

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**PAPEL DO SISTEMA COMPLEMENTO NA PATOGÊNESE DA
GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL E DA DOENÇA DE LESÕES
MÍNIMAS**

Verônica Aparecida Ferreira

Uberaba

2022

Verônica Aparecida Ferreira

**PAPEL DO SISTEMA COMPLEMENTO NA PATOGÊNESE DA
GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL E DA DOENÇA DE LESÕES
MÍNIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Investigativa, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado e Silva
Coorientadoras: Dr^a Crislaine Aparecida da Silva
Prof^a Dr^a Marlene Antônia dos Reis

Uberaba

2022

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

F444p	<p>Ferreira, Verônica Aparecida Papel do sistema complemento na patogênese da glomeruloesclerose segmentar e focal e da doença de lesões mínimas. / Verônica Aparecida Ferreira. – 2022. 102 p.: il., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022 Orientadora: Profª. Dra. Juliana Reis Machado e Silva Coorientadora(s): Dra. Crislaine Aparecida da Silva Profª. Dra. Marlene Antônia dos Reis</p> <p>1. Glomerulonefrite. 2. Imunoglobulina M. 3. Complemento C3. 4. Nefrose Lipoide. 6. Proteínas do sistema complemento. I. Silva, Juliana Reis Machado e. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.611</p>
-------	---

Verônica Aparecida Ferreira

**PAPEL DO SISTEMA COMPLEMENTO NA PATOGÊNESE DA
GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL E DA DOENÇA DE LESÕES
MÍNIMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Patologia Investigativa, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado e Silva
Coorientadoras: Dr^a Crislaine Aparecida da Silva
Prof^a Dr^a Marlene Antônia dos Reis

01 de setembro de 2022

Banca examinadora:

Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado e Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

Dr^a Aline Cristina Souza da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

Prof Dr Ruy de Souza Lino Júnior
Universidade Federal de Goiás-UFG

*Dedico este trabalho a minha família,
amigos e namorado. O apoio de vocês
foi essencial nessa caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, incentivo, carinho e por nunca medirem esforços para a formação das suas filhas.

À minha irmã, pelo companheirismo, amizade e amor.

Ao meu namorado, pelo amor, incentivo e por acreditar no meu potencial.

À minha orientadora, por todos os ensinamentos, tempo e dedicação destinados a mim.

Às minhas coorientadoras, por todas as contribuições, apoio e paciência.

Aos meus amigos, pela amizade, parceria e todo o carinho.

À minha equipe de trabalho pela companhia diária e apoio.

Ao Centro de Pesquisa em Rim, por toda a estrutura e materiais fornecidos para a realização dessa pesquisa.

Aos pacientes por tornarem esse trabalho possível.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da UFTM pela ajuda.

RESUMO

Introdução: As podocitopatias, doença de lesões mínimas (DLM) e glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF), são as principais causas de síndrome nefrótica no mundo e morfológicamente, apresentam apagamento dos pedicelos na microscopia eletrônica de transmissão. Sabe-se que o sistema imunológico é importante na etiopatogenia dessas doenças e, em especial, a ativação do sistema complemento vem sendo reconhecida como causa de lesão e como um fator de mau prognóstico em várias doenças renais. **Objetivo:** Avaliar a deposição de imunoglobulinas e partículas do sistema complemento em biópsias renais de pacientes com GESF e DLM, e relacionar com dados laboratoriais e prognóstico. **Materiais e métodos:** Foram selecionadas 59 biópsias renais de pacientes com podocitopatias, sendo 31 pacientes com GESF e 28 com DLM. Avaliou-se as informações epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e prognóstico desses pacientes. Foi realizado a análise da deposição de IgM, IgG, C3 e C1q nas biópsias renais através da técnica de imunofluorescência e de C4d pela imuno-histoquímica. Relacionamos a deposição de IgM e C3 com os dados laboratoriais e o desfecho clínico. **Resultados:** A deposição glomerular de IgM foi significativamente maior no grupo GESF, assim como a deposição de IgM e C3. A evolução clínica dos pacientes também foi pior nos casos de GESF, com um percentual maior progredindo para doença renal crônica e óbito. Em contrapartida, a grande maioria dos pacientes com DLM apresentou melhora da doença após tratamento. Pacientes com deposição de C3 apresentaram valores médios de creatinina sérica significativamente maiores e TFGe significativamente menores, independente da doença. **Conclusões:** Pacientes com GESF apresentaram mais deposição de IgM e C3, nas biópsias renais, piores parâmetros laboratoriais e evolução clínica do que os pacientes com DLM. A deposição de C3, tanto na GESF quanto na DLM, pode contribuir para a piora da função renal.

Palavras-chaves: complemento C3; glomeruloesclerose segmentar e focal; glomerulopatia de lesões mínimas; imunoglobulina M; proteínas do sistema complemento.

ABSTRACT

Introduction: Podocytopathies, minimal change disease (MCD) and focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), are the main causes of nephrotic syndrome in the world and morphologically, show foot processes effacement in transmission electron microscopy. It is known that the immune system is important in the etiopathogenesis of these diseases and, in particular, the activation of the complement system has been recognized as a cause of injury and as a factor of poor prognosis in several kidney diseases. **Objective:** To evaluate the deposition of immunoglobulins and particles of the complement system in renal biopsies of patients with FSGS and MCD, and to relate it to laboratory data and prognosis. **Materials and methods:** 59 renal biopsies from patients with podocytopathies were selected, 31 from patients with FSGS and 28 with MCD. The epidemiological, clinical and laboratory information of these patients was evaluated. The analysis of the deposition of IgM, IgG, C3 and C1q in renal biopsies was performed using the immunofluorescence technique and C4d by immunohistochemistry. We related IgM and C3 deposition with laboratory data and clinical outcome. **Results:** Glomerular IgM deposition was significantly higher in the FSGS group, as well as IgM and C3 codeposition. The clinical evolution of patients was also worse in cases of FSGS, with a higher percentage progressing to CKD and death. In contrast, the vast majority of patients with MCD showed improvement in the disease after treatment. Patients with C3 deposition had significantly higher mean serum creatinine values and significantly lower eGFR, regardless of disease. **Conclusions:** Patients with FSGS had more IgM and C3 deposition in renal biopsies, worse laboratory parameters and clinical evolution than patients with MCD. C3 deposition, both in FSGS and MCD, can contribute to the worsening of renal function.

Keywords: complement C3; focal segmental glomerulosclerosis; minimal change glomerulopathy; immunoglobulin M; complement system proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biópsias renais de pacientes com DLM e GESF.....	19
Figura 2 - Etapas iniciais da ativação do sistema complemento pelas vias alternativa, clássica e das lectinas.....	23
Figura 3 - Etapas terminais da ativação do sistema complemento e a formação do complexo de ataque a membrana (C5b-9).....	24
Figura 4 - Deposição de IgM e partículas do sistema complemento em pacientes com DLM e GESF.....	41
Figura 5 - Depósitos glomerulares de IgM e C3 em pacientes com DLM e GESF.....	42
Figura 6 - Deposição de C4d glomerular em pacientes com GESF e com codeposição de IgM e C3.....	42
Figura 7 - Parâmetros laboratoriais em pacientes com podocitopatias (DLM e GESF) e a expressão de C3.....	44
Figura 8 - Creatinina sérica em pacientes com podocitopatias (DLM e GESF) e a codeposição de IgM e C3.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil epidemiológico dos pacientes com DLM e GESF.....	39
Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com DLM e GESF.....	40
Tabela 3 – Esquema terapêutico utilizado por pacientes com DLM e GESF.....	45
Tabela 4 – Evolução clínica dos pacientes com podocitopatias.....	46
Tabela 5 – Evolução clínica dos pacientes e deposição de IgM e C3.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFG: Barreira de filtração glomerular

CEPs: Células epiteliais parietais

DLM: Doença de lesões mínimas

DP: Desvio padrão

DRC: Doença renal crônica

DRCT: Doença renal crônica terminal

GESF: Glomeruloesclerose segmentar e focal

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IF: Imunofluorescência

IgM: Imunoglobulina M

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

Máx: Máximo

MBG: Membrana basal glomerular

Mín: Mínimo

ML: Microscopia de luz

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

NI: Não informado

TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

vs: Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 O GLOMÉRULO	14
1.1.2 Glomerulopatias	14
1.2 PODÓCITOS.....	16
1.2.1 Podocitopatias	16
1.2.2 Lesão dos podócitos	20
1.3 SISTEMA COMPLEMENTO.....	22
2 JUSTIFICATIVA	28
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL.....	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
5.1 CASUÍSTICA.....	34
5.2 MÉTODOS.....	34
5.2.1 Diagnóstico de DLM e GESF	34
5.2.2 Biópsia renal	34
5.2.2.1 <i>Microscopia de luz</i>	35
5.2.2.2 <i>Microscopia de fluorescência</i>	35
5.2.2.3 <i>Microscopia eletrônica de transmissão</i>	36
5.2.2.4 <i>Imuno-histoquímica</i>	36
5.2.2.5 <i>Morfometria</i>	37
5.2.2.6 <i>Análise estatística</i>	37
6 RESULTADOS	39
6.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	39
6.2 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS	39
6.3 DEPOSIÇÃO DE PARTÍCULAS DO SISTEMA COMPLEMENTO	40
6.3.1 Sistema complemento e dados laboratoriais	42
6.3.1.1 <i>IgM</i>	42
6.3.1.2 <i>C3</i>	43
6.3.1.3 <i>IgM e C3</i>	44
6.4 DESFECHO CLÍNICO	45
6.4.1 Tratamento	45

6.4.2 Evolução	46
7 DISCUSSÃO	48
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
9 CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO 1 – Parecer do CEP	69
ANEXO 2 – Comprovante de aceite do artigo para publicação	83
ANEXO 3 – Artigo completo	84

Introdução

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 O GLOMÉRULO

3 Os néfrons são as unidades funcionais do rim e o ser humano saudável possui
4 aproximadamente 1 milhão de néfrons, sendo que pode apresentar até 2,5 milhões (KOPP;
5 ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020). Cada néfron é composto por um glomérulo e
6 um sistema tubular que é dividido em túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo
7 contorcido distal e ducto coletor. Esse sistema é responsável por secretar resíduos e
8 reabsorver água, íons, aminoácidos e glicose (OXBURGH, 2018).

9 O glomérulo é formado por um tufo de capilares, como se fosse um novelo de lã, e
10 possui na sua composição quatro células: as células endoteliais glomerulares (CEGs), células
11 epiteliais viscerais (podócitos), células mesangiais (CMs) e células epiteliais parietais (CEPs)
12 (SCOTT; QUAGGIN, 2015). As CMs e sua matriz mesangial formam o mesângio, o qual é
13 responsável por manter a estrutura da vasculatura do glomérulo. As CEPs formam um
14 envoltório chamado de cápsula de Bowman, onde o filtrado urinário é coletado e
15 posteriormente eliminado por meio dos túbulos. Os podócitos e as CEGs possuem uma matriz
16 extracelular em comum, sendo denominada de membrana basal glomerular (MBG) (SCOTT;
17 QUAGGIN, 2015).

18 A principal função do glomérulo é filtrar seletivamente o sangue, que entra pela
19 arteríola aferente e sai pela arteríola eferente, e isso ocorre por meio da Barreira de Filtração
20 Glomerular (BFG), composta por três camadas distintas: o endotélio, a MBG e os podócitos
21 (GARG, 2018). A BFG é seletiva para carga elétrica e também para o tamanho molecular,
22 evitando a perda de macromoléculas e impedindo a passagem da albumina para o espaço
23 urinário, resultando em urina livre de proteínas (LU; WANG; LU; CHEN *et al.*, 2019). Caso a
24 BFG não esteja funcionando adequadamente, ocorre a perda de proteínas na urina, que é
25 conhecida como proteinúria. Essa alteração é a principal característica clínica das
26 glomerulopatias, que são doenças que acometem os glomérulos (KOPP; ANDERS;
27 SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

28

29 1.1.2 Glomerulopatias

30 A doença renal crônica (DRC) é considerada um grande problema de saúde pública e
31 possui uma prevalência global de 9,1%, o que representa aproximadamente 700 milhões de
32 casos (COCKWELL; FISHER, 2020). As glomerulopatias são responsáveis por 20% das

Introdução

1 DRCs em todo o planeta e, além disso, é a causa mais frequente de doença renal crônica em
2 estágio terminal (DRCT), que cursa com necessidade de terapia de substituição renal, seja por
3 meio de diálise ou por transplante renal (FLOEGE; AMANN, 2016). As glomerulopatias
4 afetam todas as idades, desde crianças até idosos, e também representam uma das principais
5 causas de síndrome nefrótica no mundo (MCCLOSKEY; MAXWELL, 2017).

6 A síndrome nefrótica é caracterizada, em adultos, por proteinúria maciça ($\geq 3,5\text{g}/24\text{h}$),
7 hipoalbuminemia (albumina sérica $<2,5\text{ g/dl}$), edema e, geralmente, hipercolesterolemia
8 (colesterol total $> 350\text{ mg/dl}$) (KODNER, 2016; KOPP; ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et*
9 *al.*, 2020).

10 A proteinúria é definida em níveis de gravidade: proteinúria sub-nefrótica (300-3.400
11 mg por dia), proteinúria nefrótica ($\geq 3,5\text{ g}$ por dia) e síndrome nefrótica (KOPP; ANDERS;
12 SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

13 A hipoalbuminemia é uma manifestação clínica frequente em pacientes com
14 podocitopatias, pois ocorre perda de albumina pela urina durante a proteinúria e a sua
15 compensação através da síntese hepática é insuficiente (MACÉ; CHUGH, 2014).

16 O edema é um sintoma típico da síndrome nefrótica e em adultos ocorre devido ao
17 aumento da reabsorção de sódio pelos túbulos renais, o qual é influenciado pela proteinúria
18 que causa uma inflamação nos túbulos e interstício renal (RODRÍGUEZ-ITURBE;
19 HERRERA-ACOSTA; JOHNSON, 2002).

20 A hipercolesterolemia também é comum em pacientes com síndrome nefrótica e é
21 resultado de uma produção elevada e de um catabolismo prejudicado de LDL. No entanto, a
22 sua patogênese ainda não é totalmente compreendida (AGRAWAL; ZARITSKY; FORNONI;
23 SMOYER, 2018).

