,221 p=0,045	NS	NS	NS
$\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrina	NS	r=0,292 p=0,007	NS	r=0,244 p=0,026
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	NS	NS	NS	r=0,244 p=0,026
VEGF-A	r=0,233 p=0,034	r=0,291 p=0,008	r=0,345 p=0,001	NS



HbA1C: hemoglobina glicada; PCRus: proteína C reativa ultra-sensível; TGF $\beta$ <sub>1</sub>: fator de crescimento transformador beta; VEGF-A: fator de crescimento derivado do endotélio

Figura 1. Expressão do RNAm associadas ao podócito conforme índice de massa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).



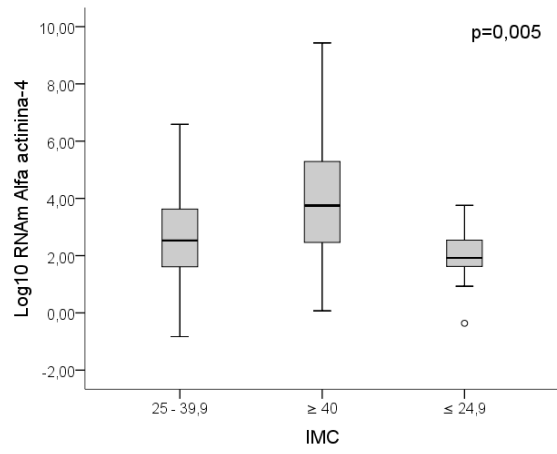
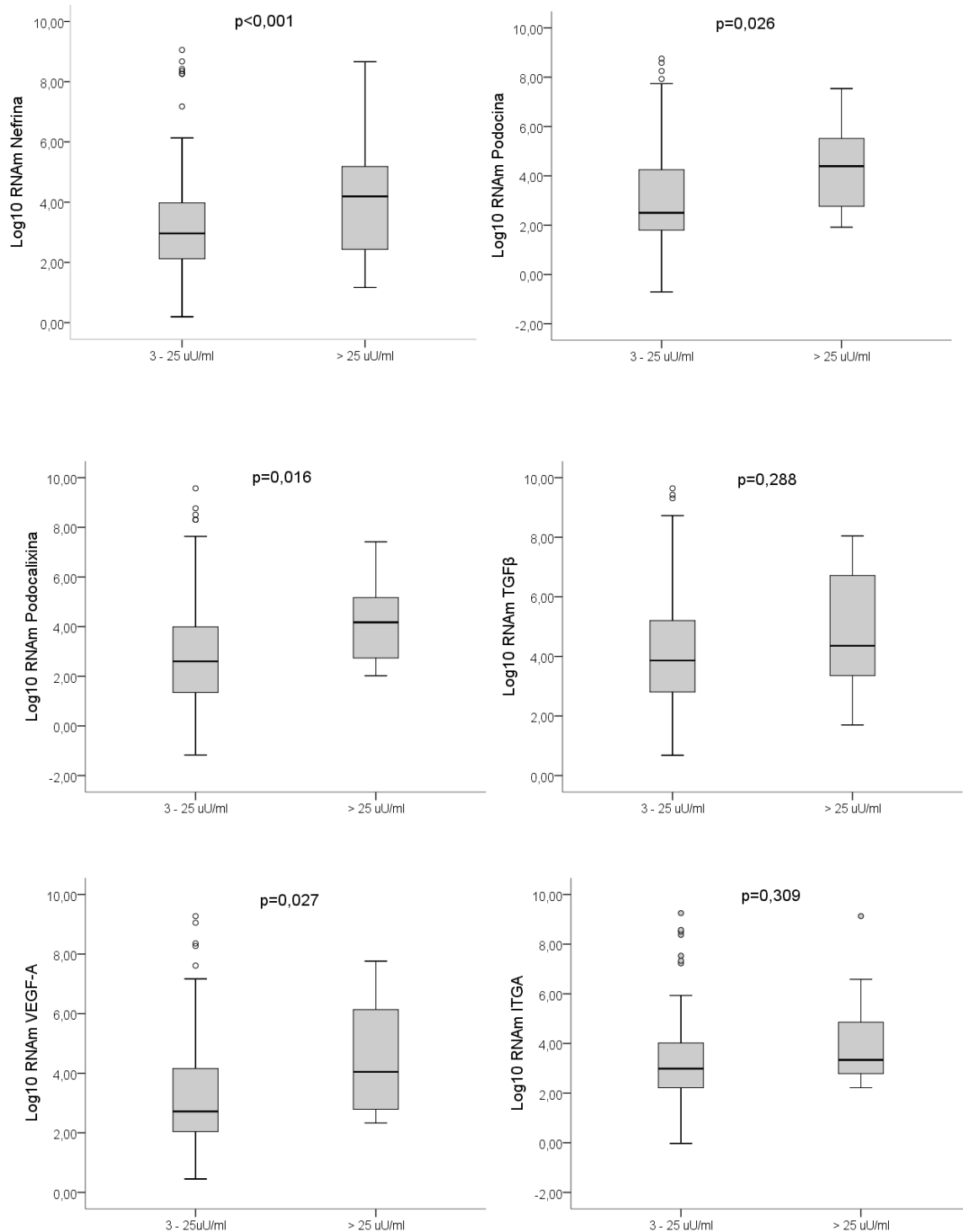


Figura 2. Expressão do RNAm associados ao podócito conforme nível de insulina sérica ( $\mu\text{U/ml}$ ).



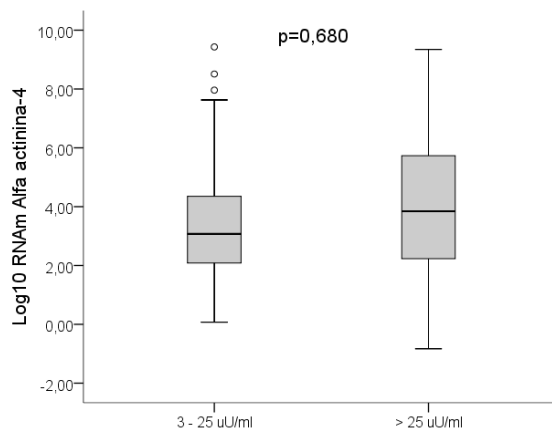
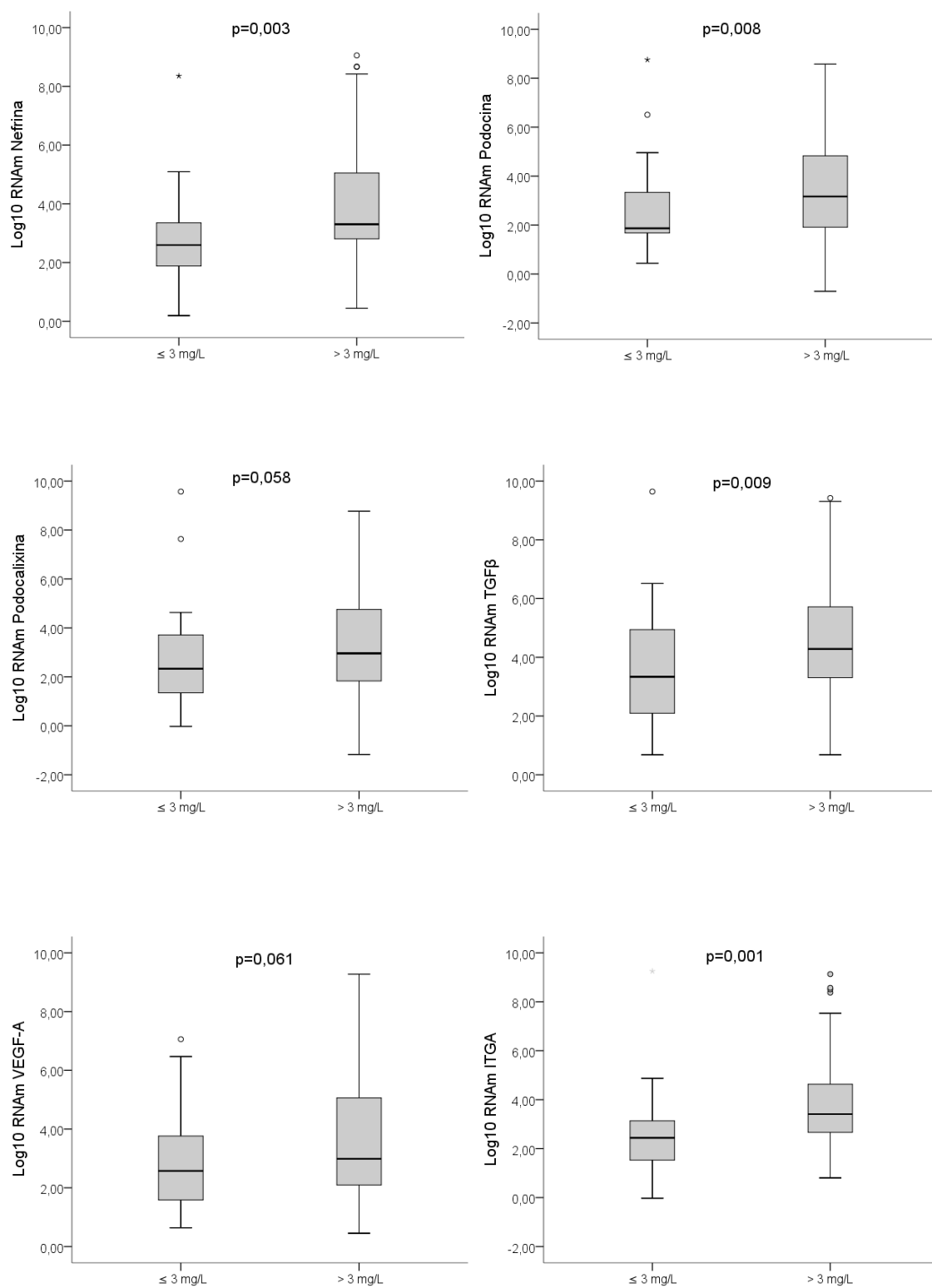
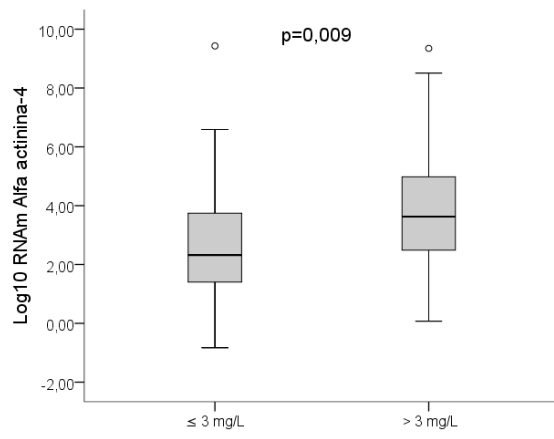


