

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO PODÓCITO EM
PACIENTES PORTADORES DE GLOMERULOPATIAS PROTEINÚRICAS**

PATRÍCIA GARCIA RODRIGUES

Porto Alegre

2012

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DE MOLÉCULAS ASSOCIADAS AO PODÓCITO EM
PACIENTES PORTADORES DE GLOMERULOPATIAS PROTEINÚRICAS**

PATRÍCIA GARCIA RODRIGUES

Orientador: Francisco José Veríssimo
Veronese

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

Porto Alegre

2012

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Rodrigues, Patrícia

Expressão gênica de moléculas associadas ao podócito em pacientes portadores de glomerulopatias proteinúricas / Patrícia Rodrigues. -- 2012.

90 f.

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese.

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. Glomerulopatias. 3. Expressão gênica. I. Veríssimo Veronese, Francisco José, orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco José Veríssimo Veronese, obrigada por essa grande oportunidade, pela sua dedicação ímpar e por todo o incentivo e apoio que sempre deste.

A minha família, principalmente meus pais, meus exemplos de vida, que sempre me deram toda a estrutura e suporte necessários, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e sem eles nada disso seria possível.

Ao meu namorado, Carlos Eduardo, pelo seu amor, paciência, toda dedicação e auxílio em todos os momentos.

Ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Nefrologia, pelo ensinamento, colaboração e companheirismo ao longo desses anos.

E a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e ao FIPE-HCPA, FUNDONEFRO e REUNI, pelo auxílio financeiro.

*“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem,
você continuara vivendo, mas terá deixado de existir”.*

Charles Chaplin

RESUMO

Introdução: A injúria ao podócito glomerular tem um papel crítico para o surgimento de proteinúria em diferentes glomerulopatias. Neste estudo avaliamos a expressão gênica das proteínas associadas ao podócito em biópsias renais e na urina simultaneamente em pacientes com glomerulopatias proliferativas (GPP) e não proliferativas (GPNP) proteinúricas, assim como a efeito do tratamento imunossupressor sobre a expressão destas moléculas. **Material e Métodos:** Setenta e cinco pacientes adultos foram incluídos, 35 com diagnóstico de GPNP e 41 casos de GPP. Vinte e um indivíduos sem doença renal foram incluídos como controles. O RNAm foi quantificado no tecido renal (basal) e em células do sedimento urinário (na biópsia, aos 6 e 12 meses) dos genes nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4 por PCR em tempo real. A expressão gênica foi correlacionada com a proteinúria e a função renal, e a variação do RNAm ao longo do tempo foi comparada entre os grupos pela Equação de Estimativas Generalizadas. **Resultados:** O RNAm dos genes (exceto da sinaptopodina) no tecido estava significativamente reduzido no grupo GPNP. No grupo GPP, a expressão também foi menor, mas apenas o gene da podocina teve diferença estatística comparado aos controles. Em paralelo, o RNAm dos mesmos genes na urina basal foi mais elevado nos pacientes, e mais marcadamente no grupo GPP. Após seis meses de tratamento imunossupressor associado ou não a inibidores da angiotensina, no grupo GPP houve uma redução significativa da expressão de podocina, podocalixina e alfa actinina-4 aos 6 e 12 meses quando comparando ao nível basal ($p < 0,001$). No grupo GPNP, apenas a alfa actinina-4 diminuiu ($p = 0,008$) com uma tendência de redução da podocalixina ($p = 0,08$). Verificou-se uma forte correlação entre os genes na biópsia (exceto com sinaptopodina), mas na urina esta correlação foi fraca. Houve correlação moderada mas significativa dos genes na urina com a proteinúria

basal e dos 6 meses, mas nenhum gene correlacionou-se com a taxa de filtração glomerular. **Conclusão:** Nestes pacientes com glomerulopatias proteinúricas em fase aguda de doença, a expressão gênica de proteínas associadas ao podócito estava reduzida na biópsia renal concomitante com aumento da excreção urinária, sugerindo a presença de podocitopenia intra-renal e podocitúria, respectivamente. O RNAm destes genes reduziu em paralelo com a proteinúria com o uso de imunossuppressores, sugerindo reorganização estrutural dos podócitos. Os resultados deste estudo não são conclusivos sobre diferenças qualitativas da podocitopatia com base em tipos histológicos específicos.

PALAVRAS-CHAVE

Podócito, glomerulopatias, expressão gênica, podocina, nefrina

Abstract

Introduction: Injury to the glomerular podocyte has a critical role in the development of proteinuria in different glomerulopathies. In this study, gene expression of podocyte-associated proteins was evaluated in kidney biopsies and urine simultaneously in patients with proliferative (PGP) and non proliferative (NPGP) glomerulopathies. The effect of immunosuppressive treatment on the expression of these molecules was also studied. **Material and Methods:** Seventy-five adult patients were included, 35 with NPGP and 41 cases of PGP. Twenty-one individuals without renal disease were included as controls. The mRNA was quantified by real time PCR in renal tissue (baseline) and in urinary sediment cells (at biopsy, at 6 and 12 months) for the following genes: nephrin, podocin, podocalyxin, synaptopodin and alpha actinin-4. Gene expression was correlated with proteinuria and renal function, and variation in mRNA levels over time was compared between groups by Generalized Estimating Equation. **Results:** The mRNA of all genes (except synaptopodin) in renal tissue was significantly decreased in NPGP group. In the PGP, this expression was also lower, but only podocin had statistical difference as compared to controls in parallel, mRNA of the same genes was increased in baseline urine of the patients, but more markedly in PGP group. After six months of immunosuppressive treatment, with or without angiotensin inhibitors, there was a significative reduction in urinary expression of podocin, podocalyxin and alpha actinin-4 at 6 and 12 months as compared to baseline levels. In the NPGP group, only alpha actinin-4 decreased in the urine ($p=0,008$) and there was also a trend to reduction of podocalyxin ($p=0,08$). There was a strong correlation between all genes (except for synaptopodin) in biopsy, but in the urine this correlation was weak. There was also a moderate but significative correlation between urinary genes and baseline and six-month proteinuria, but no gene correlated with glomerular

filtration rate. **Conclusion:** In these patients with proteinuric glomerulopathies in the acute phase of disease, gene expression of podocyte-associated proteins was decreased in kidney biopsy concurrent with increased levels in the urine, suggesting the presence of intra-renal podocytopenia and podocyturia respectively. The mRNA of these genes decreased in parallel with proteinuria along with immunosuppressive treatment, suggesting structural reorganization of podocytes. The findings of this study cannot be conclusive about qualitative differences of the podocytopathy based on specific histologic types.

KEYWORDS

Podocyte, glomerulopathies, gene expression, podocin, nephrin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Correlação entre tipo histológico da glomerulopatia e a respectiva alteração biológica do podócito.....	28
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas.....22

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla Significado

DRC – doença renal crônica

MBG – membrana basal glomerular

ZO-1 – Zona ocludens -1

GESF – Glomeruloesclerose segmentar e focal

NL – Nefrite lúpica

ND – Nefropatia diabética

NM – Nefropatia membranosa

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

WT1 – Proteína do Tumor de Wilms 1

GN – Glomerulonefrite

AG-II – angiotensina II

RNA_m – RNA mensageiro

cDNA – DNA complementar

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase

GNP – Glomerulopatia não proliferativa

GPP – Glomerulopatia proliferativa

FI/AT – Fibrose intersticial/atrofia tubular

TFGe – Taxa de filtração glomerular estimada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Estrutura do podócito.....	16
2.2 Estrutura molecular do podócito.....	18
2.3.1 <i>Domínio de membrana apical</i>	20
2.3.2 <i>Domínio Basal e citoesqueleto</i>	21
2.4 Funções do podócito.....	22
2.5 Classificação das podocitopatias e resposta podocitária à lesão glomerular.....	23
2.6 Podocitopatias.....	24
2.6.1 <i>Glomerulopatias primárias</i>	24
2.6.2 <i>Glomerulopatias Secundárias</i>	26
2.7 Identificação das proteínas do podócito no tecido renal e na urina.....	29
2.8 Efeitos do manejo terapêutico da proteinúria sobre a podocitúria.....	30
2.9 Aplicabilidade clínica da avaliação das podocitopatias.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVO.....	36
4.1 Objetivo principal.....	36
4.2 Objetivos secundários.....	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO.....	37
6. ARTIGO ORIGINAL.....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
8. ANEXOS.....	86
8.1 Protocolo de coleta de dados.....	86
8.2 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	87

1. INTRODUÇÃO

O aumento da incidência da doença renal crônica (DRC) tem atingido proporções epidêmicas em todo o mundo. O custo da diálise e transplante nos Estados Unidos atinge cifras ao redor de 20 bilhões de dólares anualmente (1). Evidências recentes sugerem que o manejo adequado da DRC em seus estágios iniciais pode prevenir morte por doença cardiovascular e retardar do início de diálise (2,3).

A incidência da DRC no Brasil não é bem conhecida e, tomando-se como referência os dados da população norte-americana, a prevalência estimada de DRC seria de 1,87% da população brasileira adulta (4). Conforme os dados do censo de 2011 da Sociedade Brasileira de Nefrologia, 91.314 pacientes estavam em tratamento hemodialítico. Com relação à mortalidade anual de pacientes em hemodiálise, o dado mais recente é de 19,9% (5). O impacto da DRC é tão grande a ponto de ser considerada um problema de saúde pública, exigindo portanto políticas de controle rigoroso no que se refere a rastreamento, diagnóstico precoce, estadiamento e seguimento dos pacientes. O custo ao sistema de saúde derivado da diálise crônica e do transplante é muito elevado, em 2010 foi cerca de 1,8 bilhão de reais (6).

Doenças glomerulares são uma das principais causas de doença renal crônica. Como tal, têm um impacto significativo na expectativa e na qualidade de vida dos pacientes. Dados do United States Renal Data System mostram que, dos pacientes com doença renal crônica terminal (DRCT), 56% tem doença glomerular secundária a nefropatia diabética, glomerulonefrite primária ou nefropatia por HIV, e outra parcela importante tem glomerulosclerose hipertensiva (7).

No Brasil, os dados apontam como principais causas de DRC terminal hipertensão arterial (26%), diabete melito (18%) e glomerulonefrite (11%) (8). Assim, a

doença glomerular diabética e não diabética tem um forte impacto nos custos impostos ao sistema de saúde, pois podem evoluir para DRCT com necessidade de terapia substitutiva da função renal, diálise ou transplante (9).

A proteinúria é a manifestação clínica primordial das doenças glomerulares, além de ser um importante fator de risco para progressão da doença renal. Os seus mecanismos fisiopatológicos ainda não estão totalmente esclarecidos (10).

O filtro glomerular, composto pelo endotélio fenestrado, membrana basal glomerular (MBG) e pelas células epiteliais denominadas podócitos, é o principal sítio de lesão que resulta no aumento da excreção urinária de proteínas. Particularmente, as células podocitárias têm sido foco de intensiva investigação, pois parecem críticas para o desenvolvimento da proteinúria (7,11,12). O dano ao podócito têm sido demonstrado nos diferentes tipos de glomerulopatias primárias, como glomeruloesclerose segmentar e focal, nefropatia membranosa, nefropatia por IgA (13) e nas formas secundárias, como nefrite lúpica (14), nefropatia diabética (15,16) e nefropatia hipertensiva (17).

O tratamento imunossupressor (7,11), inibidores da angiotensina (18,19) e agentes hipoglicemiantes (20) podem restituir a integridade funcional e estrutural dos podócitos, em paralelo com a redução da proteinúria e a melhora da função renal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O sistema renal é o principal responsável pela filtração do sangue. A cada ciclo cardíaco o rim, mais especificamente os glomérulos, filtram o sangue até formar um ultrafiltrado, a urina. O glomérulo consiste em um tufo de capilares glomerulares, células e matriz mesangial, a cápsula de Bowman e o espaço urinário (11).

A filtração glomerular é caracterizada por uma seletividade para macromoléculas, em que proteínas de alto peso molecular são excluídas do filtrado. As proteínas menores são parcialmente filtradas, mas reabsorvidas no túbulo proximal (7). Estruturalmente, o filtro glomerular é composto por três camadas: uma camada de células endoteliais separadas por fenestrações de 50-100 nm, a membrana basal glomerular (MBG), que tem cerca de 300 nm de espessura, as células epiteliais dos podócitos, com seu diafragma em fenda. Esta compreensão do filtro glomerular só foi possível após a identificação ultraestrutural e molecular destas três camadas, em que o podócito e o diafragma em fenda adjacente são determinantes a retenção de proteínas (7,21).

2.1 Estrutura do Podócito

O podócito é uma célula epitelial altamente diferenciada, com morfologia celular complexa. É uma célula embrionária derivada de células mesenquimais e cada podócito maduro tem uma distinção anatômica e funcional (11). Estão localizados no interior do glomérulo, que é responsável pela filtração do sangue (22). Estudos mostram que a

principal barreira do filtro glomerular é sua fenda diafragmática, que permite a passagem de proteínas de dimensões menores mas retém macromoléculas (23,24).

O podócito é uma célula polarizada, carregada negativamente, e sua forma peculiar é dinamicamente modificável. Isso se deve ao citoesqueleto rico em microfilamentos de F-actina e miosina (25). O citoesqueleto é constituído por três elementos ultraestruturais: microfilamentos (7-9nm), filamentos intermediários (10nm) e microtúbulos (24nm) (11).

O corpo celular do podócito é o centro da célula e encontra-se no espaço urinário. Nele encontram-se o núcleo da célula, o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias. A partir do corpo celular surgem longos processos primários, que são denominados pedicelos. Os podócitos estão ancorados à membrana glomerular basal através de proteínas “fixadoras”, principalmente $\alpha 3 \beta 1$ -integrinas e α , β -dístroglicanos (11).

Os pedicelos estão interligados entre si por um diafragma em fenda, e esta fenda é a principal barreira de filtração. Sendo assim, qualquer injúria altera esta arquitetura e leva à retração dos podócitos em relação à MBG, desencadeando perda de proteínas. Por isso, este processo é altamente controlado pela expressão de moléculas específicas (22).

O diafragma em fenda mede aproximadamente 30-40nm de comprimento (22). Na ultraestrutura, descrita inicialmente por Karnovsky (26), observam-se séries de retângulos de 4 x 14 nm de área que configuram uma estrutura tipo “zíper”, que anatomicamente constituiria uma barreira contra macromoléculas, na função de filtro do glomérulo.

Este diafragma tem 6 nm de espessura e localiza-se 60 nm acima da membrana basal glomerular. A estrutura molecular do diafragma em fenda inclui um número

crescente de proteínas que estão organizadas em microdomínios funcionais dentro de um componente lipídico e se conectam com o citoesqueleto através de interações com outras proteínas sinalizadoras do podócito (26).