24 Outras alterações importantes e que podem ser encontradas nas glomerulopatias são
25 função renal anormal e diminuição da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe). A
26 creatinina sérica é um biomarcador de função renal. Ela é um produto final do metabolismo
27 da creatina, sendo produzida nos músculos e excretada pelos rins (KASHANI; ROSNER;
28 OSTERMANN, 2020). O seu intervalo de referência é de 0,6 a 1,2 mg/dL (DELANAYE;
29 CAVALIER; POTTEL, 2017).

30 A TFGe (em $\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) é dividida em categorias: G1 (>89), G2 (60-89), G3a
31 (45-60), G3b (30-44), G4 (15-29) e G5 (<15), sendo critério para diagnóstico de DRC a TFG
32 $<60\text{ ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ por mais de 3 meses. A TFG é estimada a partir dos níveis de creatinina
33 sérica e também leva em consideração o sexo, a idade e a raça do paciente, ao utilizar a

1 equação do Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) (INKER;
2 SCHMID; TIGHIOUART; ECKFELDT *et al.*, 2012; KIRSZTAJN; FILHO; DRAIBE;
3 NETTO *et al.*, 2014).

4 Os podócitos são essenciais para manter a integridade da BFG e qualquer dano ou
5 lesão a essas células pode alterar o funcionamento dessa barreira e resultar em uma filtração
6 glomerular inadequada. Sendo assim, alteração nessas células são uma das causas mais
7 importantes das doenças glomerulares (CAMPBELL; TUMLIN, 2018).

8

9 1.2 PODÓCITOS

10 Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que possuem um corpo
11 celular, processos principais e processos secundários (também conhecido como pedicelos), os
12 quais se interdigitam e recobrem os capilares glomerulares no interior da cápsula de Bowman
13 (QUAGGIN; KREIDBERG, 2008). Os pedicelos de um podócito são interligados com os
14 pedicelos de outro podócito pelo diafragma slit, que funciona como filtro seletivo e constitui a
15 última barreira para evitar a perda de proteínas (RICE; VAN HOEK; PĂUNESCU; HUYNH
16 *et al.*, 2013). Além de desempenhar um papel crucial na BFG, os podócitos também
17 apresentam outras funções, como a produção dos constituintes da MBG e sua manutenção;
18 neutralização da pressão dentro do glomérulo; e síntese e excreção do fator de crescimento
19 endotelial vascular (LENNON; RANGLES; HUMPHRIES, 2014).

20 A actina é o principal componente dos podócitos, formando o seu citoesqueleto e
21 também servindo como ancoragem na MBG, evitando seu descolamento (GARG, 2018).
22 Podocina e nefrina são proteínas que compõe o diafragma de fenda e estão conectadas à
23 actina, auxiliando na prevenção do descolamento dos podócitos (LENNON; RANGLES;
24 HUMPHRIES, 2014).

25 No rim humano adulto, existem em média 500 a 600 podócitos em cada glomérulo
26 (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014). Por serem células diferenciadas terminais,
27 normalmente não se regeneram após uma lesão, o que resulta em apagamento dos pedicelos e
28 conseqüentemente, proteinúria (GARG, 2018). A proteinúria é a principal e, às vezes, pode
29 ser a única manifestação clínica das doenças que acometem os podócitos, conhecidas como
30 podocitopatias (KOPP; ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

31

32 1.2.1 Podocitopatias

Introdução

1 A doença de lesões mínimas (DLM) e a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF)
2 são definidas como podocitopatias e representam as principais causas de síndrome nefrótica
3 em todo o mundo (MCCLOSKEY; MAXWELL, 2017).

4 A DLM é a causa mais comum de síndrome nefrótica idiopática na infância. Em
5 crianças maiores de 1 ano é responsável por aproximadamente 70 a 90% dos casos, com uma
6 prevalência de cerca de 10 a 50 casos por 100.000 crianças e predomínio do sexo masculino
7 (próximo de 2:1). Em adultos, representa a terceira causa de síndrome nefrótica, depois da
8 GESF e da Nefropatia Membranosa, com uma porcentagem que varia entre 10 a 15% dos
9 pacientes, sendo bem menos frequente nessa faixa etária (18 a 65 anos) (EDDY; SYMONS,
10 2003; FLOEGE; AMANN, 2016; VIVARELLI; MASSELLA; RUGGIERO; EMMA, 2017).
11 No Brasil, dentre as glomerulopatias primárias, a DLM é a quarta mais prevalente, presente
12 em 15,5% das biópsias renais realizadas em indivíduos de todas as idades (POLITO; DE
13 MOURA; KIRSZTAJN, 2010).

14 O nome DLM é devido aos achados histopatológicos, uma vez que não apresenta
15 alterações significativas do glomérulo à microscopia de luz (ML) (Figura 1A) (VIVARELLI;
16 MASSELLA; RUGGIERO; EMMA, 2017). O único achado morfológico é na microscopia
17 eletrônica de transmissão (MET), onde é observado o apagamento dos pedicelos (Figura 1C)
18 (FOGO; LUSCO; NAJAFIAN; ALPERS, 2015b).

19 Clinicamente, essa doença é caracterizada por proteinúria intensa, edema e, em
20 adultos, também é comum observar hipertensão arterial e hematúria (WALDMAN; CREW;
21 VALERI; BUSCH *et al.*, 2007). A função renal geralmente está preservada (FOGO; LUSCO;
22 NAJAFIAN; ALPERS, 2015b).

23 O seu tratamento é realizado por meio de esteroides. A prednisona ou prednisolona são
24 os principais medicamentos utilizados no começo da doença e o prognóstico da DLM depende
25 dessa sensibilidade de resposta aos esteroides, que costuma ser eficiente, resultando no
26 desaparecimento da proteinúria e, conseqüentemente, na remissão do quadro. No entanto,
27 pacientes com DLM podem apresentar recidivas, sendo mais rápidas em crianças
28 (VIVARELLI; MASSELLA; RUGGIERO; EMMA, 2017; WALDMAN; CREW; VALERI;
29 BUSCH *et al.*, 2007).

30 O número de casos de GESF tem aumentado gradualmente com o passar dos anos e é
31 considerada a doença glomerular primária que mais leva à DRCT nos EUA, com uma
32 incidência que varia de 1,4 a 21 casos por milhão de habitantes, sendo 1,5 a 2 vezes mais
33 frequente em homens do que em mulheres (COLLINS; FOLEY; HERZOG; CHAVERS *et al.*,

Introdução

1 2011; KITTIYAKARA; EGGERS; KOPP, 2004; SHABAKA; TATO RIBERA;
2 FERNÁNDEZ-JUÁREZ, 2020). Ela é responsável por 30% dos casos de síndrome nefrótica
3 em adultos e 10% em crianças (SHABAKA; TATO RIBERA; FERNÁNDEZ-JUÁREZ,
4 2020). No Brasil, a GESF também é considerada a glomerulopatia primária mais comum e
5 sua frequência parece estar aumentando, ainda por razões desconhecidas (BAHIENSE-
6 OLIVEIRA; SALDANHA; MOTA; PENNA *et al.*, 2004; MACHADO; QUADROS;
7 WATANABE; AQUINO *et al.*, 2019; POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010).

8 As características clínicas dessa doença se apresentam como síndrome nefrótica
9 completa em crianças, com edema, proteinúria, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia. Nos
10 adultos, podemos observar proteinúria na faixa nefrótica ou subnefrótica, hipertensão e
11 hematúria microscópica. A hipoalbuminemia e edema difusos também são frequentes em
12 pacientes com GESF primária, no entanto a principal alteração é a proteinúria acentuada
13 (PODESTÀ; PONTICELLI, 2020).

14 A GESF normalmente apresenta uma evolução desfavorável uma vez que costuma ser
15 resistente à terapia com esteroides, a primeira linha de tratamento da doença tanto em crianças
16 como em adultos (CRAVEDI; KOPP; REMUZZI, 2013). Quando apresentam essa
17 resistência, são utilizados outros medicamentos imunossupressores como inibidores de
18 calcineurina (exemplo, ciclosporina) (CATTRAN; APPEL; HEBERT; HUNSICKER *et al.*,
19 1999) e rituximabe, um anticorpo monoclonal anti-CD20 expresso em linfócitos B
20 (FORNONI; SAGESHIMA; WEI; MERSCHER-GOMEZ *et al.*, 2011).

21 Histologicamente, a GESF é caracterizada por esclerose, ou seja, aumento de matriz
22 mesangial, de forma segmentar (acometendo apenas parte do glomérulo) e focal (<50% dos
23 glomérulos da amostra), o que resulta em obliteração segmentar dos capilares glomerulares
24 (Figura 1B). Na MET observa-se extenso apagamento dos pedicelos (Figura 1D) (FOGO;
25 LUSCO; NAJAFIAN; ALPERS, 2015a).

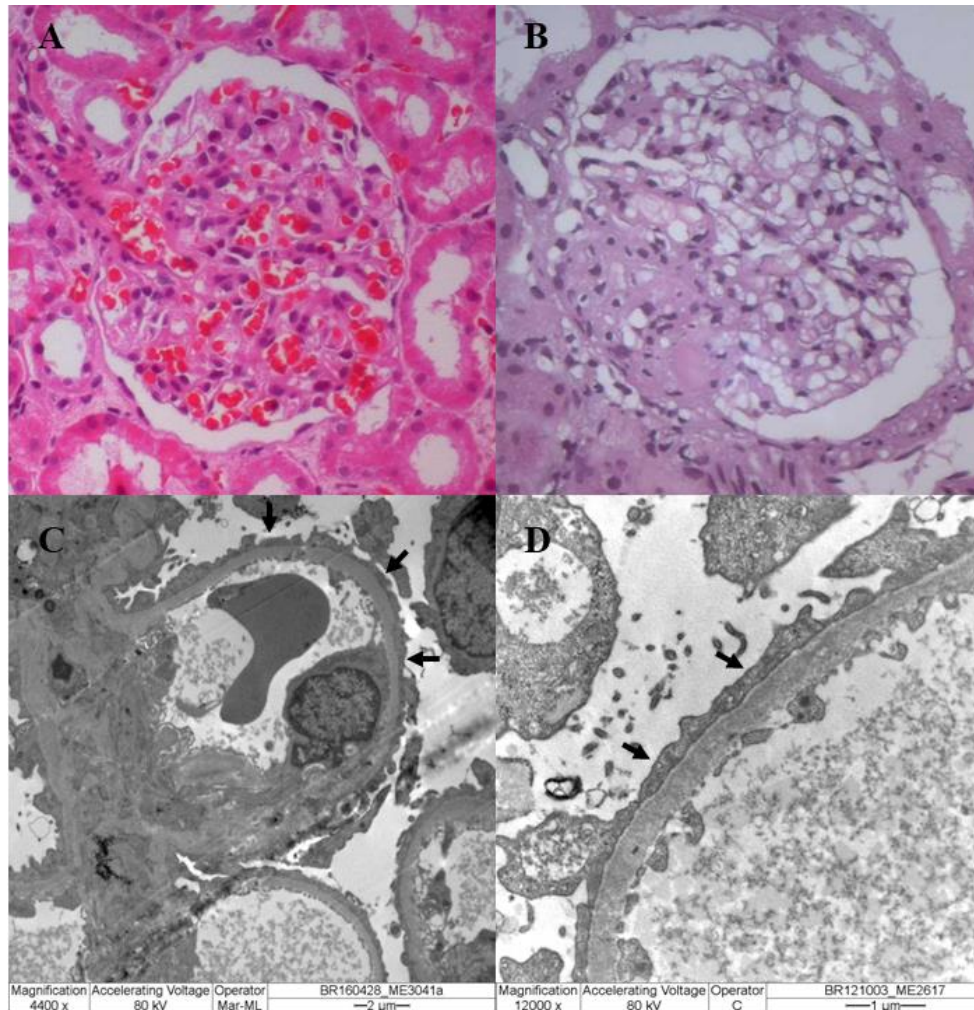


Figura 1. Biópsias renais de pacientes com DLM e GESF. A) ML demonstrando glomérulo sem alterações de paciente com DLM. B) ML demonstrando glomérulo com esclerose segmentar de paciente com GESF. C) MET evidenciando apagamento de pedicelos (setas) de paciente com DLM. D) MET evidenciando apagamento de pedicelos (setas) de paciente com GESF.

Uma discussão que ainda não está clara, é se a DLM e a GESF representam uma mesma doença em fases distintas ou se são duas entidades diferentes. Até hoje a distinção entre elas é difícil, pois ambas apresentam os mesmos sinais e sintomas, e a lesão dos podócitos (ROSENBERG; KOPP, 2017). Sendo assim, a diferenciação é realizada por meio da ML, onde são observadas lesões escleróticas na GESF em casos em que os glomérulos com essa lesão são amostrados, e não há alterações na DLM. Portanto, é essencial que a biópsia tenha uma amostragem renal adequada para demonstrar a lesão da GESF e minimizar os erros de diagnóstico como DLM (DE VRIESE; SETHI; NATH; GLASSOCK *et al.*, 2018).

A fisiopatologia da DLM e da GESF vem sendo amplamente discutida, mas suas causas ainda não estão bem definidas. Acredita-se que os podócitos desempenham um papel

1 central na patogênese dessas doenças e inúmeras condições e agentes podem ocasionar danos
2 e lesões nessas células (KOPP; ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

4 **1.2.2 Lesão dos podócitos**

5 A principal alteração e o primeiro padrão morfológico da lesão podocitária é o
6 apagamento dos pedicelos, que é caracterizado pela retificação do seu citoesqueleto e culmina
7 na perda da sua estrutura. Isso leva a uma alteração na BFG com diminuição da sua função e,
8 conseqüentemente, proteinúria. Uma possível causa desse apagamento é o rompimento no
9 citoesqueleto de actina dos podócitos (RONCO, 2007).

10 Quando ocorre esse apagamento dos pedicelos, os podócitos que são lesados e
11 perdidos não se regeneram, e essa perda pode resultar em duas respostas. Primeiro, os
12 podócitos remanescentes aumentam de tamanho, o que é chamado de hipertrofia, na tentativa
13 de cobrir o espaço deixado na MBG. Segundo, as células epiteliais parietais, que possuem
14 progenitores de podócitos, se proliferam, migram e se diferenciam em novos podócitos. No
15 entanto, esses mecanismos não são tão eficientes, pois os podócitos hipertróficos podem não
16 ser capazes de manter a estrutura dos pedicelos, resultando em descolamento de podócitos.
17 Além disso, os novos podócitos são incapazes de produzir fator de crescimento endotelial
18 vascular suficiente, o que acarreta em problemas endoteliais e formação de cicatrizes (KOPP;
19 ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

20 A lesão de podócitos pode se dar por causa genética ou de forma secundária sendo: (a)
21 associada a um baixo número de néfrons ou aumento da massa corporal, (b) agentes
22 infecciosos, (c) drogas; e de forma primária causada por fatores circulantes e fatores
23 relacionados a resposta imunológica (KOPP; ANDERS; SUSZTAK; PODESTÀ *et al.*, 2020).