Figura 3. Expressão do RNAm associado ao podócito conforme o nível de proteína C reativa ultrasensível.





Legendas para as figuras:

Figura 1. Expressão dos RNAm associados ao podócito na urina comparando diferentes níveis de índice de massa corporal ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), separando os casos de obesidade mórbida daqueles com sobrepeso e obesidade graus I e II.

Figura 2. Expressão dos RNAm associados ao podócito na urina comparando presença ou ausência de hiperinsulinemia, separando os casos de obesidade mórbida daqueles com sobrepeso e obesidade graus I e II.

Figura 3. Expressão dos RNAm associados ao podócito na urina comparando presença ou ausência de inflamação, separando os casos de obesidade mórbida daqueles com sobrepeso e obesidade graus I e II.



## 7. Artigo em inglês

### **Morbid obesity, hyperinsulinemia, and inflammation are associated with podocyte injury in obese individuals**

Sane Vianna Pereira<sup>1</sup>, Mariane dos Santos<sup>1</sup>, Patrícia Garcia Rodrigues<sup>1</sup>, Jonathan Fraportti do Nascimento<sup>2</sup>, João Rodolfo Teló Timm<sup>1</sup>, Rogério Friedman<sup>2</sup>, Francisco Veríssimo Veronese<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Division of Endocrinology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>3</sup>Division of Nephrology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Division of Nephrology, room 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, CEP 90035-003, Brazil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.ufrgs.br

Running title: Obesity and podocyte injury

Number of tables: 3

Number of figures: 3

**Abstract**

**Objective:** Obesity is associated with glomerular lesions and podocyte injury. This study aimed to correlate different degrees of obesity and overweight with expression of podocyte-associated messenger RNA (mRNA) and to search whether a relationship exists between podocyturia and metabolic and inflammatory parameters in this patient population.

**Materials and Methods:** The sample comprised 83 patients with overweight or class I, II, or III obesity and 18 healthy controls. Expression of nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin-4, integrin  $\alpha3\beta1$ , vascular endothelial growth factor (VEGF-A), and transforming growth factor-beta ( $TGF\beta_1$ ) mRNA in urine was quantified by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). mRNA expression was correlated with body mass index (BMI), markers of the metabolic syndrome, albuminuria, and inflammation.

**Results:** Twenty-one patients (20.8%) were overweight, 12 (11.9%) had class I obesity, 10 (9.9%) had class II obesity, and 40 (39.6%) had class III obesity. Patients with class III obesity had higher serum lipid, plasma glucose, HbA1C, insulin resistance, and C-reactive protein levels ( $p<0.05$ ), with 33% of subjects in this group meeting criteria for the metabolic syndrome ( $p=0.003$  vs. other groups). Albuminuria  $>30$  mg/g creatinine was observed in 14%, 8%, 10%, and 23% of patients with overweight, class I, class II, and class III obesity respectively ( $p=0.548$ ). Expression of all podocyte-associated mRNAs varied with BMI. Patients with class III obesity had significantly higher levels than controls and other patients ( $p<0.05$ ). Patients with overweight, class I, or class II obesity, also had higher levels

of some mRNAs as compared with controls: nephrin ( $p=0.021$ ), alpha-actinin-4 ( $p=0.014$ ), integrin  $\alpha3\beta1$  ( $p=0.036$ ), and e TGF $\beta_1$  ( $p=0.005$ ). Hyperinsulinemic patients and those with C-reactive protein levels consistent with systemic inflammation also exhibited a higher degree of podocyturia.

Conclusion: Patients with morbid obesity exhibited greater podocyturia even at normal urinary albumin excretion rates, which suggests that detection of podocyte products in urine may indicate early glomerular epithelial cell injury in severe obesity. Hyperinsulinemia and systemic inflammation also correlated with a higher degree of podocyturia.

**Keywords:** obesity, glomerular injury, podocyte, albuminuria, metabolic syndrome, systemic inflammation

## Introduction

In recent decades, the obesity epidemic has led to an increased incidence of obesity-related glomerulopathy (ORG), which manifests clinically as proteinuria and loss of renal function and histologically as glomerulomegaly followed by glomerular sclerosis (1).

A correlation between body mass index (BMI) and glomerulomegaly has been reported, which suggests a maladaptive response of renal hemodynamics to obesity. Hyperfiltration and mechanical stress on the glomerular capillaries alter the morphology and function of podocytes, which detach from the glomerular basement membrane (GBM) and are excreted in urine. This denudation of the GBM triggers synechia formation and glomerular sclerosis in the form of focal segmental glomerulosclerosis (1-3). Growth factors such as transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF-1) are mediators of this mechanical stress and inhibit mRNA expression of podocyte microdomain proteins, such as nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin-4, and integrin  $\alpha 3\beta 1$  (1,4).

Evidence suggests that, in obese individuals, insulin resistance and hyperinsulinemia stimulate TGF $\beta$  expression and activate the renin-angiotensin-aldosterone system, promoting podocyte injury and apoptosis (5). Furthermore, adipose tissue produces proinflammatory cytokines that induce oxidative podocyte injury and inhibit transcription of podocyte-associated mRNAs (4,6).

The degree of podocyte injury may correlate with the severity of obesity or, at an earlier stage, with overweight; this has yet to be studied in the Brazilian population. Within this context, the objective of the present study was to correlate

different degrees of obesity and overweight with expression of podocyte-associated mRNAs in urine in an attempt to detect podocyte injury in the absence of clinically manifest glomerulopathy. The associations between podocyturia and albuminuria, renal function, and the metabolic syndrome in this sample of obese and overweight individuals were also assessed.