2.3 Estrutura molecular do podócito

A primeira molécula identificada no podócito, mais especificamente no diafragma em fenda, foi a *Zona ocludens 1*, ZO-1, originalmente descrita como um componente da face citoplasmática. Schnabel et al (27) localizou a ZO-1 no epitélio dos pedicelos no ponto de inserção com a fenda diafragmática (24). Está geralmente presente em interações lábeis, capazes de sofrer rápido rearranjo. Seu significado é incerto no diafragma em fenda (23), mas estudos mostraram que a ZO-1 interage com a Neph1 (25). Com isto, desempenha um papel importante na manutenção da função de barreira do podócito (28).

Outra proteína que é um componente chave da fenda diafragmática é a nefrina. Descoberta inicialmente por Tryggvason em 1998, a nefrina é um produto do gene NPHS1 que está relacionada com a síndrome nefrótica congênita do tipo Finlandês. Possui um domínio extracelular longo com oito repetições do tipo imunoglobulina, com um único módulo fibronectina tipo III, e um pequeno domínio intracelular. É uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas (23), e está relacionada com a manutenção da citoarquitetura do podócito, interagindo com a actina através de proteínas adaptadoras NcK, e com a proteína NEPH1, formando cis-oligômeros heterogêneos. As moléculas de nefrina estendem-se umas sobre as outras a partir das interdigitações dos pedicelos, com disposição em paralelo e ligado por pontes dissulfeto, permitindo o fechamento da fenda como um “zíper” (7), como ilustra a

figura 1 (22). Mais recentemente, foi demonstrado que a nefrina também pode agir como uma molécula de sinalização (29). A nefrina faz o recrutamento de proteínas que incluem CD2AP e podocina, que são necessárias para a manutenção da estrutura molecular e estabilidade do podócito (30).

Relacionada ao diafragma em fenda, atuando na organização estrutural deste, foi identificada também a podocina (23). Ela é uma proteína codificada pelo gene *NPHS2*, composta de 42-k-Da da família das estomatinas. A podocina tem uma estrutura incomum, com um domínio transmembrano único no centro da célula, e se encontra dentro do citoplasma. Associada a um componente lipídico, apresenta uma forma de “grampo de cabelo” (31,32), e a mutação deste gene resulta em síndrome nefrótica autossômica recessiva resistente a corticosteróides. Além disso, em alguns estudos, a podocina, juntamente com a nefrina, tem relação com filamentos de actina (33). A podocina, assim como a nefrina, interage com CD2AP, facilitando a sinalização da nefrina para o meio intracelular (31,32).

Embora a nefrina e a podocina se expressem somente nos glomérulos do rim, estudos demonstraram que o RNAm da podocina também está expresso no coração fetal, possivelmente contribuindo para o desenvolvimento cardíaco normal (34).

A proteína CD2AP é uma molécula adaptadora de 80k-Da que se liga no citoplasma a CD2, uma proteína de membrana da célula T, de células *natural killer* (35). Ratos *knockout* para esta proteína apresentam defeitos nas células T de sinalização e evoluem para óbito algumas semanas depois do nascimento, em consequência de intensa proteinúria, glomeruloesclerose e uremia. Estudos também verificaram que camundongos *knockout* para CD2AP apresentam síndrome nefrótica e insuficiência renal, semelhante à glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (7). Sua expressão é

restrita ao podócito e interage com a nefrina, ancorando-a ao citoesqueleto e mantendo a arquitetura do diafragma em fenda (35).

A Neph1, proteína já citada pela sua relação estrutural com a nefrina, contém cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina e interage com a terminação carboxi da podocina. É uma proteína sinalizadora através do sítio de ligação Grb2 SH2, e participa da interação célula-célula. Sua deleção em camundongos *knockout* causa achatamento podocitário, expansão e hiperplasticidade mesangial, proteinúria e morte do animal até a oitava semana de vida (36).

2.3.1 Domínio de membrana apical

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devida à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônica, como a podocalixina, podoplanina e podocandina. Essa carga negativa limita a passagem de albumina carregada negativamente, e mantém a separação física dos podócitos adjacentes (11). A podocalixina é a maior das sialoproteínas transmembrana (165-kDa) e pertence à família das sialomucinas (37). Inicialmente foi identificada no rim, mas ela não é uma proteína específica do rim, estando presente em células progenitoras, endoteliais, plaquetas e em um subconjunto de neurónios.

Ela aparece no podócito pouco antes da formação dos pedicelos e da fenda, e é sempre encontrada na superfície apical (38). Sua importância é crítica para a formação e preservação da arquitetura celular dos podócitos, possivelmente impedindo a adesão das células parietais da cápsula de Bowman junto a estes (39). Devido a sua localização externa, é utilizada como marcador fenotípico dos podócitos em diversas

glomerulopatias, como glomeruloesclerose segmentar e focal, nefropatia por IgA, nefrite lúpica (NL), nefropatia diabética (ND) entre outras (40,41). De acordo com Volgelmann et al (42), as células que são positivas para podocalixina continuam positivas em 30-40% para outros marcadores fenotípicos do podócito.

2.3.2 Domínio basal e citoesqueleto

Este domínio é necessário para ancorar o podócito na membrana basal adjacente, o que ocorre através de $\alpha_3 \beta_1$ -integrinas e α , β -dístroglicanos. Essas proteínas ligam-se a diversos componentes da membrana, como colágeno IV, fibronectina, laminina e endactina, e também a proteínas do corpo podocitário, como alfa actinina-4 e sinaptopodina do citoesqueleto, permitindo que as alterações da membrana basal repercutam na forma e no movimento do podócito (11).

A sinaptopodina é uma proteína de actina específica do podócito localizada no citoesqueleto e tem um papel crucial na estabilização da integridade da fenda diafragmática (43). Estudos indicam que, além de sua presença nos podócitos, é encontrada em compartimentos celulares das gêmulas dos dendritos neuronais (44), ainda sendo associada ao citoesqueleto (11). Encontra-se diminuída em pacientes portadores de nefropatias (37) e apresenta correlação com gravidade de doença (22). A sinaptopodina interage diretamente com a alfa actinina-4 no citoesqueleto, modulando a sua expressão e promovendo o alongamento dos filamentos de actina, assim modificando a forma do podócito e produzindo achatamento ou simplificação dessas células (39). A utilidade da sinaptopodina tem sido questionada por Ihmoda et al (45), onde foi visto que em 100 pacientes com proteinúria, a detecção dos podócitos na urina

com a utilização de anticorpos anti-sinaptopodina foi positiva em um único paciente, sendo então pouco sensível para a identificação destas células.

A alfa actinina-4 é um filamento de actina, que está envolvida em certas formas de GESF (22). O gene da alfa actinina-4 foi identificado por Kaplan et al (46) na mutação da forma autossômica dominante da glomeruloesclerose segmentar e focal familiar (47). Esta proteína é um componente do citoesqueleto, sem dúvida desempenha um papel fundamental na integridade dos pedicelos, contribuindo para a formação e manutenção da integridade do citoesqueleto. Também é uma proteína importante para adesão do podócito à membrana basal glomerular (48).

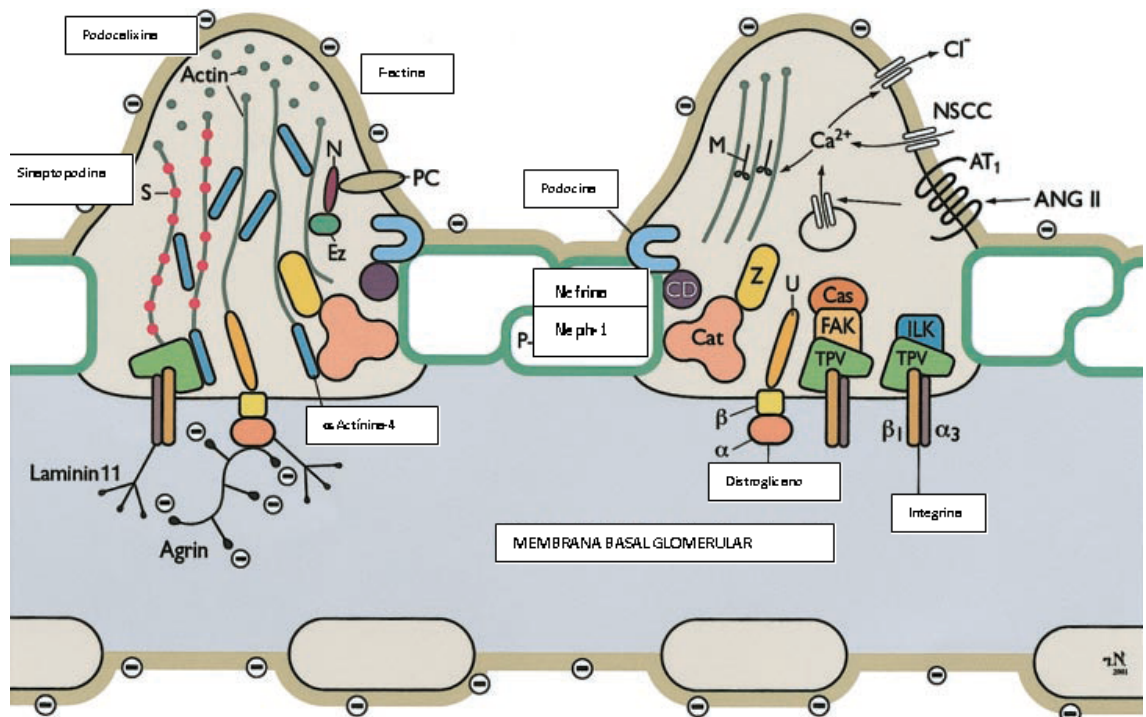


Figura 1. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas (adaptado de Barisoni e Mundel, ref. 22).

2.4 Funções do podócito

A complexa arquitetura das proteínas constitutivas do podócito é necessária para o desempenho das múltiplas funções que essa célula altamente especializada exerce (7,11). A função do podócito baseia-se principalmente na regulação dinâmica da sua arquitetura, tanto do seu corpo quanto dos pedicelos (20). Além da manutenção da integridade de barreira às proteínas (tamanho e carga) e da forma da alça capilar glomerular (7,11), o podócito também é responsável pela neutralização da pressão gerada dentro do glomérulo, síntese e manutenção da membrana basal glomerular e produção e secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), necessário para a integridade da célula endotelial do capilar glomerular (7,11,20-22). Os podócitos têm mobilidade e acomodação, o que faz com que auxiliem na preservação da arquitetura do filtro glomerular (49).

A alteração de uma ou mais dessas funções após uma injúria ao podócito resulta em proteinúria, síndrome nefrótica e perda de função renal.

2.5 Classificação das podocitopatias e resposta podocitária à lesão glomerular

As doenças glomerulares podem ser consideradas como uma consequência da disfunção do podócito causada por fatores genéticos e ambientais (11). Os mecanismos envolvidos na lesão do podócito são complexos e envolvem alterações nas proteínas expressas no núcleo, citoplasma e membranas celulares. O dano celular pode ser causado por um distúrbio congênito ou adquirido (50). A agressão ao podócito produz um processo ativo de fusão, retração e simplificação dos pedicelos, que é uma reação estereotipada a lesões de qualquer natureza, e morfológicamente identificada pelo

achatamento destas células epiteliais que cobrem a membrana basal glomerular. As doenças tipicamente se manifestam por proteinúria, com ou sem síndrome nefrótica, esta definida como a excreção de proteínas na urina superior a 3,5 gramas em 24 horas, acompanhada de hipoalbuminemia e edema. O fenótipo clínico da doença dependerá de quando e em que intensidade e rapidez a agressão ao glomérulo se estabeleceu (11).

A proteinúria, como característica típica das doenças podocitárias, ocorre pela disfunção de diversos segmentos do podócito. A desagregação ou mutação das proteínas do diafragma em fenda (nefrina, podocina, CD2AP, Neph1) (10,50), da interação podócito-MBG (intergrinas, distroglicanos) (7), a reorganização do citoesqueleto (α actinina-4, sinaptopodina) (51,52) e a perda das cargas negativas (podocalixina) (53), são mecanismos de proteinúria já demonstrados em modelos experimentais e em estudos clínicos.

2.6 Podocitopatias

2.6.1 Glomerulopatias primárias

A Nefropatia membranosa (NM) é uma doença causada pela deposição de imunocomplexos com ligação de anticorpos na camada epitelial. A lesão é mediada pelo complexo de ataque à membrana C5b-9 (11) contra um antígeno ainda desconhecido em nível subepitelial. Estudos recentes apontam o receptor da fosfatase A2 (PLA-2R) como um possível antígeno alvo na NM (54). É uma das principais causas de síndrome nefrótica em adultos e é mais frequente no sexo masculino. Caracteriza-se por depósitos imunes contendo IgG e C3 subepiteliais, apagamento das células epiteliais viscerais glomerulares e espessamento difuso da membrana basal glomerular (55). A proteinúria

é em nível nefrótico, podendo ser acompanhada de hematúria, hipertensão arterial e perda da função renal (56).

Na glomerulopatia por alterações glomerulares mínimas (AGM), as células T estão envolvidas na lesão podocitária, e seu mecanismo mediador ainda é indefinido, mas especula-se a existência de um fator que altera a permeabilidade glomerular à albumina (11). É prevalente em crianças, mas ocorre em adultos. Na microscopia eletrônica identifica-se fusão e achatamento dos podócitos. Manifesta-se por síndrome nefrótica, em geral sem hematúria, hipertensão ou perda da função renal (57).

A nefropatia por IgA é o tipo mais prevalente de glomerulonefrite primária em todo o mundo. A presença de hematúria, proteinúria não nefrótica e mais raramente nefrótica, hipertensão arterial e insuficiência renal progressiva são manifestações clínicas diversas que ocorrem nesta doença (58). Dado que a hipertensão é um importante fator de risco para a progressão das doenças glomerulares, uma variação dos genes relacionados à pressão arterial podem estar associados ao prognóstico renal de pacientes com nefropatia por IgA (59).

Intensas pesquisas têm dedicado atenção para a relação entre dano ao podócito e o desenvolvimento de glomeruloesclerose. Após uma lesão ao podócito de qualquer natureza (imunológica, tóxica, infecciosa, isquêmica), o podócito maduro apresenta uma capacidade limitada para se dividir e proliferar *in situ*. A depleção podocitária ocorre por três mecanismos: a) necrose, apoptose ou perda de adesão à MBG; b) hipertrofia glomerular e podocitopenia relativa; c) alteração fenotípica do podócito, que se torna incapaz de manter a sua estrutura e função (60). Em modelos experimentais a reposição da célula podocitária poderia ocorrer por migração sanguínea de células tronco da medula óssea ou mesmo das células parietais da cápsula de Bowman ao tufo glomerular (61).

A glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) pode ser primária ou secundária. Na GESF hereditária ocorre uma mutação da α actinina-4 e de podocina. A GESF é caracterizada pela presença de proteinúria nefrótica, hematúria e diminuição da função renal, muitas vezes evoluindo para insuficiência renal crônica terminal (46). A lesão da GESF também envolve fatores circulantes que tem como mecanismo mediador o fator de permeabilidade glomerular à albuminúria, na forma hereditária esporádica (11).

O mecanismo de glomeruloesclerose na forma segmentar e focal primária foi descrito por Kritz e cols (62). A depleção do número de podócitos resulta em áreas de desnudamento da MBG, e a pressão intracapilar elevada faz com que essas áreas se desloquem em direção à cápsula de Bowman, levando a formação de sinéquias entre as células parietais e as áreas desnudas. A glomeruloesclerose segmentar evolui para esclerose global, associado à filtração de proteínas dentro do interstício, contribuindo para a fibrose intersticial que acompanha esse processo, o qual culmina na DRC terminal (62).

A síndrome de Alport é uma forma de glomeruloesclerose hereditária. É responsável por 3% dos casos de doença renal crônica terminal crianças. Está relacionada às mutações nos genes que codificam as cadeias alfa3, alfa4 e alfa5 do colágeno tipo IV (63).

2.6.2 Glomerulopatias Secundárias

Além da GESF primária, diversas patologias como obesidade severa, nefropatia do refluxo, hipertensão arterial, oligomeganeftonia e rim único são causas de GESF

secundária (11). Pacientes podem apresentar GESF colapsante por infecções ou drogas, principalmente o HIV e parvovírus B19. (11). Uma característica desta doença é a hipertrofia e hiperplasia das células epiteliais que recobrem o glomérulo, com colapso do tufo glomerular (64). Assim como a GESF clássica, é caracterizada por proteinúria em geral nefrótica, mas a perda da função renal é rápida e a maioria dos pacientes evoluem para DRC terminal, independente do tratamento (65).

Na GESF colapsante ocorre uma diferenciação do podócito e mudança de seu fenótipo, com perda de marcadores como WT1 (Wilms Tumor 1), nefrina, sinaptopodina, podocalixina e GLEPP1, e expressão de marcadores de células imaturas (PAX1, citoqueratina 8). Ocorre desagregação do citoesqueleto, mas nesse processo os podócitos tornam-se capazes de entrar novamente no ciclo celular e proliferar, com intensa hiperplasia formando lesões semelhantes a pseudocrescentes (60,66).

A nefropatia diabética (ND) é a principal causa de estágio final da doença renal e afeta cerca de 25-30% dos pacientes portadores de diabetes. O aumento nos casos de ND tem resultado em um significativo aumento de DRC terminal (67). A patogênese da ND não está totalmente elucidada, mas estudos tem mostrado que a hiperglicemia favorece a formação de produtos de glicosilação avançada (AGEs) e de espécies ativas de oxigênio que lesam o podócito, desempenhando um papel importante na gênese e progressão desta doença (12). É caracterizada por proteinúria crescente, desde microalbuminúria até macroproteinúria, declínio da função renal, e é responsável por um aumento significativo de morbidade e mortalidade cardiovascular (19).

A nefrite lúpica (NL) é uma das manifestações clínicas mais graves do lúpus eritematoso sistêmico. Acredita-se que o desenvolvimento da lesão renal origina-se a partir de uma desregulação do sistema imune, em que ocorre hiperatividade de células B

e redução da apoptose de células, com intensa resposta inflamatória. Os auto-anticorpos são formados contra antígenos nucleares, nucleossomos e histonas. A perda dos podócitos é um marcador de atividade de doença, e pode ser revertida através de terapia imunossupressora (14). A doença pode não apresentar sintomas, sendo identificada apenas pela biópsia renal, ou mais frequentemente, se manifestar proteinúria, hematúria, síndrome nefrótica e/ou nefrítica, esta com rápida progressão para insuficiência renal (68).

Na tabela abaixo é apresentada a correlação entre tipo histológico da glomerulopatia e a respectiva alteração biológica do podócito.

Tipo histológico	Podocitopatia
Esclerose mesangial difusa	Parada do desenvolvimento glomerular
Síndrome de Alport	Defeito de construção/manutenção da MBG
Alterações glomerulares mínimas	Mudança de fenótipo do podócito
GESF	Depleção de podócitos (podocitopenia)
GESF colapsante	Desdiferenciação do podócito
GN inflamatórias/imunológicas	Lesão, perda e proliferação de podócitos
Glomeruloesclerose hipertensiva	Podocitopenia relativa e estresse mecânico
Glomeruloesclerose diabética	Podocitopenia por estresse oxidativo
	Hipertrofia glomerular (podoc. relativa)
	Podocitopenia, causa indefinida
Obesidade (GESF)	Hipertrofia glomerular (podoc. relativa)

Envelhecimento (glomeruloesclerose)	Dano ao DNA (lesão oxidativa mitocondrial)
--	---

Adaptado de Wiggins RC (ref. 60).

2.7 Identificação das proteínas do podócito no tecido renal e na urina

Antes de 1995 as proteínas do podócito eram identificadas exclusivamente em tecido renal por biópsia, procedimento invasivo sabidamente não isento de riscos. O reconhecimento do descolamento dos podócitos da MBG depois de estabelecida a lesão e sua “descamação” na urina, abriu novas possibilidades de diagnóstico não invasivo para a detecção de podocitúria em modelos experimentais e em rins humanos. Hara e cols. (40,41,69,70) detectaram podócitos viáveis e seus produtos em diversos tipos de glomerulonefrites. Lemley e cols. (71) correlacionaram podocitúria com atividade de nefrite lúpica e nefropatia por IgA, enquanto Patari e cols. (72) detectaram nefrina por Western blot em urina de pacientes diabéticos. Yu e cols. (73), em estudo experimental, sugeriram que a podocitúria não seria apenas um reflexo da proteinúria, mas um marcador ainda mais sensível e específico para detectar atividade de doença e dano glomerular.

Posteriormente foi possível quantificar o RNA mensageiro (RNAm) de proteínas do podócito em células do sedimento urinário em modelos experimentais (74) e em pacientes com glomerulopatias proteinúricas (23). Sato e cols. (75) demonstraram a utilidade clínica e a acurácia da podocitúria seriada para diagnóstico e monitorização da progressão da doença glomerular. A podocitúria elevada e persistente apresentou uma correlação positiva com proteinúria e com dano glomerular histologicamente comprovado (76).

Wang e cols.(14) avaliaram a expressão das proteínas na urina de pacientes portadores de nefrite lúpica, no qual a concentração da nefrina, podocina e sinaptopodina foi significativamente mais elevada nos pacientes doentes relacionados ao pacientes sadios. Neste estudo houve correlação da expressão da podocina e sinaptopodina com o declínio da função renal. Navarro-Munoz et al (13) também avaliaram a expressão das células do sedimento urinário em 69 pacientes com glomerulopatias proteinúricas, proliferativas (IgA e glomerulonefrite membranoproliferativa, GMP) e não proliferativas (GESF, AGM, NM) a nefrina estava mais elevada nos pacientes doentes do que em controles saudáveis. Wang e cols estudaram 21 pacientes diabéticos, observando diferença significativa na expressão da podocina, nefrina, sinaptopodina e alfa actinina-4 entre diabéticos e saudáveis (16). Estes resultados foram reduzidos em pacientes com nefropatia hipertensiva (17).

Um dos marcadores fenotípicos mais robustos para a podocitúria é a podocalixina, que assim como as proteínas do diafragma, também desempenha um papel importante no diagnóstico não invasivo de lesão do filtro glomerular. Pela sua localização externa, e mais preservada em algumas glomerulopatias, e tem sido usada para identificar excreção de podócitos em diversas doenças renais (NM, GESF, ND, NL, GMP e NIgA). Comparada às outras proteínas, a podocalixina provou ser o marcador mais acurado e reprodutível nessas patologias (76).

2.8 Efeitos do manejo terapêutico da proteinúria sobre a podocitúria

Ainda não são bem conhecidos os efeitos das drogas utilizadas no tratamento das glomerulopatias proteinúricas sobre a podocitúria. Está bem demonstrado que o bloqueio do eixo renina-angiotensina II e a redução da hipertensão intraglomerular e

sistêmica diminui a proteinúria na doença renal diabética e não diabética. Uma vez que a angiotensina II (AG-II) atua diretamente sobre o podócito através de indução de apoptose, redistribuição da actina, redução dos níveis de nefrina e ZO-1, teoricamente o bloqueio da AG-II, de seu receptor ou de ambos poderia reduzir os efeitos deletérios da AG-II sobre os podócitos e o nível de resposta à essas agressões (11,60).

Poucos estudos até o momento avaliaram os efeitos de drogas específicas sobre a podocitúria. Nakamura e cols. (77) em estudo clínico com 52 pacientes portadores de nefropatia por IgA ou glomerulonefrite mesangial difusa mensuraram o efeito do verapamil, trandolapril, candesartan ou placebo usados por três meses sobre a proteinúria e a podocitúria. Podócitos urinários não foram encontrados nos controles saudáveis. A redução do número de podócitos e da proteinúria foi estatisticamente significativa em favor do trandolapril e candesartan quando comparados a verapamil e placebo, sugerindo que a podocitúria pode ser um marcador de atividade de doença e que o bloqueio da AG-II é mais efetivo os antagonistas do cálcio na redução da podocitúria.

Outro estudo avaliando 71 pacientes com nefropatia diabética (18) mostrou que a expressão do RNAm da sinaptopodina na urina reduziu após três meses de uso da combinação inibidor da enzima conversora da angiotensina com irbersatan, sugerindo que a medida seriada de marcadores do podócito na urina pode ser clinicamente útil na monitorização do efeito terapêutico dessas drogas. Efeitos similares foram obtidos com o emprego de uma estatina em pacientes com glomerulonefrite crônica (78) e com pioglitazona em diabéticos do tipo 2 com microalbuminúria (20).

Os corticosteróides são as drogas mais usadas no tratamento das glomerulonefrites proteinúricas, e além dos seus efeitos imuno-moduladores podem também ter efeitos diretos sobre o podócito, como redução de apoptose, inibição de

genes pró apoptóticos como o p53 e estabilização da actina, entre outras ações (79). Entretanto, apenas três estudos clínicos do mesmo grupo com poucos pacientes foram publicados abordando o efeito de imunossuppressores na redução da podocitúria. Em pacientes com nefrite lúpica proliferativa não houve diferença entre plasmaferese em comparação a ciclofosfamida endovenosa, observando-se efeito similar dos dois tratamentos (80). A ciclofosfamida oral foi comparada a azatioprina por 12 meses, sendo a ciclofosfamida superior a azatioprina (81), e em relação ao corticosteróide, um estudo isolado com 8 pacientes mostrou ausência de podocitúria após o tratamento (82).

2.9 Aplicabilidade clínica da avaliação das podocitopatias

Na prática clínica, o diagnóstico da doença glomerular baseia-se exclusivamente na histopatologia clássica. Embora muito útil para o manejo clínico, a análise histológica não contempla toda a etiopatogenia das glomerulopatias, e é provável que mais de uma anormalidade molecular ou celular cause uma lesão histopatológica específica.

A história natural das diferentes formas histológicas bem como sua resposta às intervenções terapêuticas são muito variáveis, o que sugere uma lacuna entre o valor preditivo da lesão que o patologista identifica e os mecanismos subjacentes que geram a doença. A identificação de mutações nos genes que codificam as proteínas que compõe a arquitetura do podócito e do diafragma em fenda, assim como a determinação de alterações nos níveis de expressão de seus produtos, tem potencial impacto clínico por diversas razões (7). Entre elas, citam-se: refinar o diagnóstico da doença glomerular, subcategorizar os defeitos moleculares definindo a etiologia das síndromes clínicas, prever que pacientes podem se beneficiar de terapias imunossupressoras, detectar

precocemente a doença em pacientes com função renal ainda normal e proteinúria de baixo grau possibilitando intervenções precoces e preservação da função renal e constituir biomarcadores não invasivos de atividade de doença.

3. JUSTIFICATIVA

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

Na última década, o papel crítico do podócito na proteinúria foi bem estabelecido e diversos estudos tem mostrado que a camada epitelial do filtro glomerular é determinante para a retenção proteínas de maior peso molecular e contribui 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,

Estudos clínicos e experimentais tem demonstrado que a injúria ao podócito, causada por fusão podocitária, deposição de anticorpos e imunocomplexos e/ou inflamação induz a diminuição da expressão de suas proteínas no tecido renal. Especula-se que o descolamento dos podócitos da MBG e consequente excreção urinária de células viáveis ou em apoptose podem ser identificados pelo aumento da expressão do RNAm de proteínas como a nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4. A pesquisa translacional nesta área tem mostrado que a expressão gênica das proteínas do podócito em células do sedimento urinário constitui uma ferramenta não invasiva com valor diagnóstico e prognóstico, e pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia das doenças glomerulares e para o seu manejo terapêutico.

Estudos são necessários para investigar os mecanismos de lesão do filtro glomerular que desorganizam a arquitetura do podócito e produzem proteinúria, achado

sensível mas inespecífico presente em diferentes tipos de glomerulonefrite primárias e secundárias, tanto proliferativas como não proliferativas.

Em função disso, nosso estudo se propõem a aprofundar o entendimento da expressão gênica das proteínas do podócito em pacientes portadores de glomerulopatias proliferativas e não proliferativas, comparando esta expressão com pacientes saudáveis e avaliando o efeito do tratamento sobre a expressão das proteínas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Avaliar a expressão gênica de moléculas associadas ao podócito em biópsias renais e em células do sedimento urinário de pacientes com glomerulopatias proteinúricas.

4.2 Objetivos secundários

1. Quantificar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de moléculas associadas ao podócito no tecido renal e a urina, mensurar a podocitúria no período basal (pré tratamento), e aos 6 meses e 12 meses de tratamento de glomerulopatias primárias e secundárias nas formas proliferativas e não proliferativas.

2. Verificar a correlação entre a expressão do RNAm de moléculas associadas ao podócito em dois compartimentos, as células do sedimento urinário e o tecido renal.

3. Correlacionar o nível de expressão do RNAm de proteínas do podócito com o grau de proteinúria e a função renal no período basal, aos seis e aos doze meses de acompanhamento.