24 Um gene que vem sendo bastante estudado e representa a principal causa de
25 podocitopatias entre os afro-americanos é o *APOL1* (que codifica a apolipoproteína L1)
26 (FREEDMAN; COHEN, 2016). Os alelos de risco *APOL1* (variantes G1 e G2) estão
27 associados a uma piora da função renal após transplante e uma menor sobrevivência do aloenxerto
28 (TEDLA; YAP, 2019). A mutação de genes expressos em podócitos, como os que codificam
29 nefrina (*NPHS1*), podocina (*NPHS2*) e α -actina 4 (*ACTN4*) também foram considerados
30 importantes na fisiopatologia das podocitopatias (SADOWSKI; LOVRIC; ASHRAF; PABST
31 *et al.*, 2015; VAN DER VEN; CONNAUGHTON; ITYEL; MANN *et al.*, 2018).

32 Em relação à obesidade, ela representa um fator de risco para o desenvolvimento de
33 podocitopatias, uma vez que o aumento de peso sobrecarrega o néfron causando uma elevada

Introdução

1 TFGe, hipertrofia e estresse desses podócitos, com conseqüente apagamento dos pedicelos e
2 descolamento de podócitos (XU; SHENG; YAO, 2017). Sobrecarga de néfron remanescente
3 ocorre quando há baixa massa de néfrons, como, por exemplo, em casos de nascimento
4 prematuro e baixo peso ao nascer (LUYCKX; PERICO; SOMASCHINI; MANFELLOTTI
5 *et al.*, 2017), e também em algumas doenças como a anemia falciforme (AYGUN;
6 MORTIER; SMELTZER; HANKINS *et al.*, 2011).

7 Os agentes infecciosos são outro fator relevante na etiologia das podocitopatias.
8 Infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus da Hepatite C podem
9 causar podocitopatias ao danificar diretamente os podócitos (GUPTA; QUIGG, 2015). Outro
10 vírus que também se apresentou como importante causa de GESF foi o SARS-CoV-2 ao
11 afetar diretamente ou indiretamente o podócito por meio da superprodução de citocinas pró-
12 inflamatórias, predominantemente interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral
13 (JOSE; MANUEL, 2020; NASR; KOPP, 2020).

14 Alguns tipos de drogas também podem induzir podocitopatias, como o interferon que
15 causa morte de podócitos e também é um estimulador eficaz da expressão do gene APOL 1
16 (AGHAJAN; BOOTEN; ALTHAGE; HART *et al.*, 2019); e a doxorrubicina, um
17 quimioterápico que é muito utilizado para gerar lesões em podócitos de camundongos,
18 seguido de seu descolamento da MBG (MULAY; THOMASOVA; RYU; KULKARNI *et al.*,
19 2013).

20 Segundo a literatura, a presença de fatores circulantes pode estar associada ao
21 desenvolvimento da GESF. Isso pôde ser evidenciado em um caso de GESF recorrente, onde
22 um rim saudável foi transplantando em um paciente com GESF que logo desenvolveu
23 proteinúria e apagamento dos pedicelos. Depois, o mesmo rim foi removido e transplantando
24 novamente, porém em um paciente diabético e com DRCT, mas dessa vez o rim teve um bom
25 funcionamento e o paciente não desenvolveu proteinúria (GALLON; LEVENTHAL;
26 SKARO; KANWAR *et al.*, 2012). Um desses fatores é o receptor ativador de plasminogênio
27 de uroquinase solúvel (suPAR). Dados sugerem uma maior expressão desse receptor *in situ*, o
28 uPAR, em podócitos de pacientes pediátricos e adultos com GESF quando comparado com
29 pacientes com DLM e com casos controle (DA SILVA; ARAÚJO; DOS REIS MONTEIRO;
30 DE MORAIS PEREIRA *et al.*, 2019; PEREIRA; DA SILVA; MONTEIRO; ARAÚJO *et al.*,
31 2019).

32 O sistema imunológico parece desempenhar um importante papel na patogênese de
33 podocitopatias. Inicialmente acreditava-se que a DLM era uma doença relacionada às células

1 T. Essa hipótese foi apontada por Shalhoub, em 1974, ao observar que os glicocorticoides e
2 algumas drogas imunossupressoras são eficientes no tratamento desse distúrbio e que a DLM
3 pode aparecer concomitante com o linfoma de Hodgkin, uma neoplasia linfoide. Além disso,
4 a sua remissão pode ocorrer após a infecção pelo sarampo, que gera imunossupressão
5 mediada por células (SHALHOUB, 1974). Outro estudo mostrou que pacientes com
6 podocitopatias apresentavam número reduzido de células T reguladoras (TSUJI; KIMATA;
7 YAMANOUCHI; KITAO *et al.*, 2017). Posteriormente, o papel das células B chamaram a
8 atenção dos pesquisadores ao observarem que a terapia com medicamentos depletors de
9 células B, como o rituximabe, é eficaz na remissão da proteinúria em pacientes com
10 podocitopatias (IIJIMA; SAKO; NOZU; MORI *et al.*, 2014).

11 A ativação do sistema complemento também pode ser causa de lesão em algumas
12 doenças renais (THURMAN, 2012), inclusive na GESF (HUANG; CUI; GU; ZHANG *et al.*,
13 2020) e a gravidade dessa doença pode estar correlacionada com os níveis plasmáticos dos
14 produtos de ativação do sistema complemento (THURMAN; WONG; RENNER; FRAZER-
15 ABEL *et al.*, 2015).

16

17 1.3 SISTEMA COMPLEMENTO

18 O Sistema Complemento é um sistema de defesa do organismo, faz parte da
19 imunidade inata e é um dos principais mecanismos efetores da imunidade mediada por
20 anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; WALPORT, 2001). Uma de suas
21 características principais é a rapidez da resposta, pois leva apenas segundos para opsonizar ou
22 destruir uma bactéria e simultaneamente liberar peptídeos pró-inflamatórios e quimiotáticos
23 (JAVA; ATKINSON; SALMON, 2013). Esse sistema é formado por mais de 30 proteínas
24 que podem ser ativadas em cascata por meio de três vias: a via clássica, a via da lectina e a via
25 alternativa (ANDRIGHETTO; LEVENTHAL; ZAZA; CRAVEDI, 2019).

26 A via clássica é um braço efetor da imunidade humoral e sua ativação é desencadeada
27 pela ligação de complexos imunes (IgG ou IgM) à porção C1q da proteína C1, o que resulta
28 na clivagem das proteínas C4 em C4a, uma anafilatoxina liberada no ambiente e C4b, uma
29 opsonina que se liga à superfície microbiana; e de C2 em C2b e C2a, sendo que esta última se
30 liga a C4b para formar a C3 convertase da via clássica (C4b2a) (Figura 2) (ABBAS;
31 LICHTMAN; PILLAI, 2019; RICKLIN; HAJISHENGALLIS; YANG; LAMBRIS, 2010).

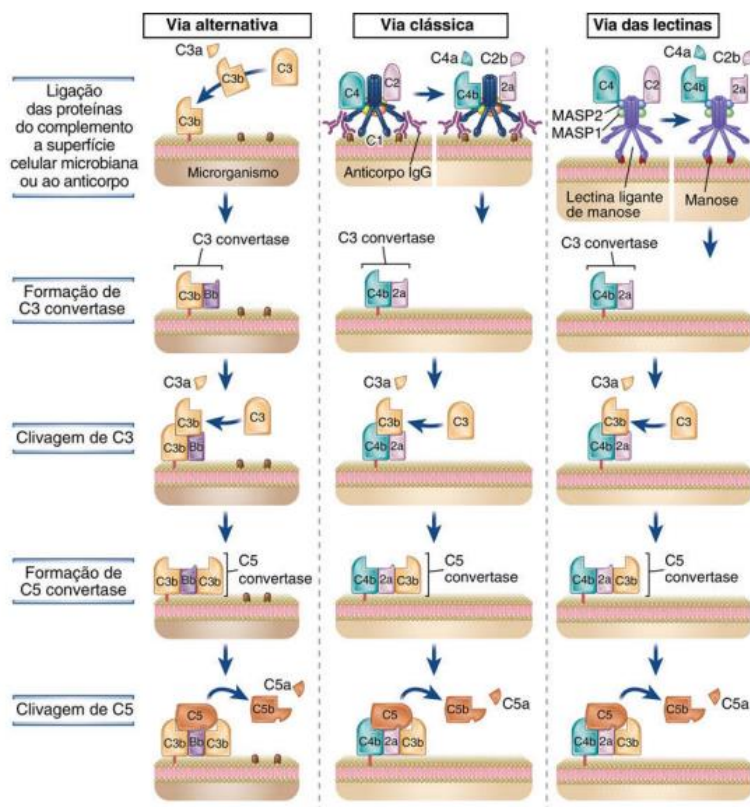
32 A via da lectina é ativada pela ligação de carboidratos presentes na superfície das
33 bactérias à lectina ligadora de manose (MBL) ou à ficolinas. A MBL e as ficolinas se ligam a

Introdução

1 serina proteases associadas à MBL (MASPs) e estas irão clivar C4 e C2, permitindo a
 2 formação da C3 convertase, idêntica à da via clássica (Figura 2) (ABBAS; LICHTMAN;
 3 PILLAI, 2019; ZACHO; JENSEN; TERP; JENSENIUS *et al.*, 2012).

4 Já a ativação da via alternativa ocorre por hidrólise espontânea de C3. A partícula C3 é
 5 continuamente clivada no plasma a uma taxa pequena, permitindo a formação de C3a, uma
 6 anafilatoxina liberada no ambiente, e C3b que irá se ligar à superfície microbiana. Caso essa
 7 ligação não ocorra, C3b é inativado e as etapas subsequentes não acontecem. O fator B irá se
 8 ligar à C3b e será clivado pelo fator D em Ba, que é liberado no ambiente, e Bb que
 9 permanece ligado a C3b, formando a C3 convertase da via alternativa (C3bBb), a qual é
 10 estabilizada pela properdina (Figura 2) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; FORNERIS;
 11 RICKLIN; WU; TZEKOU *et al.*, 2010).

12



13

14 **Figura 2. Etapas iniciais da ativação do sistema complemento pelas vias alternativa, clássica e das lectinas.**

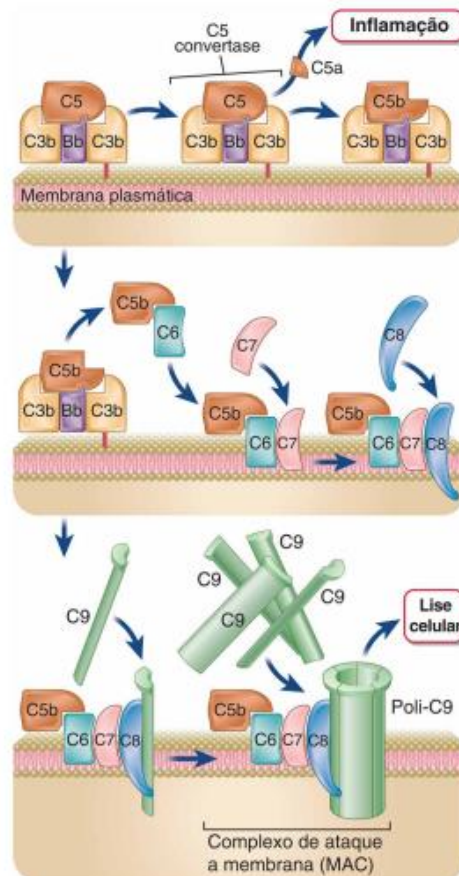
15 Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019.

16

17 Então, a ativação das três vias converge na formação de C3 convertase, o componente
 18 central da cascata, que é responsável pela clivagem de C3 em C3a e C3b, sendo que este
 19 último se liga à C3 convertase e permite a formação de C5 convertase. Esta tem a função de

Introdução

1 clivar C5, produzindo C5a, uma anafilatoxina liberada no ambiente, e C5b, uma opsonina que
 2 juntamente com as partículas C6, C7, C8 e C9 irão formar o complexo de ataque a membrana
 3 (C5b-9) e a subsequente destruição do patógeno por lise celular (Figura 3) (ABBAS;
 4 LICHTMAN; PILLAI, 2019; KWAN; VAN DER TOUW; HEEGER, 2012).



5
 6 **Figura 3. Etapas terminais da ativação do sistema complemento e a formação do complexo de ataque a**
 7 **membrana (C5b-9).**

8 Fonte: ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019.

9
 10 Os componentes do sistema complemento, em sua maioria, são produzidos no fígado,
 11 porém outros órgãos como cérebro, pulmões, intestinos e rins também podem sintetizar
 12 pequenas quantidades, sendo os rins um dos principais locais de síntese extra-hepático do
 13 complemento (SACKS; ZHOU, 2008; ZHOU; MARSH; SACKS, 2001).

14 A imunoglobulina G (IgG) é um anticorpo e constitui a principal imunoglobulina no
 15 plasma. Ela possui várias funções como opsonização de antígenos, ativação da via clássica do
 16 sistema complemento, imunidade neonatal e neutralização de microrganismos e toxinas
 17 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019). O depósito glomerular de IgG foi associado a pior
 18 sobrevida renal em pacientes com nefropatia por IgA (SHIN; LIM; HAN; HAN *et al.*, 2016).

Introdução

1 Imunoglobulina M (IgM) é um anticorpo natural, possui a capacidade de ativar o
2 sistema complemento e proteger o organismo contra infecções (KLIMOVICH, 2011). No
3 entanto, também pode colaborar para a lesão/inflamação nos tecidos (STRASSHEIM;
4 RENNER; PANZER; FUQUAY *et al.*, 2013). Várias glomerulopatias como a GESF, a DLM
5 e a nefropatia diabética apresentam IgM na biópsia, porém o papel da IgM glomerular
6 permanece obscuro (HABIB; GIRARDIN; GAGNADOUX; HINGLAIS *et al.*, 1988; PAČIĆ;
7 ŠENJUG; BACALJA; TIŠLJAR *et al.*, 2017). Pesquisadores acreditam na hipótese de que a
8 IgM glomerular e a ativação do sistema complemento podem representar uma via final
9 comum de lesão glomerular, após agressões diversas e isso levar a uma exacerbação da
10 doença (PANZER; LASKOWSKI; RENNER; KULIK *et al.*, 2015).

