

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

“EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS DO PODÓCITO NA URINA DE
PACIENTES DIABÉTICOS NORMO, MICRO OU MACROALBUMINÚRICOS E
EM PRÉ DIABÉTICOS”

Jonathan Fraportti do Nascimento

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

“EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS DO PODÓCITO NA URINA DE
PACIENTES DIABÉTICOS NORMO, MICRO OU MACROALBUMINÚRICOS E
EM PRÉ DIABÉTICOS”

Jonathan Fraportti do Nascimento

Orientador: Francisco José Verissimo Veronese

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas, UFRGS,
com requisito para obtenção do título
de Mestre

Porto Alegre

2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

do Nascimento, Jonathan Fraportti
EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS DO PODÓCITO NA URINA
DE PACIENTES DIABÉTICOS NORMO, MICRO E
MACROALBUMINÚRICOS E EM INDIVÍDUOS COM PRÉ DIABETES /
Jonathan Fraportti do Nascimento. -- 2012.
96 f.

Orientador: Francisco José Verissimo Veronese.
Coorientador: Luis Henrique Canani.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Podócitos. 2. Diabetes. 3. Pré Diabetes. 4.
Albuminúria. 5. Nefropatia Diabética. I. Veronese,
Francisco José Verissimo, orient. II. Canani, Luis
Henrique, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A todos os meus familiares, que me incentivaram de uma forma ou outra, em especial aos meus pais, por se privaram de tantas coisas em benefício da minha formação. São modelos que seguirei pelo resto da vida.

Ao professor Francisco José Verissimo Veronese, pela oportunidade e pelo conhecimento transmitido. Seguirei como exemplo sua dedicação à pesquisa científica e interesse na formação de pesquisadores capazes de contribuir de forma positiva com o país.

A todos os colegas do LABMAN, que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho.

Aos amigos, colegas de profissão e mestrado, que ao longo desta jornada partilharam comigo momentos alegres, de dúvidas e preocupações.

RESUMO

Introdução: A lesão do podócito exerce um papel crítico na nefropatia diabética (ND) e é um fator preditivo de albuminúria patológica e progressão da doença. Neste estudo foi avaliada a expressão gênica de proteínas associadas ao podócito na urina de pacientes diabéticos em diferentes estágios da ND e em indivíduos com pré diabetes.

Material e Métodos: Foram estudados 67 pacientes diabéticos com normo (n=34), micro (n=14) ou macroalbuminúria (n=19), dezenove indivíduos pré diabéticos e 15 controles saudáveis. O RNAm de nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina, Transient Receptor Potential Cation Channel 6 (TRPC6), alfa actinina-4 e TGFβ₁ foi quantificado por PCR em tempo real ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em células do sedimento urinário. A expressão dos genes alvo do podócito foi correlacionada com albuminúria, controle glicêmico e função renal. O desempenho diagnóstico dos genes para albuminúria patológica foi determinado por curva ROC, e o seu efeito independente sobre esse desfecho foi avaliado por análise de regressão de Poisson.

Resultados: O RNAm na urina dos genes alvo foi significativamente maior nos pacientes diabéticos em comparação aos não diabéticos, exceto de sinaptopodina e TGFβ₁. A expressão de nefrina foi mais elevada nos indivíduos diabéticos micro e macroalbuminúricos comparado aos controles (p=0,04 e p<0,001 respectivamente), pré diabéticos (p<0,05) e normoalbuminúricos (p<0,05). Embora sua expressão tenha sido maior do que nos não diabéticos, os genes TRPC6, podocalixina e alfa actinina-4 não discriminaram os estágios da ND. A correlação da expressão dos genes com albuminúria e hemoglobina glicada foi estatisticamente significativa. Pacientes pré diabéticos tiveram expressão gênica semelhante aos controles. Na análise multivariada, apenas o gene da nefrina foi preditivo de albuminúria patológica.

Conclusões: A expressão das proteínas associadas ao podócito na urina foi maior nos pacientes diabéticos, mas não houve correlação direta do RNAm dos genes com níveis crescentes de albuminúria, exceto de nefrina. O gene da nefrina foi o único que discriminou os diferentes estágios da ND e foi preditivo de albuminúria patológica, mas a podocalixina e o TRPC6 também se correlacionaram com albuminúria e controle glicêmico. Neste estudo preliminar não se identificou aumento da expressão gênica das proteínas do podócito na urina em indivíduos com pré diabetes.

Palavras chave: podócito, nefropatia diabética, albuminúria, nefrina, TRPC6

ABSTRACT

Introduction: Podocyte damage plays a critical role in the development of diabetic nephropathy (DN). The present study evaluated gene expression of podocyte-associated proteins in urine of pre-diabetic and diabetic patients at different stages of DN.

Material and Methods: We studied 19 pre-diabetic patients, 67 diabetic patients with normo (n = 34), micro (n = 15), or macroalbuminuria (n = 19), and 15 healthy controls. Levels of mRNA of nephrin, podocin, podocalyxin, synaptopodin, transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6), alpha-actinin-4, and TGF- β , were quantitatively measured by real-time polymerase chain reaction in urinary sediment. Gene expression was correlated with albuminuria, glycemic control, and renal function. The diagnostic performance of the genes for detecting pathological albuminuria was assessed by the receiver operating characteristic (ROC) curve and Poisson regression.

Results: The mRNA expression of target genes in urinary sediment was significantly higher in diabetic compared to pre-diabetic patients and controls. Levels of nephrin were higher in diabetic patients with micro or macroalbuminuria than controls (p= 0.04 and p<0.001, respectively), pre-diabetic (p<0.05), and diabetic patients with normoalbuminuria (p<0.05), and increased with increasing rates of albuminuria. Gene expression was similar in pre-diabetic patients and controls. There was a significant positive correlation of gene expression with albuminuria and glycosylated hemoglobin. In the multivariate analysis, only nephrinuria predicted pathological albuminuria.

Conclusions: The expression of podocyte-associated proteins in urine was higher in diabetic patients, but only nephrin correlated with increasing albuminuria and predicted

pathological albuminuria. This preliminary study did not find increased gene transcription in pre-diabetic patients.

Keywords: podocyte, diabetic nephropathy, pre-diabetes, nephrin, podocin, TRPC6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas (adaptado de Hermann Pavenstädt <i>et al.</i>).....	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DM - Diabetes Mellitus

DM1 - Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

DRCT - Doença Renal Crônica Terminal

OMS: Organização Mundial de Saúde

ND - Nefropatia Diabética

TFG - Taxa de Filtração Glomerular

ACEi - Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

ARBs - Bloqueadores dos Receptores 1 de Angiotensina II,

RAS - Sistema Renina-Angiotensina

MBG - Membrana Basal Glomerular

DF - Diafragma em Fenda

CD2AP - CD2-Associated Protein

Ig - Imunoglobulinas

GESF - Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

TRPC6 - Transient Receptor Potential Cation Channel 6

AGE - Produtos de Glicação Avançada

MEC - Matriz Extracelular

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

NF- κ B - Fator Nuclear Kappa B

MAPKs - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

TGF β - Fator de Crescimento Transformador Beta

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract	7
Lista de Figuras	9
Lista de Abreviaturas	10
Capítulo 1. Introdução	13
Capítulo 2. Referencial Teórico	17
2.1. Albuminúria e Diabetes	18
2.2. As células Podocitárias do Filtro Glomerular	19
2.3. A Lesão Renal e Podocitária no Diabetes Melito	27
2.4. Estudos Clínicos e Experimentais da podocitopatia na ND	30
Capítulo 3. Justificativa	34
Capítulo 4. Objetivos	37
Capítulo 5. Referências Bibliográficas	39
Capítulo 6. Artigo	52
Capítulo 7. Considerações Finais	87
Capítulo 8. Anexos	90

Capítulo 1. Introdução

No século XXI, o Diabetes Mellitus (DM) é a primeira causa de doença renal crônica terminal (DRCT) nos Estados Unidos (1, 2). Nos últimos 25 anos, a prevalência de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) nos Estados Unidos como etiologia de DRCT quase duplicou, sendo mais prevalente que hipertensão arterial sistêmica ou glomerulonefrite crônica. Em países asiáticos, a prevalência de DM2 aumentou de três a cinco vezes (3). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a China e Índia terão aproximadamente 130 milhões de indivíduos diabéticos em 2025, consumindo cerca de 40% do orçamento de seu país em saúde (4). Em 2007, o número de pessoas com diabetes no mundo era de 246 milhões, e em 2025 esse número é estimado em 380 milhões. Já para indivíduos com intolerância à glicose ou "estado pré diabético", que em 2007 era de 308 milhões, para 2025 a estimativa é de 418 milhões (5). O aumento da prevalência de DM será maior nos países em desenvolvimento, por exemplo, em 2025 no México 18% de sua população adulta terá DM2 (6).

No mundo, 20% a 40% das pessoas que iniciam o tratamento para DRCT tem como causa nefropatia diabética (ND). Em países norte americanos, quatro em cada dez novos casos que surgem de DRCT são de ND, uma proporção que tem aumentado de forma constante ao longo das últimas décadas e parece não diminuir. Aproximadamente 30% dos indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e 10% dos indivíduos com DM2 irão desenvolver DRCT (7). Na Austrália, a prevalência de diálise por ND aumentou cinco vezes em quatorze anos. Entre 1983 e 2005, no Japão, o aumento do número de pacientes que iniciaram terapia de substituição renal devido a DM foi sete vezes maior, correspondendo a 40% de todas as novas incidências (8). Sabe-se que 1,1 trilhões de dólares são investidos em diálise no mundo, aproximadamente 30% desse valor custeia o tratamento de diabéticos com nefropatia (9).

No Brasil, a incidência de DRC não é bem conhecida, e tomando-se como referência dados da população norte-americana, a prevalência estimada de DRC seria de 1,87% na população brasileira adulta (10). Conforme os dados do censo de 2011 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 91.314 pacientes estavam em tratamento hemodialítico, e em relação a mortalidade anual de pacientes em hemodiálise, o dado mais recente é de 17%, referente ao ano de 2009 (11). As principais causas de DRCT foram hipertensão arterial (26%), DM (18%) e glomerulonefrite crônica (11%) (12). Assim, a doença glomerular diabética e não diabética tem um forte impacto nos custos impostos ao sistema de saúde, pois a doença é progressiva e evolui para DRCT, diálise ou transplante (13).

O estudo "United Kingdom Prospective Diabetes Study" (UKPDS), mostrou que a taxa de progressão da ND nos estágios de normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria foi de 2% a 3% ao ano (14). No seguimento de 4000 participantes, quase 40% desenvolveram microalbuminúria ao longo de 15 anos e, aproximadamente, 30% desenvolveram insuficiência renal, dos quais 50% não tinham aumento prévio de albuminúria (15). Em outro estudo, o "Developing Education for Awareness of Renal and Cardiovascular Risk in Diabetes" (DEMAND), que incluiu 32.208 indivíduos com DM2 de 33 países, 39% tinham microalbuminúria, e a sua prevalência aumentou com a idade, tempo de diabetes e presença de hipertensão arterial (16). A redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e o aumento da albuminúria causada pela ND são fatores de risco independentes para eventos cardiovasculares e morte (17). Portanto, estratégias para detectar a doença renal diabética precocemente incluem a dosagem da albuminúria e a estimativa da TFG através de equações que utilizam a creatinina sérica para o cálculo.

Outra dificuldade a ser superada é a falta de informação dos pacientes sobre sua condição. Baseado em estudos populacionais, para cada paciente diabético conhecido, existe pelo menos um que não sabe que é portador de DM (5); apenas 8,7% da população foi capaz de identificar o DM como fator de risco para a doença renal (18). Assim, a educação pública é a terceira etapa necessária para o controle da doença renal diabética na comunidade (19).

A patogênese da ND não está totalmente elucidada. Estudos recentes mostraram que os podócitos desempenham um papel crítico na progressão desta doença (20). Foi encontrada uma correlação inversa entre o número de podócitos nos glomérulos e o grau de proteinúria (21), e a redução no número de podócitos por glomérulo está relacionada com glomerulosclerose, lesão que contribui para a progressão da ND (22, 23). O controle glicêmico, juntamente com medidas farmacológicas, pode diminuir mas não interromper a progressão da ND para DRCT (24, 25). Para estes pacientes, a única solução disponível é a terapia de substituição da função renal, diálise ou transplante. Face aos níveis epidêmicos de obesidade e diabetes em populações de muitos países ocidentais, uma melhor compreensão da etiopatogenia da doença renal diabética é necessária, para que novas terapias possam ser desenvolvidas. Muitos esforços estão sendo destinados para a identificação dos mecanismos da ND em que o tratamento possa ser feito de forma mais específica, e antes que a lesão renal irreversível ocorra. Atualmente, a proteinúria, mais especificamente a microalbuminúria, é o principal e mais precoce marcador da lesão renal induzida pelo DM (26).

2.1. ALBUMINÚRIA E DIABETES

A presença de proteínas na urina é indicativa de alguma lesão na barreira de filtro do glomérulo na doença renal diabética. A microalbuminúria está presente quando a albuminúria ajustada para creatininúria for 30-300 mg/g de creatinina (amostra de urina) ou 20-200 $\mu\text{g}/\text{min}$ (urina de 24 h), macroalbuminúria >300 mg/g de creatinina ou >200 $\mu\text{g}/\text{min}$ e a proteinúria ≥ 430 mg/g de creatinina ou ≥ 500 mg/24h, respectivamente (27).