4. Comparar a expressão do RNAm das proteínas do podócito em pacientes portadores de glomerulopatias não proliferativas e proliferativas em relação a indivíduos normais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. US Renal Data System USRDS 2008 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2008.
2. Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Eng J Med* 2004; 351: 1296-1305.
3. St Peter WL, Schoolwerth AC, McGowan T, McClellan WM. Chronic kidney diseases: issues and establishing programs and clinics for improved patient outcomes. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 903-924.
4. Sesso R, Gordan P. Dados Disponíveis Sobre a Doença Renal Crônica no Brasil. *J Bras Nefrol* 2007; 29, 9-12.
5. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo Nefrológico, 2011. http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2011_publico.pdf (acessado em junho de 2012).
6. Portal da Saúde 2012. Available from: [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4458/162/recursos-para-hemodialise-aumentam-em-r\\$-1816-mi.html](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4458/162/recursos-para-hemodialise-aumentam-em-r$-1816-mi.html)
7. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:271-82.
8. Oliveira MB, Romão JE, Zatz R. End-stage renal disease in Brazil: Epidemiology, prevention, and treatment. *Kidney Int* 2005;68:S82-S6.
9. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 1998;339:1448-56.

10. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2063-71.
11. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-47.
12. Wang G, Lai FM-M, Lai K-B, Chow K-M, Kwan BC-H, Li K-TP, 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.
13. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Pérez V, Ara J, Espinal A, López D, et al. Messenger RNA expression of B7-1 and NPHS1 in urinary sediment could be useful to differentiate between minimal-change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adult patients. *Nephrol Dial Transpl* 2011;26:3914-23.
14. Wang G, Lai FM-M, Tam L-S, Li K-M, Lai K-B, Chow K-M, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007;34:2358-64
15. Zheng M, Lv L-L, Ni J, Ni H-F, Li Q, Ma K-L, et al. Urinary Podocyte-Associated mRNA profile in Various Stages of Diabetic Nephropathy. *Plos One* 2011 31;6
16. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c169-79
17. Wang G, Lai FM, Kwan BC, Lai KB, Chow KM, Li PK, et al. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens* 2009;22:300-6

18. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Sato Y, Chowdhury MA, Wang SQ, et al. Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney Int* 2012;81:40-55
19. Wang G, Lai FM-M, Lai K-B, Chow K-M, Kwan BC-H, Li PK-T, 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;158:317-22.
20. 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.
21. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the Biology and Genetics of the Podocytopathies Implications for Diagnosis and Therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:201-16.
22. Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353-60.
23. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CYK, Yip TWC, 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.
24. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* 2006;11:274-81
25. Mundel P, Reiser J, Borja AZM, 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.

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

27. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990;111:1255-63.

28. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:477-89.

29. Wagner N, Morrison H, Pagnotta S, Michiels J-F, Schwab Y, Tryggvason K, et al. The podocyte protein nephrin is required for cardiac vessel formation. *Hum Mol Gen* 2011;20:2182-94.

30. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 2006;440:818-23.

31. 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.

32. Schwarz K, Simons MS, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001;108:1621-9.

33. 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.

34. Jaffer AT, Ahmed WU, Raju DS, Jahan P. Foothold of NPHS2 mutations in primary nephrotic syndrome. *J Postgrad Med* 2011;57:314-20.

35. 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.

36. 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.

37. Skoberne A, Konieczny A, Schiffer M. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile? *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F230-41.

38. Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1669-76.

39. 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

40. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:231-8.

41. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transpl* 2000;15:1379-83.

42. 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-

43. Kato T, Mizuno S, Nakamura T. Preservations of nephrin and synaptopodin by recombinant hepatocyte growth factor in podocytes for the attenuations of foot process injury and albuminuria in nephritic mice. *Nephrology* 2011;16:310-8.

44. 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

45. Ihmoda I, Saleem M, Mathieson P, Turner N. Podocyuria: a useful test for progressive renal diseases? *Nephrol Dial Transpl* 21,2006 Suppl 4: 312–313.

46. 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.

47. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Grone HJ, Schlondorff D, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2958-66.

48. Kobayashi R, Kamiie J, Yasuno K, Ogihara K, Shirota K. Expression of nephrin, podocin, α -actinin-4 and α 3-integrin in canine renal glomeruli. *J Comp Pathol* 2011;145:220-5.

49. Barisoni L. Podocyte Biology in Segmental Sclerosis and Progressive Glomerular Injury. *Adv Chronic Kidney Dis* 2012;19:76-83.

50. Yuan HP, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002;13.

51. CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest* 2003;111:1683-90.

52. Kimura M, Toyoda M, Kato M, Kobayashi K, Abe M, Kobayashi T, et al. expression of Alpha-actinin-4 in Human Diabetic Nephropathy. *Int Med* 2008;47:1099-106.

53. Economou CG, Kitsiou PV, Tzinia AK, Panagopoulou E, Marinos E, Kershaw DB, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface. *J Cell Sci* 2004;117:3281-94.

54. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ: M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 361: 11–21, 2009

55. Cybulsky AV. Membranous Nephropathy: From Mechanisms to Therapies. *Dial & Transpl* 2010;39:484-8.

56. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I, et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000;57:147-58.

57. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008;17:271-81.

58. Kim SM, Chin HJ, Oh YK, Kim YS, Kim S, Lim CS. Blood pressure-related genes and the progression of IgA nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2009;113:c301-8.

59. Song J, Narita I, Goto S, Saito N, Omori K, Sato F, et al. Gender specific association of aldosterone synthase gene polymorphism with renal survival in patients with IgA nephropathy. *J Med Genet* 2003;40:372-6.

60. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 2007;71:1205-14.

61. Prodromidi EI, Poulson R, Jeffery R, Roufousse CA, Pollard PJ, Pusey CD, et al. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells* 2006;24:2448-55.
62. Kritz W, Elger M, Nagata M, Kretzler M, Uiker S, Koeppenhagemann I, et al. The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1994;45:S64-S72.
63. Thorner PS. Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c82-8.
64. Lu T-C, He JC, Klotman PE. Podocytes in HIV-associated nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;106:C67-C71.
65. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, Smith RJ. Secondary Focal and Segmental Glomerulosclerosis Associated With Single-Nucleotide Polymorphisms in the Genes Encoding Complement Factor H and C3. *Am J Kidney Dis* 2012.
66. Yang Y, Gubler MC. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 2002;91:416-23.
67. Brennan EP, Morine MJ, Walsh DW, Roxburgh SA, Lindenmeyer MT, Brazil DP, et al. Next-generation sequencing identifies TGF- β 1-associated gene expression profiles in renal epithelial cells reiterated in human diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:589-99.
68. Mok CC. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options. *Int J Womens Health* 2012;4:213-22.
69. Hara M, Yanagihara T, Itoh M, Matsuno M, Kihara I. Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. *Pediatric Nephrol* 1998;12:43-8.
70. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2001;89:342-7.

71. 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.
72. Patari A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop PH, Holthofer H, et al. Nephrituria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52:2969-74.
73. Yu DH, 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.
74. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int* 2001;60:957-68.
75. Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, et al. Urine Podocyte mRNAs Mark Progression of Renal Disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1041-52.
76. Skoberne A, Konieczny A, Schiffer M. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile? *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:F230-41
77. 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.
78. Nakamura T, Ushiyama C, Hirokawa K, Osada S, Inoue T, Shimada N, et al. Effect of cerivastatin on proteinuria and urinary podocytes in patients with chronic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transpl* 2002;17:798-802.

79. Wada T, Pippin JW, Marshall CB, Griffin SV, Shankland SJ. Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: Role of p53 and Bcl-2-related family proteins. *JAm Soc Nephrol* 2005;16:2615-25.

80. Nakamura T, Ushiyama C, Hara M, Osada S, Ugai K, Shimada N, et al. Comparative effects of plasmapheresis and intravenous cyclophosphamide on urinary podocyte excretion in patients with proliferative Lupus nephritis. *Clin Nephrol* 2002;57:108-13.

81. Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, et al. Effect of cyclophosphamide or azathioprine on urinary podocytes in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *Nephron* 2001;87:192-3.

82. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000;320:112-6.

Análise molecular das proteínas associadas ao podócito em biópsias renais e urina de pacientes com glomerulopatias proliferativas ou não proliferativas proteinúricas

Molecular analysis of podocyte-associated proteins in kidney biopsies and in urine of patients with proteinuric proliferative or non proliferative glomerulopathies

Rodrigues PG¹, Nascimento JF¹, Joelsons G¹, dos Santos M¹, Pereira S¹, Veronese FV^{1,2}

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

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

Título resumido: Expressão de proteínas do podócito em glomerulopatias proteinúricas

Palavras-chaves: Podócito, glomerulopatias, expressão gênica, podocina, nefrina

Contagem de palavras resumo: 392

Contagem de palavras texto: 4566

Número de tabelas:5

Número de figuras:3

RESUMO

Introdução: A injúria ao podócito glomerular tem um papel crítico para o surgimento de proteinúria em diferentes glomerulopatias. Neste estudo avaliamos a expressão gênica das proteínas associadas ao podócito em biópsias renais e na urina simultaneamente em pacientes com glomerulopatias proliferativas (GPP) e não proliferativas (GPNP) proteinúricas, assim como a efeito do tratamento imunossupressor sobre a expressão destas moléculas. **Material e Métodos:** Setenta e cinco pacientes adultos foram incluídos, 35 com diagnóstico de GPNP e 41 casos de GPP. Vinte e um indivíduos sem doença renal foram incluídos como controles. O RNAm foi quantificado no tecido renal (basal) e em células do sedimento urinário (na biópsia, aos 6 e 12 meses) dos genes nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4 por PCR em tempo real. A expressão gênica foi correlacionada com a proteinúria e a função renal, e a variação do RNAm ao longo do tempo foi comparada entre os grupos pela Equação de Estimativas Generalizadas. **Resultados:** O RNAm dos genes (exceto da sinaptopodina) no tecido estava significativamente reduzido no grupo GPNP. No grupo GPP, a expressão também foi menor, mas apenas o gene da podocina teve diferença estatística comparado aos controles. Em paralelo, o RNAm dos mesmos genes na urina basal foi mais elevado nos pacientes, e mais marcadamente no grupo GPP. Após seis meses de tratamento imunossupressor associado ou não a inibidores da angiotensina, no grupo GPP houve uma redução significativa da expressão de podocina, podocalixina e alfa actinina-4 aos 6 e 12 meses quando comparando ao nível basal ($p < 0,001$). No grupo GPNP, apenas a alfa actinina-4 diminuiu ($p = 0,008$) com uma tendência de redução da podocalixina ($p = 0,08$). Verificou-se uma forte correlação entre os genes na biópsia (exceto com sinaptopodina), mas na urina esta correlação foi fraca. Houve correlação moderada mas significativa dos genes na urina com a proteinúria

basal e dos 6 meses, mas nenhum gene correlacionou-se com a taxa de filtração glomerular. **Conclusão:** Nestes pacientes com glomerulopatias proteinúricas em fase aguda de doença, a expressão gênica de proteínas associadas ao podócito estava reduzida na biópsia renal concomitante com aumento da excreção urinária, sugerindo a presença de podocitopenia intra-renal e podocitúria, respectivamente. O RNAm destes genes reduziu em paralelo com a proteinúria com o uso de imunossupressores, sugerindo reorganização estrutural dos podócitos. Os resultados deste estudo não são conclusivos sobre diferenças qualitativas da podocitopatia com base em tipos histológicos específicos.

PALAVRAS-CHAVE

Podócito, glomerulopatias, expressão gênica, podocina, nefrina

Introdução

A célula epitelial glomerular ou podócito tem diversas funções que incluem a filtração glomerular, a biossíntese e a manutenção da arquitetura do capilar e da membrana basal glomerular (MBG). Estudos tem mostrado que a principal barreira da filtração glomerular é o diafragma em fenda dos podócitos, onde se expressam proteínas como a nefrina e a podocina em inter-relação direta com proteínas do citoesqueleto, como a alfa actinina 4 e a sinaptopodina, as quais permitem um rearranjo dinâmico e estabilização de sua arquitetura (1). O podócito é uma célula carregada negativamente e na sua membrana apical expressam-se proteínas como a podocalixina e o receptor GLEPP-1, e adjacente a membrana basal estão presentes as proteínas de ancoragem, $\alpha 3, \beta 1$ -integrinas e α, β -dístroglicanos (2).

A análise da expressão gênica das moléculas associadas ao podócito tem contribuído para o entendimento da patogênese da proteinúria (3). Parâmetros clínicos, laboratoriais e histológicos muitas vezes não distinguem os diferentes tipos de glomerulonefrites, e tem se investigado o valor diagnóstico e prognóstico destas moléculas em estudos clínicos e experimentais. A análise molecular das proteínas associadas ao podócito no tecido renal tem sido o método de referencia para determinar lesão podocitária (4,5), mas recentemente a identificação de podocitúria (6,7) e a quantificação do RNA mensageiro das proteínas do podócito na urina em diferentes nefropatias (8-10) tem sido uma ferramenta não invasiva útil para determinar atividade e progressão de doenças glomerulares (11). Existem evidências de que o tratamento das glomerulopatias pode reduzir a podocitúria, tanto imunossupressores (12,13), agentes hipoglicemiantes (14) ou inibidores da angiotensina (15).

A expressão das proteínas associadas ao podócito varia entre as diferentes glomerulopatias, e também com a gravidade da lesão glomerular. A consequência da lesão podocitária é o descolamento da MBG e excreção de podócitos na urina, viáveis ou em apoptose (11). Diferenças na expressão intra-renal e urinária do RNAm de moléculas como nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4 tem sido descritas em glomerulopatias não inflamatórias como glomeruloesclerose segmentar e focal, lesões mínimas e membranosa (4-6, 8, 16). Poucos estudos avaliaram a expressão destas moléculas simultaneamente nos dois compartimentos, tecido e urina, apresentando resultados heterogêneos. Na nefrite lúpica ativa foi descrito redução da expressão dos podócitos glomerulares e aumento da podocitúria (17), o que não foi observado na doença inativa. Na nefropatia diabética, o RNAm intra-renal das proteínas do podócito correlacionou-se com redução do número de podócitos glomerulares, função renal e aumento da fibrose túbulo-intersticial, mas estes parâmetros não se correlacionaram com a expressão o RNAm na urina (18). Ainda é controverso como estes mecanismos se desenvolvem nas diferentes glomerulopatias proteinúricas, cuja etiopatogenia envolve fusão podocitária, fatores circulantes, deposição de imunocomplexos e/ou inflamação.