11 Estudo em um modelo experimental de GESF induzida por adriamicina, demonstrou
12 que a IgM contribui para a progressão da doença e sugeriram que esse anticorpo se liga ao
13 glomérulo danificado, ativa o sistema complemento e gera mais lesão glomerular
14 (STRASSHEIM; RENNER; PANZER; FUQUAY *et al.*, 2013).

15 Pesquisa semelhante em camundongos com nefropatia por adriamicina, observou que
16 o desenvolvimento de GESF foi acompanhado por deposição de C3 glomerular e a deficiência
17 deste, foi fator de proteção de lesões e também apresentaram menos proteinúria,
18 glomeruloesclerose, lesão tubulointersticial e disfunção renal (TURNBERG; LEWIS; MOSS;
19 XU *et al.*, 2006). A proteína C3 é a mais abundante do sistema complemento (ABBAS;
20 LICHTMAN; PILLAI, 2019).

21 Outro componente desse sistema é o C4d, um produto da ativação de C4 pelas vias
22 clássica e da lectina, e pode ser utilizado como evidência da ativação do complemento
23 (COHEN; COLVIN; DAHA; DRACHENBERG *et al.*, 2012). A deposição de C4d em
24 transplantes renais é usada para diagnosticar rejeição mediada por anticorpos humanos
25 (MURATA; BALDWIN, 2009) e sua presença também é considerada um fator de mau
26 prognóstico em algumas doenças renais como GESF, nefropatia por IgA e nefrite lúpica.
27 (BATAL; LIANG; BASTACKY; KISS *et al.*, 2012; ESPINOSA; ORTEGA; SÁNCHEZ;
28 SEGARRA *et al.*, 2014).

29 Pesquisa realizada em pacientes com GESF demonstrou aumento dos níveis
30 plasmáticos de C4d e diminuição dos níveis plasmáticos de C1q, indicando a ativação da via
31 clássica do complemento. Os níveis séricos de C1q foram associados negativamente com a
32 proteinúria e os níveis urinários de C1q foram positivamente associados com fibrose
33 intersticial grave (HUANG; CUI; GU; ZHANG *et al.*, 2020).

Introdução

1 A identificação da ativação do sistema complemento como causa de doença renal
2 estimuló a indústria farmacêutica a desenvolver medicamentos que bloqueiam essa ativação
3 (ANDRIGHETTO; LEVENTHAL; ZAZA; CRAVEDI, 2019). O Eculizumab é um anticorpo
4 monoclonal humanizado que se liga à partícula C5 e inibe a formação com complexo de
5 ataque a membrana. Ele melhorou a morbidade renal e reduziu o risco de desenvolvimento de
6 DRCT em pacientes com síndrome hemolítico-urêmica atípica (LEGENDRE; LICHT;
7 MUUS; GREENBAUM *et al.*, 2013) e também reduziu a recorrência dessa doença após o
8 transplante renal (ZUBER; FRIMAT; CAILLARD; KAMAR *et al.*, 2019). No entanto, ainda
9 não há estudos sobre esse tipo de medicamento em casos de podocitopatias.

10 Diante do exposto, este trabalho visa avaliar a deposição de imunoglobulinas e de
11 partículas do sistema complemento em biópsias renais de pacientes com DLM e GESF, e
12 relacioná-las com dados laboratoriais e desfecho clínico desses pacientes.

Justificativa

1 **2 JUSTIFICATIVA**

2 A DRC é considerada um grande problema de saúde pública e acomete
3 aproximadamente 700 milhões de pessoas. As glomerulopatias representam uma das causas
4 mais frequentes de DRCT em todo o planeta, especialmente a GESF.

5 A DLM e a GESF são doenças glomerulares definidas como podocitopatias, pois a
6 célula alvo nessas doenças é o podócito e acredita-se que ele desempenhe um papel central na
7 patogênese destas entidades. No entanto, as causas ainda não estão bem esclarecidas.

8 Sabe-se que o sistema imunológico é bastante importante na etiopatogenia dessas
9 podocitopatias e, em especial, a ativação do sistema complemento vem sendo reconhecida
10 como causa de lesão e como um fator de mau prognóstico em várias doenças renais.
11 Entretanto, há poucos estudos abordando o seu papel nas podocitopatias, em específico.

12 Sendo assim, estudar a deposição de imunoglobulinas e de partículas do sistema
13 complemento na DLM e na GESF pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos
14 envolvidos no desenvolvimento destas doenças e proporcionar aos pacientes abordagens
15 terapêuticas mais direcionadas com vistas a um melhor prognóstico.

Hipótese

Hipótese

1 3 HIPÓTESE

2 Biópsias renais de pacientes com diagnóstico de GESF apresentam maior deposição de
3 imunoglobulinas e de componentes do sistema complemento quando comparadas as dos
4 pacientes com DLM. Biópsias com mais deposição dessas partículas apresentam piores
5 parâmetros laboratoriais e evolução clínica da doença.

Objetivos

1 4 OBJETIVOS**2 4.1 OBJETIVO GERAL**

3 Avaliar a deposição de imunoglobulinas e de partículas do sistema complemento em
4 biópsias renais de pacientes com podocitopatias (GESF e DLM) de causa primária,
5 diagnosticadas no Centro de Pesquisa em Rim (CePRim) da UFTM, no período de 1996 a
6 2021.

8 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 9 I. Realizar a caracterização epidemiológica, laboratorial e clínica dos pacientes
10 diagnosticados com podocitopatias;
- 11 II. Analisar a deposição das imunoglobulinas IgM e IgG em biópsias renais de pacientes
12 diagnosticados com podocitopatias;
- 13 III. Analisar a deposição de C1q, C3 e C4d em biópsias renais de pacientes
14 diagnosticados com podocitopatias;
- 15 IV. Descrever a evolução clínica dos pacientes diagnosticados com podocitopatias;
- 16 V. Relacionar a expressão desses fatores imunes com os dados laboratoriais e a
17 evolução clínica dos pacientes.

Casuística e métodos

1 **5 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

2 **5.1 CASUÍSTICA**

3 Foram utilizadas biópsias renais de 59 pacientes com idade entre 18 e 62 anos, com
4 diagnóstico de podocitopatias de causa primária, sendo 31 pacientes com GESF e 28 com
5 DLM, realizadas pelo Centro de Pesquisa em Rim (CePRim) da Universidade Federal do
6 Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, no período 1996 a 2021.

7 Foi confeccionada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel), por meio da análise das
8 solicitações e dos laudos das biópsias renais, referente aos dados clínicos (presença de
9 hipertensão arterial e hematúria), laboratoriais (níveis séricos de creatinina, albumina e
10 proteinúria) e epidemiológicos (idade, cor e sexo) dos pacientes, além dos dados sobre os
11 depósitos de IgM, IgG, C3 e C1q nas biópsias renais. A imuno-histoquímica para detecção de
12 C4d foi realizada pela pesquisadora e as informações referentes ao tratamento e a evolução
13 clínica dos pacientes foram obtidas por meio de um formulário enviado via e-mail para os
14 nefrologistas ou por meio de contato telefônico com o próprio paciente.

15 Foram incluídos no estudo pacientes adultos que apresentaram as três amostras
16 (microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão) completas
17 para análise e possuíam o registro das informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas.
18 Os critérios de exclusão foram pacientes com idade inferior a 18 anos; pacientes cujas
19 biópsias não possuíam os três fragmentos para análise, pacientes que não apresentavam as
20 informações necessárias para a realização do estudo, bem como aqueles pacientes com
21 diagnóstico de GESF ou DLM de causa secundária.

22 O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade
23 Federal do Triângulo Mineiro com o número 4.735.380 (em anexo).

24

25 **5.2 MÉTODOS**

26 **5.2.1 Diagnóstico de DLM e GESF**

27 O diagnóstico foi realizado pela nefropatologista, de acordo com achados da biópsia
28 renal (microscopia de luz, imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão)
29 associados com a clínica do paciente.

30

31 **5.2.2 Biópsia renal**

1 O exame anatomopatológico foi composto pela avaliação microscópica por meio da
2 análise da microscopia de luz (histoquímica e imuno-histoquímica), da microscopia de
3 fluorescência e pela microscopia eletrônica de transmissão. As análises das alterações foram
4 feitas de acordo com o compartimento em que se encontrava a lesão: 1) glomérulos
5 (membrana basal, células e matriz mesangial), 2) túbulos, 3) interstício e 4) vasos, levando-se
6 em consideração as áreas atingidas pela biópsia (córtex e medular) e o número de glomérulos
7 apropriados para estudo. O processamento do material foi realizado no laboratório de
8 Histopatologia do Centro de Pesquisa em Rim da Disciplina de Patologia Geral da UFTM.

9 10 *5.2.2.1 Microscopia de luz*

11 A amostra proveniente do frasco de paraformaldeído, após fixada foi desidratada em
12 uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%) por 8 minutos em cada e diafanizada em
13 xilol (I, II e III) por 7 minutos em cada. Após esse processamento, o fragmento foi passado
14 em duas parafinas líquidas por 7 minutos em cada e embocado. O bloco então foi submetido
15 a cortes seriados de 2µm de espessura para confecção das lâminas. Após a microtomia, as
16 lâminas foram colocadas na estufa por 50 minutos e posteriormente foram desparafinadas no
17 xilol e hidratadas no álcool, e foram realizadas as colorações de hematoxilina e eosina (HE),
18 picro-sírius (PS), PAMS e tricrômico de masson azul (TMA). Ao final de todas as colorações,
19 as lâminas foram desidratadas em álcool absoluto (I, II e III), diafanizadas em xilol (I, II e III)
20 e montadas com uma gota de meio de montagem permanente e lamínula.

21 22 *5.2.2.2 Microscopia de fluorescência*

23 Foram pesquisadas as cadeias pesadas de imunoglobulina IgG e IgM, e as partículas
24 do complemento C3 e C1q por meio da técnica de imunofluorescência (IF) direta.

25 A amostra foi lavada em tampão PBS e congelada no nitrogênio líquido em solução
26 para inclusão em criostato. Posteriormente, os fragmentos foram cortados na espessura de 2
27 µm para confecção das lâminas. As lâminas foram então colocadas em câmara úmida e os
28 cortes hidratados com tampão PBS. Após, as lâminas foram incubadas com os anticorpos
29 policlonal anti-IgM (Kent, lote 1032 GD1, diluição 1:40), anti-IgG (Kent, lote 1032MJ6,
30 diluição 1:40), anti-C3 (Kent, lote 1052BE6, diluição 1:20) e anti-C1q (Kent, lote 1112 X3,
31 diluição 1:40). Após a adição dos anticorpos, as lâminas foram incubadas em câmara escura e
32 úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, foi retirado o excesso de

1 anticorpo e as lâminas foram lavadas com tampão PBS. Posteriormente, as lâminas foram
2 secadas e montadas com lamínula e uma gota de meio de montagem aquoso.

3 *5.2.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão*

4 O fragmento para microscopia eletrônica de transmissão é fixado em Karnovsky +
5 vermelho de rutênio. Em seguida é pós fixado em tetróxido de ósmio + vermelho de rutênio
6 0,2% por 3 horas em temperatura ambiente, processado em sequências de álcool e acetona, e
7 emblocado em resina Epon. São então realizados cortes semi-finos (300nm) no
8 ultramicrotomo com navalha de vidro e corados com Azul de Toluidina para análise do
9 material sob a microscopia de luz, para escolher a região glomerular com a estrutura que será
10 analisada no corte ultrafino. Após a escolha da região, o bloco é aparado e então são
11 realizados os cortes ultrafinos (60nm), para serem examinados em microscópio eletrônico de
12 transmissão Zeiss EM-900.

13

14 *5.2.2.4 Imuno-histoquímica*

15 A imuno-histoquímica para detecção de C4d foi realizada apenas nos casos de
16 codeposição de IgM e C3. Foi utilizada uma lâmina reserva proveniente do material
17 parafinado. As lâminas foram desparafinadas em xilol e hidratadas em concentrações
18 decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%) e em água destilada. A recuperação
19 antigênica foi realizada por meio de calor úmido e pressão na panela “Paschal” (DAKO) com
20 tampão Target (DAKO) pH 6,0 por 20 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas
21 com tampão PBS e incubadas em câmara úmida e escura com uma gota de bloqueador de
22 peroxidase (Peroxidase block, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 30
23 minutos. Após, foram incubadas com o bloqueador de proteínas (Protein block, Kit Novolink
24 Polymer Detection System, LEICA) por 15 minutos. Posteriormente foram incubadas com
25 anticorpo primário anti-C4d (1:250, Biomedica, lote RDC181) por 2 horas em temperatura
26 ambiente. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com o reagente pós-primário
27 (Post Primary, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 30 minutos. Depois
28 foram lavadas com PBS e incubadas com o reagente polímero (Polymer, Kit Novolink
29 Polymer Detection System, LEICA) por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e
30 incubadas com o cromógeno diamino benzidina (DAKO). Por fim, foram lavadas em água
31 corrente e contra coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após, as lâminas foram

1 desidratadas em uma sequência de álcoois absolutos, diafanizadas em xilol e montadas com
2 meio de montagem permanente e lamínula.

3

4 5.2.2.5 Morfometria

5 As lâminas da imuno-histoquímica foram analisadas no microscópio de luz comum e
6 todos os glomérulos de cada amostra foram analisados. Imagens digitais de cada glomérulo
7 foram capturadas usando a câmera digital AxionCam ICc5 (Zeiss, Germany) acoplada ao
8 microscópio de luz na lente objetiva de 40x.

9 O glomérulo foi considerado positivo para C4d se houvesse pelo menos uma
10 imunomarcagem, caracterizada pela coloração amarronzada. Avaliamos a imunomarcagem de
11 C4d apenas nos casos que apresentavam codeposição de IgM e C3.

12 As lâminas da IF foram analisadas em microscópio de luz ultravioleta para
13 fluorescência e também foram avaliadas segundo sua positividade (sim ou não).

14

15 5.2.2.6 Análise estatística

16 A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism versão 7.0. A
17 normalidade foi testada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov.

18 As variáveis categóricas foram apresentadas como porcentagem e foram comparadas
19 pelo teste Exato de Fisher ou pelo teste do Qui-Quadrado. As variáveis numéricas foram
20 apresentadas como média e desvio-padrão, quando a distribuição era normal; ou mediana com
21 mínimo e máximo, quando não normal e foram comparadas pelo teste *t de Student*, quando a
22 distribuição das variáveis era normal e variâncias semelhantes, ou pelo teste de Mann-
23 Whitney, nos demais casos.