A albuminúria atualmente é considerada uma variável contínua (28), em que níveis de albumina acima daquele considerado “normal” (<30 mg/L) apresentam um risco maior para o desenvolvimento de doença renal crônica (29). Indivíduos com ND que apresentam níveis elevados de proteinúria (>500 mg/24 h) evoluem para doença renal terminal mais freqüentemente do que indivíduos com níveis mais baixos de proteinúria (30).

O uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (ACEi) e bloqueadores do receptor 1 de angiotensina II (ARBs), juntamente com o controle glicêmico, estão associados com uma diminuição na deterioração da função renal e retardo no desenvolvimento da doença renal terminal, tanto na ND quanto nas nefropatias não diabéticas (31). Estudos realizados mostraram que o bloqueio precoce do sistema renina-angiotensina (RAS) com ACEi ou ARBs, como o captopril, enalapril, losartan ou irbesartan, não só reduz a pressão arterial e a proteinúria, como também retarda a progressão da doença glomerular na ND (32, 33).

Estudos têm demonstrado um efeito benéfico do bloqueio do RAS usando irbesartan em ratos diabéticos (34, 35). O estudo realizado por Dai et al mostrou que intervenção precoce com irbesartan em ratos diabéticos atenua significativamente os

danos renais e a transdiferenciação dos podócitos, e fornece uma visão inovadora para a aplicação antecipada de ARBs para prevenir o desenvolvimento da ND (36).

A identificação das proteínas dos diferentes domínios do podócito pode ser feita através de técnicas de imunohistoquímica ou por análise molecular. A imunohistoquímica detecta o produto do gene, a proteína, após a sua translação do núcleo para o citoplasma ou superfície da célula. A análise molecular em tempo real (PCR-RT) quantifica a transcrição do RNAm do gene de interesse, o qual codifica uma proteína específica. Como técnica, o PCR em tempo real tem as vantagens de excelente sensibilidade, acurácia e reprodutibilidade, e é capaz de quantificar o RNAm dos genes em baixas concentrações (37). Recentemente, com o desenvolvimento de métodos de extração de RNAm a partir de células do sedimento urinário e aplicação da técnica do PCR em tempo real, a quantificação da expressão de RNAm no sedimento urinário surgiu como um método emergente para estudar a patologia renal. Estudos preliminares sugerem que a determinação do RNAm do sedimento urinário pode ser valioso para identificação e o controle da progressão da doença renal (38, 39).

2.2. AS CÉLULAS PODOCITÁRIAS DO FILTRO GLOMERULAR

O filtro glomerular tem uma seletividade bem definida para macromoléculas baseada em carga elétrica e tamanho. 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 50-100nm), a membrana basal glomerular

(MBG) com espessura de 300 nm, e os podócitos com o diafragma em fenda (40nm) adjacente a membrana basal (40).

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas e diferenciadas, com prolongamentos primários e secundários, denominados pedicelos, que cobrem a superfície externa da MBG. 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) situados no lado oposto estão ancorados à MBG via $\alpha 3\beta 1$ integrinas e α, β distroglicanos (41).

Os pedicelos estão conectados entre si através de uma estrutura especializada de junção célula-célula, denominada diafragma em fenda (DF). O DF situa-se entre dois podócitos adjacentes, e atualmente considera-se ser uma importante barreira à filtração de proteínas (42). Ele é formado por um complexo de proteínas transmembrana: nefrina, NEPH1-3, podocina, FAT1, ve-caderina, e P-caderina (43). A nefrina, NEPH1, podocina, e FAT1 são necessários para a formação da barreira de filtração glomerular; (44) P-caderina não parece ser essencial para filtração glomerular (45) e os papéis de ve-caderina e NEPH2-3 no glomérulo são desconhecidos (46). O endotélio fenestrado parece ser muito grande para impor permeabilidade às macromoléculas, mas em que proporção a membrana basal e o podócito contribuem para esse processo, assim como se a seletividade por carga ou por tamanho é o mecanismo mais determinante, são perguntas que ainda não tem uma resposta definitiva até o momento (47).

Os podócitos são células polarizadas e sua forma única é devida a grande concentração de actina no citoesqueleto, servindo de estrutura para o podócito e permitindo uma adaptação de sua arquitetura quando ocorre algum estresse hemodinâmico ou mecânico, por exemplo (48). Os filamentos de actina permitem ao podócito alterar sua forma e também manter a sua função em condições basais.

O citoesqueleto compreende 3 diferentes estruturas: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos. Os microfilamentos são os principais constituintes do citoesqueleto dos pedicelos, e contem uma grande quantidade de filamentos de actina e miosina. Existem outras proteínas ligantes como a sinaptopodina (49) e α -actinina 4 (50) nos podócitos, que também são importantes para manter sua estrutura. A α -actinina 4 atua na regulação da morfologia e da motilidade do podócito e também na cascata de sinalização intracelular (48).

Kerjaschki (51) caracterizou três diferentes domínios do podócito com base na anatomia molecular de cada segmento, conforme ilustrado na Figura 1 e descrito adiante.

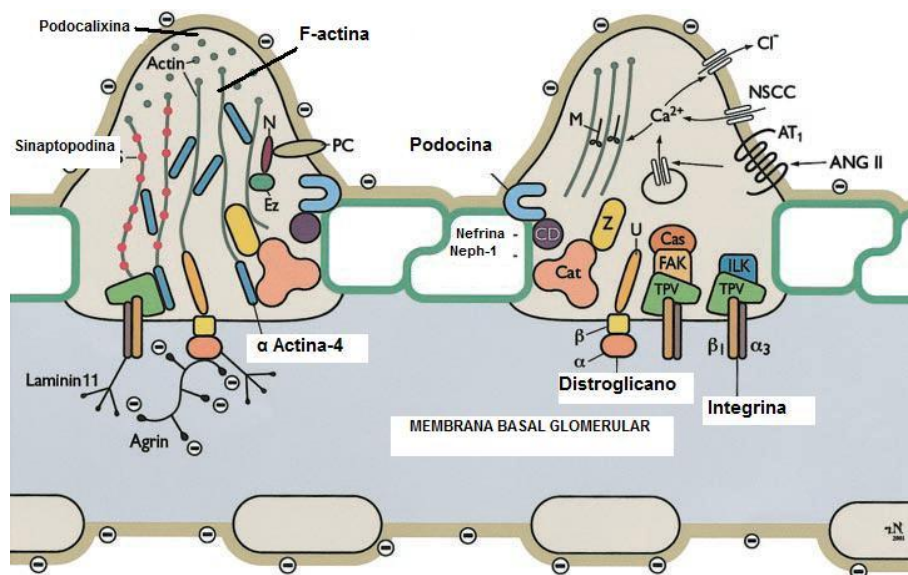


Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas (adaptado de Hermann Pavenstädt *et al.*) (42)

Domínio juncional: Os espaços entre os processos podocitários são poros de filtração altamente organizados, medindo entre 25-60 nm, onde o DF serve de “ponte”

entre dois podócitos. Na ultra-estrutura, descrita inicialmente por Karnovsky (52), observa-se séries de retângulos de 4x14 nm de área que configuram uma estrutura tipo “zíper”, que anatomicamente constituiria uma barreira de macromoléculas na função de filtro do glomérulo.

A estrutura molecular do DF é composta por uma variedade de proteínas, que estão ancoradas ao citoesqueleto do podócito através de interações com outras proteínas, como, por exemplo, a CD2AP (CD2- Associated Protein), um ligante da molécula de adesão CD2. Outras proteínas importantes do podócito são descritas a seguir:

- 1) Nefrina: Foi primeiramente descoberta por Tryggvason (44), é um produto do gene NPHS1, sendo uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas (Ig). Contem um domínio extracelular com 8 repetições de imunoglobulinas, um módulo de fibronectina tipo III e um pequeno domínio intracelular. Essas moléculas estendem-se uma sobre as outras, ligadas por pontes dissulfeto, permitindo o fechamento da fenda como um zíper (53). Uma mutação autossômica recessiva pode causar a síndrome nefrótica congênita, tipo Finnish, desencadeando uma proteinúria maciça intra-uterina (47, 53). Níveis reduzidos de nefrina foram descritos em modelos animais de ND e em humanos, o que talvez possa ser mediado pela sinalização da proteino-quinase C- α e redução da fosforilação da via da quinase-fosfatidilinositol-3 intra-citoplasmática (54, 55).
- 2) Podocina: Proteína codificada pelo gene NPHS2, pertencendo à família das estomatinas (56). Schwartz *et al.* referem que a podocina está associada ao componente lipídico do DF como se fosse um “grampo de cabelo”, e interage com a nefrina e o CD2AP (57). Essa interação sugere que a

podocina auxilia na organização estrutural do DF, pois estudos mostram que a nefrina e a podocina interagem com os filamentos de actina do citoesqueleto (58). A mutação do gene NPHS2 está presente em famílias com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) hereditária. Sua apresentação fenotípica é a síndrome nefrótica córtico-resistente, com baixo risco de recorrência no rim transplantado (59, 60).

- 3) CD2AP: É uma molécula adaptadora, que se liga no citoplasma do domínio CD2. É uma proteína de membrana da célula T e células *natural killer*. Contem um sítio ligante de actina na porção N-terminal (61). Interage com a nefrina ancorando-a ao citoesqueleto e mantendo estável a arquitetura do DF (62).
- 4) Neph1: Contem cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina e estruturalmente está relacionado à nefrina, e interage com a terminação carboxi da podocina. É uma proteína sinalizadora através do sitio de ligação Grb2 SH2, e participa da interação célula-célula. Sua deleção em camundongos *knockout* causa achatamento podocitário, expansão e hiperplasticidade mensangial, proteinúria e morte do animal até a oitava semana de vida (63).
- 5) Transient Receptor Potential Cation Channel 6 (TRPC6): O TRPC6 é um membro da subfamília C dos canais de potencial de receptor transitório. É um grupo de canais seletivos para íons cálcio (Ca^{2+}) e é composto por seis subgrupos, sendo que o TRPC2 é um pseudogene. Com base na sequência de aminoácidos, os canais TRPC se dividem em 3 grupos: 1) TRPC1; 2) TRPC4 e TRPC5; e 3) TRPC3, TRPC6 e TRPC7. O TRPC6 é uma proteína

transmembrana de canais iônicos localizada na membrana celular do podócito, adjacente ao DF (64). Uma mutação no TRPC6 está associada com o desenvolvimento de GESF (65).

Domínio Apical: A membrana apical do podócito é carregada negativamente, devido à presença de sialoproteínas aniônicas como a podocalixina (Pdx), podoplanina e podoendina (66). Essas proteínas exercem duas funções, a manutenção da carga negativa da MBG, o que limita a passagem de albumina, e a manutenção da separação física de podócitos adjacentes (67).

A Pdx é a maior das sialoproteínas e , provavelmente, a proteína marcadora mais utilizada para fenotipar os podócitos na urina. Está localizada na membrana plasmática dos podócitos e possui uma importância crítica para a formação e preservação da arquitetura dos podócitos, possivelmente impedindo a adesão dos podócitos às células parietais da cápsula de Bowman (68). Devido à sua localização na membrana apical, permanece bem preservada em muitas glomerulopatias, independente da integridade do diafragma em fenda. A Pdx é um indicador de podócitos, não só na ND, mas em diversas doenças renais, como glomerulopatia membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa, GESF, Nefropatia por IgA e púrpura de Henoch-Schoenlein Púrpura (69), nefrite lúpica e pré-eclampsia (70). Em comparação com outros marcadores, a Pdx provou ser o marcador mais reprodutível para identificação de podócitos na urina. De acordo com Vogelmann et al. (71), as células positivas para Pdx são também positivas para outros marcadores do podócito em 30-40% das vezes, mas as células positivas para outros marcadores específicos de podócitos sempre serão positivas para Pdx. É importante notar que a expressão de Pdx não é específica para os

podócitos, pois ela também está presente nas células endoteliais, plaquetas, megacariócitos e células epiteliais parietais (CEPs). Embora fosse demonstrado que a Pdx na urina não marca os marcadores endoteliais e mesangiais, a proporção de células positivas entre PECs e Pdx não é bem conhecida (72, 73).

Citoesqueleto: O citoesqueleto dos podócitos, é constituído unicamente por filamentos de actina e de proteínas associadas, como a α -actinina 4, miosina, a talina e a vinculina. Estas proteínas desempenham um papel importante na fixação dos podócitos à MBG e na adaptação da forma e no movimento dos podócitos para acomodar injúria a elevação da pressão intracelular do glomérulo (74).

A sinaptopodina interage com a α -actinina 4 no citoesqueleto, modulando a sua expressão e promovendo o alongamento dos filamentos de actina, permitindo que as alterações da membrana basal repercutam na forma e no movimento do podócito, achatamento ou a simplificação dessas células (75). No entanto, sua expressão também pode ser encontrada em dendritos telencefálicos (49). Semelhante a nefrina e podocina, a expressão de sinaptopodina nos podócitos está diminuída em biópsias de pacientes com doenças renais (76). Segundo De Petris et al. (77), a expressão de sinaptopodina medida por RT-PCR tem sido utilizada para a identificação de podócitos na urina, corroborando com este estudo de Peterman et al. em modelo de roedor com nefrite induzida por puromicina, que mostrou a expressão aumentada de sinaptopodina e diminuída de podocina (78).