O presente estudo investigou a expressão gênica de proteínas do podócito no tecido renal e na urina simultaneamente de pacientes com glomerulopatias proteinúricas, testando a hipótese de que existem diferenças entre as formas proliferativas e não proliferativas, e que o tratamento imunossupressor reduz esta expressão ao longo do tempo.

Pacientes e Métodos

Delineamento

Estudo transversal com seguimento longitudinal, com enfoque fisiopatológico.

Pacientes

Foram incluídos setenta e seis pacientes adultos submetidos à biópsia renal por indicação clínica no Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de setembro de 2009 à maio de 2012. Os pacientes apresentavam glomerulopatias (GP) primárias ou secundárias e foram estratificados de acordo com o diagnóstico histológico em GP não proliferativas (grupo GPNP, n=35) e proliferativas (grupo GPP, n=41). Todos os pacientes tiveram tecido renal e urina coletados no período basal (biópsia), e somente urina aos 6 meses (n=56) e aos 12 meses (n=43) do início do tratamento da glomerulopatia. Para o grupo controle do tecido, foi utilizado o fragmento livre de neoplasia de 11 pacientes submetidos à nefrectomia por tumor, que não apresentavam evidência de outra doença renal, e outros 10 indivíduos saudáveis que coletaram amostra de urina para comparação, em um total de 21 indivíduos.

Foram avaliados os seguintes dados demográficos e clínicos coletados do prontuário eletrônico: idade, sexo, etnia, nível de pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD), medicações em uso como imunossupressores e/ou inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) /bloqueadores do receptor 1 da angiotensina II (ARA-2), creatinina sérica, albumina sérica, proteinúria calculada pelo índice proteinúria/creatininúria (IPC) em amostra de urina, e taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) pela equação do CKD-EPI. Os parâmetros analisados aos 6 e 12 meses nos pacientes com glomerulopatias foram creatinina sérica, IPC e TFGe.

Tratamento da glomerulopatia nos grupos GPNP e GPP

Os protocolos de imunossupressão dos diferentes tipos de glomerulopatias seguiram as diretrizes da Sociedade Brasileira de Nefrologia (19), e foram padronizados no Serviço de Nefrologia do HCPA. Os critérios de resposta ao tratamento foram: a) Total: redução do IPC $< 0,35$ e elevação da albumina sérica $> 3,5$ g/dl; b) Parcial: redução do IPC entre 0,35 e 3,5 ou pelo menos 50% de redução na proteinúria basal; c) Sem resposta: IPC $> 3,5$ até o sexto mês de tratamento imunossupressor (20). Os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e nefropatia diabética foram tratados com agentes hipoglicemiantes e inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) ou bloqueadores do receptor 1 da angiotensina II (ARA-2). No período basal, 92% dos pacientes do grupo GPNP e 71% do grupo GPP utilizavam IECA ($p=0,024$), e 9% e 15% utilizava ARA-2, respectivamente ($p=0,494$).

Todos os participantes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, o qual é acreditado pelo Conselho Nacional de Pesquisa do Ministério da Saúde brasileiro e registrado no Gabinete para Proteção de Humanos em Pesquisa (Office of Human Research Protections - OHRP-USDHHS), IRB 00000921.

Biópsia Renal

A biópsia renal foi guiada por ultrassonografia, com pistola semi-automática e agulha 16-G. Foram removidos dois fragmentos, para anatomopatológico e imunofluorescência, e separado um terço do segundo fragmento para análise molecular, armazenado a -80°C . Foram realizadas as colorações histológicas convencionais. O

diagnóstico histopatológico e a porcentagem de fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT) da biópsia foram estabelecidos por patologista renal.

No grupo GPNP, os diagnósticos histopatológicos foram: GESF (primária, n=21 e secundária, n=1), GNM (n=4), AGM (n=2) e nefropatia diabética, (ND) (n=7); no grupo GPP: nefrite lúpica, (NL) (n=19), sendo classe IV (n=11), classe III (n=5) e classe II (n=3), nefropatia por IGA (n=14), GN membranoproliferativa, (GNMP) (n=6) e GN crescêntica (n=2).

Quantificação da expressão gênica no tecido renal e urina

A quantificação do RNAm das proteínas do podócito foi feita no tecido renal e em células do sedimento urinário em amostra matinal de urina (toda a micção) sendo analisados genes de diferentes domínios do podócito: diafragma em fenda, nefrina e podocina; citoesqueleto, alfa actinina-4 e sinaptopodina e membrana apical, podocalixina.

Extração do RNA mensageiro e transcrição do DNA complementar

Para a extração do material foi utilizado QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O tecido renal foi triturado, macerado e processado para a extração de RNA. A urina foi centrifugada a 1800 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em solução salina tamponada, e centrifugado por 10 minutos e armazenado a -80°C até ser utilizado. A quantificação do RNA total foi feita com Nano'Drop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e a pureza do RNA foi determinada como razão de absorbâncias em

espectrofotômetro, nos comprimentos de onda 260/280 nm. A transcrição reversa do RNA total foi feita utilizando-se o cDNA High Capacity Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, a um volume final de 20 uL, e armazenado a -20°C.

PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada usando o Taqman Universal PCR Master Mix, composto pelo AmpliTaq Gold[®] DNA polymerase, Amperase UNG, referencia passiva (ROX), tampão e dNTP's (Applied Bioystems, Foster City, CA, USA) e primers específicos para a amplificação do RNAm dos seguintes genes (todos provenientes da Applied Bioystems, Foster City, CA, USA): NPSH1, nefrina (ID: Hs00190446_m1), NPSH2, podocina (ID: Hs00387817_m1), podocalixina (ID: Hs01574644_m1), sinaptopodina (ID: Hs00326493_m1) e alfa actinina-4 (ID: Hs00245168_m1), de acordo com as instruções do fabricante. O controle endógeno utilizado foi o 18s rRNA (Taqman[®] PDAR) para normalização das amostras. As sondas FAM (6-carboxyfluorescein) e VIC Taqman *minor groove binder* (MBG) foram utilizadas como *reporters* e conjugadas com as terminações 5' para detecção dos produtos de amplificação. A quantidade de fluorescência de FAM ou VIC em cada reação liberada pela degradação da exonuclease durante a amplificação da PCR foi medida como função do ciclo de PCR usando o ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A PCR em tempo renal foi realizada em duplicata em placas com 96 poços com 2 uL de cDNA. As condições térmicas dos ciclos foram 50°C por 2 minutos, 60°C por 30 minutos seguido por 95°C por 5 minutos, e 40 ciclos usando temperaturas de 94°C por 20 segundos e 62°C por 60 segundos. Os dados foram coletados no termociclador

ABI PRISM 7000 SDS (Applied Bioystems). A quantificação relativa da expressão do gene alvo foi realizada usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o valor do CT (*threshold cycle*) é definido pelo ponto onde ocorre um aumento estatisticamente significativo da fluorescência.

Análise estatística

Os dados são apresentados como análise descritiva, média \pm desvio padrão, mediana e percentis (P25-P75). A normalidade das variáveis foi estabelecida pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. A associação entre variáveis categóricas foi analisada pelo teste do Qui-quadrado e exato de Fisher. Os valores do RNAm foram logaritmizados para redução da assimetria. A comparação de variáveis contínuas foi feita por ANOVA ou Kruskal Wallis, e o teste de Friedman foi utilizado para comparação das medianas do RNAm nos três períodos estudados (biópsia, 6 e 12 meses). O coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para a análise de correlações entre os genes, e para as correlações dos genes com a proteinúria e a função renal.

A comparação da evolução do RNAm na urina dos grupos GPNP e GPP nos três períodos estudados foi analisada pela Equação de Estimativas Generalizadas (GEE), utilizando a distribuição gama com função de ligação logarítmica, onde é analisado o comportamento do RNAm por grupo, por momento e na interação momento-grupo. Os resultados foram expressos como média e IC95%. Todas as análises foram realizadas pelo software SPSS for Windows (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). O nível de significância foi estabelecido como P menor que 0,05.

Resultados

As características demográficas e clínicas são apresentadas na tabela 1. Conforme esperado, os grupos GPNP e GPP diferiram significativamente dos controles em relação à média de PAS e PAD, creatinina sérica, TFGe, albumina sérica, proteinúria e na porcentagem de FI/AT da biópsia renal.

Setenta e seis pacientes foram analisados no período basal. Destes 76, 56(74%) foram avaliados também aos 6 meses, e dos 56, 43 (57% do total) pacientes completaram o seguimento ate 12 meses. As razões de seguimento incompleto foram: material coletado somente para o período basal (n=17) por inclusão tardia no estudo, perda de seguimento (n=4), mudança de endereço (n=4), transplante renal ou hemodiálise (n=4) ou óbito (n=5).

Aos 6 meses, 63% e 54% dos pacientes nos grupos GPNP e GPP continuavam em uso de I-ECA (p=0,418); 6% e 15% estavam usando ARA-2 (p=0,275). Aos 12 meses, 57% e 48% usavam IECA (P=0,598) e 5% e 12% usavam ARA-2 (p=0,06), respectivamente.

A evolução da proteinúria e da função renal dos pacientes com GPNP ou GPP foi determinada até o décimo segundo mês de seguimento. Em ambos os grupos houve uma redução significativa da proteinúria até 12 meses (GPNP: $5,10 \pm 4,70$ vs. $2,36 \pm 2,19$, p=0,02); GPP: $4,40 \pm 3,80$ vs. $2,39 \pm 2,10$, p=0,019). O IPC manteve-se estável entre 6 e 12 meses (p=0,503). A TFGe no grupo GPNP foi significativamente maior aos 12 meses em relação ao valor basal ($58,4 \pm 41,6$ vs. $67,3 \pm 42,1$, p=0,046), assim como no grupo GPP ($62,3 \pm 41,8$ vs. $75,3 \pm 36,0$, p=0,029), não variando entre 6 e 12 meses (p=0,698).

Dos 48 pacientes tratados com imunossupressão (excluindo-se pacientes com nefropatia diabética e GESF secundária), 35 apresentaram resposta total (n=9) ou parcial (n=26) após 6 meses de tratamento. Treze pacientes não responderam: GESF,

n=5, NL, n=4, sendo 1 de classe III e 3 de classe IV; IgA, n=2 e GNMP, n=2. O IPC na biópsia e aos 6 meses do grupo respondedor foram $4,80\pm 3,78$ e $1,30\pm 1,01$ ($p<0,001$) e no não respondedor $5,60\pm 5,41$ e $4,86\pm 2,61$ ($p=0,630$), respectivamente. A TFGe basal comparada aos 6 meses foi $78,3\pm 36,2$ e $55,2\pm 44,0$ mg/dl ($p=0,04$) no grupo respondedor, e $63,8\pm 48,2$ mg/dl e $62,2\pm 39,8$ mg/dl ($p=0,985$) no não respondedor, respectivamente.

Expressão gênica no tecido renal

A expressão do RNAm dos genes na biópsia renal foi significativamente menor nos grupo GPNP em relação aos controles (tabela 2), exceto para o gene sinaptopodina. O grupo GPP apresentou menor nível de podocina e uma tendência de menor expressão de nefrina, podocalixina e alfa actinina-4 na biópsia renal. Globalmente, embora a expressão gênica também estivesse reduzida nas glomerulopatias proliferativas, pacientes com GESF, GNM, AGM ou ND mostraram redução mais marcada da expressão destas moléculas (figura1).

Expressão gênica no sedimento urinário

O padrão de expressão do RNAm dos genes na urina – exceto sinaptopodina - foi o oposto do encontrado no tecido renal, isto é, níveis mais elevados de RNAm em comparação aos controles (tabela 3). O aumento do RNAm de nefrina, podocina e podocalixina foi de maior magnitude no grupo GPP em relação ao grupo GPNP e aos controles, como mostra a figura 2. No grupo GPNP verificou-se apenas um aumento marginal da expressão de nefrina. Ambos os grupos diferiram significativamente dos controles quanto a maior expressão do RNAm da alfa actinina-4. Apesar da quantidade

de RNAm da podocina e da podocalixina ser maior no grupo GPNP quando comparado aos controles, esse aumento não atingiu significância estatística

Efeito do tratamento imunossupressor sobre a expressão gênica das proteínas do podócito na urina

Globalmente, houve redução nas medianas do RNAm dos genes podocina, podocalixina e alfa actinina-4 comparando a urina basal vs. 6 meses e 12 meses ($p < 0,001$, para os três genes). Apesar de haver redução no nível do RNAm da nefrina ao longo dos 12 meses, esta diferença não foi estatisticamente significativa; o RNAm da sinaptopodina foi similar nos três períodos. A análise individual dos grupos (tabela 4) mostra que esta redução persistente no RNAm dos genes ocorreu predominantemente nas glomerulopatias proliferativas, onde a diminuição na expressão de podocina e podocalixina (basal vs. 6 e 12 meses) e de alfa actinina-4 (basal vs. 6 meses) foi estatisticamente significativa. Nas glomerulopatias não proliferativas, houve redução na expressão de alfa actinina-4 (basal vs. 6 e 12 meses, $p = 0,011$), e uma tendência de redução na podocalixina (basal vs. 6 e 12 meses, $p = 0,080$). Neste grupo, o nível de nefrina apresentou discreta mas significativa elevação.

A transcrição gênica no tecido e urina foi comparada entre pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento imunossupressor. O nível do RNAm das proteínas associadas ao podócito no período basal não diferiu entre os dois grupos, e mesmo no grupo não respondedor houve uma redução estatisticamente significativa da expressão gênica (exceto de sinaptopodina) aos 6 meses e 12 meses pós tratamento. Utilizando modelo de Regressão de Cox ($n = 56$), verificou-se que nenhum dos cinco genes foi preditivo de não resposta ao tratamento imunossupressor ($IPC > 3,5$) aos 6 meses.

A análise da EEG mostra o comportamento dos genes na urina, nos três períodos estudados, expresso como média e IC95% (figura 3). As médias de nefrina (Wald Chi-Square: 4,33; $p=0,037$) e podocalixina (Wald Chi-Square: 8,61; $p=0,003$) foram mais elevadas no grupo GPP. O momento da medida não influenciou a expressão da nefrina, mas houve efeito de momento na expressão de podocalixina e alfa actinina-4. Ocorreu interação para o gene da podocina entre momento e grupo, o que indica que a sua expressão depende do efeito conjunto do momento e do grupo na qual foi medida (Wald Chi-Square: 23,037; $p<0,001$). Assim, o grupo GPP apresentou uma redução mais acentuada de podocina do que o grupo GPNP do período basal até o sexto mês. O RNAm da sinaptopodina não diferiu entre os grupos e não variou ao longo do tempo (figura 3).