24 As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando “*p*” foi menor
25 que 0,05.

Resultados

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foram avaliadas 59 biópsias renais de pacientes com podocitopatias, destes 34 (57,6%) eram brancos, 33 (55,9%) do sexo masculino e a mediana de idade de 34 (18-62) anos. Os pacientes com DLM (n=28) apresentaram mediana de idade de 33,5 (18-62) anos, 18 (64,3%) eram da cor branca e 15 (53,6%) do sexo masculino. Os casos de GESF (n=31) apresentaram mediana de idade de 37 (18-60) anos, sendo 16 (51,6%) brancos e 18 (58,1%) do sexo masculino (Tabela 1).

Tabela 1 – Perfil epidemiológico dos pacientes com DLM e GESF

	DLM (n=28)	GESF (n=31)	Total (n=59)	p
Cor				
<i>Branco</i>	18 (64,3%)	16 (51,6%)	34 (57,6%)	0,61
<i>Não branco</i>	2 (7,1%)	3 (9,7%)	5 (8,5%)	
<i>NI</i>	8 (28,6%)	12 (38,7%)	20 (33,9%)	
Sexo				
<i>Masculino</i>	15 (53,6%)	18 (58,1%)	33 (55,9%)	0,73
<i>Feminino</i>	13 (46,4%)	13 (41,9%)	26 (44,1%)	
Idade				
<i>Mediana (mín-máx)</i>	33,5 (18-62)	37 (18-60)	34 (18-62)	0,65

11 Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

12 DLM: Doença de Lesões Mínimas; DP: Desvio padrão; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal; Mín:
13 Mínimo; Máx: Máximo; n: Número de casos; NI: Não informado.

14

6.2 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

16 Em relação aos dados clínicos e laboratoriais, apresentaram hematúria 11 (35,5%)
17 pacientes com GESF e 10 (35,7%) pacientes com DLM ($p=0,50$, $\chi^2=1,39$, Tabela 2).

18 Ao avaliar a presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS), observamos uma
19 tendência ($p=0,07$) de maior prevalência nos pacientes com GESF (61,3%) do que em DLM
20 (32,1%, $\chi^2= 5,39$, Tabela 2).

21 Pacientes com GESF também apresentaram uma tendência de maiores níveis de
22 proteinúria ($p=0,06$, $U=278,5$) quando comparados com os pacientes com DLM (Tabela 2).

Resultados

1 Não houve diferença estatística no que se refere à creatinina sérica ($p=0,20$, $U=245,5$)
 2 e albumina sérica ($p=0,88$, $U=173,0$). Em relação à TFGe, também não foi encontrada
 3 diferença significativa entre os grupos ($p=0,68$, $t=0,41$, Tabela 2).

4

5 Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com DLM e GESF

	DLM (n=28)	GESF (n=31)	Total (n=59)	p
Hematúria				
<i>Sim</i>	10 (35,7%)	11 (35,5%)	21 (35,6%)	0,50
<i>Não</i>	14 (50%)	12 (38,7%)	26 (44,1%)	
<i>NI</i>	4 (14,3%)	8 (25,8%)	12 (20,3%)	
HAS				
<i>Sim</i>	9 (32,1%)	19 (61,3%)	28 (47,4%)	0,07
<i>Não</i>	16 (57,2%)	9 (29,0%)	25 (42,4%)	
<i>NI</i>	3 (10,7%)	3 (9,7%)	6 (10,2%)	
Proteinúria (g/24h)				
<i>Mediana (mín-máx)</i>	3,8(0,2-17,7)	4,8(1,1-25,0)	4,3(0,2-25,0)	0,06
Creatinina (mg/dL)				
<i>Mediana (mín-máx)</i>	0,9(0,4-2,5)	1,3(0,5-6,7)	1,0(0,4-6,7)	0,20
Albumina (g/dL)				
<i>Mediana (mín-máx)</i>	2,6(1,3-4,1)	2,3(1,2-4,1)	2,3(1,2-4,1)	0,88
TFGe (ml/min/1.73m²)				
<i>Média±DP</i>	85,6±29,5	80,5±42,9	83,1±36,1	0,68

6

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

7

DLM: Doença de Lesões Mínimas; DP: Desvio padrão; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal; Mín:

8

Mínimo; Máx: Máximo; n: Número de casos; NI: Não informado; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; TFGe:

9

Taxa de Filtração Glomerular estimada.

10

11

6.3 DEPOSIÇÃO DE PARTÍCULAS DO SISTEMA COMPLEMENTO

12

Das 59 biópsias renais avaliadas, 37 (62,7%) apresentaram deposição glomerular de
 13 IgM. Os pacientes com GESF apresentaram deposição significativamente maior quando
 14 comparados com os pacientes com DLM (64,9% vs 35,1%, $p=0,02$, figura 4A).

15

O depósito glomerular de C3 estava presente em 21 casos (35,6%), sendo que
 16 pacientes com GESF apresentaram tendência de mais deposição quando comparadas aos de
 17 DLM (71,4% vs 28,6%, $p=0,05$, figura 4B).

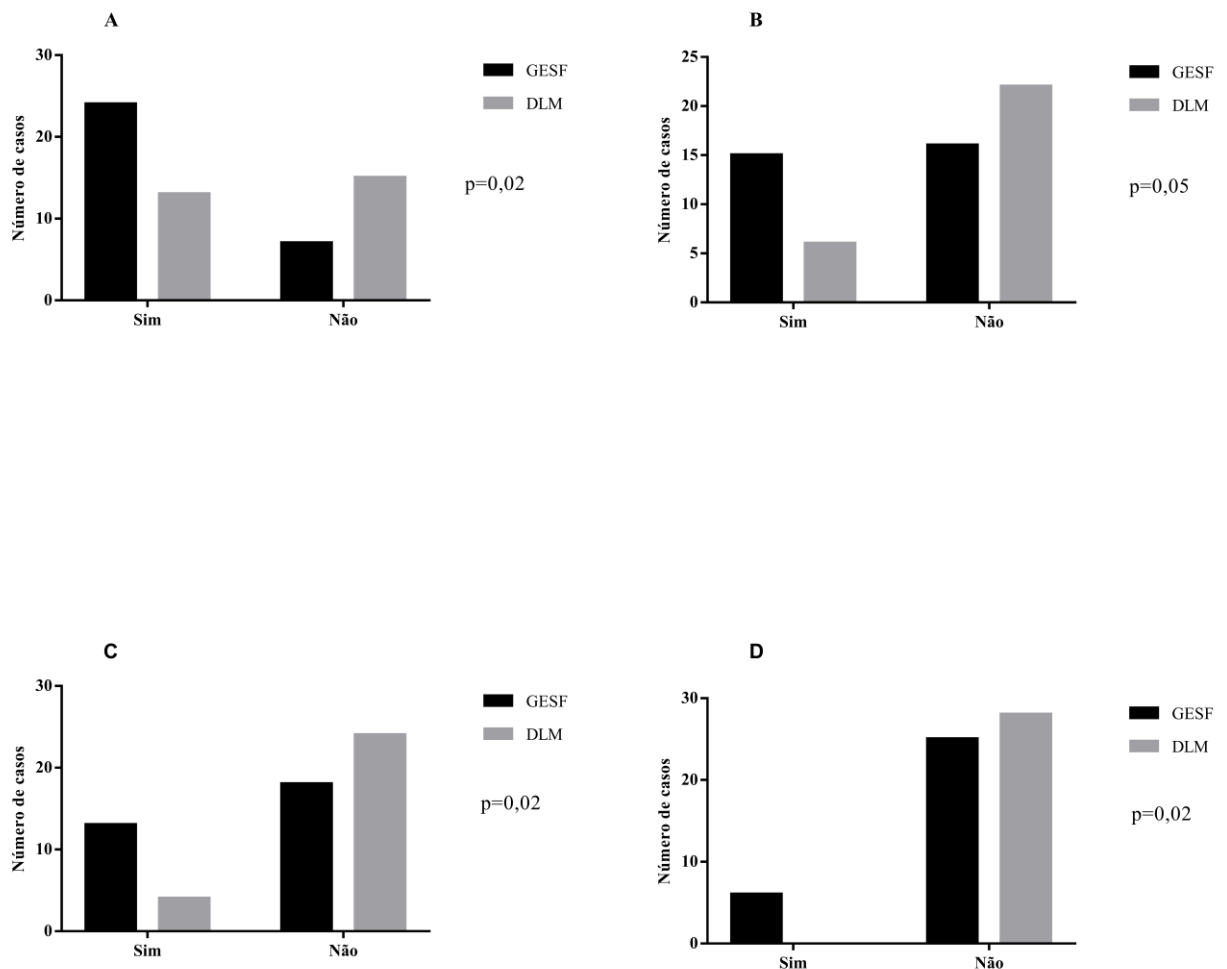
Resultados

1 Em relação à codeposição de IgM e C3, 17 (28,8%) casos possuíam essa positividade,
 2 com prevalência significativamente maior nos casos de GESF (76,5%) em comparação aos
 3 casos de DLM (23,5%, $p=0,02$, Figura 4C).

4 Considerando as biópsias que apresentaram codeposição de IgM e C3, avaliamos se
 5 essas mostravam também deposição de C4d. Pudemos observar que apenas 6 casos (35,3%)
 6 apresentaram codeposição de IgM+C3+C4d+, e essas biópsias eram de pacientes com
 7 diagnóstico de GESF ($p=0,02$, Figura 4D).

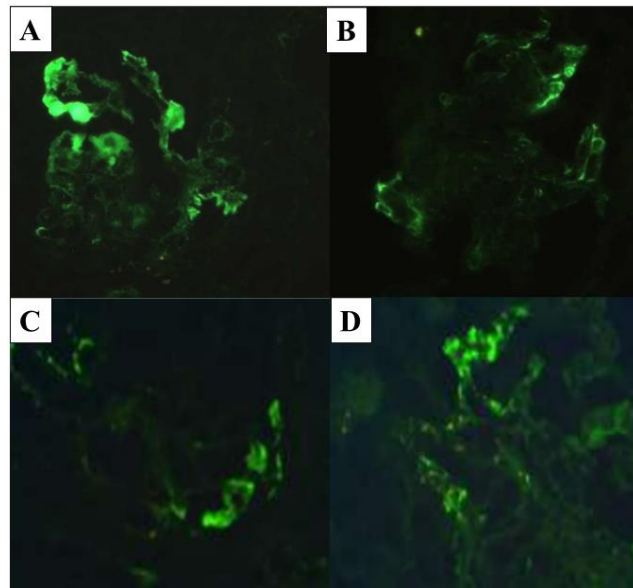
8 As imunofluorescências com deposições de IgM e de C3 positivas é mostrada na
 9 Figura 5 e a deposição de C4d em pacientes com GESF é apresentada na Figura 6.

10 A deposição de C1q ($n=2$) e de IgG ($n=1$) foi mostrada exclusivamente em pacientes
 11 com GESF que apresentaram também deposição de IgM.



12 **Figura 4. Deposição de IgM e partículas do sistema complemento em pacientes com DLM e GESF.** A)
 13 Deposição glomerular de IgM em pacientes com DLM e GESF. B) Deposição glomerular de C3 em pacientes
 14 com DLM e GESF. C) Codeposição glomerular de IgM e C3 em pacientes com DLM e GESF. D) Codeposição
 15 glomerular de IgM, C3 e C4d em pacientes com DLM e GESF.
 16

1



2

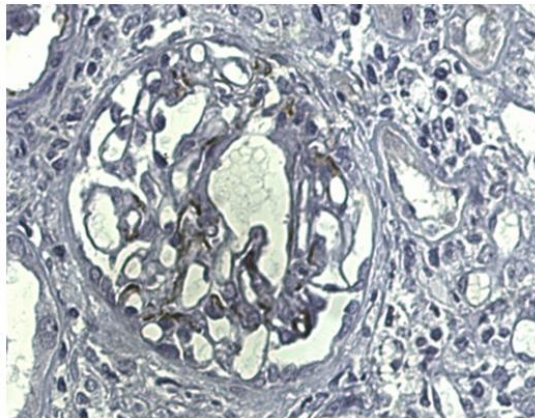
3

4

5

6

Figura 5. Depósitos glomerulares de IgM e C3 em pacientes com DLM e GESF. A) Deposição glomerular de IgM em paciente com GESF. B) Deposição glomerular de IgM em paciente com DLM. C) Deposição glomerular de C3 em paciente com GESF. D) Deposição glomerular de C3 em paciente com DLM.



7

8

9

10

Figura 6. Deposição de C4d glomerular em pacientes com GESF e com codeposição de IgM e C3. Os depósitos de C4d podem ser vistos como coloração amarronzada.

11 6.3.1 Sistema complemento e dados laboratoriais

12 6.3.1.1 IgM

13 Ao analisar os níveis de proteinúria e a deposição de IgM nos pacientes com
 14 podocitopatias (GESF + DLM), não houve diferença estatística significativa ($p=0,31$,
 15 $U=306,5$). Quando avaliamos os grupos separados, também não encontramos diferenças entre
 16 deposição de IgM e níveis de proteinúria, GESF ($p=0,97$, $U=65,0$) e DLM ($p=0,70$, $U=89,0$).

17 Não houve diferença estatística em relação aos níveis de creatinina ($p=0,56$, $U=251,5$)
 18 nos pacientes com podocitopatias que apresentaram deposição de IgM quando comparados
 19 com aqueles que não possuíam essa positividade. Ao avaliar os grupos separadamente,

Resultados

1 também não houve diferença significativa, GESF ($p=0,79$, $U=48,0$) e DLM ($p= 0,94$,
2 $U=70,5$).

3 Em relação à TFGe e a deposição ou ausência de IgM glomerular, não foi encontrada
4 diferença significativa ($p=0,67$, $t=0,43$) nos pacientes com podocitopatias, nem nos grupos
5 GESF ($p=0,54$, $t=0,63$) e DLM ($p= 0,85$, $t=0,18$).

6

7 6.3.1.2 C3

8 Os níveis de proteinúria em pacientes com podocitopatias não foram diferentes
9 estatisticamente ($p=0,48$, $U= 317,5$) entre os pacientes que tiveram positividade ou não de C3
10 na biópsia. Ao analisar os grupos GESF e DLM, também não encontramos diferença
11 significativa ($p=0,40$, $t=0,86$ e $p= 0,52$, $U=54,0$, respectivamente).