Domínio Basal: O domínio basal é constituído por proteínas que tem a função de ancorar o podócito na MBG, como as $\alpha3\beta1$ integrinas e os α,β distroglicanos (41). A $\alpha3\beta1$ integrina é a isoforma mais abundante. A cadeia $\alpha3$ é necessária para o desenvolvimento do tufo glomerular. Estudos experimentais mostraram que a

deficiência de integrina- $\alpha 3$ ocasiona defeitos no capilar glomerular e na formação dos pedicelos (79). Ratos nos quais o gene da integrina $\alpha 3$ é inativado durante o desenvolvimento dos podócitos, através da utilização do sistema de recombinação Cre-loxP, desenvolvem proteinúria maciça dentro da primeira semana de vida e a microscopia eletrônica do rim mostra a retração dos pedicelos da MBG (80). Assim, a integrina $\alpha 3$ também é necessária para a maturação do filtro glomerular

Em resumo, a complexa arquitetura das proteínas que constituem o podócito é necessária para que esta célula especializada realize as seguintes funções: a) manutenção da integridade da barreira às proteínas; b) manutenção da forma da alça capilar glomerular; c) oposição à pressão gerada dentro do glomérulo; d) síntese e manutenção da MBG; e) produção e secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) necessário para a integridade da célula endotelial glomerular. Qualquer alteração em uma dessas funções após a lesão ao podócito pode ocasionar proteinúria, síndrome nefrótica e perda da função renal (81).

A microalbuminúria é um marcador precoce da doença renal no diabetes e resulta do dano na barreira do filtro glomerular, em nível das células epiteliais do capilar glomerular. Esse dano ocorre por diferentes mecanismos que serão citados adiante, e resulta em diversas alterações na estrutura e organização dos podócitos, permitindo o escape de proteínas como a albumina para o espaço urinário de Bowman, túbulos e interstício renal.

2.3. A LESÃO RENAL E PODOCITÁRIA NO DIABETE MELITO

A hiperglicemia é um pré-requisito para o desenvolvimento da ND, desencadeando alterações metabólicas intracelulares quando a fisiologia celular não é capaz de utilizar as quantidades excessivas de glicose (82). Um estudo com pacientes diabéticos do tipo 1, normotensos e albuminúricos, mostrou que o número de podócitos estava significativamente reduzido (83). No DM2, resultados semelhantes também foram descritos (84).

A hiperglicemia ativa inúmeras vias intracelulares em diferentes tipos de células renais, com pequenas exceções relacionadas a especificidade de cada tecido. Em geral, os eventos celulares incluem um fluxo aumentado de polióis e hexosaminas, a geração de produtos de glicação avançada (AGE) e o aumento da atividade de proteína quinase C, citocinas e fatores de crescimento, como a Angiotensina II e o fator de crescimento transformador beta (TGF β). Também ocorre uma expressão aumentada de enzimas que degradam a matriz extracelular (MEC) e de seus inibidores, e um aumento na síntese e deposição de MEC. As espécies reativas de oxigênio (ROS) têm sido associadas à sinalização intracelular envolvida em todos estes eventos (85). As ROS exercem o seu efeito prejudicial não só por oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, mas também por interferirem em moléculas sinalizadoras. Como moléculas sinalizadoras, as ROS ativam a transdução de sinal intracelular e as cascatas de transcrição, nas quais proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e o Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B) desempenham papéis cruciais (86).

A análise ultraestrutural na fase inicial na ND mostra lesões específicas da unidade do podócito, que incluem hipertrofia celular, achatamento ou simplificação dos podócitos e redução de seu número e densidade, como resultado de apoptose e/ou descolamento da MBG, em paralelo com a expansão de matriz e acúmulo de proteínas

de matriz como fibronectina, laminina e colágeno. Em nível molecular, a redução do conteúdo de nefrina no diafragma em fenda tem sido demonstrada em modelos experimentais (87) e em humanos (26).

A sequência detalhada de eventos em nível molecular ainda não é clara. Uma das possibilidades é que o processo degenerativo possa ser iniciado por defeitos moleculares na estrutura do DF. Um dano neste segmento do filtro glomerular ocasiona o escape de albumina, provocando lesão nos podócitos e perda dos mesmos como um evento secundário (88). Estudos em pacientes diabéticos têm mostrado que a diminuição dos podócitos está diretamente relacionada ao grau de proteinúria e à progressão da doença, e que o número original de podócitos poderia prever o índice de aumento da albuminúria (89).

Como a contagem de podócitos pode variar entre indivíduos, a densidade do volume numérico ao invés do número de células absoluto foi sugerida como fator mais específico de progressão da doença (90). Na diabetes, entretanto, a hipertrofia glomerular excede o limiar determinado, e com isso os podócitos não são mais capazes de manter a distância estreita entre as células vizinhas. Nesta fase, a hipertrofia compensatória é acompanhada por alterações morfológicas do podócito e na expressão das proteínas dos seus diferentes domínios. As alterações estão associadas a susceptibilidade dos podócitos em se descolar da MBG, reduzindo ainda mais a sua densidade (91).

As alterações fisiopatológicas que causam o comprometimento precoce dos podócitos na ND ainda estão indefinidas. No entanto, fatores metabólicos e hemodinâmicos, estão envolvidos neste processo (91). Fatores metabólicos incluem hiperglicemia e produtos de reações não enzimáticas da glicose, tais como auto-

oxidação ou glicação de proteínas, o estresse oxidativo (dano ocasionado pelas espécies ativas de oxigênio), os produtos da glicosilação avançada (interação da glicose com moléculas protéicas ou lipídicas) e os efeitos bioquímicos e desregulatórios da hiperglicemia e da glicose intracelular sobre os podócitos. Os fatores hemodinâmicos determinantes são a hipertrofia e a hiperfiltração glomerular, que ocasionam aumento da pressão hidráulica transcápsular, lesando a MBG, causando descolamento de podócito, e, induzindo o desenvolvimento de glomeruloesclerose. Uma variedade de citocinas e fatores de crescimento são ativados por vias complexas de transdução de sinal, como o TGF β , considerado um mediador do desenvolvimento de hipertrofia renal, acúmulo de matriz mesangial extracelular e fibrose renal. Entretanto, a sua relação causal na gênese da albuminúria na ND ainda é controversa (85).

Sabe-se que níveis elevados de albumina na urina sobrecarregam a capacidade de reabsorção e metabolização dos túbulos renais, promovendo inflamação, glomeruloesclerose, fibrose intersticial e atrofia tubular e resultando na redução da TFG. Uma intervenção antes de estes eventos ocorrerem é crítica, pois cicatrizes da fase crônica da nefropatia são irreversíveis. O surgimento de albuminúria também pode refletir uma disfunção generalizada do endotélio vascular em nível sistêmico, podendo se manifestar de forma semelhante no glomérulo e caracterizando um outro mecanismo de lesão renal (92). Zanatta CM et al (93), demonstraram uma expressão aumentada de endotelina 1 em células endoteliais de glomérulos e de capilares peritubulares em biópsias de pacientes com ND, em associação com níveis significativamente aumentados de proteinúria quando comparado a rins histologicamente normais. No entanto, ainda faltam evidências que mostrem claramente a célula endotelial como célula alvo para lesão e progressão da doença renal diabética. Estudos recentes têm

apontado a célula epitelial do capilar glomerular – o podócito - como a chave para o início da lesão na doença renal diabética e para o desenvolvimento de proteinúria (94).

2.4. ESTUDOS CLÍNICOS E EXPERIMENTAIS DE PODOCITOPATIA NA NEFROPATIA DIABÉTICA

Os mecanismos fisiopatológicos que resultam na redução da densidade dos podócitos na doença renal diabética, assim como nas nefropatias não diabéticas, têm sido intensamente investigados. Atualmente duas hipóteses são descritas: a ocorrência de apoptose do podócito e/ou o descolamento do podócito da MBG aparecendo como célula viável na urina, ambos mecanismos levando a uma redução significativa do número de podócitos nos glomérulos renais (95).

Estudos clínicos tem demonstrado que a diminuição dos podócitos por apoptose ou por descolamento nos glomerulos é um achado frequente na ND (83, 84). A podocitopenia está diretamente relacionada com a progressão da doença, e inversamente correlacionada com o controle da hipertensão arterial e da diabetes (96).

Nakamura et al demonstraram em humanos a presença de podocitopenia na ND e também em diversas nefropatias não diabéticas, como a GESF, a nefrite lúpica e na nefropatia por IgA (97). Estudando 50 pacientes diabéticos (10 normoalbuminúricos, 15 microalbuminúricos, 15 macroalbuminúricos e 10 renais crônicos) e 10 indivíduos normais como controles, esses autores quantificaram a podocitúria por imunofluorescência com anticorpo anti-podocalixina, proteína expressa na membrana externa dos podócitos, e correlacionaram a podocitúria com a excreção urinária de albumina. A podocitúria estava ausente nos controles e nos diabéticos com normoalbuminúria, e ocorreu em 53% e 80% dos casos de ND com micro e

macroalbuminúria, respectivamente. Não foi encontrada correlação entre podocitúria e albuminúria. Utilizando pioglitazona em diabéticos com microalbuminúria, esses autores também demonstraram uma redução tanto da microalbuminúria quanto da podocitúria (98).

Meyer et al (84) observaram em diabéticos com nefropatia que o número reduzido de podócitos, quantificado na análise morfológica de biópsias renais, foi um fator preditivo forte para piora da albuminúria e progressão mais rápida da ND. Dalla Vestra et al (23) avaliando o número e a densidade dos podócitos por microscopia eletrônica nas diferentes fases da ND, verificaram redução de ambos os parâmetros já nas fases iniciais da nefropatia, em correlação negativa com o nível de albuminúria. Essa correlação negativa entre podocitopenia e albuminúria em pacientes com ND também foi observada por White et al (83) , tanto em um corte transversal quanto em um seguimento longitudinal de 3 anos. Na comparação entre pacientes com ND e indivíduos saudáveis, Zheng et al (99) mostraram que a expressão gênica de sinaptopodina, CD2AP, α -actinina 4, podocalixina e podocina estava significativamente aumentada nos pacientes diabéticos. Adicionalmente, estratificando os pacientes diabéticos pelo nível de albuminúria, estes autores demonstraram um aumento crescente da expressão destas moléculas, diretamente proporcional ao aumento da albuminúria.

Hara et al. (100) detectaram podócitos e seus fragmentos na urina de humanos com diversas doenças glomerulares por imunofluorescência com anticorpos anti-podocalixina. Lemley et al. (101) demonstraram podocitúria na urina de humanos com nefropatia por IgA e lúpus eritematoso sistêmico (LES), em correlação com a gravidade da doença. Em pacientes com glomerulosclerose diabética, a expressão de nefrina estava significativamente aumentada quando comparada a pacientes diabéticos

microalbuminúricos. Entretanto, não foi encontrada diferença na expressão de nefrina comparando diabéticos microalbuminúricos com indivíduos saudáveis (102).

Wang et al (103) relataram o aumento da expressão de RNAm das proteínas do podócito (nefrina, podocina, sinaptopodina e α -actinina 4 no sedimento urinário de pacientes com ND comparados com indivíduos saudáveis. Em outro estudo do mesmo grupo com pacientes diabéticos, o número de podócitos por unidade de glomérulo se correlacionou significativamente com a expressão intra renal de nefrina e podocina, e com a expressão de sinaptopodina na urina. Além disso, a expressão de todos os genes foi correlacionada com a função renal basal, e inversamente correlacionada com o índice de fibrose tubular e intersticial do túbulo renal (38). Em pacientes com doença renal progressiva, como por exemplo GESF, nefropatia membranosa e ND, o aumento do níveis de TGF β foi observado nas células podocitárias. O TGF β por se tratar de um marcador de fibrose, foi estudado por Wahab et al (104) em pacientes diabéticos com glomeruloesclerose, mostrando que os podócitos adjacentes aos segmentos de esclerose tinham uma expressão aumentada do RNAm do TGF β e de sua proteína. Esse aumento da expressão de TGF β também ocorreu nos podócitos de animais diabéticos (105).

Outro mecanismo que pode levar a podocitopenia é a apoptose. Susztak et al. (106) demonstraram que a produção aumentada de ROS tem um papel importante na apoptose de podócitos e no descolamento da MBG in vitro e in vivo. Em condições normais, os podócitos não podem se proliferar pois são células terminais, assim a lesão ou a perda dos podócitos constitui um fator de lesão glomerular na ND.

O aumento da produção de ROS, ativa a proteína quinase mitogénica p38 (MAPK) e a caspase 3, ambas moléculas pró-apoptóticas. Níveis elevados de glicose também resultam na ativação de proteína quinase C-b1 e do NF- κ B, ambos associados

com a patogênese da hiperglicemia mediada pelo estresse. O aumento no nível do p27KIP dependente de ciclina - inibidor da quinase, sensibiliza os podócitos para hipertrofia e apoptose. Além disso, aumenta a expressão de TGF β , a sinalização do receptor do TGF β II e do fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A). Os níveis aumentados de TGF β , uma citocina pró-apoptótica, resulta na morte programada dos podócitos (107).