## **Materials and Methods**

### *Patients*

This cross-sectional study included 83 patients with obesity or overweight seen at the outpatient clinics of the Division of Nephrology and Endocrinology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, from March 2012 to September 2013. The World Health Organization classification of BMI (7) was used to stratify patients as having overweight (25–29.9 kg/m<sup>2</sup>), class I obesity (30–34.9 kg/m<sup>2</sup>), class II obesity (35–39.9 kg/m<sup>2</sup>), or class III obesity (>40 kg/m<sup>2</sup>). Subjects with a BMI between 18.5 and 24.9 were recruited as controls. Patients with a diagnosis of diabetes mellitus or clinical and laboratory evidence of preexisting nephropathy were excluded from the study.

The control group comprised healthy subjects with a BMI  $\leq$ 24.9 kg/m<sup>2</sup>, no personal or family history of kidney disease, blood pressure <149/90 mmHg, estimated glomerular filtration rate (eGFR) >90 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, and no evidence of hematuria or proteinuria on urinalysis. This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee. All study procedures were performed in compliance

with the 1975 Declaration of Helsinki, and all patients and controls provided written informed consent for participation.

#### *Demographic and clinical data*

Data were collected on age, sex, ethnicity, systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure, presence of peripheral edema, and current medications. The metabolic syndrome (MetS) was defined as central obesity (waist circumference >88 cm in women or >102 cm in men), HDL-cholesterol <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women, triglycerides >150 mg/dL, and impaired fasting glucose (fasting plasma glucose [FPG] 100-125 mg/dL) (8). Serum insulin levels were measured by chemiluminescence, with a reference range of 3.0–25.0  $\mu$ U/mL. The homeostasis model assessment – insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated with the formula (fasting glucose [mg/dL]/18) x (fasting insulin [ $\mu$ gU/mL])/22.5, with insulin resistance defined as a HOMA-IR score >2.5 (9).

Serum and urinary creatinine were measured by the automated Jaffe method (Modular P Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), and the glomerular filtration rate was estimated (eGFR) using the CKD-EPI equation. Glomerular hyperfiltration was defined as an eGFR >130 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (10). Spot urinary albumin was measured by immunoturbidimetric assay, and urinary albumin excretion expressed as mg albumin per g creatinine (<30 mg/g creatinine, within normal limits; 30–300 mg/g creatinine, microalbuminuria; >300 mg/g creatinine, macroalbuminuria). Glycated hemoglobin (HbA1c), used as a marker of glycemic control, was measured by high-performance liquid chromatography and expressed as a

percentage as per National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) standards. Total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were measured by enzymatic colorimetric assays, and LDL-cholesterol was calculated with the Friedewald formula. Ultra-sensitive C-reactive protein (us-CRP) was measured by immunoturbidimetric assay, and values  $>3$  mg/L were considered indicative of systemic inflammation.

#### *Quantitation of podocyte-associated mRNAs*

Podocyte-associated protein mRNAs were quantitated by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) in urinary sediment cells obtained from early-morning urine specimens (whole stream), as described elsewhere (11). The nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin-4, and integrin  $\alpha 3\beta 1$  genes were measured. mRNAs for VEGF-A and TGF- $\beta_1$  were used as markers of endothelial proliferation and intrarenal fibrosis respectively. Increased expression of these mRNAs in urine was defined in relation to the mRNA levels detected in control group specimens (12).

In brief, messenger RNA was extracted from urine samples using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA) in accordance with manufacturer instructions. Urine samples were centrifuged for 10 min at 1800 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in buffered saline and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes before being stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Total RNA concentration was quantified using the NanoDrop® 1000

Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The 260/280 nM absorbance ratio was used to assess RNA purity. Reverse RNA transcription was performed using the High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in accordance with manufacturer instructions. The final volume of 20  $\mu$ L purified RNA was then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . RT-PCR was performed using a TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix. Specific primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to the following genes were used, in accordance with manufacturer instructions: NPSH1, nephrin (ID:HS00190446\_m1); NPSH2, podocin (ID: Hs00387817\_m1); podocalyxin (ID:Hs01574644\_m1); integrin  $\alpha 3\beta 1$  (ID: Hs00989190\_m1); alpha-actinin-4 (ID:Hs00245168\_m1); VEGF-A (ID:HS00173626\_m1); and TGF $\beta_1$  (ID: HS00998133\_m1). Additionally, 18s rRNA (TaqMan<sup>®</sup> PDAR, Foster City, CA, USA) was used as an endogenous control for variations in the samples. RT-PCR was performed in duplicate in 96-well plates containing 2  $\mu$ L cDNA. Data were collected in an ABI PRISM SDS 7000 thermal cycler (Applied Biosystems), using the following cycling parameters:  $50^{\circ}\text{C}$  for 2 minutes,  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes, and  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 minutes, followed by 40 cycles at  $94^{\circ}\text{C}$  for 20 seconds and  $62^{\circ}\text{C}$  for 60 seconds. Relative quantification of target gene expression was performed using the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  comparative method, in which threshold cycle numbers (CT) were determined by the point at which a statistically significant increase in fluorescence was first detected.

### *Statistical analysis*



Data were presented as absolute and relative frequencies, mean  $\pm$  standard deviation (SD), or median and interquartile range. Associations between categorical variables were analyzed using chi-squared and Fisher's exact tests. RNA values were log-transformed to reduce asymmetry. Continuous variables were compared using ANOVA or the Kruskal–Wallis test. Spearman correlation coefficients were used to assess the relationships between podocyte-associated mRNAs and the correlations of podocyte-associated mRNAs with metabolic parameters, albuminuria, kidney function, and inflammation. All analyses were performed using PASW Statistics for Windows 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significance was set at  $p < 0.05$ .

## **Results**

### *Clinical and metabolic profile of overweight and obese patients*

The sample comprised 101 subjects (83 cases and 18 controls). The demographic and clinical profiles of both cases and controls are shown in Table 1. As determined by BMI, 21 patients (20.8%) were overweight, 12 (11.9%) had class I obesity, 10 (9.9%) had class II obesity, and 40 (39.6%) had class III obesity. Fifteen (18%) obese patients had mild (1+/4+ or 2+/4+) peripheral edema. Overall, 33 (40%) patients in the overweight or obesity group were on angiotensin receptor blockers, of whom 22 (27%) had class III obesity ( $p=0.001$ ). Significant differences in SBP and DBP were found between patients with class II/III obesity and controls. Conversely, there were no differences in eGFR between cases and controls; no obese patient had chronic kidney disease, defined as eGFR  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>,

whereas three patients with class III obesity had eGFR  $>130$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, which was defined as hyperfiltration. Albuminuria ( $>30$  mg/g creatinine) was detected in 14%, 8%, 10%, and 23% of patients with overweight, class I, class II, and class III obesity respectively ( $p=0.548$ ). Ten patients had microalbuminuria and four, all of whom had class III obesity, exhibited macroalbuminuria (665, 955, 1034, and 2022 mg/g creatinine respectively).

The prevalence of microinflammation ranged from 50% to 88% across the three obesity classes ( $p<0.001$ ). The highest us-CRP levels were found in patients with morbid obesity, with a median (IQR) level of 12.6 (6.3–18.0) mg/L (Table 1).

Data on metabolic profile are shown in Table 2. MetS was diagnosed in 0, 25, 10, and 33% of patients with overweight, class I, class II, and class III obesity respectively ( $p=0.003$ ). The overweight, class I obesity, and class II obesity groups were pooled for purposes of comparison, as there were no significant differences in metabolic parameters among them. Patients with class III obesity differed significantly ( $p<0.05$ ) from controls in all metabolic parameters other than eGFR and albuminuria, and differed significantly ( $p<0.05$ ) from overweight/class I/class II patients in fasting plasma glucose, HbA1c, serum insulin, HOMA-IR, and us-CRP levels, which demonstrates the more severely impaired metabolic profile of patients with morbid obesity. On comparison with controls, patients in the pooled overweight/class I/class II obesity group had higher total, HDL, and LDL-cholesterol, serum insulin, HOMA-IR, and us-CRP levels ( $p<0.05$ ), but did not differ in fasting plasma glucose, HbA1c, or triglycerides.