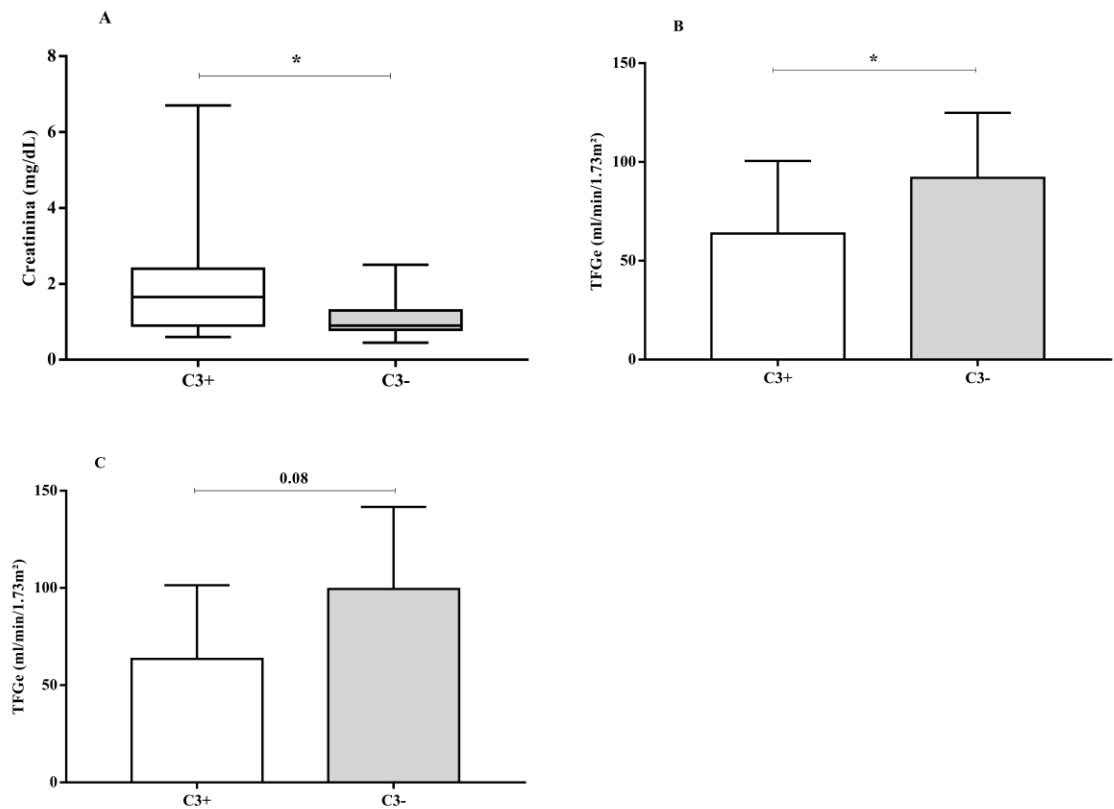
12 Os pacientes com deposição de C3 apresentaram níveis de creatinina sérica
13 significativamente maiores do que aqueles sem a deposição de C3 ($1,6, 0,6-6,7$ vs $0,9, 0,4-2,5$
14 mg/dL , $p=0,04$, $U=193,0$, Figura 7A). Ao avaliar os grupos separadamente, não foi observada
15 diferença significativa, GESF ($p=0,10$, $U=52,0$) e DLM ($p=0,57$, $U=39,0$).

16 A TFGe apresentou valores significativamente menores em pacientes com expressão
17 de C3 quando comparados com pacientes sem deposição de C3 ($63,8\pm 36,8$ vs $92,0\pm 32,9$
18 ml/min/1.73m^2 , $p=0,03$, $t=2,26$, Figura 7B).

19 Pacientes com diagnóstico de GESF e com C3 positivo na biópsia, tiveram uma
20 tendência ($p=0,08$) a níveis menores de TFGe do que pacientes com GESF e com C3 negativo
21 ($53, 19-127$ vs $112, 43-162$ ml/min/1.73m^2 , $t=1,85$, Figura 7C). Já nos pacientes com DLM,
22 não foi encontrada diferença significativa ($p=0,31$, $t=1,05$).

23

Resultados



1

2 **Figura 7. Parâmetros laboratoriais em pacientes com podocitopatias (DLM e GESF) e a expressão de C3.**3 A) Valores médios de creatinina sérica em pacientes com podocitopatias que apresentam ou não deposição de C3
4 nas biópsias renais. B) Valores médios de TFGe em pacientes com podocitopatias que apresentam ou não
5 deposição de C3 nas biópsias renais. C) Valores médios de TFGe em pacientes com GESF que apresentam ou
6 não deposição de C3 nas biópsias renais.
78 **6.3.1.3 IgM e C3**9 Ao avaliar os níveis de proteinúria com a codeposição de IgM e C3 em todos os
10 pacientes e separadamente nos grupos, GESF e DLM, não foi observado diferença estatística
11 ($p=0,29$, $U=106$; $p=0,70$, $U=20,5$; $p=0,64$, $U=21,5$) respectivamente.12 Pacientes com codeposição de IgM e C3 apresentaram uma tendência a maiores níveis
13 de creatinina sérica, quando comparados aos pacientes sem essa codeposição (1,6, 0,6-6,7 vs
14 0,9, 0,6-2,5 mg/dL, $p=0,08$, $U=59,0$, Figura 8). Nos pacientes com GESF e DLM, a diferença
15 não foi significativa ($p=0,46$, $U=12,5$ e $p=0,45$, $U=10$, respectivamente).16 Em relação à TFGe, não encontramos diferenças significativas nos pacientes ($p=0,23$,
17 $t=1,25$), tampouco no grupo GESF ($p=0,81$, $t=0,24$). Não foi possível a análise no grupo
18 DLM, devido ao pequeno número de informações sobre a TFGe nos pacientes com IgM+C3+.

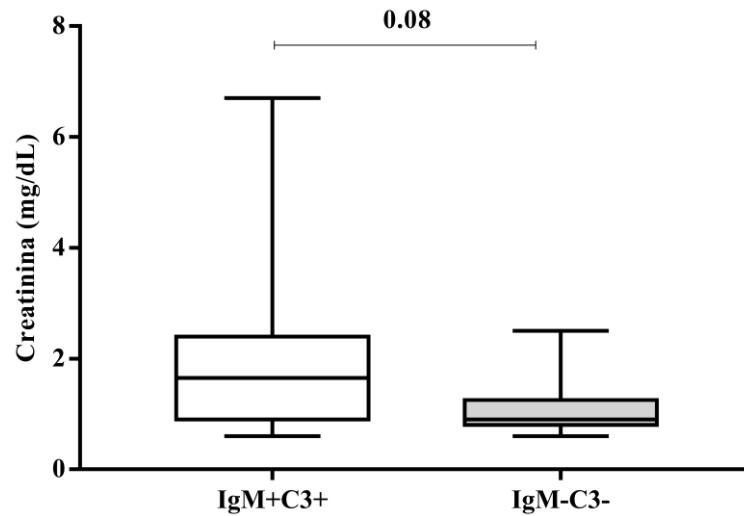


Figura 8. Creatinina sérica em pacientes com podocitopatias (DLM e GESF) e a codeposição de IgM e C3. Valores de creatinina sérica em pacientes com podocitopatias que apresentam ou não codeposição de IgM e C3 nas biópsias renais.

6.4 DESFECHO CLÍNICO

6.4.1 Tratamento

A terapia de escolha para o tratamento das DLM e GESF foram os esteroides em 88,2% (n=15) dos casos, sendo utilizado sozinho em 35,3% (n=6) dos pacientes e associados com inibidores de calcineurina em 29,4% (n=5), seguido da associação com anti-hipertensivos em 17,6% (n=3) e com ciclofosfamida em 5,9% (n=1, Tabela 3).

A opção terapêutica mais utilizada nos pacientes com DLM foi o uso de esteroides sozinhos (55,5%), seguido por sua associação com antihipertensivos (22,3%). Em pacientes com GESF, o esquema terapêutico preferido foi esteroide associado com inibidores de calcineurina (50%) e em segundo lugar, corticoide sozinho (12,5%) e corticoide com antihipertensivos (12,5%, Tabela 3). Dois pacientes (25%) com GESF necessitaram de terapia de substituição renal, sendo que um, diálise peritoneal e o outro, hemodiálise.

Tabela 3 – Esquema terapêutico utilizado por pacientes com DLM e GESF

	DLM (n=9)	GESF (n=8)
Esteroides	5 (55,5%)	1 (12,5%)
Esteroides + Inibidores de Calcineurina	1 (11,1%)	4 (50%)
Esteroides + Antihipertensivos	2 (22,3%)	1 (12,5%)
Esteroides + Ciclofosfamida	1 (11,1%)	-
Não informado	-	2 (25%)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

DLM: Doença de Lesões Mínimas; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

Resultados

6.4.2 Evolução

O principal desfecho clínico dos pacientes foi a melhora do quadro com 52,9% (n=9), seguido da evolução para DRC em segundo lugar, com 23,5% (n=4) dos casos. A recidiva da doença e o óbito ficaram em terceiro lugar com 11,8% (n=2) cada (Tabela 4).

Os pacientes com GESF demonstraram um pior desfecho clínico, sendo que 37,5% evoluíram para DRC, 25% foram a óbito e 12,5% apresentaram recidiva da doença. A melhora do quadro ocorreu em 25% dos pacientes. Já nos casos de DLM, 77,8% tiveram melhora do quadro após tratamento, 11,1% evoluíram para DRC e 11,1% para recidiva da doença (Tabela 4).

10

11 Tabela 4 – Evolução clínica dos pacientes com podocitopatias

	DLM (n=9)	GESF (n=8)
Melhora do quadro *	7 (77,8%)	2 (25%)
Recidiva	1 (11,1%)	1 (12,5%)
DRC *	1 (11,1%)	3 (37,5%)
Óbito *	-	2 (25%)

12 Ao comparar DRC, óbito e melhora * p= 0,05

13 Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

14 DLM: Doença de Lesões Mínimas; DRC: Doença renal crônica; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

15

Ao comparar a evolução dos pacientes com a deposição de partículas do complemento na biópsia renal no momento do diagnóstico, observamos que a IgM estava presente em 2/2 casos que foram a óbito e em 3/4 que evoluíram para DRC, mas também em 5/9 que tiveram melhora do quadro. A deposição de C3 foi menos frequente do que a IgM, mas o que nos chamou atenção foi a codeposição de IgM e C3 nos dois pacientes que foram a óbito, sendo que em um deles havia positividade de IgM+C3+C4d+. Todavia, a nossa amostra é muito pequena, o que compromete a análise estatística (Tabela 5).

23

24 Tabela 5 - Evolução clínica dos pacientes e deposição de IgM e C3

		Melhora do quadro	Recidiva	DRC	Óbito
IgM	<i>Sim</i>	5	1	3	2
	<i>Não</i>	4	1	1	0
C3	<i>Sim</i>	3	0	1	2
	<i>Não</i>	6	2	3	0
IgM+ C3+	<i>Sim</i>	2	0	1	2
	<i>Não</i>	3	1	1	0

25 Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

26 DLM: Doença de Lesões Mínimas; DRC: Doença renal crônica; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

Discussão

1 **7 DISCUSSÃO**

2 Depósitos glomerulares de IgM e C3 são frequentemente encontrados em pacientes
3 com GESF primária, no entanto as consequências funcionais ainda são questionadas. Neste
4 estudo, identificamos a presença desses depósitos também nos indivíduos com DLM e
5 observamos que a deposição de C3 pode contribuir para a piora da função renal, tanto nos
6 casos de GESF como em DLM.

7 Tivemos predomínio de casos de GESF, sendo a maioria da cor branca e do sexo
8 masculino. Essa prevalência do sexo masculino corrobora com os dados da literatura
9 (ZHANG; GU; HUANG; QU *et al.*, 2016), no entanto a cor branca não é a mais frequente em
10 pacientes com GESF, uma vez que a doença parece ser mais comum em pacientes afro-
11 americanos do que em caucasianos, com proporções de até 3:1 (SPRANGERS; MEIJERS;
12 APPEL, 2016).

13 O perfil clínico dos pacientes com podocitopatias foi caracterizado por proteinúria
14 maciça, TFG_e diminuída, hipoalbuminemia e creatinina sérica normal. Esses dados estão de
15 acordo com a literatura, que cita a proteinúria nefrótica e a hipoalbuminemia como
16 manifestações clínicas típicas das podocitopatias, já a redução da TFG_e pode ou não ocorrer
17 (AHN; BOMBACK, 2020).

18 Ao avaliar os dados laboratoriais de acordo com a doença no momento da biópsia
19 renal, observamos que a proteinúria teve uma tendência a valores maiores em pacientes com
20 GESF. A proteinúria representa a característica clínica principal na GESF e normalmente os
21 pacientes com GESF primária apresentam proteinúria intensa de início súbito, podendo atingir
22 20g por dia ou, às vezes, até mais (DE VRIESE; SETHI; NATH; GLASSOCK *et al.*, 2018).

23 A prevalência de HAS foi praticamente duas vezes maior nos pacientes com GESF,
24 demonstrando uma tendência à maior prevalência nesse grupo. Em um estudo multicêntrico
25 realizado em 2021, também foi encontrado predomínio de HAS nos pacientes com GESF
26 (56,2 vs 28,7%) (OZEKI; MARUYAMA; IMASAWA; KAWAGUCHI *et al.*, 2021).

27 Estudos recentes sugerem um papel importante da ativação do sistema complemento
28 no desenvolvimento das podocitopatias. Foi observado que a ativação do sistema
29 complemento pode mediar o dano renal na GESF (HUANG; CUI; GU; ZHANG *et al.*, 2020)
30 e as estratégias que reduzem os anticorpos da IgM ou evitam a ativação do complemento
31 podem retardar a progressão da GESF (STRASSHEIM; RENNER; PANZER; FUQUAY *et*
32 *al.*, 2013).

Discussão

1 Dessa forma, analisamos a deposição de imunoglobulinas e dos componentes do
2 sistema complemento nas biópsias renais de pacientes com podocitopatias. Dos depósitos
3 avaliados, a IgM foi a mais encontrada, presente em 62,7% das biópsias avaliadas, sendo mais
4 prevalente nos casos de GESF do que em DLM.