Correlação entre os genes no tecido e a na urina, e dos genes com a proteinúria e função renal

A tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação de Spearman entre os genes no tecido e na urina basal. Globalmente, as correlações entre os genes no tecido renal foram, em sua maioria, forte e estatisticamente significativa ($p<0,001$), exceto para sinaptopodina. Na urina basal, a nefrina e a podocina correlacionaram-se significativamente entre si e com os demais genes, mas as correlações foram mais fracas do que no tecido. Não houve correlação na urina entre podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4.

Analisando a correlação entre proteinúria e expressão gênica na urina, verificou-se que no momento da biópsia houve correlação positiva e significativa com nefrina ($r=0,637$, $p<0,001$), podocina ($r=0,513$, $p=0,002$), alfa actinina-4 ($r=0,340$, $p=0,05$) e uma tendência para podocalixina ($r=0,320$, $p=0,06$). Aos 6 meses (mas não aos 12

meses), esta correlação manteve-se para os mesmos genes: nefrina ($r=0,621$, $p=0,001$), podocina ($r=0,576$, $p=0,003$), podocalixina ($r=0,577$, $p=0,003$), com uma tendência para alfa actinina-4 ($r=0,345$, $p=0,09$). Não houve correlação entre proteinúria e a expressão gênica no tecido.

Não houve correlação entre função renal e RNAm dos genes na urina no período basal, apenas uma tendência de correlação inversa da TFGe com podocina ($r=-0,272$, $p=0,08$), podocalixina ($r=-0,303$, $p=0,051$) e alfa actinina-4 ($r=-0,320$, $p=0,06$). As medianas do RNAm no tecido e na urina dos cinco genes em pacientes com variação positiva ou negativa da TFGe (TFGe aos 12 meses – TFGe basal) não diferiram. Também não houve correlação dos genes no tecido e na urina basal com o grau de fibrose intersticial e atrofia tubular aferidos na biópsia renal.

Discussão

A proteinúria na doença glomerular resulta de alterações estruturais e funcionais do filtro glomerular ainda não bem definidas. Evidências recentes mostram que a injúria ao podócito e às proteínas de seus diferentes domínios tem um papel crítico neste processo, no qual diferentes mecanismos podem iniciar a lesão, como células inflamatórias, ativação do complemento, fatores circulantes e deposição de imunocomplexos (1-3). Existe controvérsia se a podocitúria e a proteinúria são eventos glomerulares diferentes ou se tem relação de causa e efeito, e qual marcador é mais acurado para refletir atividade de doença. A sequência de eventos que levam à podocitopenia intra-renal, característica da GESF, envolve fusão e achatamento dos podócitos que se desprendem da MBG e são excretadas como células viáveis na urina, posteriormente sofrendo apoptose ou necrose (3,11). Com base nesta hipótese estudamos em diferentes glomerulopatias a expressão gênica simultânea das proteínas

do podócito em biópsias renais e nas células do sedimento urinário, pressupondo que a podocitopenia ocorre simultaneamente com a podocitúria e que a análise do RNAm das proteínas do podócito é uma evidência direta de sua presença na urina.

Tem sido demonstrado em estudos experimentais e clínicos que a expressão de nefrina, podocina, podocalixina e sinaptopodina está reduzida no tecido renal em glomerulopatias como GESF, GNM, NL e ND, tanto em nível pós translacional (4,21) quanto do RNAm (5 16, 22, 23). Em acordo com os esses estudos, observamos que a expressão de nefrina, podocina, podocalixina e alfa actinina-4 foi marcadamente reduzida nas glomerulopatias não proliferativas não inflamatórias. É possível que a fusão podocitária desestabilize a ligação célula-célula e induza um rearranjo estrutural do diafragma em fenda e do citoesqueleto, com redistribuição e menor expressão dessas proteínas no glomérulo (1-3, 16, 24). Por outro lado, proliferação endocapilar ou extracapilar, invasão de células inflamatórias e depósitos de imunocomplexos, características da NL, GNMP e IgA também produzem lesão podocitária como demonstrado em estudos experimentais (25). Entretanto, ainda não é claro em que intensidade esses fenômenos ocorrem. Em nosso estudo, observamos que a expressão das moléculas do podócito nas biópsias de glomerulonefrites proliferativas e inflamatórias foi marginalmente inferior aos controles, mas a podocitúria foi mais intensa que nas formas não proliferativas, dado a ser mais investigado em outros estudos. Os diferentes níveis de transcrição gênica observados nos grupos GPNP e GPP não pode ser atribuída ao grau de proteinúria no momento da biópsia, que foi semelhante nos dois grupos.

A resposta do podócito a diferentes injúrias não parece ser estereotipada. Um dos mecanismos é a perda ou redução da adesão de proteínas como nefrina, podocina e podocalixina que leva ao desnudamento da MBG; os podócitos remanescentes tentam

recobrir estas áreas, hipertrofiando-se e fundindo-se na camada externa. A menor adesão leva ao descolamento e excreção de podócitos no espaço urinário, na forma de células viáveis ou em apoptose ou necrose (3, 6, 7, 11). Experimentalmente, podócitos lesados podem manter a expressão de suas proteínas específicas e sobreviver até 2 semanas antes de entrar em apoptose (6). Diversos estudos tem identificado a presença de podócitos na urina pela quantificação do RNAm de suas proteínas em diferentes glomerulopatias (8, 10, 21, 26, 27) e também na nefrosclerose hipertensiva (9). Em modelo experimental, esta ferramenta não invasiva mostrou maior especificidade que a proteinúria para detecção de dano glomerular, atividade de doença e sua seqüela (28).

No presente estudo verificamos uma maior expressão gênica de nefrina, podocina, podocalixina e alfa actinina-4 na urina, tanto nas glomerulopatias proliferativas como nas não proliferativas, e houve uma correlação positiva e significativa entre podocitúria e proteinúria tanto pré como pós tratamento imunossupressor. Entretanto, somente nos pacientes com glomerulonefrites proliferativas houve uma diferença consistente e significativa em relação aos controles. Este achado foi inesperado, pois se ocorre maior podocitopenia glomerular, como descrito nas formas não proliferativas onde predomina a fusão podocitária, se esperaria maiores níveis de podocitúria nesses pacientes (29). Pode-se argumentar que a correlação entre número de podócitos por glomérulo e RNAm das moléculas do podócito no tecido e na urina não é absoluta (18). No estudo de Navarro-Muñoz (30) o RNAm de nefrina em células do sedimento urinário estava aumentado não só nas lesões não proliferativas (principalmente na GESF) mas também nas glomerulonefrites proliferativas (GNPM, IgA). Essas diferenças podem ser atribuídas a diferentes critérios de diagnóstico e também pelo emprego de diferentes metodologias na análise molecular.

Deposição de anticorpos e imunocomplexos, ativação do complemento e inflamação são mecanismos de podocitopatia em glomerulonefrites proliferativas inflamatórias. Curiosamente, na Nefropatia por IGA os depósitos se localizam no mesângio glomerular, e não existem receptores para IgA1 no podócito. Apesar disso, a expressão de marcadores do podócito está diminuída no rim, possivelmente associada à injúria de mediadores inflamatórios secretados pela célula mesangial, como fator de necrose tumoral alfa e fator de crescimento transformador beta, que alteram a permeabilidade glomerular (31). Níveis de podocalixina e número de podócitos na urina correlacionam-se com a gravidade das lesões extracapilares e de esclerose segmentar em pacientes com Nefropatia por IgA (32). Na nefrite lúpica, a ruptura do filtro glomerular e a podocitúria podem estar associadas a alterações na dinâmica do podócito decorrentes da deposição de imuno-complexos e da secreção de fatores humorais, e se correlacionam com a gravidade da lesão proliferativa e o escore de atividade de doença (10, 17). Adicionalmente, a magnitude da expressão gênica no tecido e na urina pode depender de outros fatores, como intensidade da lesão inicial, fase da doença, atividade ou inatividade imunológica e efeito de imunossupressores. No presente estudo, a maior parte dos pacientes foram biopsiados e coletaram urina em fase aguda de doença, antes do tratamento imunossupressor, quando a lesão podocitária é intensa.

A sinaptopodina foi a única proteína que, tanto no tecido como na urina, não se correlacionou com tipo de lesão histológica, proteinúria ou creatinina sérica. Tem sido considerado um controle endógeno (housekeeping gene) devido a sua expressão ser relativamente constante no citoesqueleto do podócito, e possivelmente por não afetar a permeabilidade glomerular às proteínas nos processos patológicos (33). Outros autores também não encontraram correlação entre sinaptopodina e outras moléculas do podócito em glomerulopatias proteinúricas (5, 8).

O efeito do tratamento imunossupressor e de outras intervenções como IECA, ARA- 2 e agentes hipoglicemiantes sobre a podocitúria foi investigado em estudos experimentais (34-37), e clínicos (12-15). Teoricamente a evolução da lesão podocitária depende da interrupção do insulto agudo e da restituição da arquitetura glomerular e do fenótipo primário do podócito, e a imunossupressão por restituir a barreira do filtro glomerular pode influenciar o desfecho da lesão. Avaliando a podocitúria seriada até 12 meses do início do tratamento, o RNAm da podocina, podocalixina e alfa actinina-4 reduziu significativamente, de forma mais marcada nas glomerulopatias proliferativas. Entretanto, não avaliamos se a redução da podocitúria se acompanha de retenção das moléculas do podócito no glomérulo, pois não havia indicação clínica de re-biópsias nesses pacientes.

A nefrina aumentou em relação ao valor basal apesar do tratamento, o que também foi relatado em pacientes com nefropatia diabética em uso de IECA e/ou ARA-2 (38). Talvez a nefrina seja um marcador mais sensível da disfunção do diafragma em fenda, e a imunossupressão não restaure completamente a sua conformação molecular e a redistribuição na MBG. Considerando que apenas nove pacientes apresentaram resposta total ao tratamento persistindo com proteinúria subnefrótica, é possível que a podocitúria ainda ocorra em paralelo com a proteinúria. No nosso estudo e também em outros (10), o tipo de resposta ao tratamento imunossupressor não foi fator preditivo de redução da podocitúria.

A correlação entre as proteínas dos diferentes domínios do podócito foi significativa, mas mais forte no tecido do que na urina, talvez apontando para uma excreção errática das moléculas após o seu descolamento da MBG. Na urina, o comportamento da sinaptopodina foi único pois não mostrou correlação com as demais proteínas, sugerindo uma expressão de menor variabilidade. Schmid et al (5) estudando

glomerulopatias proteinúricas primárias encontraram correlações semelhantes, mas também para sinaptopodina. Alguns estudos mostraram correlação das proteínas do podócito com a proteinúria e com evolução da função renal em diferentes glomerulopatias (8, 10, 17, 18, 27, 39). Embora se possa presumir uma correlação direta da proteinúria com a expressão gênica das proteínas na urina, refletindo a quebra da barreira do filtro glomerular, e uma correlação inversa com a expressão tecidual (40), encontramos correlação significativa apenas com a podocitúria. Também não houve correlação com a função renal basal, e mesmo pacientes com variação positiva ou negativa da TFGe tiveram níveis de RNAm semelhantes no tecido e na urina.

Este estudo apresenta limitações, pois incluiu um número pequeno de pacientes por tipo histológico e não houve controle da expressão gênica por gravidade da proteinúria, presença de insuficiência renal e uso correto das drogas imunossupressoras prescritas. Devido aos diferentes mecanismos de injúria ao podócito e da variabilidade de resposta ao tratamento nos diferentes tipos histológicos, é necessário um estudo envolvendo um número maior de pacientes, individualizando as glomerulopatias com base em sua etiopatogenia.

Este estudo mostrou que pacientes com glomerulopatias proteinúricas apresentam simultaneamente redução da expressão gênica das proteínas do podócito no tecido renal e aumento de sua excreção urinária na fase aguda da doença. A podocitúria diminuiu significativamente pelo efeito do tratamento imunossupressor até doze meses de seguimento. Nenhum dos genes estudados foi preditivo de não resposta ao tratamento. Entretanto, os resultados deste estudo não são conclusivos em relação a características específicas da podocitopatia em glomerulopatias que apresentam lesões proliferativas ou não proliferativas.

Reconhecimentos

Ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pela bolsa de mestrado, ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte financeiro e ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado à Nefrologia do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte técnico.

Conflitos de interesse: Não há conflitos de interesse.

Referências

1. Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003;23:353-60
2. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: A unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int* 2007;71:1205-14
3. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-47
4. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2063-71
5. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2958-66
6. 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
7. 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
8. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta* 2005;36:182-90
9. Wang G, Lai FM, Kwan BC, Lai KB, Chow KM, Li PK, et al. Podocyte loss in human hypertensive nephrosclerosis. *Am J Hypertens* 2009;22:300-6

10. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol* 2007;34:2358-64
11. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c61-6
12. Nakamura T, Ushiyama C, Hara M, Osada S, Ugai K, Shimada N, et al. Comparative effects of plasmapheresis and intravenous cyclophosphamide on urinary podocyte excretion in patients with proliferative Lupus nephritis. *Clin Nephrol* 2002;57:108-13
13. Nakamura T, Ushiyama C, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Hara M, et al. Effect of cyclophosphamide or azathioprine on urinary podocytes in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *Nephron* 2001;87:192-3
14. 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
15. 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
16. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001;158:1723-31

17. Bollain-y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodriguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011; 21: 166-171
18. Wang G, Lai FM, Lai K-B, Chow K-M, Kwan BC, Li K-T, et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for estimation of glomerular filtration loss. *Ren Fail* 2010; 32: 372-379
19. Investigation and Treatment of Glomerular diseases in adults. Guidelines of the Brazilian Society of Nephrology. *J Bras Nefrol* 2005; 26: 1-40
20. Cattran DC, Alexopoulos E, Heering P, Hoyer PF, Johnston A, Meyrier A, et al. Cyclosporin in idiopathic glomerular disease associated with the nephrotic syndrome: Workshop recommendations. *Kidney Int* 2007; 72: 1429-1447
21. Wang SX, Rastaldi MP, Pätäri A, Ahola H, Heikkilä E, Holthöfer H. Patterns of nephrin and a new proteinuria-associated protein expression in human renal diseases. *Kidney Int* 2002;61:141-147
22. Clement LC, Kiu G, Perez-Torres I, Kanwar YS, Avila-Casado, Chugh SS. Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease. *Kidney Int* 2007; 72: 337-347
23. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus* 2011; 20: 781-91
24. Wernerson A, Dunér F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 70-76