*Urinary expression of podocyte-associated mRNAs in overweight and obese patients*

As urinary expression of podocyte-associated mRNAs did not differ significantly among patients with overweight, class I obesity, or class II obesity (with the exceptions of higher nephrin, podocin, and podocalyxin expression in the class II group), these patients were pooled for purposes of comparison. Figures 1, 2, and 3 show median and percent expression of podocyte-associated mRNAs in the pooled (overweight/class I/class II) group, class III obesity group, and control group. Urinary expression of podocyte-associated mRNAs was associated with three parameters: increased BMI, hyperinsulinemia, and inflammation. Comparison of morbidly obese patients with the other groups revealed a significantly greater degree of expression of mRNAs for all genes of interest, including VEGF-A and TGF $\beta$ <sub>1</sub>, which are associated with endothelial proliferation and renal fibrosis. Four genes had increased expression in patients with less severe (class I or II) obesity or overweight than in controls: nephrin (p=0.021), alpha-actinin-4 (p=0.014), integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 (p=0.036), and TGF $\beta$ <sub>1</sub> (p=0.005). Patients with inflammation had higher levels of mRNA for all analyzed genes (with a trend toward significance in podocalyxin and VEGF-A levels). Patients with hyperinsulinemia had higher urinary levels of nephrin (p<0.001), podocin (p=0.026), podocalyxin (p=0.16), and VEGF-A (p=0.027). There was no association between gene expression of podocyte-associated molecules and renal function or HOMA-IR. Regarding urinary albumin excretion rates, only nephrinuria was associated with levels >30 mg/g creatinine (p=0.039).

*Spearman correlation coefficients of podocyte-associated mRNAs with metabolic parameters and markers of inflammation in overweight and obese patients*

There were strong correlations among urinary expression of the analyzed genes, ranging from 0.635 to 0.861, with p-values <0.001. Table 3 shows Spearman correlation coefficients and their respective p-values for correlations between podocyte-associated mRNAs and fasting plasma glucose, HbA1c, serum insulin, and us-CRP. Correlations between podocyte-associated mRNAs and metabolic and inflammatory profile were weak, but still significant.

## **Discussion**

A dramatic increase in the worldwide incidence of obesity has drawn the attention of the scientific community to the complications of this disease, not only cardiovascular and metabolic but also renal, such as chronic kidney disease (3). The connection between morbid obesity, proteinuria, and glomerulopathy was first established by Weisinger et al. in 1974 (13). This condition, later termed obesity-related glomerulopathy (ORG), was found to have increasing incidence among obese adults, and is characterized by usually non-nephrotic proteinuria, podocyte foot process fusion, glomerulomegaly followed by focal segmental glomerulosclerosis and progression to chronic renal failure (14). With increasing BMI, glomerular hypertrophy and hyperfiltration occur in response to high metabolic demands, exerting mechanical stress on the glomerular capillary walls and leading to podocyte epithelial cell injury. When podocyte hypertrophy becomes disproportional to the degree of glomerulomegaly, podocytes detach from the GBM and are

excreted in urine (2,4). Reduction in the number and density of podocytes by foot process fusion and effacement, with a consequent reduction in frequency of slit diaphragm pores, are the main ultrastructural changes described in ORG (15,16).

Molecular analyses of the cellular byproducts of podocytes in urine in obesity and MetS are scarce. In a previous study (11), we found that obese individuals with prediabetes but no microalbuminuria, with a mean BMI of 32 kg/m<sup>2</sup> and fasting plasma glucose of 107 mg/dL, exhibited increased urinary expression of podocin, podocalyxin, alpha-actinin-4, and TGFβ<sub>1</sub> as compared with healthy individuals, raising the hypothesis that early podocyte injury may be associated with metabolic changes. In the present study, urinary podocyte-associated mRNAs were found in 73% of patients with class III obesity and normal urinary albumin excretion rates. Most of these patients had elevated lipid and HbA1c levels, insulin resistance, and systemic inflammation. Wu et al. (17) demonstrated that increased expression of microRNAs of candidate ORG-related genes were associated with lipid metabolism, inflammatory cytokine levels, and insulin resistance. It is interesting to note that genes associated with modulation of the extracellular matrix and vascular endothelium, such as TGFβ<sub>1</sub> and VEGF respectively, were also upregulated in the renal tissue of patients with ORG.

Studies have shown a strong association between BMI and CKD. Data from the Framingham cohort (18) show that, for every one-standard deviation increase in BMI, controlling for age, diabetes mellitus, smoking, and baseline eGFR, the incidence of eGFR <60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> increased by 21%. Hsu et al. (19) assessed 320,000 adults and found that, as compared with optimal BMI, the relative risk of

end-stage renal disease (ESRD) in class I, II, and III obesity was 3.57, 6.12, and 7.07 respectively, after adjusting for baseline blood pressure and diabetes mellitus. Our study demonstrated a clear association between BMI and podocyturia, defined by augmented levels of podocyte-specific protein mRNAs in urine relative to normal controls. However, there were no associations between podocyturia and glomerular hyperfiltration, albuminuria, or eGFR, which may be explained by the detection of these changes at a very early, subclinical stage of glomerular injury. Longitudinal serial measurements of proteinuria and renal function in this sample are essential to provide supporting evidence for a potential association.

A low-grade microinflammatory status is present in obesity, and has been associated with adiponectin deficiency and activation of the proinflammatory nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) protein. NF- $\kappa$ B activates genes in the inflammatory cascade to produce proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, and CRP, as well as adipokines such as leptin and resistin (4). Macrophage-produced cytokines, such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , inhibit gene transcription of nephrin at the glomerular podocyte, leading to slit diaphragm instability (20). It is also possible that systemic inflammation contributes to expansion of the glomerular mesangium, thus speeding the development of glomerulosclerosis and kidney failure. Two clinical studies suggest that obese patients with primary glomerulopathies fare poorly as compared with non-obese patients with the same glomerulopathy (21,22). In the study of Bonnett et al. (22) obese patients with IgA nephropathy exhibit more severe proteinuria, chronic histologic damage, and higher rates of progression to dialysis than non-obese patients with IgA disease. CRP, a marker of inflammation and vascular injury, is known to be elevated in visceral obesity. In the present study,

76% of patients with a BMI  $>30$  kg/m<sup>2</sup> had an us-CRP level  $>3$  mg/L, demonstrating a clear association between obesity and inflammation. These patients, who had no prior history of glomerulopathy, exhibited significantly higher levels of podocyte products in urine than patients with no chronic inflammation. This is a challenging finding to interpret in the clinical context of morbid obesity, as it may represent nothing more than an epiphenomenon, with no direct association to the pathophysiology of glomerular injury in ORG. Nevertheless, there is a clear quantitative association between BMI and podocyte injury.

An association between podocyturia and hyperinsulinemia, although not as marked, was also observed in the present study. Insulin resistance plays an essential role in obesity-related proteinuria (23), but it is unclear how glucose intolerance and hyperinsulinemia lead to podocyte damage. Insulin stimulates the expression of TGF $\beta$  and increases renin-angiotensin-aldosterone system activity, promoting podocyte apoptosis through yet-unknown signaling pathways (5). The effect of insulin resistance on podocytes is believed to be mediated via growth factor secretion and glomerular hypertrophy, or indirectly by a reduction in adiponectin levels (24). In the present study, patients with class III obesity exhibited hyperinsulinemia and insulin resistance, which were associated with increased urinary excretion of nephrin, podocin, podocalyxin, and VEGF-A. Acting in tandem with other metabolic factors and changes in glomerular hemodynamics inherent to morbid obesity, these findings may signal a harmful effect of insulin on podocytes. However, these alterations may be reversible, as demonstrated in experimental models. As an example, rosiglitazone administration stimulated glucose uptake by podocytes and increased their stability on the GBM (25). In another study, the use

of rosuvastatin improved the glomerular filter permeability reducing albuminuria, which may be associated with a reduction in the effects of insulin resistance and oxidative stress on podocytes (26).

Hyperglycemia modulates cell adhesion and integrin subunits, disregulating the interaction between podocytes and the GBM, which is maintained by  $\alpha3\beta1$  integrin and by dystroglycans. MetS disrupts this contact, causing detachment of podocytes, which break free into Bowman's space (27). In obesity, mechanical strain on the capillary wall stimulates secretion of TGF $\beta$ , a fibrogenesis-inducing cytokine, which inhibits tissue expression of  $\alpha3\beta1$  integrin and thus promotes podocyte detachment and excretion in urine (28). In the present study, the increased urinary levels of  $\alpha3\beta1$  integrin and TGF $\beta$  mRNAs detected in patients with overweight and obesity – regardless of class – may be the result of active effects of these mechanisms on glomerular capillaries. Other humoral factors associated with obesity, such as leptin and hyperinsulinemia, also contribute to expansion of the extracellular matrix and glomerulomegaly by stimulating growth factors such as VEGF and TGF $\beta$  (29).