5 A IgM é um anticorpo natural que possui várias funções, ela atua na limpeza de
6 células danificadas e apoptóticas, remove tecidos lesionados, ajuda na proteção contra
7 infecções e é um potente ativador da via clássica do sistema complemento, sendo até 1000
8 vezes mais eficiente do que a IgG devido a sua estrutura pentamérica que permite a ligação de
9 uma única molécula de IgM a várias moléculas de C1q (KLIMOVICH, 2011; PANZER;
10 LASKOWSKI; RENNER; KULIK *et al.*, 2015).

11 Pesquisas *in vitro* e *in vivo* descobriram que a IgM também pode ativar a via das
12 lectinas. Essa ativação pode ocorrer através da interação de IgM com a MBL (MCMULLEN;
13 HART; WALSH; BURAS *et al.*, 2006) e/ou ficolina (LEI; LIU; AZADZOI; LI *et al.*, 2015),
14 moléculas que apresentam estruturas semelhantes ao C1q (ZACHO; JENSEN; TERP;
15 JENSENIUS *et al.*, 2012). Outro estudo realizado em aloenxertos renais também demonstrou
16 a ativação da via das lectinas através da ligação de IgM a ficolina (IMAI; NISHI; ALCHI;
17 UENO *et al.*, 2006). A IgM tem glicofomas que podem ser ligantes para as moléculas que
18 iniciam a via das lectinas (ARNOLD; WORMALD; SUTER; RADCLIFFE *et al.*, 2005).

19 A descoberta da via de ativação é realizada através da detecção de outras partículas do
20 complemento, por exemplo, IgM e C1q demonstra que a ativação do sistema complemento
21 ocorreu através da via clássica. A partícula C4 pode ser usada tanto na via clássica como na
22 via das lectinas, então a positividade para C4d e C1q significa que a ativação ocorreu pela via
23 clássica, mas C4d positivo e C1q negativo representa a ativação da via das lectinas
24 (HEYBELI; OKTAN; YILDIZ; ÜNLÜ *et al.*, 2019; SETHI; NASR; DE VRIESE;
25 FERVENZA, 2015). O C3 pode ser ativado pelas três vias, então para determinar qual a sua
26 via de ativação deve ser pesquisadas outras partículas como C1q, fator B e MBL ou ficolinas.

27 Em nosso estudo, encontramos apenas dois pacientes com deposição de C1q e um com
28 IgG, exclusivamente em pacientes com GESF e com codeposição de IgM. Podemos sugerir
29 que nesses pacientes a via de ativação do complemento foi a clássica. No entanto, a grande
30 maioria dos pacientes com IgM não apresentava C1q, demonstrando que possivelmente a
31 ativação da via das lectinas foi mais prevalente.

32 Antes acreditava-se que a deposição de IgM glomerular era atribuída a um
33 aprisionamento passivo da grande macromolécula dentro das áreas escleróticas. No entanto, a

Discussão

1 IgM também está presente em áreas não escleróticas em glomérulos de pacientes com GESF e
2 a sua presença não é uniforme em glomérulos com esclerose global. O aprisionamento
3 inespecífico também não explica a codeposição frequente de C3, mas não de outras partículas
4 que apresentam peso molecular idêntico a ele. Uma hipótese bem aceita atualmente é que a
5 IgM se liga a antígenos específicos gerados após insultos e ativa o complemento dentro dos
6 glomérulos (PANZER; LASKOWSKI; RENNER; KULIK *et al.*, 2015; PAČIĆ; ŠENJUG;
7 BACALJA; TIŠLJAR *et al.*, 2017; STRASSHEIM; RENNER; PANZER; FUQUAY *et al.*,
8 2013).

9 Pesquisadores demonstraram uma prevalência acima de 60% de IgM em pacientes
10 com GESF (HEYBELI; OKTAN; YILDIZ; ÜNLÜ *et al.*, 2019). A deposição dessa partícula
11 é bastante comum nesses pacientes e também é responsável por acelerar a lesão nos
12 glomérulos em modelos experimentais (STRASSHEIM; RENNER; PANZER; FUQUAY *et*
13 *al.*, 2013). Além da GESF, a IgM também pode ser encontrada em várias outras doenças
14 renais como na DLM (HABIB; GIRARDIN; GAGNADOUX; HINGLAIS *et al.*, 1988),
15 contudo não há muitas pesquisas sobre complemento e DLM, pois as deposições são bem
16 menos frequentes nessa doença e acreditavam que eram inespecíficas, sendo assim, a DLM
17 era usada como grupo controle.

18 Nos nossos pacientes com deposição de IgM não encontramos diferenças
19 significativas em relação aos dados laboratoriais, no entanto pesquisas realizadas em
20 pacientes com GESF primária observaram valores maiores de proteinúria em pacientes com
21 positividade para IgM (MIRIOGLU; CALISKAN; OZLUK; DIRIM *et al.*, 2019), além de
22 apresentarem maior disfunção renal (ZHANG; GU; HUANG; QU *et al.*, 2016).

23 A deposição de C3 foi a segunda mais frequente, presente em 35,6% dos pacientes
24 com podocitopatias e demonstrou uma tendência à maior prevalência nos pacientes com
25 GESF do que em DLM. Observamos também uma prevalência significativamente maior de
26 codeposição de IgM e C3 nos pacientes com GESF em comparação com os pacientes com
27 DLM.

28 A partícula C3 pode ser ativada pelas vias clássica, alternativa ou das lectinas. Em
29 uma pesquisa experimental foi mostrada a ativação de C3 pela via alternativa ao observarem
30 que os camundongos deficientes em fator D eram protegidos da proteinúria precoce e
31 apresentavam menor lesão glomerular e tubulointersticial assim como os camundongos
32 deficientes em C3 (TURNBERG; LEWIS; MOSS; XU *et al.*, 2006). O fator D é um

Discussão

1 componente da via alternativa responsável pela clivagem do fator B e subsequente formação
2 da C3 convertase (CORVILLO; LÓPEZ-TRASCASA, 2018).

3 Os nossos pacientes com deposição de C3, a maioria apresentava codeposição de IgM
4 e ausência de C1q, sugerindo a ativação do sistema complemento pela via das lectinas.
5 Todavia, quatro pacientes tinham positividade exclusiva para C3, o que pode demonstrar uma
6 possível ativação pela via alternativa ou pela via das lectinas.

7 Nesse estudo encontramos níveis significativamente maiores de creatinina sérica e
8 significativamente menores de TFGe em pacientes com positividade para C3 quando
9 comparados com aqueles sem C3. Isso demonstra uma pior função renal em pacientes com
10 deposição de C3. Os pacientes com GESF e C3+ demonstraram uma tendência a níveis
11 menores de TFGe em relação aos pacientes sem a deposição dessa partícula. O depósito de C3
12 tem sido associado a tempo de sobrevivência renal significativamente mais curto (ZHANG;
13 GU; HUANG; QU *et al.*, 2016).

14 O C3 é a partícula mais abundante do sistema complemento e a sua clivagem resulta
15 em C3a e C3b (SEELE; BEINEKE; HILLERMANN; JASCHOK-KENTNER *et al.*, 2015).
16 Experimentos *in vitro* indicaram que C3a era capaz de ativar os podócitos para liberarem fator
17 neurotrófico e assim recrutar as CEPs e formar lesões com esclerose em pacientes com GESF
18 (MORIGI; LOCATELLI; ROTA; BUELLI *et al.*, 2016).

19 Os pacientes com codeposição de IgM e C3 apresentaram uma tendência a pior função
20 renal, com valores maiores de creatinina sérica. Nossos dados corroboram com a literatura, a
21 qual mostra dados laboratoriais significativamente piores em pacientes com IgM+C3+ ao
22 comparar com IgM-C3- (MIRIOGLU; CALISKAN; OZLUK; DIRIM *et al.*, 2019).

23 A deposição de IgM intraglomerular é significativamente associada à deposição de C3
24 (HEYBELI; OKTAN; YILDIZ; ÜNLÜ *et al.*, 2019), apresentando uma prevalência
25 significativamente maior em pacientes com GESF e servindo como critério de diagnóstico
26 complementar para pacientes que tem uma progressão mais rápida da doença (PAČIĆ;
27 ŠENJUG; BACALJA; TIŠLJAR *et al.*, 2017). Em camundongos com GESF, a ausência da
28 partícula C3 e a depleção de IgM reduziram o grau de esclerose glomerular, mostrando que a
29 ativação do complemento contribui para a lesão glomerular na GESF (STRASSHEIM;
30 RENNER; PANZER; FUQUAY *et al.*, 2013; TURNBERG; LEWIS; MOSS; XU *et al.*,
31 2006).

32 A codeposição das partículas IgM, C3 e C4d em nosso trabalho foi mostrada
33 exclusivamente em pacientes com GESF. Avaliamos a presença de C4d apenas em pacientes

Discussão

1 com positividade para IgM e C3, e observamos uma prevalência de 35,3% de casos.
2 Pesquisadores encontraram imunomarcagem para C4d em 73% das biópsias de pacientes com
3 GESF e em apenas 21% nos casos de DLM, e sugeriram que o C4d pode preceder o
4 desenvolvimento de lesões na GESF (VAN DE LEST; ZANDBERGEN; WOLTERBEEK;
5 KREUTZ *et al.*, 2019) e aumentar significativamente as falhas no tratamento (HEYBELI;
6 OKTAN; YILDIZ; ÜNLÜ *et al.*, 2019).

7 Em relação ao tratamento, a terapia de escolha tanto para os casos de GESF como para
8 DLM, em nosso estudo, foram os esteroides, sozinhos ou associados com inibidores de
9 calcineurina, antihipertensivos ou ciclofosfamida. Em pacientes com GESF, o esquema
10 terapêutico de preferência foi o esteroide associado com inibidores de calcineurina e na DLM
11 foi o uso de esteroides sozinhos. O objetivo do tratamento consiste na remissão da proteinúria
12 e prevenção da DRC (AHN; BOMBACK, 2020).

13 A terapia utilizada atualmente para os pacientes com podocitopatias primárias se
14 baseia em medicamentos imunossuppressores, sendo os esteroides, como a prednisona, a
15 primeira opção (AHN; BOMBACK, 2020). Ainda não se sabe exatamente o seu mecanismo
16 de ação, mas acreditam que esteja relacionado a regulação da expressão gênica nuclear,
17 levando a indução de genes que ativam citocinas anti-inflamatórias e supressão de genes de
18 citocinas pró-inflamatórias, além de inibir a função de células T e estabilizar o citoesqueleto
19 dos podócitos (HAHN; HODSON; WILLIS; CRAIG, 2015).

20 A segunda linha terapêutica de imunossuppressores são os inibidores de calcineurina,
21 como a ciclosporina e o tacrolimus. A calcineurina é uma proteína presente nos linfócitos T e
22 quando ativada atua na transcrição de citocinas inflamatórias (CASTRO, 2006). A sua
23 inibição diminui a função das células T e a inflamação. Ademais, também é importante no
24 rearranjo do citoesqueleto podocitário (AHN; BOMBACK, 2020).

25 O uso de medicamentos antihipertensivos que atuam sobre o sistema renina
26 angiotensina aldosterona (SRAA), como os inibidores da enzima conversora de angiotensina e
27 bloqueadores de receptores da angiotensina, são efetivos no controle da pressão arterial,
28 evitando uma piora do dano renal e, conseqüentemente, a progressão da DRC (JAFAR;
29 STARK; SCHMID; LANDA *et al.*, 2003). Pesquisadores demonstraram que a angiotensina
30 atua em processos inflamatórios, fibróticos e em alterações hemodinâmicas que causam lesões
31 renais (RÜSTER; WOLF, 2006).

32 A ciclofosfamida é um quimioterápico amplamente utilizado no tratamento de câncer
33 e também é considerado um imunossupressor (AHLMANN; HEMPEL, 2016). O seu uso é

Discussão

1 indicado como terapia de escolha em casos de síndrome nefrótica com recidivas frequentes ou
2 síndrome nefrótica dependente de esteroides (CAMMAS; HARAMBAT; BERTHOLET-
3 THOMAS; BOUISSOU *et al.*, 2011). No entanto, esse medicamento apresenta vários efeitos
4 colaterais, tais como leucopenia e infertilidade (AHN; BOMBACK, 2020).

5 Estudos randomizados sobre tratamento dos pacientes com podocitopatias mostraram
6 que a ciclosporina associada a prednisona é melhor do que o uso de prednisona sozinha tanto
7 para a manutenção da função renal (CATTRAN; APPEL; HEBERT; HUNSICKER *et al.*,
8 1999) quanto na rapidez de remissão (EGUCHI; TAKEI; YOSHIDA; TSUCHIYA *et al.*,
9 2010). Embora a GESF possa responder ao esquema terapêutico com esteroides isolados, o
10 número de recaídas é frequente (ROSENBERG; KOPP, 2017). No entanto, o uso de
11 esteroides ou ciclosporina foi associado a melhores resultados renais do que aqueles sem
12 nenhuma imunossupressão (LAURIN; GASIM; POULTON; HOGAN *et al.*, 2016).

13 Esses tratamentos imunossupressores convencionais tem eficácia limitada
14 (CAMERON, 2003). Medicções que inibem o sistema complemento estão sendo testadas em
15 algumas doenças como glomerulopatia C3 e síndrome hemolítico-urêmica atípica,
16 apresentando resultados animadores (COFIELL; KUKREJA; BEDARD; YAN *et al.*, 2015;
17 VIVARELLI; EMMA, 2014). Pesquisadores sugeriram considerar essas terapias que visam o
18 complemento também no tratamento de pacientes com GESF primária (HUANG; CUI; GU;
19 ZHANG *et al.*, 2020).

20 Em nosso trabalho observamos que os pacientes com GESF apresentaram uma pior
21 evolução clínica, uma vez que 37,5% dos indivíduos evoluíram para DRC e 25% para óbito.
22 Em comparação, a grande maioria (77,8%) dos pacientes com DLM tiveram melhora do
23 quadro após o tratamento. Dados da literatura trazem que a GESF tem um pior desfecho
24 clínico e dentre as doenças nefróticas primárias, é a que apresenta maior propensão de
25 progredir para DRC (ROSENBERG; KOPP, 2017).

26 Comparamos também o prognóstico dos pacientes com a deposição de partículas do
27 complemento e observamos a presença de IgM nas biópsias dos pacientes que foram a óbito e
28 na maioria daqueles que evoluíram para DRC. Notamos a codeposição de IgM e C3 nos dois
29 óbitos e um deles apresentava também C4d. No entanto, não encontramos significância
30 estatística e acreditamos que seja devido ao pequeno número de nossa amostra.