Um estudo recente com podócitos expostos a altas concentrações de glicose identificou uma diminuição da expressão de α -actinina 4, bem como inibição de anexinas (Anexina 3 e 6) em nível da proteína e do RNAm (108). As anexinas desempenham um papel importante na organização da membrana celular e estas alterações podem estar envolvidas na reorganização de domínios especializados da membrana dos podócitos, tais como o DF, o qual é de importância crítica para a função anti-proteinúrica destas células.

Capítulo 3. Justificativa

A nefropatia diabética (ND) é a primeira causa de doença renal crônica terminal no mundo, impondo elevados custos ao sistema de saúde decorrentes do alto índice de morbidade e mortalidade cardiovascular e da necessidade de métodos de substituição de função renal como diálise e transplante renal.

Na última década, o papel crítico do podócito na proteinúria foi bem estabelecido e diversos estudos têm mostrado que a camada epitelial do filtro glomerular é determinante para a retenção de proteínas de maior peso molecular, contribuindo significativamente para o processo de filtração. As funções do podócito incluem manutenção da integridade da barreira de filtração, síntese e manutenção da membrana basal glomerular (MBG), produção e secreção dos fatores de crescimento, neutralização da pressão gerada no capilar glomerular, e regulação dinâmica de sua arquitetura.

A investigação dos mecanismos de proteinúria, o principal e mais precoce marcador de lesão renal na ND, tem sido intensa. A identificação precoce da lesão podocitária é comumente feita no tecido renal, em que a expressão do RNAm dos genes das proteínas do podócito está suprimida. Mais recentemente tem sido utilizada uma ferramenta não invasiva para diagnóstico da podocitopatia, a análise molecular dos genes alvo do podócito em células do sedimento urinário. O aumento do RNAm dos genes do podócito é uma evidência do descolamento destas células da MBG, excretadas como células viáveis ou em apoptose. O RNAm dos genes alvo tem mostrado boa correlação com albuminúria e redução da taxa de filtração glomerular na ND, sendo preditivos de progressão da doença.

O melhor entendimento dos mecanismos de proteinúria e podocitúria é crucial para o diagnóstico e prognóstico da ND, além de auxiliar no desenvolvimento de

terapias específicas para reduzir a lesão renal e atenuar a sua progressão. Assim, esse estudo se justifica por identificar a lesão podocitária de forma não invasiva em pacientes diabéticos, e por investigar a podocitopatia antes do diagnóstico do diabetes, avaliando indivíduos de risco com pré diabetes e síndrome metabólica.

4.1 . Objetivo Primário

Quantificar a expressão gênica de proteínas do podócito nas diferentes fases da nefropatia diabética em pacientes diabéticos do tipo 1 ou do tipo 2, e em indivíduos pré diabéticos.

4.2. Objetivos Secundários

1. Quantificar a expressão do RNAm de moléculas estruturais do podócito em células do sedimento urinário de pacientes portadores de Diabetes Mellitus do tipo 1 ou do tipo 2, com e sem aumento de albuminúria, comparado a indivíduos normais e pré diabéticos.

2. Avaliar se pacientes pré diabéticos apresentam precocemente podocitúria através da quantificação do RNAm de moléculas estruturais do podócito na urina, comparado a indivíduos saudáveis

3. Avaliar a correlação da expressão das moléculas estruturais do podócito com albuminúria, taxa de filtração glomerular e controle glicêmico.

4. Determinar a acurácia dos genes alvo do podócito para diagnóstico de albuminúria patológica

Capítulo 5. Referências Bibliográficas

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-7.
2. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998;21:1414-31.
3. Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH, et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* 2006;368:1681-8.
4. Atkins RC, Zimmet P. World Kidney Day 2010: diabetic kidney disease--act now or pay later. *American journal of kidney diseases. Am J Kidney Dis* 2010; 55: 205-8.
5. Sicree R, Shaw J, Zimmet P. Diabetes and impaired glucose tolerance. In: Gan D, editor. *Diabetes atlas*, 3rd ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation 2006. p. 15–109
6. Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 2011; 170: 1-7.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Incidence of end-stage renal disease among persons with diabetes--United States, 1990-2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005 ;54:1097-100.
8. Yamagata K, Iseki K, Nitta K, Imai H, Iino Y, Matsuo S, et al. Chronic kidney disease perspectives in Japan and the importance of urinalysis screening. *Clin Exp Nephrol* 2008; 12:1-8.
9. Lysaght MJ. Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 2002 ;13 :S37-S40.
10. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DR. 2010 report of the Brazilian dialysis census. *J Bras Nefrol* 2011; 33: 442-7.
11. Censo Nefrológico. Sociedade Brasileira de Nefrologia. 2010.

12. Oliveira MB, Romao JE, Jr., Zatz R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int Suppl* 2005; 97:S82-S86.
13. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1448-1456.
14. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int* 2003 63: 225-32.
15. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. *Diabetes* 2006; 55:1832-1839.
16. Parving HH, Lewis JB, Ravid M, Remuzzi G, Hunsicker LG. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: a global perspective. *Kidney Int* 2006; 69:2057-2063.
17. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1813-1821.
18. Dunstan DW, Zimmet PZ, Welborn TA, De Courten MP, Cameron AJ, Sicree RA, et al. The rising prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes care* 2002; 25: 829-34.
19. White SL, Polkinghorne KR, Cass A, Shaw J, Atkins RC, Chadban SJ. Limited knowledge of kidney disease in a survey of AusDiab study participants. *Med J Aust* 2008 18;188:204-208.
20. Whaley-Connell A, Sowers JR, McCullough PA, Roberts T, McFarlane SI, Chen SC, et al. Diabetes mellitus and CKD awareness: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 2009 ;53:S11-S21.

21. Marshall SM. The podocyte: a major player in the development of diabetic nephropathy? *Horm Metab Res* 2005 ;37: 9-16
22. Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, et al. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J Pathol* 2006 ;168:42-54.
23. Kriz W, Lemley KV. The role of the podocyte in glomerulosclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999 ; 8:489-97.
24. Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1031-5.
25. Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int* 2005;67:799-812.
26. Ruggenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, et al. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2004 ;351: 1941-51.
27. Wolf G, Ziyadeh FN. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 2007;106:26-31.
28. Zelmanovitz T GJ, Paggi A, Azevedo MJ. Nefropatia Diabética. In: Gross JL, Silveiro SP. *Rotinas Diagnósticas em Endocrinologia*. 1 ed ed. Porto Alegre: ARTMED; 2004.
29. Ruggenti P, Remuzzi G. Time to abandon microalbuminuria? *Kidney Int* 2006;70:1214-22.
30. Karalliedde J, Viberti G. Hypertension and microalbuminuria: risk factors for cardiovascular disease in diabetes. *Curr Hypertens Rep* 2005; 7 :1-2.

31. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:288-96.
32. Remuzzi A, Gagliardini E, Sangalli F, Bonomelli M, Piccinelli M, Benigni A, et al. ACE inhibition reduces glomerulosclerosis and regenerates glomerular tissue in a model of progressive renal disease. *Kidney Int* 2006;69:1124-30.
33. Reiser J, Mundel P. Dual effects of RAS blockade on blood pressure and podocyte function. *Curr Hypertens Rep* 2007;9:403-8.
34. Kalaitzidis R, Bakris GL. Effects of angiotensin II receptor blockers on diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl* 2009 ;27:S15-S21.
35. Liu BC, Chen Q, Luo DD, Sun J, Phillips AO, Ruan XZ, et al. Mechanisms of irbesartan in prevention of renal lesion in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003 ;24: 67-73.
36. Liu BC, Xu Y, Ma KL, Huang HQ, Yin LF, Liu DG. Effects of irbesartan on the expression of matrix metalloproteinase-2/tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118:1040-4.
37. Dai HY, Zheng M, Tang RN, Ni J, Ma KL, Li Q, et al. Effects of angiotensin receptor blocker on phenotypic alterations of podocytes in early diabetic nephropathy. *Am J Med Sci* 2011 ;341: 207-14.
38. Liss B. Improved quantitative real-time RT-PCR for expression profiling of individual cells. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30: e89.
39. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li KT, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. *Ren Fail* 2010; 32:372-9.

40. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract.* 2007; 106:c169-c179.
41. Deen WM, Lazzara MJ, Myers BD. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:F579-F596.
42. Raats CJ, van den Born J, Bakker MA, Oppers-Walgreen B, Pisa BJ, Dijkman HB, et al. Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 2000;156:1749-65.
43. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83: 253-307.
44. Cohen CD, Klingenhoff A, Boucherot A, Nitsche A, Henger A, Brunner B, et al. Comparative promoter analysis allows de novo identification of specialized cell junction-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5682-7.
45. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006 Mar; 354: 1387-401.
46. Radice GL, Ferreira-Cornwell MC, Robinson SD, Rayburn H, Chodosh LA, Takeichi M, et al. Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice. *J Cell Biol* 1997; 139:1025-32.
47. Pozzi A, Jarad G, Moeckel GW, Coffa S, Zhang X, Gewin L, et al. Beta1 integrin expression by podocytes is required to maintain glomerular structural integrity. *Dev Biol* 2008; 316: 288-301.
48. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2: 271-82.
49. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, Pavenstadt H, Davidson GR, Kriz W, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation

during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 1997 ; 236: 248-58.

50. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997 ;139: 193-204.

51. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-6.

52. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001;108:1583-7.

53. Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1972; 2:35-60

54. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)* 2006;11: 274-81.

55. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, Uehara G, Maruyama M, Honma M, et al. Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004 ;19: 380-5

56. Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, et al. Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in-vivo. *Kidney Int* 2006;70:1456-62.

57. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, et al. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002;160:131-9.

58. 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;108:1621-9.

59. Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V, Mundel P, et al. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 2002;161:1459-66.
60. 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;24:349-54.
61. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Moriniere V, Tete MJ, Legendre C, et al. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post-transplant recurrence. *Kidney Int* 2004;66:571-9.
62. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 1998;94:667-77.
63. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999;286:312-5.
64. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001;21:4829-36.
65. Reiser J, Polu KR, Moller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005; 37: 739-44.
66. Thebault S, Hoenderop JG, Bindels RJ. Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006; 13:110-7.

67. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984; 98:1591-6.
68. Matsui K, Breitender-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14: 9-11.
69. 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.
70. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; 2: 231-8.
71. Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, Rosenthal DW, Watson WJ, Brost BC, et al. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196:e1-e7.
72. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *American journal of physiology. Am J Physiol Renal Physiol* 2003 ;285: F40-F48.
73. Kanno K, Kawachi H, Uchida Y, Hara M, Shimizu F, Uchiyama M. Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases. *Nephron Clin Pract* 2003;95: c91-c99.
74. Yu D, Petermann A, Kunter U, Rong S, Shankland SJ, Floege J. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1733-41.

75. Pavenstadt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *American journal of physiology. Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F173-F179.
76. 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;115:1188-98.
77. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2001;59:118-25.
78. De Petris L, Patrick J, Christen E, Trachtman H. Urinary podocyte mRNA excretion in children with D+HUS: a potential marker of long-term outcome. *Ren Fail* 2006;28:475-82.
79. Petermann AT, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, et al. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int* 2003;64:1222-31.
80. Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 1996;122:3537-47.
81. Sachs N, Kreft M, van den Bergh Weerman MA, Beynon AJ, Peters TA, Weening JJ, et al. Kidney failure in mice lacking the tetraspanin CD151. *J Cell Biol* 2006 9;175: 33-9.
82. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-47.
83. Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes *Endocr Rev* 2004;25: 807-30.

84. White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, et al. Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 2002;51:3083-9.
85. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia* 1999;42:1341-4.
86. Schrijvers BF, De Vriese AS, Flyvbjerg A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr Rev* 2004;25:971-1010.
87. Lee HB, Seo JY, Yu MR, Uh ST, Ha H. Radical approach to diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2007; 106: S67-S70.
88. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001;44:874-7.
89. Lahdenkari AT, Lounatmaa K, Patrakka J, Holmberg C, Wartiovaara J, Kestila M, et al. Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 2611-8.
90. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001;59:2104-13.
91. Siu B, Saha J, Smoyer WE, Sullivan KA, Brosius FC, 3rd. Reduction in podocyte density as a pathologic feature in early diabetic nephropathy in rodents: prevention by lipoic acid treatment. *BMC Nephrol* 2006; 15: 7-6.
92. Gruden G, Perin PC, Camussi G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Curr Diabetes Rev* ;1: 27-40.

93. Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008;51:714-25.
94. Zanatta CM, Veronese FV, Loreto Mda S, Sortica DA, Carpio VN, Eldeweiss MI, et al. Endothelin-1 and endothelin a receptor immunoreactivity is increased in patients with diabetic nephropathy. *Ren Fail* 2012;34:308-15.
95. Reddy GR, Kotlyarevska K, Ransom RF, Menon RK. The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17: 32-6
96. Kumar D, Robertson S, Burns KD. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem.* 2004 ;259: 67-70.
97. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2007;72:1262-72.
98. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, angiotensin II receptor antagonist and calcium antagonist on urinary podocytes in patients with IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 2000;20:373-9.
99. Nakamura T, Ushiyama C, Osada S, Hara M, Shimada N, Koide H. Pioglitazone reduces urinary podocyte excretion in type 2 diabetes patients with microalbuminuria. *Metabolism* 2001; 50: 1193-6.
100. Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* 2011;6:e20431.
101. Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:408-16.

102. Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002;61:1475-85.
103. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta* 2005; 361: 182-90
104. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, Yiannikouris O, Wright A, Babelova A, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* 2005;48:2650-60.
105. Baba M, Wada J, Eguchi J, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, et al. Galectin-9 inhibits glomerular hypertrophy in db/db diabetic mice via cell-cycle-dependent mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3222-34.
106. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006;55:225-33.
107. Eid AA, Gorin Y, Fagg BM, Maalouf R, Barnes JL, Block K, et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. *Diabetes* 2009;58:1201-11.
108. Schordan S, Schordan E, Endlich N, Lindenmeyer MT, Meyer-Schwesinger C, Meyer TN, et al. Alterations of the podocyte proteome in response to high glucose concentrations. *Proteomics* 2009;9:4519-28.

Gene expression of podocyte-associated proteins in urine of pre-diabetic and diabetic patients with normo, micro or macroalbuminuria

Nascimento JF¹, Canani LH², Gerchman F², Rodrigues PG¹, Joelsons G¹, dos Santos M¹, Pereira S¹, Veronese FV^{1,3}

¹ Post Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Division of Endocrinology, Porto Alegre Clínicas Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil and ³Division of Nephrology, Porto Alegre Clínicas Hospital, Porto Alegre, RS, Brazil

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

Running title: Podocyte-associated proteins in diabetic nephropathy

Numero de palavras do texto:

Numero de palavras do resumo: 249

Numero de tabelas: 04

Numero de figuras: 03

Abstract

Introduction: Podocyte damage plays a critical role in the development of diabetic nephropathy (DN). The present study evaluated gene expression of podocyte-associated proteins in urine of pre-diabetic and diabetic patients at different stages of DN.

Material and Methods: We studied 19 pre-diabetic patients, 67 diabetic patients with normo (n = 34), micro (n = 15), or macroalbuminuria (n = 19), and 15 healthy controls. Levels of mRNA of nephrin, podocin, podocalyxin, synaptopodin, transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6), alpha-actinin-4, and TGF- β_1 were quantitatively measured by real-time polymerase chain reaction in urinary sediment. Gene expression was correlated with albuminuria, glycemic control, and renal function. The diagnostic performance of the genes for detecting pathological albuminuria was assessed by the receiver operating characteristic (ROC) curve and Poisson regression.

Results: The mRNA expression of target genes in urinary sediment was significantly higher in diabetic compared to pre-diabetic patients and controls. Levels of nephrin were higher in diabetic patients with micro or macroalbuminuria than controls (p= 0.04 and p<0.001, respectively), pre-diabetic (p<0.05), and diabetic patients with normoalbuminuria (p<0.05), and increased with increasing rates of albuminuria. Gene expression was similar in pre-diabetic patients and controls. There was a significant positive correlation of gene expression with albuminuria and glycated hemoglobin. In the multivariate analysis, only nephrinuria predicted pathological albuminuria.

Conclusions: The expression of podocyte-associated proteins in urine was higher in diabetic patients, but only nephrin correlated with increasing albuminuria and predicted pathological albuminuria. This preliminary study did not find increased gene transcription in pre-diabetic patients.

Keywords: podocyte, diabetic nephropathy, pre-diabetes, nephrin, podocin, TRPC6

Introduction

Diabetic nephropathy (DN) has significantly increased as a leading cause of chronic renal disease (ESRD) worldwide. In Brazil, 28% of hemodialysis patients have DN as the etiology of ESRD (1). The pathogenesis of DN is not yet fully understood, and research studies have focused on the mechanisms of glomerular injury and podocyte damage.

Proteinuria, more specifically microalbuminuria, is a known early marker of diabetes mellitus (DM)-induced damage to the glomerular filtration barrier. Clinical and experimental studies suggest that the onset of albuminuria is associated with podocyte injury, when there are podocyte hypertrophy and effacement. The mechanisms of injury in DN include glomerular hyperfiltration, toxicity from active oxygen specimens, advanced glycation end-products, angiotensin II, and cytokine and growth factors secretion (2-5). Podocytes detach from the glomerular basement membrane (GBM) and are shed into the urine as viable and/or apoptotic cells which can be detected by different techniques (5-7).

Several methods have been used to quantitatively measure gene expression of podocyte-associated proteins in renal tissue. However, renal biopsy is usually not indicated for diagnosis of DN. Recently, detection of podocyturia became possible (8,9) and mRNA quantification of podocyte-associated molecules in urine has emerged as a useful non-invasive tool as a marker of podocyte injury (9,10). Podocyturia is associated with increased levels of albuminuria and could be a marker of disease activity in DN (10). In addition, oral anti-diabetics and ARB-2 have been clinically and experimentally shown to reduce podocyte injury (10-12).

Preliminary data suggest that gene transcription of podocyte-associated proteins increase parallel with albuminuria and severity of DN (10,13). It is speculated whether podocyte injury and podocyturia may occur at very early stages in pre diabetes, associated with glucose intolerance and other factors. However, this hypothesis has not yet been tested in clinical studies. In the present study, we evaluated gene expression of podocyte-associated proteins in urinary sediment of diabetic patients and assessed its correlation with different stages of DN. We also investigated whether pre-diabetic patients have an early increase of gene transcription of podocyte proteins compared to healthy controls.

Patients and Methods

Study Population

We selected 67 adult patients with DM type 1 or type 2 and 19 pre-diabetic adult individuals attending outpatient clinics of Endocrinology and Nephrology at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), from December 2010 to January 2012.

DM was defined as: fasting glucose ≥ 126 mg/dL at two separate examinations or glucose tolerance test (GTT) 75 g in 2 hours ≥ 200 mg/dL, regardless of fasting blood glucose. Diabetic patients were divided into three groups based on their urinary excretion of albumin: normoalbuminuria (NO) (< 30 mg/g creatinine; $n = 34$); microalbuminuria (MI) (30–300 mg/g creatinine; $n = 14$); and macroalbuminuria (MA) (> 300 mg/g creatinine; $n = 19$).

A pre-diabetic state was defined as impaired glucose tolerance (GTT 75 g in 2 hours 140–199 mg/dL) or impaired fasting glucose (fasting glucose 100–125 mg/dL).

The control group consisted of 15 healthy individuals without any clinical and laboratory evidence of renal disease. Pre-diabetic and diabetic patients were matched for age and gender. Diabetic patients with unstable renal function, those with acute cardiovascular events, urinary tract infection or any acute medical complications were excluded from the study.

Demographic, clinical, and laboratory data were collected from medical records including age, gender, ethnicity, body mass index (BMI), type of DM (1 or 2), DM duration (years), systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressure, use of ACE or ARB-II, serum creatinine, blood glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), and albuminuria. An estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation (14). Urinary albumin excretion was measured in a random sample by immunoturbidimetric method. HbA1c was measured by high-performance liquid chromatography and was used as a measure of glycemic control.

The study was approved by the institutional review board at HCPA. All subjects agreed to participate in the study and signed an informed consent form.

Quantification of gene expression in renal tissue and urine sediment

Levels of mRNA of podocyte-associated proteins were quantitatively measured in urinary sediment in morning urine samples (whole stream). Gene expression of nephrin, podocin, alpha-actinin-4, synaptopodin, podocalyxin and transient receptor potential calcium channel 6 (TRPC6) was measured. Human transforming growth factor β_1 (TFG- β_1) was used as a marker of renal fibrosis.

mRNA extraction and complementary DNA transcription

The material was extracted from urine samples using QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Urine samples were centrifuged at 1,800 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the pellet resuspended with buffered saline and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes and stored at -80°C until use. Total RNA was quantified with NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The ratio of absorbance at 260/280 nm was used to assess RNA purity. Reverse transcription of total RNA was performed using the High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The final volume of purified RNA was 20 uL and stored at -20°C.

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using Taqman® Universal PCR Master Mix. It contains AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, AmpErase® UNG, ROX passive reference, buffer and dNTPs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and gene-specific primers to mRNA amplification of the following genes (all from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions: NPSH1, nephrin (ID: Hs00190446_m1); NPSH2, podocin (ID: Hs00387817_m1); podocalyxin (ID: Hs01574644_m1); synaptopodin (ID: Hs00326493_m1), alpha-actinin-4 (ID: Hs00245168_m1), TRPC6 (ID:

Hs00395102_m1) and TGF- β_1 (ID: Hs00998133_m1). In addition, 18s rRNA (Taqman[®] PDAR, Foster City, CA, USA) was used as endogenous control to correct for variations in the samples. VIC[®] dye-labeled or FAM[™] (6-carboxyfluorescein) dye-labeled TaqMan[®] MGB (minor groove binder) probes were used as reporters conjugated to 5' terminations to the detection of amplification products. The amount of FAM[™] or VIC[®] fluorescence released in each reaction during exonuclease degradation was measured in the PCR cycle using the ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

RT-PCR was performed in duplicate in 96-well plates containing 2 μ L cDNA. The thermal conditions of the cycles included 50°C for 2 minutes, 60°C for 30 minutes followed by 95°C for 5 minutes, and 40 cycles at 94°C for 20 seconds and 62°C for 60 seconds. Data were collected in the ABI PRISM SDS 7000 thermal cycler (Applied Biosystems). Relative quantification of target gene expression was performed using 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} comparative method where the threshold cycle (CT) value is defined by the point at which there is a statistically significant detectable increase in fluorescence.

Statistical Analysis

Descriptive statistics are presented as mean \pm standard deviation or median and percentiles (P25-P75). The association between categorical variables was assessed by the chi-square test and Fisher exact test. mRNA values were log transformed to reduce asymmetry. Independent t-test or Mann-Whitney test was used to compare differences between two groups, and the Kruskal-Wallis test or ANOVA for more than two groups. Spearman's correlation coefficient was used to assess correlations of genes with albuminuria, renal function and glycemic control (HbA1c).

Sample size was calculated by the Win-Pepi program v. 9.7. Based on previous data from our laboratory, we considered mean \pm SD values of nephrin log₁₀ mRNA in urine as 2.0 \pm 0.9 and 3.4 \pm 1.4 for healthy individuals and diabetic patients, respectively. For 90% study power and 5% level of significance a sample of at least 63 diabetic patients and 14 controls was required.

The performance of genes in urine for diagnosis of pathological albuminuria (≥ 30 mg/g creatinine) was assessed by the receiver operating characteristic (ROC) curve and accuracy was calculated. Poisson regression was used to assess the independent effect of age, gender, diabetes mellitus, renal function, and gene expression to the development of pathological albuminuria. All analyzes were performed by SPSS for Windows (version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL). The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Demographic and clinical characteristics

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of pre-diabetic and diabetic patients and controls. Twenty-one (31%) patients had DM type 1 and 46 (69%) type 2, with a mean disease duration of 18 \pm 7 and 15 \pm 8 years, respectively. The prevalence of NO, MA and MI in diabetic patients was 54%, 21% and 28%, respectively. Of those diabetic patients with NO, MA, and MI, 54%, 78%, and 86% respectively ($p = 0.032$) were on ACE inhibitors or ARB-2. Of pre-diabetic patients, 56% were on ACE inhibitors or ARB-2.

The variable age was similar in pre-diabetic and diabetic patients, but controls were younger. BMI was higher among pre-diabetics compared to controls, and SBP and

DBP were also higher in pre-diabetics and diabetics. No pre-diabetic patient had increased albuminuria. Although diabetic patients presented a lower eGFR, this difference did not reach statistical significance compared to the other groups.

Gene expression of podocyte-associated proteins in urine in pre-diabetic and diabetic patients and controls

The urinary levels of mRNA of all genes studied were significantly higher in diabetic compared to pre-diabetic patients and controls (Figure 1). There were no differences in gene expressions between patients with diabetes type 1 or type 2 (data not shown).

Table 2 shows gene expressions by level of albuminuria (NO, MI, or MA) in diabetic patients compared to pre-diabetic patients and controls. Expression levels of nephrin mRNA were significantly increased in diabetic patients with MA compared to controls, pre-diabetic, and diabetic patients with NO. Despite the higher nephrin mRNA levels in diabetics with MA compared to all other groups, no statistical difference was found with those with MI (Figure 2). Regarding expression levels of podocalyxin mRNA, diabetic patients at any level of albuminuria showed increased expression compared to controls; and the same was seen in diabetic patients with NO and MI compared to pre-diabetic patients. TRPC6 expression were higher in diabetic patients with MA compared to pre-diabetics and controls, and was also higher in those with NO compared to controls. The urinary mRNA of alpha-actinin-4 were higher in diabetic patients with MI compared to pre-diabetics as well as in diabetics with NO compared to pre-diabetics and controls. The mRNA expression levels of podocin, synaptopodin and TGF- β_1 did not differ among all five groups studied.

Correlation between gene expression of podocyte-associated proteins and albuminuria and glycemic control

Table 3 shows the Spearman's correlation coefficients of genes and albuminuria and glycemic control. Nephtrin, podocalyxin, and TRPC6 were significantly correlated with albuminuria. There was a weaker though significant correlation of albuminuria with podocin and alpha actinin-4 genes. Gene expression was positively and significantly correlated with glycemic control as well. However, no correlation was found of albuminuria and glycemic control with synaptopodin and TGF- β_1 genes.