Limitations of this study include the relatively small number of patients in each BMI category, which may have influenced the non significant correlations, such as those found with other MetS markers, albuminuria, and GFR. For ethical reasons, we could not determine the prevalence of ORG in our sample, as there were no clinical indications for the performance of renal biopsy. To study the relationship between obesity and podocytopathy, the correlation of histopathology and ultrastructure alterations are essential. On the other hand, the non invasive diagnosis of podocyturia, through the identification of podocyte-associated mRNAs in urine, can



lead to an early diagnosis of glomerular damage in severe obesity, perhaps signaling to new therapeutic targets to be used in the prevention of ORG.

In conclusion, patients with morbid obesity exhibited a greater degree of podocyturia even at normal urinary albumin excretion rates, which suggests that detection of podocyte byproducts in urine may be a marker of early glomerular epithelial cell injury in severe obesity. Metabolic and inflammatory parameters, such as hyperinsulinemia and elevated CRP levels, also correlated with a greater degree of podocyturia, even in patients with overweight and class I or II obesity.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (FIPE/HCPA) for its financial support, the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the graduate fellowship awarded to Sane Vianna Pereira, and the Laboratory of Molecular Biology in Nephrology of the Department of Nephrology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre for the technical support provided.

Conflicts of interest: We declare no conflicts of interest.

#### References

1. Darouich S, Goucha R, Jaafoura MH, Zekri S, Maiz HB, Kheder A. Clinicopathological Characteristics of Obesity-associated Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Ultrastruct Pathol* 2011; 35: 176-182.
2. Praga M. Synergy of low nephron number and obesity: a new focus on hyperfiltration nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 2594-2597.
3. Wickman C, Kramer H. Obesity and Kidney Disease: Potential Mechanisms. *Semin Nephrol* 2013; 33: 14-22.
4. D'Elia JA, Roshan B, Maski M, Weinrauch LA. Manifestation of renal disease in obesity: pathophysiology of obesity-related dysfunction of the kidney. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2009; 2: 39-49.
5. Sarafidis PA, Ruilope LM. Insulin resistance, hyperinsulinemia and renal injury: mechanisms and implications. *Am J Nephrol* 2006; 26: 232-244.
6. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1645-1656.
7. Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; 894: 1-253.
8. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, valuation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in

Adults (Adult Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.

9. Guiringhello MT, Vieira JG, Tachibana TT, Ferrer C, Maciel RMB, Amioka PHC et al. Distribution of HOMA-IR in brazilian subjects with different body mass indexes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50:573-574.

10. Soares AA, Prates AB, Weinert LS, Veronese FV, de Azevedo MJ, Silveiro SP. Reference values for glomerular filtration rate in healthy Brazilian adults. *BMC Nephrol* 2013; 14:54. doi: 10.1186/1471-2369-14-54.

11. 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.

12. 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.

13. Weisinger JR, Kempson RL, Eldridge FL, Swenson RS. The nephrotic syndrome: a complication of massive obesity. *Ann Int Med* 1974; 81: 440-447.

14. Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D' Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. *Kidney Int* 2001; 59:1498-1509.

15. Chen HM, Liu ZH, Zeng CH, Li SJ, Wang QW, Li LS. Podocyte Lesions in Patients With Obesity-Related Glomerulopathy. *Am J Kidney Dis* 2006; 48:722-729.
16. Goumenos DS, Kawar B, El Nahas M, Conti S, Wagner B, Spyropoulos C, et al. Early histological changes in the kidney of people with morbid obesity. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3732-3738.
17. Wu Y, Liu Z, Xiang Z, Zeng C, Chen Z, Xiaojing M, et al. Obesity-Related Glomerulopathy: Insights from Gene Expression Profiles of the Glomeruli Derived from Renal Biopsy Samples. *Endocrinology* 2006; 147: 44-50.
18. Fox CS, Larson MG, Leip EP, Culleton B, Wilson PW, Levy D. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA* 2004; 291: 844-850.
19. Hsu CY, McCulloch CE, Iribarren C, Darbinian J, Go AS. Body mass index and risk for end-stage renal disease. *Ann Intern Med* 2006; 144: 21-28.
20. Takano Y, Yamauchi K, Hayakawa K, Hiramatsu N, Kasai A, Okamura M, et al. Transcriptional suppression of nephrin in podocytes by macrophages: roles of inflammatory cytokines and involvement of the PI3K/Akt pathway. *FEBS Lett* 2007; 581: 421-426.
21. Kato S, Nazneen A, Nakashima Y, Razzaque MS, Nishino T, Furusu A, et al. Pathological influence of obesity on renal structural changes in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2009; 13: 332-340

22. Bonnett F, Deprele C, Sassolas A, Moulin P, Alamartine E, Berthezène F, et al. Excessive body weight as a new risk factor for clinical and pathological progression in primary IgA nephritis. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 1-12.
23. Matsumoto H, Nakao T, Okada T, et al. Insulin resistance contributes to obesity-related proteinuria. *Intern Med* 2005; 44: 548-553.
24. Stieger N, Worthmann K, Schiffer M. The role of metabolic and hemodynamic factors in podocyte injury in diabetes. *Diabetes Metab Res rev* 2011; 27: 207-215.
25. Lennon R, Welsh GI, Singh A, et al. Rosiglitazone enhances glucose uptake in glomerular podocytes using the glucose transporter GLUT1. *Diabetologia* 2009; 52: 1944-1952.
26. Whaley-Connell A, DeMARco VG, Lastra G, Manrique C, Nistala R, Cooper SA et al. Insulin resistance, Oxidative Stress, and Podocyte Injury: Role of Rosuvastatin Modulation of Filtration Barrier Injury. *Am J Nephrol* 2008; 28: 67-75.
27. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci* 2000; 67: 2345-2353.
28. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei Cas A, Thomas SM, Viberti G, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha3beta1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2645-2655.
29. Chen S, Kasama Y, Lee JS, jim B, Marin M, Ziyadeh FN. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen

production by transforming growth factor  $\beta$ 1 in mouse podocytes. *Diabetes* 2004; 53: 2939-2949.

Table 1. Demographic and clinical profile of cases and controls

	<i>Overweight</i>	<i>Class I obesity</i>	<i>Class II obesity</i>	<i>Class III obesity</i>	<i>Control</i>	<i>p</i>
N	21	12	10	40	18	
Age (years)	46 ± 9	50 ± 15	50 ± 10	44 ± 11	41 ± 9	0.102
Sex (female)	11 (52)	10 (83)	9 (90)	33 (83)	12 (67)	0.072
Race (white)	18 (86)	12 (100)	8 (80)	38 (95)	18 (89)	0.312
SBP (mmHg)	121 ± 6	120 ± 3	132 ± 21	127 ± 10	110 ± 5	0.010
DBP (mmHg)	77 ± 7	80 ± 1	85 ± 8	82 ± 6	71 ± 3	0.003
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.1 ± 1.5	32.1 ± 1.3	37.3 ± 1.7	47.3 ± 6.7	22.5 ± 1.3	0.001
eGFR	97 ± 12	94 ± 15	101 ± 16	104 ± 14	100 ± 10	0.062
Serum albumin	4.2 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.3	4.5 ± 0.2	0.242
Albuminuria	8.8 (5.3-12.2)	5.2 (4.3-7.7)	8.5 (3.4-12.4)	10.0 (4.5-18.1)	6.5 (4.6-8.9)	0.248
Albuminuria ≥30	3 (14)	1 (8)	1 (10)	9 (23)	0 (0)	0.548
us-CRP (mg/L)	1.0 (0.4-4.1)	3.8 (1.9-7.4)	4.1 (0.5-16.3)	12.6 (6.3-18.0)	0.8 (0.5-1.0)	<0.001
us-CRP > 3 mg/L	6 (29)	6 (50)	6 (60)	35 (88)	0 (0)	<0.001

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate (ml/min/1.73 m<sup>2</sup>); us-CRP, ultra-sensitive C-reactive protein. Serum albumin expressed as g/dL. Albuminuria expressed as mg/g creatinine.