25. Kawachi H, Han GD, Miyauchi N, Hashimoto T, Suzuki K, Shimizu F. Therapeutic targets in the podocyte: findings in anti-slit diaphragm antibody-induced nephropathy. *J Nephrol* 2009; 22: 450-456
26. Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:231-8
27. Zheng M, Lv L-L, Ni J, Ni H-F, Li Q, Ma K-L, et al. Urinary Podocyte-Associated mRNA profile in Various Stages of Diabetic Nephropathy *Plos One* 2011 31;6 42
28. Yu DH, 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
29. Hara M, Yanagihata T, Takada T et al. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2001; 15: 1379-1383
30. Navarro-Muñoz M, Ibernón M, Pérez V, Ara J, Espinal A, López D, et al. Messenger RNA expression of B7-1 and NPHS1 in urinary sediment could be useful to differentiate between minimal-change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adult patients. *Nephrol Dial Transpl* 2011 Dec;26:3914-23
31. Lai KN, Leung JCK, Chan LYY, Saleem MA, Mathieson PW, Tam KY et al. Podocyte injury induced by mesangial-derived cytokines in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 62-72
32. Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Nagai-Hosoe Y, Seki T et al. Relationships between Levels of Urinary Podocalyxin, Number of Urinary Podocytes, and Histologic Injury in Adult Patients with IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012

33. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kritz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139: 193-204
34. Moysiadis DK, Perisynakis G, Bertias G, Stratakis S, Kyriacou K, Nakopoulou, et al. Early treatment with glucocorticoids or cyclophosphamide retains the slit diaphragm proteins nephrin and podocin in experimental lupus nephritis. *Lupus* 2012, Jul 5 [Epub ahead of print].
35. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Sato Y, Chowdhury MA, Wang SQ, et al. Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease. *Kidney Int* 2012;81:40-55
36. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, Panagiotopoulos S, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1327-1332
37. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, et al. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 2008;14:931-8
38. 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
39. Wang G, Lai FM, Lai KB, Chow KM, Li KT, Szeto CC. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in the urinary sediment of patients with diabetic nephropathy. *Nephron Clin Pract* 2007;106:c169-79

40. 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: 380-385

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes com glomerulopatias e controles

	GPNP	GPP	Controles		P
			Urina	Tecido	
N	35	41	10	11	
Idade (anos)	41±17 ^a	35±11 ^a	44±12 ^a	59±11 ^b	<0,001
Sexo (masculino)	10 (54)	19 (46)	4 (40)	6(54)	0,185
Etnia (brancos)	26 (74)	37 (90)	9(90)	9(81)	0,137
PAS (mm/Hg)	133±15 ^a	134 ± 12 ^a	111±7,2 ^b	115±7,9 ^b	<0,001
PAD (mm/Hg)	81 ± 10 ^a	85 ± 10 ^a	71±7,3 ^b	72±6,5 ^b	<0,001
Creatinina sérica (mg/dl)	2,11±1,44 ^a	2,33±1,72 ^a	0,83±0,17 ^b	0,88±0,14 ^b	0,046
TFGe (ml/min./1,73m ²)	58,4±41,6 ^a	62,3±41,8 ^a	92,1±9 ^b	85,2±11,3 ^b	0,008
Proteinúria (IPC)	5,10±4,70 ^a	4,40±3,80 ^a	0,05±0,04 ^b	0,06±0,03 ^b	0,01
Albumina sérica	3,07±0,92 ^a	3,08±0,84 ^a	4,51±0,32 ^b	4,28±0,38 ^b	<0,001
FI/AT (%)	24±20 ^a	18±16 ^a	-	3±2 ^b	0,002

PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada; IPC: índice proteinúria/creatininúria; FI/AT: fibrose intersticial/atrofia tubular; GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas; ^a ou ^b : médias ou medianas seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa entre si (p<0,05).

Tabela 2: Expressão gênica das proteínas associadas ao podócito no tecido renal dos pacientes com glomerulopatias em comparação ao controles

Gene	Grupo	Controles (n=11)	Glomerulopatia não proliferativa (n=35)	Glomerulopatia Proliferativa (n=41)	P
Nefrina		2,00 (1,07 – 2,56)	0,87 (0,02 – 1,10)	0,86 (0,51 – 2,08)	0,009
Podocina		2,04 (1,43 – 3,04)	0,89 (0,24 – 1,60)	1,12 (0,05 – 1,85)	0,007
Podocalixina		1,86 (1,21 – 2,53)	0,76 (0,38 – 1,22)	0,96 (0,39 – 1,75)	0,031
Sinaptopodina		1,46 (1,21 – 2,70)	1,05 (0,68 – 1,80)	1,23 (0,74 – 2,01)	0,133
Alfa actinina 4		1,70 (1,39 – 2,57)	0,66 (0,40 – 1,47)	1,01 (0,41 – 1,60)	0,019

Nefrina: GPNP vs. C: p= 0,009; GPP vs. C: p=0,08; podocina: GPNP vs. C: p=0,045, GPP vs. C: p=0,024; podocalixina: GPNP vs. C: p= 0,027; GPP vs. C: p=0,064; alfa actinina-4: GPNP vs. C: p=0,014; GPP vs. C p=0,055; GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas.

Tabela 3: Expressão gênica das proteínas associadas ao podócito na urina basal dos pacientes com glomerulopatias em comparação aos controles

Gene	Grupos	Controles (n=10)	Glomerulopatia não Proliferativa (n=35)	Glomerulopatia Proliferativa (n=41)	P
Nefrina		2,29 (0,64 – 2,58)	2,13 (1,69 – 3,17)	2,87 (2,16 – 3,64)	0,015
Podocina		1,92 (0,85 – 3,05)	2,85 (1,97 – 3,64)	4,82 (4,15 – 5,52)	<0,001
Podocalixina		2,33 (0,90 – 3,01)	2,98 (2,41 – 3,94)	3,97 (3,63 -4,42)	<0,001
Sinaptopodina		2,15 (1,12 – 2,71)	1,98 (1,87 – 2,78)	1,99 (1,72 – 3,12)	0,702
Alfa actinina-4		1,42 (1,11 – 2,23)	2,38 (1,87- 2,99)	2,42 (2,05 – 3,16)	0,011

Nefrina: GPP vs. C: p= 0,048; GPP vs. GPNP: p=0,060; podocina: GPP vs. C: p < 0,001; GPP vs. GPNP: p < 0,001; podocalixina: GPP vs. C: p < 0,001; GPP vs. GPNP: p= 0,001; alfa actinina-4: GPP vs. C: p= 0,009; GPNP vs. C: p= 0,038; GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas;

Tabela 4: Efeito do tratamento imunossupressor sobre a expressão gênica das proteínas do podócito na urina aos 6 e 12 meses em comparação ao valor basal

		Tempo			p
		Basal	6 meses	12 meses	
Gene					
GPNP	Nefrina	2,13 (1,69 – 3,17)	2,11 (1,65 – 2,64)	2,33 (1,67 – 2,67)	0,017
	Podocina	2,85 (1,97 – 3,64)	2,10 (1,72 – 2,99)	1,99 (1,67- 3,08)	0,678
	Podocalixina	2,98 (2,41 – 3,94)	1,92 (1,18 – 3,05)	1,84 (1,38 – 2,73)	0,080
	Sinaptopodina	1,98 (1,87 – 2,78)	1,96 (1,55 – 3,05)	1,94 (1,50 – 3,07)	0,502
	Alfa actinina-4	2,38 (1,87- 2,99)	1,37 (0,84 – 2,54)	1,58 (1,25 – 2,03)	0,011
GPP	Nefrina	2,87 (2,16 – 3,64)	2,50 (1,55 - 3,59)	2,29 (1,78 – 3,18)	0,237
	Podocina	4,82 (4,15 – 5,52)	3,04 (1,97 – 3,95)	2,49 (1,96 – 3,47)	<0,001
	Podocalixina	3,97 (3,63 - 4,42)	2,44 (1,79 – 3,35)	2,39 (1,78 – 3,11)	<0,001
	Sinaptopodina	1,99 (1,72 – 3,12)	2,26 (1,79 – 2,92)	2,26 (1,70 – 2,92)	0,961
	Alfa actinina-4	2,42 (2,05 – 3,16)	1,72 (1,07 – 2,37)	1,87 (1,26 – 2,68)	0,007

GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas; GPNP: Alfa actinina-4: Basal vs. 6meses (p=0,008); GPP - Podocina: Basal vs. 6meses, 12 meses (p<0,001); Podocalixina: Basal vs. 6meses, 12meses(p<0,001); Alfa actinina-4: Basal vs. 6meses (p=0,006).

Tabela 5: Correlações entre os genes das proteínas do podócito no tecido e urina

	Coefficiente de correlação (<i>r</i> , valor de P)	Alfa Actinina-4	Sinaptopodina	Podocalixina	Podocina	Nefrina
Tecido Renal	Nefrina	0,722 <0,001	0,224, 0,042	0,768 <0,001	0,655 <0,001	1
	Podocina	0,529 <0,001	0,209 0,073	0,548 <0,001	1	
	Podocalixina	0,867 <0,001	0,072, 0,482	1		
	Sinaptopodina	0,104, 0,261	1			
	Alfa Actinina-4	1				
Sedimento urinário (basal)	Nefrina	0,376 <0,001	0,233, 0,038	0,393 <0,001	0,497 <0,001	1
	Podocina	0,223 0,039	0,267, 0,013	0,583 <0,001	1	
	Podocalixina	0,193 0,075	0,168, 0,123	1		
	Sinaptopodina	0,101 0,355	1			
	Alfa Actinina-4	1				