Effect of clinical variables and gene expression on albuminuria

The univariate analysis of the effect of age, gender, diabetes mellitus, renal function, and mRNA levels on the outcome (albuminuria >30 mg/g creatinine) showed that the presence of diabetes and nephtrin, TRPC6 and podocin genes increased significantly the risk of albuminuria. However, in the multivariate regression analysis adjusted for age, gender, diabetes and level of renal function, only urinary nephtrin mRNA increased the risk of pathological albuminuria: for every one-unit increase in log₁₀ of nephtrin mRNA the risk of albuminuria increased by 20% (Table 4).

ROC curves for diagnosis of pathological albuminuria

The diagnostic performance and accuracy parameters of podocyte-associated proteins for diagnosis of pathological albuminuria were determined by the ROC curve as shown in Figure 3. Greater areas under the curve and accuracy were found for nephtrin, podocalyxin, TRPC6, and alpha actinin-4 genes than for the other genes. The sensitivity

of the genes for diagnosis of pathological albuminuria was greater than 80% and specificity ranged between 60% and 70%. The positive predictive value ranged between 63% and 80%, and the negative predictive value ranged between 54% and 79%.

Values greater than the cutoffs determined by the ROC curve were used to define high or low expression of nephrin, podocalyxin, TRPC6, and alpha actinin-4 in urine (Figure 3). Only the nephrin gene was able to discriminate increasing levels of albuminuria in diabetic patients, and nephrinuria (high expression) was found in 53%, 71% and 90% of patients with NO, MI, and MA, respectively ($p=0.023$). This difference was not statistically significant for all other genes analyzed.

Discussion

The role of podocytes in the pathogenesis of DN has been extensively investigated. Reduction in glomerular podocyte number and density has been observed at early stages of DN, predicting progression of albuminuria and correlating with poor control of DM (7,15-17). Podocyte detachment from the GBM results in podocytopenia and podocyte excretion in urine as viable or apoptotic cells, which have been demonstrated in DN (10,16-19) and in non-diabetic glomerulopathies (18,20). Sustained hyperglycemia and protein glycation, and hemodynamic factors such as intracapillary hypertension and angiotensin II action activate intracellular signaling pathways that damage the architecture of podocyte cytoskeleton and the glomerular slit diaphragm, leading to podocyte detachment and podocyturia (2,4,21,22). Denuded areas in GBM form synechiae with Bowman's capsule, that is probably the initial step to development of progressive glomerulosclerosis and decline in renal function (3,5,6).

Increased gene transcription of podocyte-associated molecules in urinary cells can be a direct evidence of detached podocytes or their fragments as a result of glomerular injury. Anti-podocalyxin antibodies has been used to phenotype podocytes in urine, but this method is time-consuming and requires immunocytologic analysis (8,10). Messenger RNA of nephrin, podocalyxin, alpha actinin-4 and of other podocyte-specific molecules in urine correlates with podocyte injury and albuminuria, and has been shown to be a valuable non-invasive tool for assessing disease activity and progression of DN (13,18,23-26).

Clinical studies in diabetic patients showed reduced intra-renal expression and increased urinary excretion of nephrin and alpha-actinin-4 evidencing loss of cytoskeletal integrity (10,24-26). In addition to nephrin, other proteins can also be suppressed in the renal tissue and/or be increased in urine of those patients including podocin, podocalyxin, synaptopodin, alpha-actinin-4 (10,13,18,24,26), and Wilms' tumor protein (WT-1), a phenotypic marker of mature podocytes (24).

TRPC6 located at the luminal membrane regulates intracellular calcium concentration, and its induction disregulates the actin cytoskeleton resulting in proteinuria in acquired kidney disease (27). Graham et al (28) demonstrated in experimental diabetes that hyperglycemia, reactive oxygen species, and protein kinase C suppress the expression of TRPC6 in the glomerulus in diabetic rats. However, there are no clinical data evaluating the urinary excretion of TRPC6 in patients with incipient or clinical DN. Additionally, pro-fibrotic growth factors also play a role in podocyte damage; suppression of TGF- β_1 has pro-differentiation effects and its induction activates pro-apoptotic signaling pathways and podocyte apoptosis (29).

Some studies with diabetic patients (either type 1 or type 2) have investigated whether damaged podocytes correlate with the stage of DN and severity of albuminuria (10,13,26,30,31). We studied the expression of podocyte-associated molecules in urine and found a significantly higher gene transcription in diabetics compared with pre-diabetics and controls, but individual analyses by stage of DN showed non-uniform gene expression patterns. Most important, normoalbuminuric diabetic patients already showed high mRNA levels of nephrin, TRPC6 and alpha actinin-4 compared to healthy individuals and pre diabetics, suggesting that podocyte damage may occur early in diabetes as reported by other authors (13,26,31). However, a longitudinal study is needed to determine if early podocyturia can predict subsequent diabetic renal disease.

Despite gene expression being always higher in diabetic patients compared to controls or pre diabetic individuals, messenger RNA of podocalyxin, TRPC6 and alpha-actinin-4 did not correlated directly with increasing rates of albuminuria. It is possible that podocyte damage and GBM denudation in DN to be morphologically not uniform, depending on how severe and extensive is the podocyte effacement along the GBM, even in early stages of DN. Lemley et al (32) reported that macroalbuminuric patients with DM type 2 had increased filtration of high-molecular-weight dextrans through enlarged pores which act as molecular shunts, but in patients with lower levels of albuminuria the shunt size did not differ from controls.

One important finding of our study was that nephrin had the highest correlation with albuminuria and stage of DN, and was the only gene to predict pathological albuminuria in the multivariate analysis. Nephrin is a major component of the slit diaphragm and a podocyte-specific protein, and a well-known early marker of podocyte injury in diabetes (15,25,31). Experimentally, immortalized podocytes from diabetic patients with

different mutations do not express nephrin rendering podocytes unresponsive or less responsive to insulin. Nephrin facilitates the fusion of GLUT-1 and GLUT-4 (glucose transporters)-rich vesicles in the podocyte cell membrane making it insulin-sensitive, and its suppression may be associated with albuminuria and progression of DN (33,34). We do not know if nephrinuria correlates with decreased glomerular podocyte number or podocyte effacement, but it certainly does with albuminuria. Jim et al (26) found nephrinuria as a sensitive biomarker of pre-clinical DN, as 54% of the normoalbuminuric diabetic patients had a high expression of urinary nephrin.

The cytoskeleton protein alpha-actinin-4 had a more pronounced excretion in diabetic patients with normo and microalbuminuria, and correlated with poor glycemic control. Wang et al. (24) also described increased expression of alpha-actinin-4 in urine of patients with DN. Kimura et al. (36) found direct correlation of suppression of alpha-actinin-4 transcripts with mesangial expansion in biopsies of patients with DN. However, synaptopodin and podocin had similar expression in diabetics and controls contrasting to other studies that measured either the mRNA in urine (13) or the protein in kidney biopsies by immunohistochemistry (26). Accordingly, Wang et al. (35) did not find either any correlation between the expression of glomerular and urinary podocin and synaptopodin, and Szeto et al. (18) reported a marginal correlation of synaptopodin with proteinuria and decline in glomerular filtration rate. Other studies reported suppression of nephrin rather than podocin in DN (15,25). These conflicting data may be attributed to the inclusion of patients at different stages of DN and to variable cut off points of high/low gene expression set by molecular analysis or other methods.

No clinical studies evaluated so far the urinary expression of TRPC6 of diabetic patients. The present study showed that TRPC6 mRNA was higher in the diabetics than in controls, and correlated with higher albuminuria and HbA1c. These findings suggest that TRPC6 can disrupt and dissociate from the luminal membrane, and could be another biomarker of renal podocyte dysfunction in DN, as demonstrated in experimental models (28). Longitudinal studies are needed to assess accuracy of TRPC6 in pre-clinical stages of DN to predict progression of nephropathy to clinical proteinuria and renal failure.

All genes (except synaptopodin and TGF- β_1) correlated positively with the levels of HbA1c parallel to albuminuria, a finding that seems logical as it reflects uncontrolled diabetes mellitus. However, there was no correlation with eGFR. In contrast, Wang et al (24) measured synaptopodin urinary mRNA and reported an inverse correlation with eGFR. Jim et al (26) negatively correlated eGFR with glomerular downregulation of nephrin, podocin and synaptopodin. This discrepancy may be occurred because our study included diabetic patients with less compromised renal function (mean eGFR = 85 mL/min/1.73 m²) compared to that of Jim (mean eGFR = 13.3 mL/min/1.73 m²) or Wang (53.2 mL/min/1.73 m²). Perhaps they included patients with more advanced stages of DN when podocyte disruption is more pronounced and its relation to renal function becomes evident.

TGF- β_1 is a marker of fibrosis and chronic intra-renal damage in DN (37). Wahab et al (38) reported that glomerular expression of TGF- β_1 mRNA and protein in podocytes increased with the stage of DN; i.e., TGF- β_1 expression was lower at an early stage of DN and more pronounced in clinical nephropathy, suggesting that TGF- β_1 induces pro-fibrotic responses that leads to glomerulosclerosis. Earlier studies found a correlation of

increased urinary excretion of TGF- β_1 , measured by enzyme immunoassay, with increasing levels of albuminuria in patients with type 1 DM (39). Overall, we found that TGF- β_1 mRNA expression was significantly higher in diabetics than in pre-diabetics or controls. The analysis of each stage of DN showed higher TGF- β_1 mRNA expression in patients with macroalbuminuria, but the difference was not statistically significant compared to the other groups. Sample size and patients with a less advanced DN may have influenced the lack of significance. Further studies evaluating progressive stages of DN are needed to evaluate the correlation of TGF- β_1 with increasing rates of albuminuria.

So far no clinical study evaluated if podocyturia could represent an early marker of glomerular epithelial cell injury in the pre diabetic state. We found that podocyte-associated molecules in pre-diabetic patients and controls were similarly expressed. Despite the fact that pre diabetic individuals were more obese, blood pressure, blood glucose and Hb1Ac levels did not differ from controls. Perhaps glucose intolerance could not induce major podocyte damage as it occurs in established diabetes, but the small sample size prevents a reliable interpretation of these data.

Some important limitations need to be considered. First, the study used a cross-sectional design, a relatively small sample size, and molecular analysis of the urine sediment only. However, renal biopsies were not usually performed in diabetic patients with a typical clinical presentation, and the use of biopsies from patients suspicious of having other glomerulopathies can potentially confound the results. It is also noteworthy the effect of angiotensin inhibitors, which was not controlled for in this study. These drugs can reduce either proteinuria and podocyturia, as described in DN (40) and other nephropathies (41), and may have attenuated podocyte injury and urinary

podocyte excretion, thus reducing the differences between diabetics and healthy individuals.

In conclusion, the expression of podocyte-associated proteins in urine was significantly higher in diabetic than non-diabetic individuals, but no direct correlation of gene expression and increasing albuminuria levels was evidenced except for nephrin. Nephrinuria discriminated the different stages of DN and was a predictor of pathological albuminuria. This preliminary study did not identify increased expression of podocyte-associated proteins in pre-diabetic individuals.

Acknowledgment

The authors thank the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for a mastership grant, the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Foundation (FIPE) for funding this research project, and the Laboratory of Molecular Biology Applied to Nephrology (LABMAN) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre for their technical support.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DR. 2010 report of the Brazilian dialysis census. *J Bras Nefrol* 2011; 33: 442-7.

2. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55: 225-233.
3. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003; 162:1123-37.
4. Schrijvers BF, De Vriese AS, Flyvbjerg A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocr Rev* 2004; 25: 971-1010.
5. Diez-Sampedro A, Lenz O, Fornoni A. Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder. *Am J Kidney Dis* 2011; 58: 637-646.
6. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2005; 54: 1626-1634.
7. Toyoda M, Najafian B, Kim Y, Caramori ML, Mauer M. Podocyte Detachment and Reduced Glomerular Capillary Endothelial Fenestration in Human Type 1 Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 2007; 56: 2155-2160.
8. Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 408-416.
9. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007; 106: c61-c66.

10. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15 : 1379-1383.
11. Xing Y, Ye S, Hu Y, Chen Y. Podocyte as a potential target of inflammation, role of hydrochloride pioglitazone in type 2 diabetics. *Endocr Pract* 2012;18:493-498.
12. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li PK, et al. Urinary messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in patients with diabetic nephropathy treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker. *Eur J Endocrinol* 2008 ; 158: 317-322.
13. Zheng M, Lv LL, Ni J, Ni HF, Li Q, Ma KL, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy. *PLoS One* 2011; 6: e20431.
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman 3rd HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-612.
15. Doublier S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, et al. Nephryn expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003; 52: 1023-30.
16. Verzola D, Gandolfo MT, Ferrario F, Rastaldi MP, Villaggio B, Gianiorio F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2007 ; 72: 1262-1272.
17. Steffes MW, Schmidt D, McCrery R, Basgen JM. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients. *Kidney Int* 2001; 59:2104-2113.