Table 2. Metabolic profile of patients and controls

	<i>Overweight</i>	<i>Class I obesity</i>	<i>Class II obesity</i>	<i>Class III obesity</i>	<i>Control</i>	<i>p</i>
WC (cm)						
Male	97.1 ± 12.1	113.0 ± 2.8	108.5 ± 0	144.6 ± 11.8	71.7 ± 6.5	<0.001
Female	91.0 ± 11.8	105.5 ± 13.6	112.1 ± 6.8	123.8 ± 13.7	78.5 ± 7.0	<0.001
Cholesterol, total	172.8 ± 24.7	203.3 ± 51.2	195.3 ± 43.4	195.8 ± 44.4	160.3 ± 30.2	0.007
Cholesterol, HDL	48.1 ± 8.9	43.2 ± 5.0	45.2 ± 11.6	43.0 ± 9.3	51.4 ± 11.0	0.021
Cholesterol, LDL	100.7 ± 27.6	131.7 ± 47.0	125.8 ± 39.7	121.4 ± 36.9	85.4 ± 25.7	0.001
Triglycerides	120.2 ± 25.6	142.6 ± 43.8	121.6 ± 49.9	157.0 ± 70.6	117.7 ± 41.8	0.036
FPG	84 ± 4	92 ± 7	95 ± 10	96 ± 11	83 ± 5	0.001
FPG >99 mg/dL	0 (0)	1 (8)	1 (10)	15 (38)	-	0.001
HbA1C (%)	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.4	5.4 ± 0.6	5.9 ± 1.3	4.8 ± 0.2	0.016
HbA1C >6%	0 (0)	1 (8)	1 (10)	8 (20)	-	0.158
Insulin (µU/mL)	11.0 ± 3.8	14.4 ± 8.1	17.0 ± 8.5	23.0 ± 12	9.1 ± 3.2	<0.001
Insulin >25	0 (0)	0 (0)	1 (10)	11 (28)	-	0.005
HOMA-IR	2.4 ± 0.8	3.0 ± 1.7	3.1 ± 1.1	4.2 ± 1.8	1.9 ± 0.5	<0.001
HOMA-IR >2,5	9 (43)	7 (58)	6 (60)	35 (88)	-	<0.001
MetS	0 (0)	3 (25)	1 (10)	13 (33)	-	0.003

WC, waist circumference; FPG, fasting plasma glucose; HbA1C, glycated

hemoglobin; HOMA-IR: homeostatic model assessment, insulin resistance; MetS,

metabolic syndrome. Lipids and FPG expressed as mg/dL. MetS defined as central



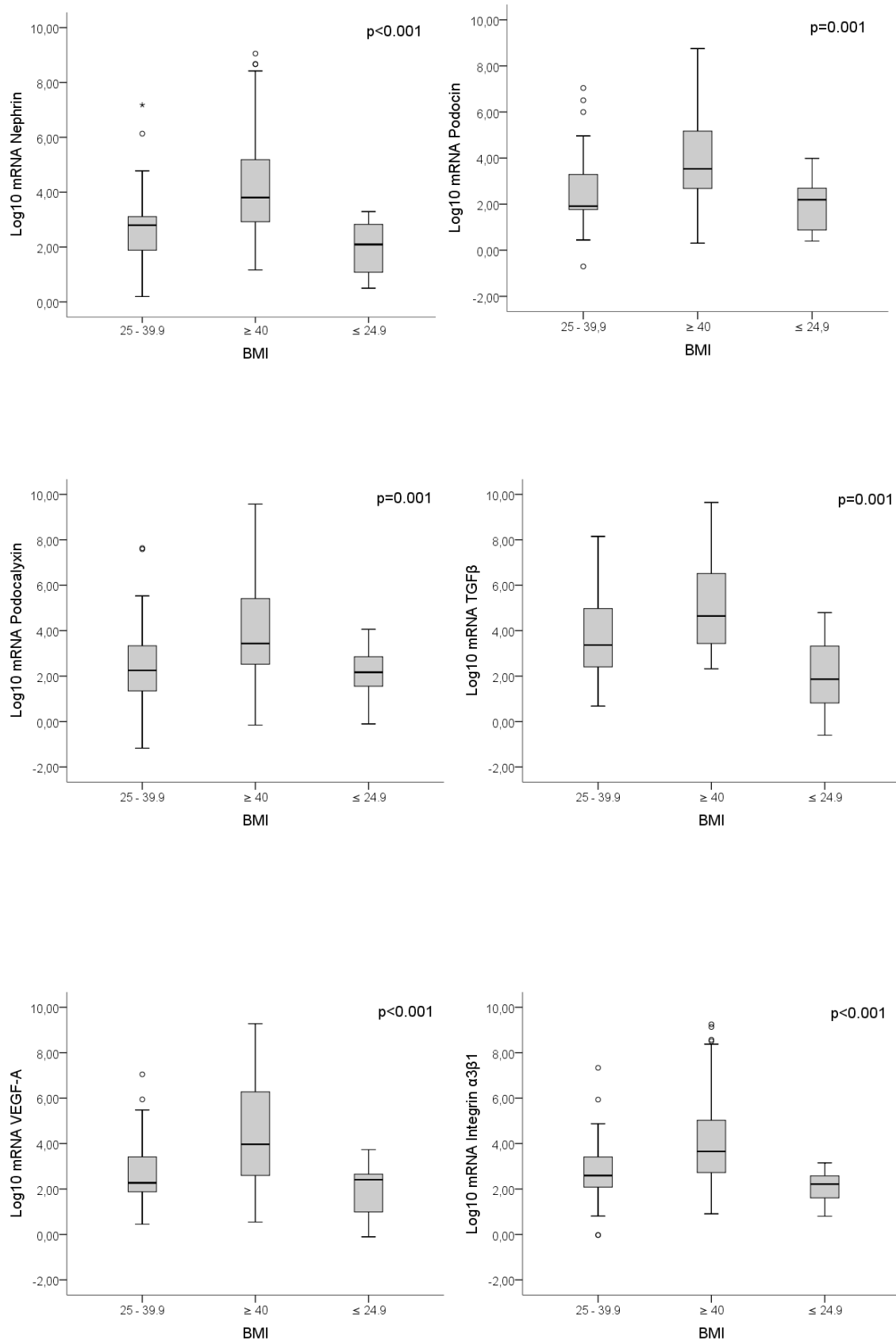
obesity (WC >88 cm in women or >102 cm in men), HDL-cholesterol <40 mg/dL in men or <50 mg/dL in women, triglycerides >150 mg/dL, and impaired fasting glucose (FPG 100-125 mg/dL).

Table 3. Spearman correlation coefficients of podocyte-associated mRNAs and metabolic and inflammatory parameters in overweight or obese patients

Gene (log10 mRNA)	Plasma glucose (mg/dL)	HbA1C (%)	Insulin ( $\mu$ U/mL)	us-CRP (mg/L)
Nephrin	r=0.244 p=0.026	r=0.292 p=0.007	NS	r=0.244 p=0.026
Podocin	r=0.309 p=0.005	r=0.296 p=0.006	r=0.239 p=0.029	NS
Podocalyxin	r=0.233 p=0.034	r=0.285 p=0.009	r=0.325 p=0.003	NS
Alpha-actinin-4	r=0.221 p=0.045	NS	NS	NS
Integrin $\alpha$ 3 $\beta$ 1	NS	r=0.292 p=0.007	NS	r=0.244 p=0.026
TGF $\beta$ <sub>1</sub>	NS	NS	NS	r=0.244 p=0.026
VEGF-A	r=0.233 p=0.034	r=0.291 p=0.008	r=0.345 p=0.001	NS

HbA1C, glycated hemoglobin; us-CRP, ultra-sensitive C-reactive protein; TGF $\beta_1$ , transforming growth factor-beta; VEGF-A, vascular endothelial growth factor. NS, non significant.

Figure 1. Expression of podocyte-associated mRNAs according to the body mass index (kg/m<sup>2</sup>).