Figura 1

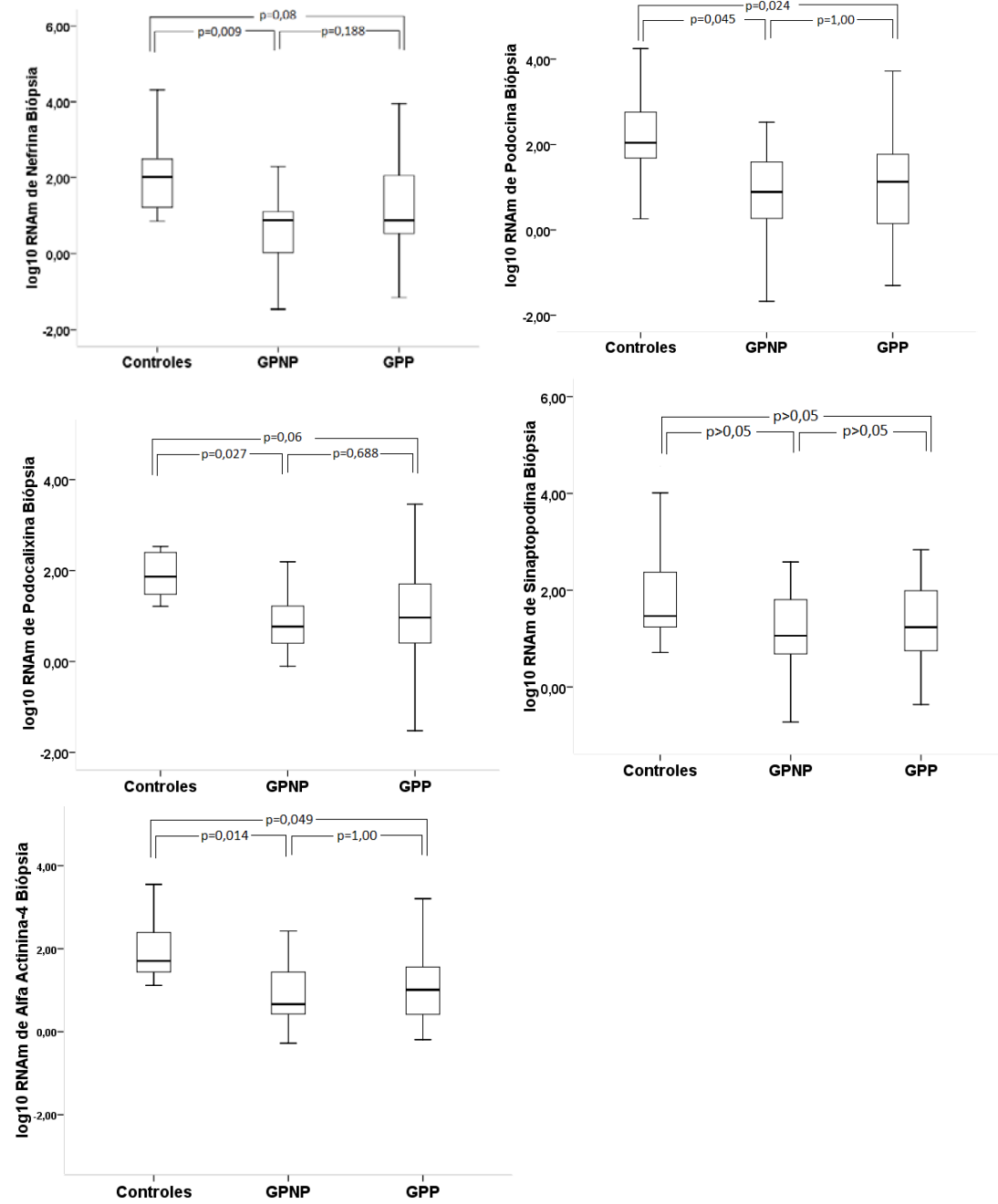


Figura 2

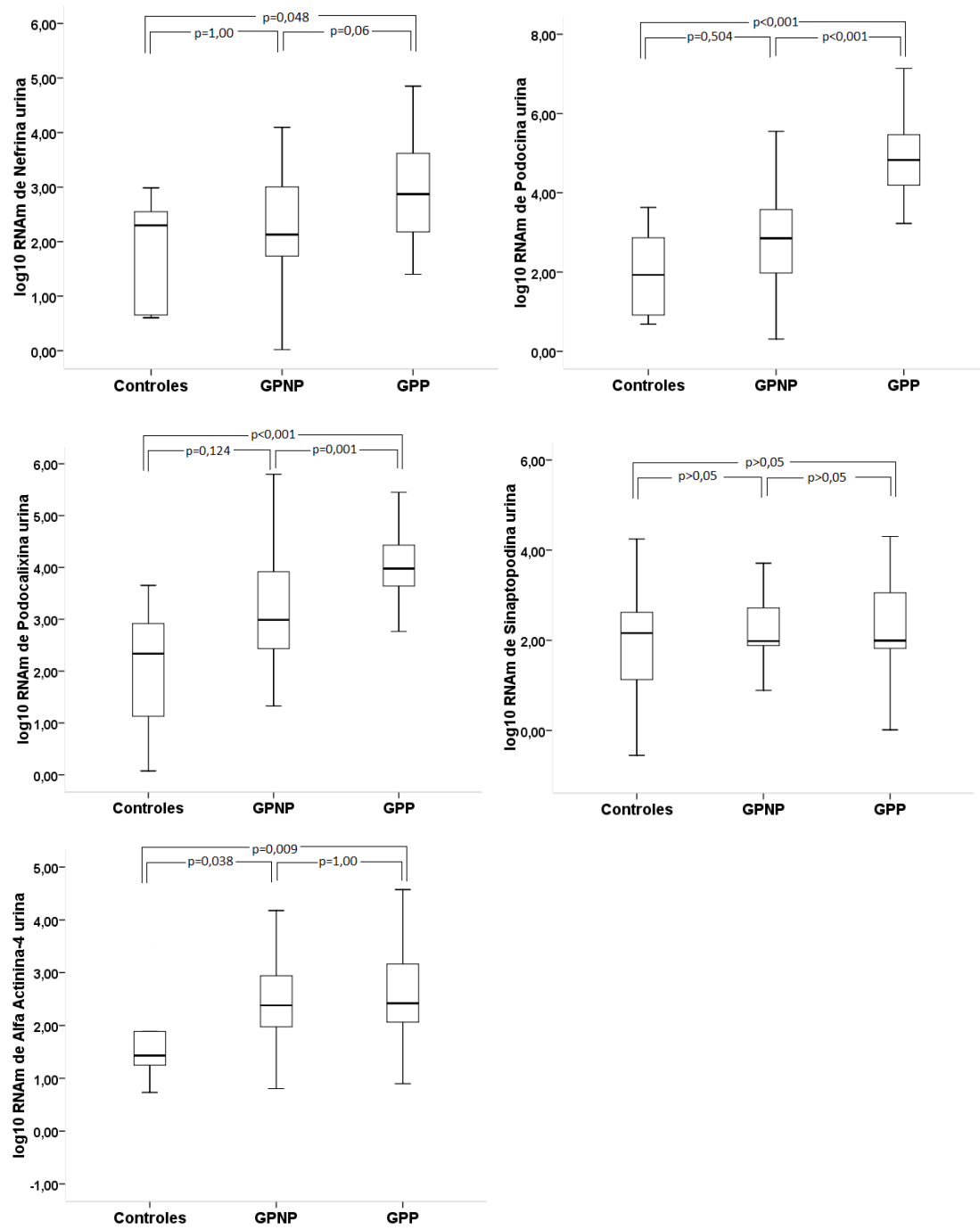
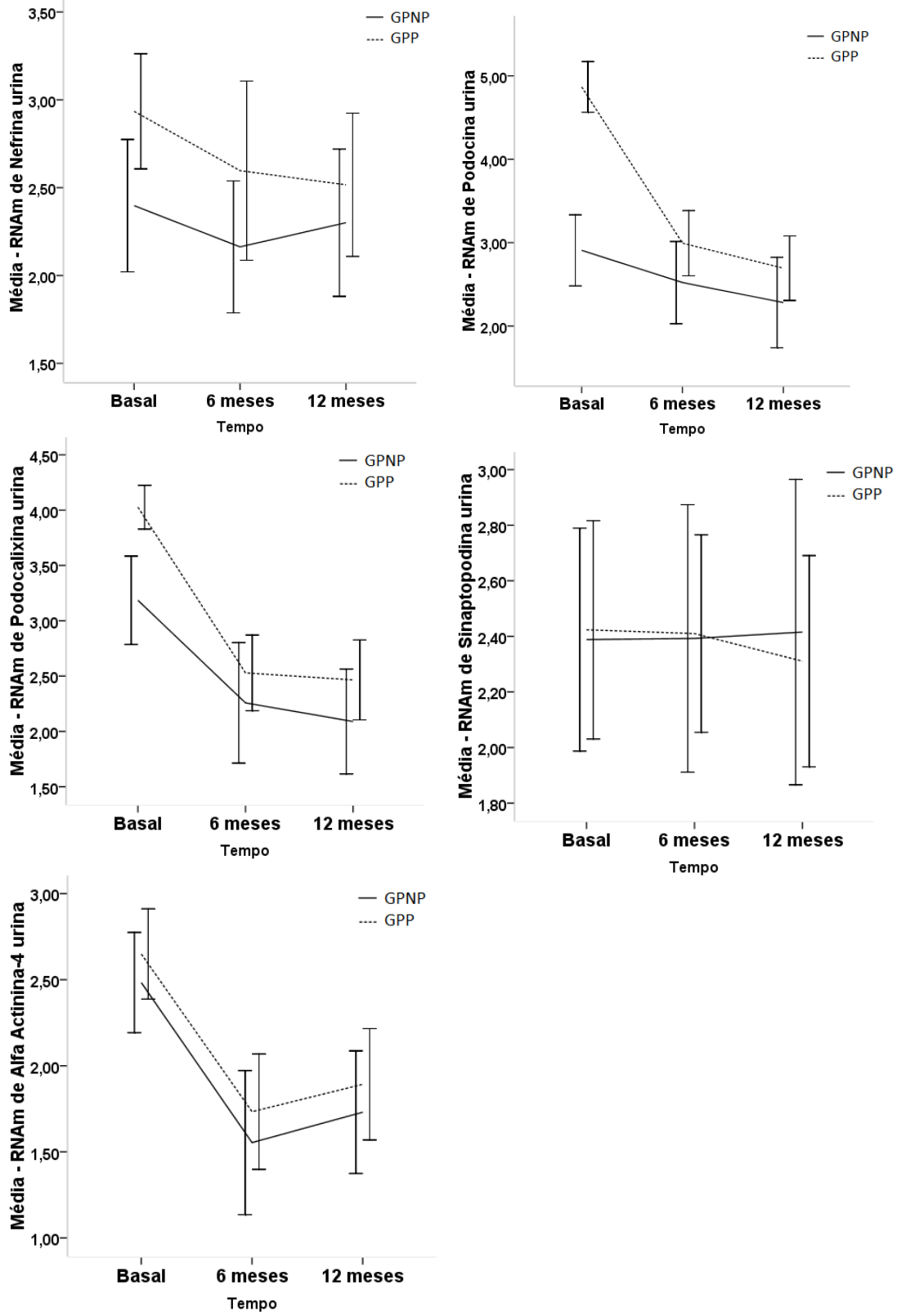


Figura 3



Legendas para as figuras

Figura 1: Expressão do RNAm dos genes nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4 no tecido renal comparando pacientes com GPNP, GPP e controles. GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas.

Figura 2: Expressão do RNAm dos genes nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e a alfa actinina-4 na urina basal (momento da biópsia) comparando pacientes com GPNP, GPP e controles. GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas.

Figura 3: Efeito do tratamento imunossupressor sobre a expressão gênica das proteínas do podócito na urina aos 6 meses e 12 meses de seguimento nos pacientes com GPNP e GPP. Barras: as barras de erro apresentam o intervalo de confiança de 95%. GPNP: Glomerulopatias não proliferativas; GPP: Glomerulopatias proliferativas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo avaliamos a expressão gênica de moléculas associadas ao podócito em biópsias renais e em células do sedimento urinário em dois grupos de glomerulopatias proteinúricas, as formas proliferativas e não proliferativas. O achado mais importante deste trabalho foi que, em acordo com os dados da literatura, a expressão do RNAm de nefrina, podocina, sinaptopodina e alfa actinina-4 está significativamente reduzida no tecido renal, em paralelo com uma aumento significativo na urina. A redução no tecido foi mais intensa nos pacientes com glomerulopatias não proliferativas como glomeruloesclerose segmentar e focal, lesões mínimas, membranosa e nefropatia diabética, mas a magnitude da expressão urinária foi maior nas lesões proliferativas, como nefrite lúpica, nefropatia por IgA, e nas glomerulonefrites membranoproliferativa e crescêntica. O tratamento com imunossuppressores e/ou inibidores da angiotensina influenciou essa expressão, reduzindo-a em relação aos valores basais já no sexto mês, e mantendo níveis baixos até 12 meses. Por outro lado, nenhum gene foi preditivo de não resposta aos imunossuppressores.

O RNAm das proteínas do podócito correlacionou-se positivamente com a proteinúria, mas não mostrou correlação com a taxa de filtração glomerular. Também não observamos correlação com o grau de fibrose intersticial e atrofia tubular presente na biópsia.

As limitações deste estudo precisam ser citadas. Pequeno número de pacientes por tipo histológico, não controle da expressão gênica por gravidade da proteinúria (presença de síndrome nefrótica), presença de insuficiência renal e uso correto das drogas imunossupressoras prescritas. Adicionalmente, os resultados deste estudo não são conclusivos em relação a características específicas da podocitopatia em

glomerulopatias que apresentam lesões proliferativas ou não proliferativas. Considerando os diferentes mecanismos de injúria ao podócito e a variabilidade de resposta ao tratamento nos diferentes tipos histológicos, é necessário um estudo envolvendo um número maior de pacientes, individualizando as glomerulopatias com base em sua etiopatogenia.

8. ANEXOS

8.1 Protocolo de coleta de dados

Identificação

Nome				Data Nascimento:	Protocolo n°	N° AP:
Idade	Sexo	<input type="checkbox"/> 1=Masc <input type="checkbox"/> 2=Fem	Etnia	<input type="checkbox"/> 1=Branco <input type="checkbox"/> 2=Negro	Registro HCPA	Telefone:

Dados clínicos e laboratório basal

Hipertensão arterial: () Sim () Não	Medicações em uso e doses (listar)
Índice proteinúria/creatininúria:	1.
Creatinina sérica (mg/dl):	2.
MDRD (filtração glomerular estimada, em ml/min/1,73 m ²):	3.
	4.
	5.
Albumina:	6.
EQU: hemácia () Sim () Não N°:	Doenças Sistêmicas:
Observações:	

Punção Biópsia Renal

Data	Indicação	Diagnóstico Histológico	Protocolo de tratamento (imunossupressão)	Duração do tratamento
		FI/AT:		

Pressão arterial

Data	Pressão

Evolução laboratorial

Parâmetro	6 meses	12 meses
Índice proteinúria/creatininúria		
Creatinina sérica (mg/dl)		
MDRD (filtração glomerular estimada, em ml/min/1,73 m ²)		

Análise Molecular

URINA

Gene / RNAm	Basal	6 meses	12 meses
Nefrina			
Podocina			
Podocalixina			
Sinaptopodina			
Alfa actinina-4			

TECIDO RENAL

Gene / RNAm	Biópsia renal (período basal)
Nefrina	
Podocina	
Podocalixina	
Sinaptopodina	
Alfa actinina-4	

8.2 Termo de consentimento livre e esclarecido

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o(a) Sr.(a) _____ a participar de um estudo que será elaborado com o objetivo de identificar alterações renais relacionadas a sua doença dos rins que leva à perda de proteínas na urina, chamada de glomerulonefrite. O objetivo dessa pesquisa é desenvolver um teste fácil de aplicar, feito em uma amostra de urina, para ajudar no diagnóstico de sua doença e verificar como o(a) Sr.(a) está respondendo às medicações que o seu médico prescreveu. Os procedimentos a que os (as) Sr. (as) serão submetidos são uma coleta de urina em três momentos, minutos antes da biópsia do rim indicada pelo seu médico, e depois de 6 meses e 12 meses do início do tratamento. Adicionalmente, um pequeno fragmento do seu rim que será removido pela biópsia, indicada para o manejo de sua doença que faz perder proteínas na urina, será examinada por técnicas utilizadas neste estudo, chamadas de biologia molecular e imunohistoquímica. Estes materiais serão analisados no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia.

As coletas de urina no frasco que não oferecem nenhum risco. A biópsia do rim é um procedimento que envolve riscos de complicações. A complicação mais freqüente é a perda de sangue pela urina que ocorre em quase todos os casos, e não requer nenhum tratamento específico. Também podem ocorrer hematomas ao redor ou dentro do rim, que em geral são pequenos, e às vezes podem dar dor na região das costas do lado biopsiado. Nos raros casos de hemorragias mais graves pode ser necessário transfusões sanguíneas e/ou cirurgia para estancar o sangramento, o que pode ocorrer em até 3% e 2% dos casos respectivamente. Para evitar as complicações descritas e tratá-las com a maior brevidade é necessário estar em jejum por 6 horas antes da biópsia e 4 horas após, permanecendo em repouso absoluto no leito do hospital por 24 horas após a biópsia, o que diminui muito esses riscos.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para os(as) Sr.(as), mas a sua ajuda será muito importante na pesquisa de melhores diagnósticos e verificação do efeito do tratamento sobre essas doenças do rim que fazem perder proteína na urina (glomerulonefrites) para futuros pacientes.

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 3359-8295, 3359-8121 ou ainda pelo telefone celular do Dr. Francisco Veronese -99693920 ou do Dr. Elvino Barros – 99861619. Ainda em caso de urgências com o plantão do Serviço de Nefrologia do HCPA pelo telefone 3359-8000.

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
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

8.2.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 que tem por objetivo identificar alterações dos rins relacionadas a nefrites (inflamação do rim) que levam à perda de proteínas na urina. Essa pesquisa visa desenvolver um teste fácil de aplicar, feito em uma amostra de urina, para ajudar no diagnóstico e no melhor entendimento das nefrites. A nefrite é uma doença que afeta muitas pessoas, e que pode levar à perda de proteínas na urina, o que se chama de proteinúria. Entretanto, precisamos comparar a urina de pessoas que tem nefrite com a urina de pessoas que não tem nem nefrite e nem 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.

Os procedimentos aos quais o(a) Sr. (a) será submetido serão: 1) Uma coleta de uma amostra de urina em um frasco, o que não envolve nenhum risco para o(a) Sr(a).; 2) Após a retirada do seu rim, indicada pelo seu médico urologista para tratar a sua lesão renal, e com o rim já fora do seu corpo depositado em uma bacia com soro gelado, será feita uma biópsia com agulha para retirada de um pequeno pedaço do rim (como uma tira fina, de 1 cm de comprimento por 0,4 cm de largura). Como a biópsia será feita no rim após o mesmo ser retirado do seu corpo, este procedimento não envolve nenhum risco para o seu organismo. Estes materiais serão analisados no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O seu rim será encaminhado após para o Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde será examinado pelo patologista na rotina normal do hospital para confirmar o seu diagnóstico.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para os(as) Sr.(as), mas a sua ajuda

será muito importante para o entendimento das nefrites e da perda de proteínas que elas causam.

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, 3395-8121 ou ainda pelo telefone celular do Dr. Francisco Veronese -99693920 ou do Dr. Elvino Barros - 99861619. 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
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

Data: ____/____/____