- 18 Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta*. 2005 ; 361:182-190.
19. Meyer TW, Bennett PH, Nelson RG. Podocyte number predicts long-term urinary albumin excretion in Pima Indians with Type II diabetes and microalbuminuria. *Diabetologia*. 1999;42:1341-1344.
20. Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F40-8.
21. Lewko B, Bryl E, Witkowski JM, Latawiec E, Angielski S, Stepinski J. Mechanical stress and glucose concentration modulate glucose transport in cultured rat podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:306–311
22. Dessapt C, Baradez MO, Hayward A, Dei Cas A, Thomas SM, Viberti G, et al. Mechanical forces and TGFbeta1 reduce podocyte adhesion through alpha-3,beta-1 integrin downregulation. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2645–2655.
23. Dalla Vestra M, Masiero A, Roiter AM, Saller A, Crepaldi G, Fioretto P. Is podocyte injury relevant in diabetic nephropathy? Studies in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 1031–1035.
24. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract*. 2007;106: c169-179.
25. Benigni A, Gagliardini E, Tomasoni S, et al. Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2004; 65: 2193–2200.

26. Jim B, Ghanta M, Qipo A, Fan Y, Chuang PY, Cohen HW et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: a cross sectional study. *PLoS One* 2012; 7: e36041.
27. 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.
28. Graham S, Gorin Y, Abboud HE, Ding M, Lee DY, Shi H, et al. Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C304-15.
29. WuDT, BitzerM, JuW, Mundel P, Böttinger EP. TGFbeta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3211–3221.
30. Weil EJ, Lemley KV, Mason CC, Yee B, Jones LI, Blouch K, et al. Podocyte detachment and reduced fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2012; 82: 1010-1017.
31. Pätäri A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, et al. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003; 52: 2969–2974.
32. Lemley KV, Blouch K, Abdullah I, Boothroyd DB, Bennett PH, Myers BD, et al. Glomerular permselectivity at the onset of nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2095-2105.
33. Coward RJ, Welsh GI, Koziell A, Hussain S, Lennon R, Ni L, Tavaré JM, et al. Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes* 2007; 56: 1127-35.

34. Lewko B, Stepinski J. Hyperglycemia and Mechanical Stress: Targeting the Renal Podocyte. *J Cell Physiol* 2009; 221: 288-295.
35. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Kwan BC, Li KT, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of glomerular podocyte loss. *Ren Fail.* 2010; 32: 372-379.
36. Kimura M, Toyoda M, Kato M, Kobayashi K, Abe M, Kobayashi T. Expression of alpha-actinin-4 in human diabetic nephropathy. *Intern Med* 2008; 47: 1099-106.
37. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol* 2003; 23: 532-43.
38. Wahab NA, Schaefer L, Weston BS, Yiannikouris O, Wright A, Babelova A et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli. *Diabetologia* 2005 ; 48: 2650-2660.
39. Ellis D, Forrest KY, Erbey J, Orchard TJ. Urinary measurement of transforming growth factor-beta and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem.* 1998; 44:950-6.
40. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthofer H, Zaoui IN, et al. Proteinuria and the expression of podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition . *Diabetologia* 2002; 45: 1572-6.

41. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, angiotensin II receptor antagonist and calcium antagonist on urinary podocytes in patients with IgA nephropathy. *Am J Nephrol* 2000; 20:373-9.

Table 1: Demographic and clinical data of controls, pre-diabetic and diabetic patients

	Controls	Pre- diabetics	Diabetics	p-value
	(n = 15)	(n = 19)	(n = 67)	
Age (years)	40 ± 11 ^a	61 ± 12 ^b	53 ± 13 ^c	<0.001
Gender (female)	8 (53%)	15 (79%)	42 (63%)	0.267
Ethnicity (white)	86.7%	94.7%	73.1%	0.091
BMI (kg/m²)	25.1 ± 2.4 ^d	31.6 ± 7.7 ^e	28.9 ± 6.5	0.016
SBP (mm Hg)	116 ± 9 ^f	128 ± 13	137 ± 18 ^g	<0.001
DBP (mm Hg)	72 ± 7 ^h	77 ± 10	80 ± 8 ⁱ	0.006
Serum creatinine (mg/dL)	0.86 ± 0.20 ^j	0.77 ± 0.10 ^k	1.55 ± 1.19 ^l	0.011
eGFR (mL/min/1.73 m²)	98.8 ± 23.1	95.7 ± 21.8	84.9 ± 39.0	0.117
Blood glucose (mg/dL)	90 ± 11 ^m	105 ± 11 ⁿ	162 ± 60 ^o	<0.001
Hb1Ac (%)	5.14 ± 0.62 ^p	5.81 ± 0.55 ^q	8.70 ± 1.93 ^r	<0.001
Albuminuria (mg/g creatinine)	3.2 (1.5–6.6) ^s	9.6 (3.7–6.6) ^t	375.0 (12.0–1340.5) ^u	<0.001

BMI = body mass index; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; eGFR = estimated glomerular filtration rate; Hb1Ac = glycated hemoglobin; **Age:** p<0.001: b>a ; p=0.001: c>a ; **BMI:** p=0.012: e>d ; **SBP:** p<0.001: g>f ; **DBP:** p=0.004: i>h; **creatinine:** p=0.027: l>k ; p=0.039: l>j ; **Blood glucose:** p<0.001: o>n,m ; **Hb1Ac:** p<0.001: r>q,p; **albuminuria:** p<0.001: u>t,s

Table 2: Medians and 25th-75th percentiles (P25-P75) of log10 mRNA of podocyte-associated proteins in urine by stage of diabetic nephropathy, and in pre-diabetic patients and controls

Log 10 mRNA Urinary	Healthy (n=15)	Pre Diabetic (n=19)	Diabetic			p-value
			Normoalbuminuria (n=34)	Microalbuminuria (n=15)	Macroalbuminuria (n=19)	
Nephrin	2.03 (1.49 - 2.67) ^a	2.03 (1.20 - 2.93) ^b	2.85 (2.14 - 3.63) ^c	3.35 (2.14 - 5.48) ^d	4.21 (3.16 - 4.95) ^e	<0.001
Podocin	1.57 (1.32 - 2.33)	2.22 (1.83 - 3.25)	2.67 (2.12 - 4.00)	2.54 (1.72 - 3.99)	2.33 (1.64 - 3.62)	0.150
Podocalyxin	1.68 (1.18 - 2.53) ^f	2.10 (1.41 - 2.83) ^g	3.04 (2.35 - 3.76) ^h	3.51 (2.79 - 5.13) ⁱ	2.89 (2.69 - 3.42) ^j	<0.001
Synaptopodin	1.72 (1.30 - 2.60)	1.86 (1.22 - 2.29)	2.93 (1.88 - 3.12)	2.61 (1.13 - 3.33)	1.62 (1.02 - 4.30)	0.112
TRPC6	1.97 (1.21 - 2.83) ^k	1.69 (0.97 - 2.53) ^l	3.06 (1.96 - 3.83) ^m	2.40 (1.89 - 4.17)	3.06 (2.25 - 4.29) ⁿ	0.001
Alpha actinin-4	1.94 (1.24 - 3.11) ^o	2.44 (1.74 - 2.67) ^p	3.26 (2.48 - 4.23) ^q	3.54 (2.45 - 4.75) ^r	2.70 (2.38 - 4.08)	<0.001
TGFβ1	2.21 (0.78 - 2.96)	2.59 (1.98 - 3.30)	2.75 (2.25 - 3.86)	2.31 (1.40 - 4.18)	3.02 (1.97 - 4.15)	0.241

Nephrin: P<0,001: e>a ; e>b ; P<0,03: d>b ; e>c ; P=0,048: d>a ; **Podocalyxin:**

P<0,001: i>f ; P<0,01: j>f ; h>f ; i>g ; P=0,035=h>g ; **TRPC6:** P<0,02: n>l ; m>l ;

P=0,049 = n>k ; **Alpha actinin-4:** P<0,01: q>p ; q>o ; P=0,032 = r>p

Table 3: Spearman’s correlation coefficients of gene expression of podocyte-associated proteins with albuminuria and glycemic control

	Albuminuria		Hb1Ac	
	<i>r</i>	p-value	<i>r</i>	p-value
Nephrin	0.628	<0.001	0.346	<0.001
Podocin	0.254	0.010	0.280	0.005
Synaptopodin	0.123	0.220	0.186	0.063
Podocalyxin	0.452	<0.001	0.441	<0.001
TRPC6	0.455	<0.001	0.318	0.001
Alpha actinin-4	0.210	0.036	0.301	0.002
TGFβ₁	0.104	0.301	0.074	0.465

r: correlation coefficient; Hb1Ac: glycated hemoglobin

Significance levels for all correlations of podocyte-associated proteins with albuminuria and glycemic control were $p < 0.05$, except for podocalyxin and TGFβ.

Table 4: Poisson regression analysis of the effect of gene expression of podocyte-associated proteins on the outcome (albuminuria ≥ 30 mg/g creatinine) adjusted for age, gender, diabetes, and renal function

	Exp(B)	95% CI	p-value
Age	0.997	0.982–1.012	0.673
Gender	0.876	0.644–1.191	0.398
Diabetes	15.496	2.128–112.867	0.007
eGFR	0.994	0.989–0.999	0.190
mRNA of nephrin	1.206	1.086–1.1338	<0.001
Podocin	1.073	0.965–1.193	0.190
TRPC6	0.938	0.795–1.108	0.452