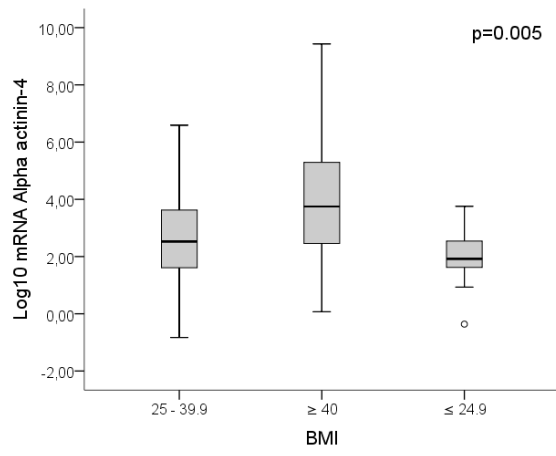
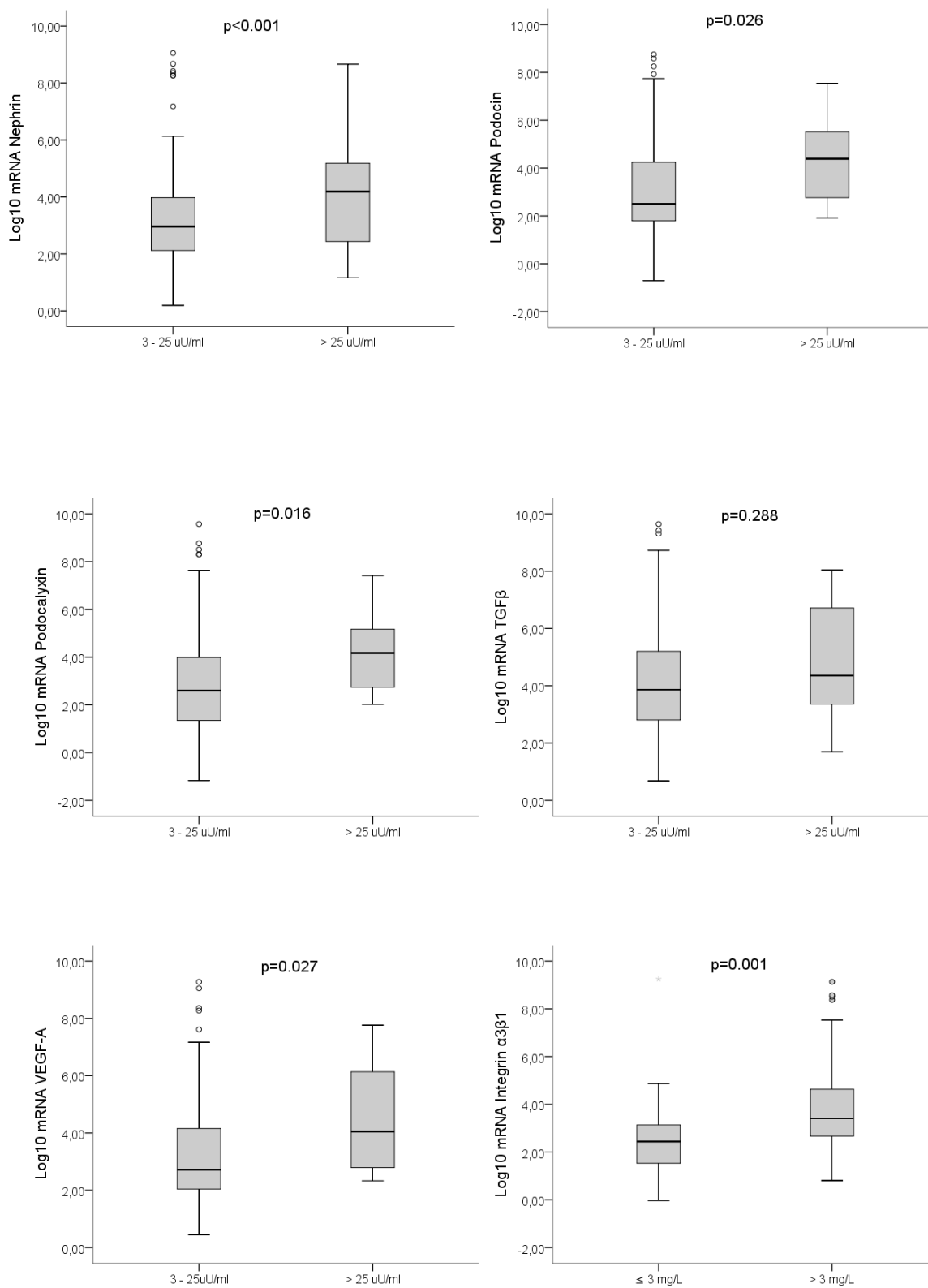


Figure 2. Expression of podocyte-associated mRNAs according to serum insulin levels.



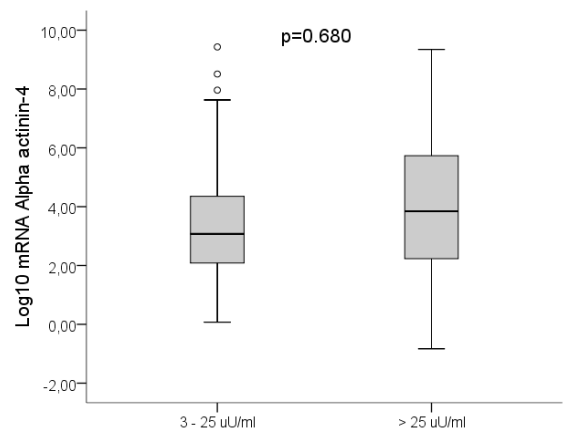
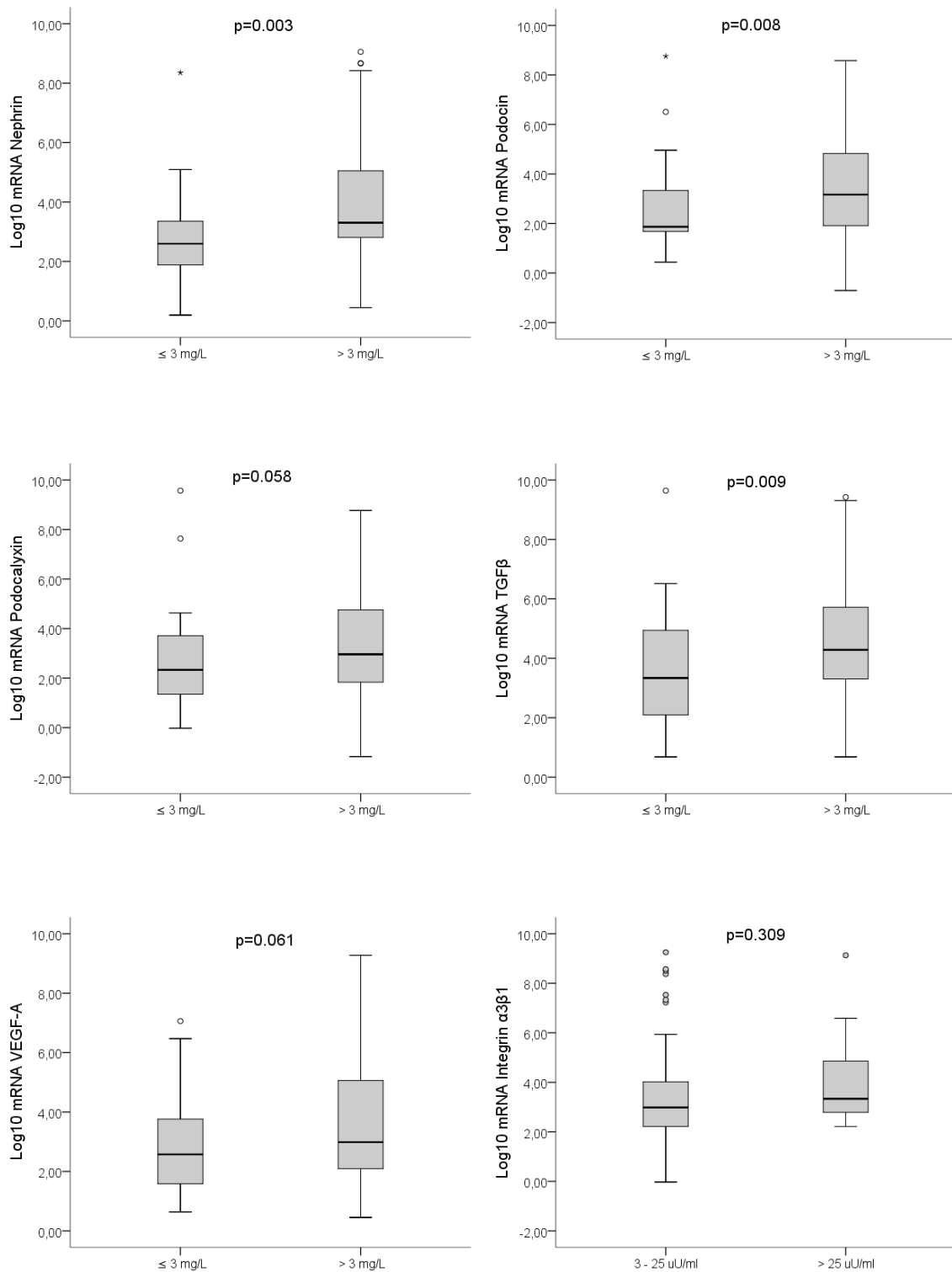


Figure 3. Expression of podocyte-associated mRNAs according to C-reactive protein levels.





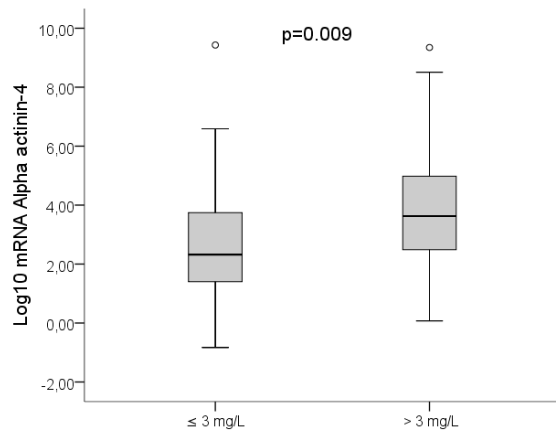


Figure legends.

Figure 1. Expression of podocyte-associated mRNAs in urine. Patient groups stratified by body mass index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ), separating cases of morbid obesity from overweight or class I/II obesity.

Figure 2. Expression of podocyte-associated mRNAs in urine. Patient groups stratified by presence or absence of hyperinsulinemia, separating cases of morbid obesity from overweight or class I/II obesity.

Figure 3. Expression of podocyte-associated mRNAs in urine. Patient groups stratified by presence or absence of inflammation, separating cases of morbid obesity from overweight or class I/II obesity.

## 8. Considerações finais

A obesidade é um problema de saúde pública e tem proporções epidêmicas, afetando 20-40% da população geral em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Constitui-se em um importante fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares, sendo uma doença prevenível, tratável e modificável. Neste contexto, tem sido descrito nas últimas décadas um número crescente de pacientes com doença renal associada à obesidade, denominada na literatura inglesa *Obesity Related Glomerulopathy* (ORG). Clinicamente, a ORG é caracterizada pelo desenvolvimento de albuminúria, proteinúria patológica e doença renal crônica com perda progressiva de função renal, podendo evoluir para a necessidade de uma terapia de substituição função renal.

A determinação do RNAm das proteínas dos diversos domínios do podócito em células do sedimento urinário é uma ferramenta não invasiva útil e acurada para detecção precoce de lesão do filtro glomerular, sendo um fator preditivo de atividade de doença, resposta ao tratamento e evolução para insuficiência renal crônica. Consideramos importante estudar a relação da pré obesidade e obesidade nos seus diferentes graus de severidade com a injúria podocitária, que é o fator desencadeante do dano glomerular e glomeruloesclerose progressiva. Procura-se assim estabelecer métodos de diagnóstico precoce de dano glomerular na busca de alvos terapêuticos específicos que, em conjunto com a perda de peso, controle rigoroso da pressão arterial, uso de inibidores da angiotensina e em alguns casos

cirurgia bariátrica, visam reduzir a hiperfiltração glomerular e prevenir a glomeruloesclerose da ORG.

Como resultados principais deste estudo, observamos que pacientes com obesidade mórbida apresentaram maior grau de podocitúria mesmo com níveis normais de albuminúria, sugerindo que a detecção dos produtos do podócito na urina pode indicar injúria precoce às células epiteliais glomerulares nestes casos de obesidade grave. Parâmetros metabólicos e inflamatórios, como hiperinsulinemia e proteína C reativa, também se correlacionaram com maior grau de podocitúria, mesmo nos pacientes com sobrepeso ou obesidade grau I e II.

Uma limitação deste estudo é o número relativamente pequeno de pacientes por cada categoria de IMC. Adicionalmente, por questões éticas não pudemos determinar a prevalência de ORG nesta população de pacientes por não haver indicação clínica de biópsia renal. A correlação da histopatologia e ultraestrutura do rim com a podocitúria ainda é necessária para o estudo mais acurado desta podocitopatia.

## 9. Anexos

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Anexo 2. Protocolo de coleta de dados

### **Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr.(a) \_\_\_\_\_ a participar do estudo **Associação entre Obesidade, Albuminúria e Expressão Gênica de Proteínas do Podócito na Urina (projeto número 12-0274 do WebGPPG)** que será elaborado com o objetivo de identificar alterações renais relacionadas à obesidade, que podem levar à perda de proteínas na urina. O objetivo dessa pesquisa é realizar exames no sangue e na urina para verificar uma possível associação entre o seu problema de excesso de peso e lesão nos rins. Os procedimentos a que o (a) Sr. (a) serão submetidos são uma coleta de amostra de sangue e de urina. Estes materiais serão analisados no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia e de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A coleta de urina será realizada em um frasco de 500mL. O desconforto relacionado à coleta de sangue de uma veia do braço é a possibilidade de ocorrer um pequeno hematoma (mancha roxa na pele) e dor no local da coleta, lembrando que a maioria dos pacientes já tem os exames solicitados pelo ambulatório, então não passará por este procedimento de coleta de sangue, sendo seus dados obtidos pelo sistema do Hospital, mediante autorização em consentimento informado.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para os(as) Sr.(as), mas a sua ajuda será muito importante na pesquisa de possíveis complicações renais que possam ser causados por excesso de peso.

Para seu esclarecimento sobre o projeto 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 pelo telefone 33598121 e 33598205, da pesquisadora Sane Vianna Pereira (95493171) ou do pesquisador Francisco Veronese (99693920). Para esclarecimentos éticos da pesquisa você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo telefone:33597640.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito

participar do estudo e declaro que fui também informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

Nome do Paciente / Assinatura

Nome do Pesquisador/ Assinatura:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo 2: Protocolo de Coleta de Dados****Identificação e Dados Clínicos**

Nome:

Protocolo nº:

Registro HCPA:

Data de Nasc.:

Data da coleta:

Sexo:

Etnia:

( ) Masc = 1

( ) Afrodescendente = 1

( ) Fem = 2

( ) Não- afrodescendente = 2

Peso:

Altura:

IMC:

P.A. 1:

P. A. 2:

Possui Hipertensão: ( ) Sim ( ) Não

Classificação da Obesidade:

( ) Normal ( ) Sobrepeso ( ) O.grau I ( ) O. grau II ( ) O. grau III

Possui edema periférico: ( ) Sim ( ) Não

Circunferência da Cintura (cm):

Medicações Utilizadas:

### Dados Laboratoriais Bioquímicos, Imunológicos e Urinários

Glicose (mg/dL):

Triglicerídeos (mg/dL):

Colesterol Total (mg/dL):

Creatinina (mg/dL):

Colesterol HDL (mg/dL):

Albumina (g/dL):

Colesterol LDL (mg/dL):

Insulina (ug UI/mL):

PCR us (mg/L):

EQU: Proteínas ( )

Hemáceas ( )

Leucócitos ( )

Albumina/Creatinina Urinária (mg/g):

Taxa de Filtração Glomerular (mL/min/1,73 m<sup>2</sup>):

HOMA – IR:

### Dados Moleculares

Gene/RNA - Quantificação do RNAm ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ )

18S

TGF- $\beta$

Nefrina

VEGF-1

Podocina

ITGA

Podocalixina

Alfa actinina-4