eGFR: estimated glomerular filtration rate

Figure 1

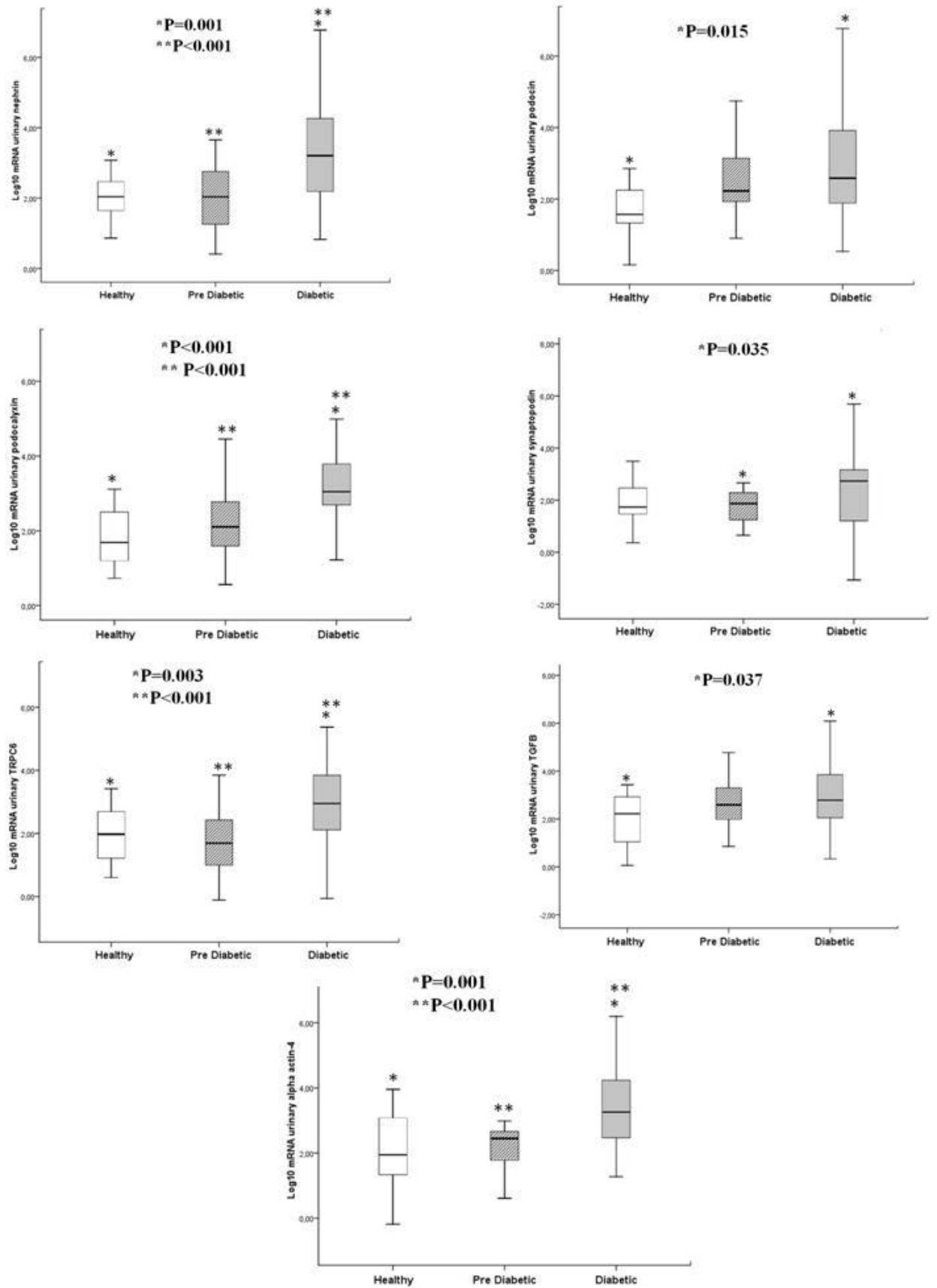


Figure 2

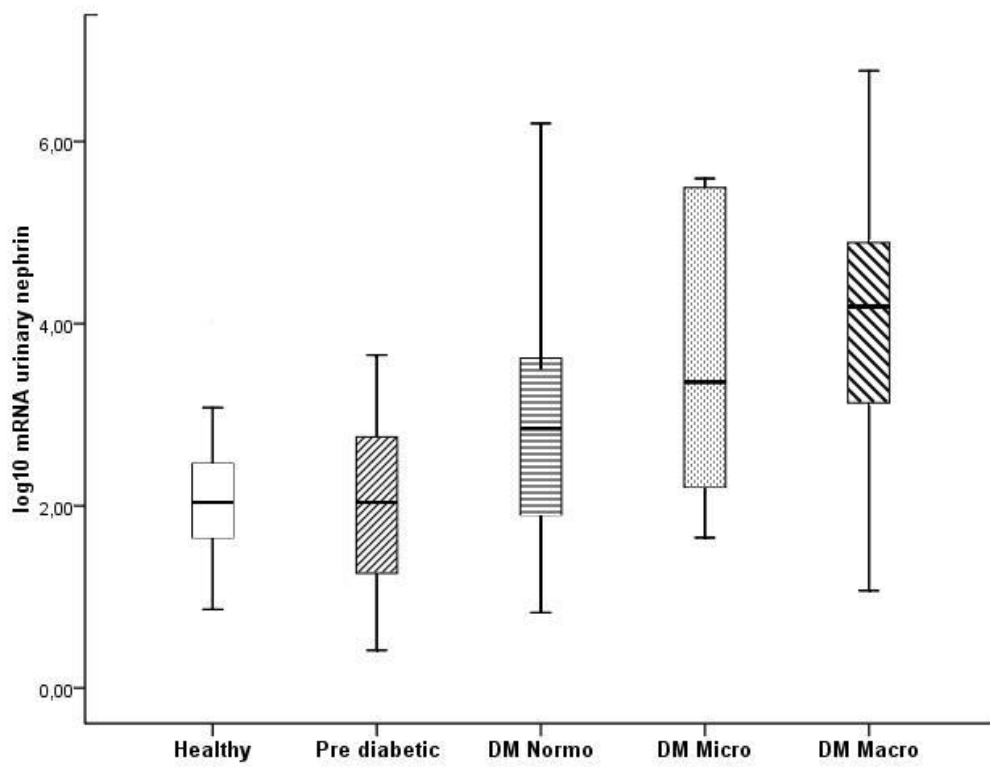
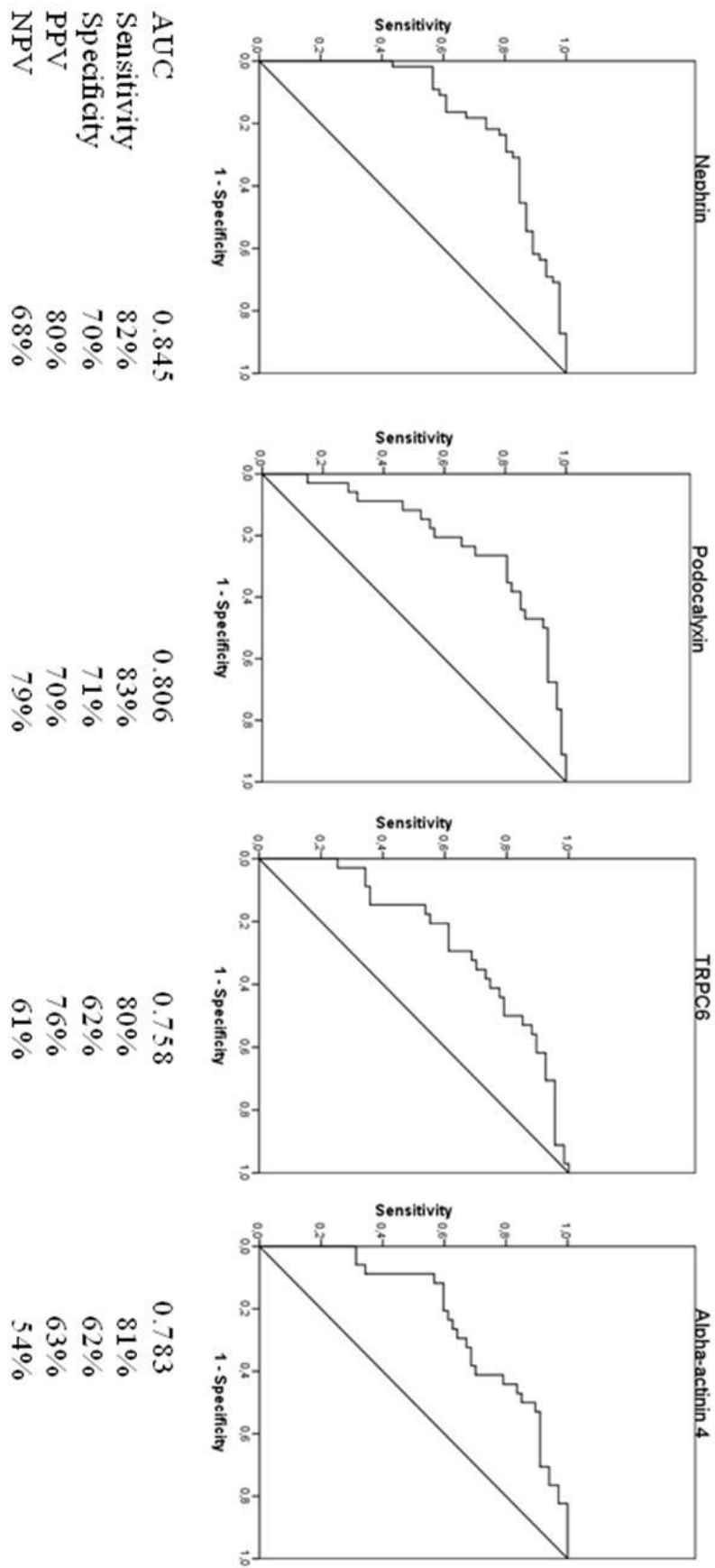


Figure 3



Legend to figures

Figure 1. Box-plots showing medians and 25th-75th percentiles (P25-P75) of urinary podocyte-associated proteins mRNA, log transformed and normalized ($2^{-\Delta\Delta CT}$), comparing controls, pre-diabetic, and diabetic patients.

Figure 2. Box-plots showing medians and 25th-75th percentiles (P25-P75) of urinary nephrin mRNA, log transformed and normalized ($2^{-\Delta\Delta CT}$), comparing controls, pre-diabetic and diabetic patients (with normoalbuminuria, microalbuminuria, and macroalbuminuria).

Nephrin: * $p < 0.05$ (diabetic patients with macroalbuminuria vs. controls, pre-diabetic and diabetic patients with normoalbuminuria; diabetic patients with microalbuminuria vs. pre-diabetic patients and controls)

Figure 3. Diagnostic performance of nephrin, podocalyxin, TRPC6, and alpha-actinin-4 for diagnosis of albuminuria >30 mg/g creatinine determined by the receiver operating characteristic (ROC) curve with related accuracy parameters, expressed as percentages. AUC: area under the curve; PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value.

Neste estudo avaliamos a expressão gênica de moléculas associadas ao podócito em células do sedimento urinário de pacientes diabéticos e com pré diabetes. Os achados deste trabalho mostram que a expressão do RNAm de nefrina, podocina, podocalixina, TRPC6 e α -actnina 4, mas não de sinaptopodina e TGF β ₁, foi significativamente mais elevada nos pacientes diabéticos em comparação aos não diabéticos. Quando a expressão foi analisada individualmente nas diferentes fases da nefropatia diabética (normo, micro e macroalbuminúria), a expressão de nefrina teve um aumento consistente nos pacientes micro e macroalbuminúricos em relação aos controles, pré diabéticos e normoalbuminúricos. A podocalixina, o TRPC6 e a alfa actinina-4 estavam elevados nos diabéticos independente do grau de albuminúria, e esse aumento não foi proporcional a níveis crescentes de albuminúria. A expressão de podocina e sinaptopodina não diferiu dos controles. Os níveis de TGF β ₁ nos diabéticos também não diferiu dos indivíduos não diabéticos, talvez por aqueles apresentarem um grau menos avançado de nefropatia.

O RNAm da nefrina, podocina, podocalixina, TRPC6 e alfa actinina-4 na urina correlacionaram-se positivamente com a albuminúria. Também foi observada uma correlação significativa, porém mais fraca, das moléculas associadas ao podócito com o controle glicêmico.

Este estudo apresenta limitações, como delineamento transversal, número relativamente pequeno de pacientes e análise molecular apenas urina, e não na urina e no tecido simultaneamente. Outro aspecto a ser comentado é o efeito dos inibidores da angiotensina, utilizados na maioria dos diabéticos micro e macroalbuminúricos e nos pré diabéticos, de reduzir a proteinúria em paralelo com a podocitúria, como descrito na

ND e em outras nefropatias, o que pode ter atenuado a lesão do podócito e sua excreção na urina, diminuindo as diferenças entre os grupos.

Em conclusão, a expressão de proteínas associadas ao podócito na urina nestes diabéticos foi significativamente maior que nos não diabéticos, mas não houve correlação direta dos genes com níveis crescentes de albuminúria. O gene da nefrina foi o único que discriminou os diferentes estágios da ND, e foi preditivo de albuminúria patológica. Os genes da podocina, podocalixina, TRPC6 e alfa actinina-4 também se correlacionaram com albuminúria e controle glicêmico. Neste estudo preliminar não se identificou aumento da expressão gênica das proteínas do podócito em indivíduos com pré diabetes.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PACIENTES)

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr.(a) _____ a participar de um estudo com o objetivo de identificar alterações nos rins relacionadas a sua doença, o diabetes. O diabetes pode levar à perda de proteínas na urina, o que se chama de albuminúria. O objetivo dessa pesquisa é aplicar um teste em uma amostra de urina, para ajudar a entender como ocorre a perda de proteína na urina no diabetes. Os procedimentos a que os (as) Sr. (as) serão submetidos são uma coleta de urina e uma coleta de sangue (5mL). Este material será analisado no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo, tanto para o Serviço de Nefrologia quanto para o (a) Sr.(a), mas a sua ajuda será muito importante para o entendimento do porque os diabéticos perdem proteína urina, pois essa perda é um sinal de que o rim está doente e pode passar a não funcionar bem.

Para seu esclarecimento 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 pelos telefones 3395-8295, 3359-8121 ou ainda pelo telefone celular do Dr. Francisco Veronese -99693920 ou do acadêmico Jonathan Fraportti do Nascimento – 91874397. Ainda em caso de urgências com o plantão do Serviço de Nefrologia do HCPA pelo telefone 3395-8000.

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.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

ou responsável legal

Data: ____/____/____

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (CONTROLES)

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr.(a) _____ a participar de um estudo com o objetivo de identificar como ocorre a perda de proteína na urina. O diabetes é uma doença que afeta muitas pessoas, e que pode levar à perda de proteínas na urina, o que se chama de albuminúria. O objetivo dessa pesquisa é aplicar um teste em uma amostra de urina, para ajudar a entender como ocorre a perda de proteína na urina no diabetes. Entretanto, precisamos comparar a urina de pessoas diabéticas com a urina de pessoas que não tem nem diabetes e nem qualquer doença de rim que leve a perda de proteína pela urina, como o Sr.(a.), para ter um valor de comparação e saber o que é doença e o que é normalidade.

O único procedimento ao qual o(a) Sr. (a) será submetido será uma coleta de uma amostra de urina em um frasco e uma coleta de sangue (5mL). Este material será analisado no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo, tanto para o Serviço de Nefrologia quanto para o (a) Sr.(a), mas a sua ajuda será muito importante para o entendimento do porque os diabéticos perdem proteína urina, pois essa perda é um sinal de que o rim está doente e pode passar a não funcionar bem.

Para seu esclarecimento 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 pelos telefones 3395-8295, 3359-8121 ou ainda pelo telefone celular do Dr.

Francisco Veronese -99693920 ou do acadêmico Jonathan Fraportti do Nascimento – 91874397. Ainda em caso de urgências com o plantão do Serviço de Nefrologia do HCPA pelo telefone 3395-8000.

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;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador

ou responsável legal

Data: ____/____/____

ANEXO 3

PROTOCOLO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO

NOME:		IDADE	
Sexo: Masculino Feminino	ETNIA <input type="checkbox"/> 1=Afrodescendente <input type="checkbox"/> 2=Não-Afrodescendente	Prontuário: Solicitação:	
PESO:	ALTURA	IMC:	

DADOS CLINICOS E LABORATORIAIS

Diabetes Mellitus tipo : 1 () 2 ()	Tempo de doença (Anos):
Hipertensão Arterial: () Sim () Não PAS: _____ PAD: _____	Medicações em uso e doses: _____ _____ _____ _____
Albuminúria (mg/g de creatinina): 1ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 2ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 3ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____	HbA1C (%) 1ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 2ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 3ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____
Creatinina sérica (mg/dl): 1ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 2ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 3ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____	MDRD / CKD-EPI (filtração glomerular estimada em ml/min/1,73 m²):
Glicose: 1ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 2ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____ 3ª coleta ___/___/___ RESULTADO : _____	