31 A deposição de IgM tem sido associada à ausência de resposta a esteroides
32 (SWARTZ; ELGIN; HICKS; FEIG, 2009), ao desenvolvimento de insuficiência renal (ZEIS;
33 KAVAZARAKIS; NAKOPOULOU; MOUSTAKI *et al.*, 2001) e foi considerada um

Discussão

1 marcador de progressão para DRCT (ALEXOPOULOS; PAPAGIANNI; STANGO; U;
2 PANTZAKI *et al.*, 2000; SWARTZ; ELDIN; HICKS; FEIG, 2009).

3 A codeposição de IgM e C3 nas biópsias renais também vem sendo associada a piores
4 desfechos clínicos. Dados da literatura mostram que a evolução para insuficiência renal é
5 significativamente maior nos pacientes com IgM+C3+ (MIRIOGLU; CALISKAN; OZLUK;
6 DIRIM *et al.*, 2019) e essa codeposição foi identificada como fator de risco para síndrome
7 nefrótica refratária em pacientes com GESF primária (ZHANG; GU; HUANG; QU *et al.*,
8 2016).

9 Além disso, a positividade para C4d é um preditor independente de progressão da
10 doença em pacientes com GESF primária (HEYBELI; OKTAN; YILDIZ; ÜNLÜ *et al.*,
11 2019). Essas informações sugerem que a deposição glomerular de IgM, C3 e C4d está
12 associado a piores prognósticos e essa pode ser uma possível explicação para a pior evolução
13 clínica e laboratorial em nossos pacientes com GESF.

14 O presente estudo demonstra que o sistema complemento está associado a piores
15 dados laboratoriais em pacientes com podocitopatias, especialmente na GESF, mas não
16 estabelece que a ativação do complemento esteja envolvida na patogênese dessas doenças. A
17 via de ativação do sistema complemento mais prevalente nesses pacientes possivelmente foi a
18 via das lectinas, no entanto o pequeno número de pacientes é uma limitação importante do
19 nosso estudo. Pesquisas futuras com uma amostra maior devem ser realizadas para confirmar
20 nossos achados, investigar se a ativação do complemento pode levar ao desenvolvimento das
21 podocitopatias e, assim, identificar inibidores para que os pacientes tenham um melhor
22 tratamento e prognóstico.

Considerações finais

1 **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- 2 I. O perfil dos pacientes com podocitopatias é em sua maioria branco, do sexo
3 masculino e idade média de 34 anos;
- 4 II. Os pacientes com GESF apresentaram uma tendência a níveis mais elevados de
5 proteinúria e também à maior prevalência de HAS;
- 6 III. A deposição glomerular de IgM foi significativamente maior no grupo GESF,
7 assim como a codeposição de IgM e C3. Pacientes com GESF também
8 demonstraram uma tendência à maior expressão de C3 e foram os únicos a
9 apresentarem IgM+C3+C4d+.
- 10 IV. Pacientes com deposição de C3 apresentaram valores médios de creatinina sérica
11 significativamente maiores e TFGe significativamente menores, independente da
12 doença;
- 13 V. Pacientes com GESF e C3+ tiveram uma tendência a níveis menores de TFGe do
14 que pacientes com GESF e sem C3;
- 15 VI. Pacientes com codeposição de IgM e C3 tiveram uma tendência a valores maiores
16 de creatinina sérica;
- 17 VII. Em pacientes com GESF, a terapia de escolha para o tratamento foram esteroides
18 associados com inibidores de calcineurina e em pacientes com DLM, o esquema
19 terapêutico mais utilizado foi o uso de esteroides sozinhos;
- 20 VIII. A evolução clínica dos pacientes foi pior nos casos de GESF, com um percentual
21 maior progredindo para DRC e óbito. Em contrapartida, a grande maioria dos
22 pacientes com DLM apresentou melhora da doença após tratamento;
- 23 IX. Observamos a codeposição de IgM e C3 nos dois pacientes que foram a óbito,
24 sendo que em um deles encontrava-se IgM+C3+C4d+.

Conclusões

1 9 CONCLUSÕES

2 Pacientes com GESF apresentam mais deposição de IgM e C3, nas biópsias renais,
3 piores parâmetros laboratoriais e evolução clínica do que os pacientes com DLM. A
4 deposição de C3, tanto na GESF quanto na DLM, pode contribuir para a piora da função
5 renal.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

AGHAJAN, M.; BOOTEN, S. L.; ALTHAGE, M.; HART, C. E. *et al.* Antisense oligonucleotide treatment ameliorates IFN- γ -induced proteinuria in APOL1-transgenic mice. **JCI Insight**, 4, n. 12, 06 20 2019.

AGRAWAL, S.; ZARITSKY, J. J.; FORNONI, A.; SMOYER, W. E. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. **Nat Rev Nephrol**, 14, n. 1, p. 57-70, Jan 2018.

AHLMANN, M.; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, 78, n. 4, p. 661-671, 10 2016.

AHN, W.; BOMBACK, A. S. Approach to Diagnosis and Management of Primary Glomerular Diseases Due to Podocytopathies in Adults: Core Curriculum 2020. **Am J Kidney Dis**, 75, n. 6, p. 955-964, 06 2020.

ALEXOPOULOS, E.; PAPAGIANNI, A.; STANGOU, M.; PANTZAKI, A. *et al.* Adult-onset idiopathic nephrotic syndrome associated with pure diffuse mesangial hypercellularity. **Nephrol Dial Transplant**, 15, n. 7, p. 981-987, Jul 2000.

ANDRIGHETTO, S.; LEVENTHAL, J.; ZAZA, G.; CRAVEDI, P. Complement and Complement Targeting Therapies in Glomerular Diseases. **Int J Mol Sci**, 20, n. 24, Dec 16 2019.

ARNOLD, J. N.; WORMALD, M. R.; SUTER, D. M.; RADCLIFFE, C. M. *et al.* Human serum IgM glycosylation: identification of glycoforms that can bind to mannan-binding lectin. **J Biol Chem**, 280, n. 32, p. 29080-29087, Aug 12 2005.

AYGUN, B.; MORTIER, N. A.; SMELTZER, M. P.; HANKINS, J. S. *et al.* Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Nephrol**, 26, n. 8, p. 1285-1290, Aug 2011.

BAHIENSE-OLIVEIRA, M.; SALDANHA, L. B.; MOTA, E. L.; PENNA, D. O. *et al.* Primary glomerular diseases in Brazil (1979-1999): is the frequency of focal and segmental glomerulosclerosis increasing? **Clin Nephrol**, 61, n. 2, p. 90-97, Feb 2004.

BATAL, I.; LIANG, K.; BASTACKY, S.; KISS, L. P. *et al.* Prospective assessment of C4d deposits on circulating cells and renal tissues in lupus nephritis: a pilot study. **Lupus**, 21, n. 1, p. 13-26, Jan 2012.

CAMERON, J. S. Focal segmental glomerulosclerosis in adults. **Nephrol Dial Transplant**, 18 Suppl 6, p. vi45-51, Aug 2003.

Referências bibliográficas

- CAMMAS, B.; HARAMBAT, J.; BERTHOLET-THOMAS, A.; BOUISSOU, F. *et al.* Long-term effects of cyclophosphamide therapy in steroid-dependent or frequently relapsing idiopathic nephrotic syndrome. **Nephrol Dial Transplant**, 26, n. 1, p. 178-184, Jan 2011.
- CAMPBELL, K. N.; TUMLIN, J. A. Protecting Podocytes: A Key Target for Therapy of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Am J Nephrol**, 47 Suppl 1, p. 14-29, 2018.
- CASTRO, A. P. Calcineurin inhibitors in the treatment of allergic dermatitis. **J Pediatr (Rio J)**, 82, n. 5 Suppl, p. S166-172, Nov 2006.
- CATTRAN, D. C.; APPEL, G. B.; HEBERT, L. A.; HUNSICKER, L. G. *et al.* A randomized trial of cyclosporine in patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. North America Nephrotic Syndrome Study Group. **Kidney Int**, 56, n. 6, p. 2220-2226, Dec 1999.
- COCKWELL, P.; FISHER, L. A. The global burden of chronic kidney disease. **Lancet**, 395, n. 10225, p. 662-664, 02 29 2020.
- COFIELL, R.; KUKREJA, A.; BEDARD, K.; YAN, Y. *et al.* Eculizumab reduces complement activation, inflammation, endothelial damage, thrombosis, and renal injury markers in aHUS. **Blood**, 125, n. 21, p. 3253-3262, May 21 2015.
- COHEN, D.; COLVIN, R. B.; DAHA, M. R.; DRACHENBERG, C. B. *et al.* Pros and cons for C4d as a biomarker. **Kidney Int**, 81, n. 7, p. 628-639, Apr 2012.
- COLLINS, A. J.; FOLEY, R. N.; HERZOG, C.; CHAVERS, B. *et al.* US Renal Data System 2010 Annual Data Report. **Am J Kidney Dis**, 57, n. 1 Suppl 1, p. A8, e1-526, Jan 2011.
- CORVILLO, F.; LÓPEZ-TRASCASA, M. Acquired partial lipodystrophy and C3 glomerulopathy: Dysregulation of the complement system as a common pathogenic mechanism. **Nefrologia (Engl Ed)**, 38, n. 3, p. 258-266, 2018 May - Jun 2018.
- CRAVEDI, P.; KOPP, J. B.; REMUZZI, G. Recent progress in the pathophysiology and treatment of FSGS recurrence. **Am J Transplant**, 13, n. 2, p. 266-274, Feb 2013.
- D'AGATI, V. D.; KASKEL, F. J.; FALK, R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. **N Engl J Med**, 365, n. 25, p. 2398-2411, Dec 22 2011.
- DA SILVA, C. A.; ARAÚJO, L. S.; DOS REIS MONTEIRO, M. L. G.; DE MORAIS PEREIRA, L. H. *et al.* Evaluation of the Diagnostic Potential of uPAR as a Biomarker in Renal Biopsies of Patients with FSGS. **Dis Markers**, 2019, p. 1070495, 2019.
- DE VRIESE, A. S.; SETHI, S.; NATH, K. A.; GLASSOCK, R. J. *et al.* Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. **J Am Soc Nephrol**, 29, n. 3, p. 759-774, 03 2018.
- DELANAYE, P.; CAVALIER, E.; POTTEL, H. Serum Creatinine: Not So Simple! **Nephron**, 136, n. 4, p. 302-308, 2017.

Referências bibliográficas

EDDY, A. A.; SYMONS, J. M. Nephrotic syndrome in childhood. **Lancet**, 362, n. 9384, p. 629-639, Aug 23 2003.

EGUCHI, A.; TAKEI, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, K. *et al.* Combined cyclosporine and prednisolone therapy in adult patients with the first relapse of minimal-change nephrotic syndrome. **Nephrol Dial Transplant**, 25, n. 1, p. 124-129, Jan 2010.

ESPINOSA, M.; ORTEGA, R.; SÁNCHEZ, M.; SEGARRA, A. *et al.* Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. **Clin J Am Soc Nephrol**, 9, n. 5, p. 897-904, May 2014.

FLOEGE, J.; AMANN, K. Primary glomerulonephritides. **Lancet**, 387, n. 10032, p. 2036-2048, May 14 2016.

FOGO, A. B.; LUSCO, M. A.; NAJAFIAN, B.; ALPERS, C. E. AJKD Atlas of Renal Pathology: Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Am J Kidney Dis**, 66, n. 2, p. e1-2, Aug 2015a.

FOGO, A. B.; LUSCO, M. A.; NAJAFIAN, B.; ALPERS, C. E. AJKD Atlas of Renal Pathology: Minimal Change Disease. **Am J Kidney Dis**, 66, n. 2, p. 376-377, Aug 2015b.

FORNERIS, F.; RICKLIN, D.; WU, J.; TZEKOU, A. *et al.* Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. **Science**, 330, n. 6012, p. 1816-1820, Dec 24 2010.

FORNONI, A.; SAGESHIMA, J.; WEI, C.; MERSCHER-GOMEZ, S. *et al.* Rituximab targets podocytes in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. **Sci Transl Med**, 3, n. 85, p. 85ra46, Jun 01 2011.

FREEDMAN, B. I.; COHEN, A. H. Hypertension-attributed nephropathy: what's in a name? **Nat Rev Nephrol**, 12, n. 1, p. 27-36, Jan 2016.

GALLON, L.; LEVENTHAL, J.; SKARO, A.; KANWAR, Y. *et al.* Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. **N Engl J Med**, 366, n. 17, p. 1648-1649, Apr 26 2012.

GARG, P. A Review of Podocyte Biology. **Am J Nephrol**, 47 Suppl 1, p. 3-13, 2018.

GUPTA, A.; QUIGG, R. J. Glomerular Diseases Associated With Hepatitis B and C. **Adv Chronic Kidney Dis**, 22, n. 5, p. 343-351, Sep 2015.

HABIB, R.; GIRARDIN, E.; GAGNADOUX, M. F.; HINGLAIS, N. *et al.* Immunopathological findings in idiopathic nephrosis: clinical significance of glomerular "immune deposits". **Pediatr Nephrol**, 2, n. 4, p. 402-408, Oct 1988.

HAHN, D.; HODSON, E. M.; WILLIS, N. S.; CRAIG, J. C. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD001533, Mar 18 2015.

Referências bibliográficas

- HEYBELI, C.; OKTAN, M. A.; YILDIZ, S.; ÜNLÜ, M. *et al.* Mesangial C4d deposition is independently associated with poor renal survival in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. **Clin Exp Nephrol**, 23, n. 5, p. 650-660, May 2019.
- HUANG, J.; CUI, Z.; GU, Q. H.; ZHANG, Y. M. *et al.* Complement activation profile of patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. **PLoS One**, 15, n. 6, p. e0234934, 2020.
- IJIMA, K.; SAKO, M.; NOZU, K.; MORI, R. *et al.* Rituximab for childhood-onset, complicated, frequently relapsing nephrotic syndrome or steroid-dependent nephrotic syndrome: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. **Lancet**, 384, n. 9950, p. 1273-1281, Oct 04 2014.
- IMAI, N.; NISHI, S.; ALCHI, B.; UENO, M. *et al.* Immunohistochemical evidence of activated lectin pathway in kidney allografts with peritubular capillary C4d deposition. **Nephrol Dial Transplant**, 21, n. 9, p. 2589-2595, Sep 2006.
- INKER, L. A.; SCHMID, C. H.; TIGHIOUART, H.; ECKFELDT, J. H. *et al.* Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C. **N Engl J Med**, 367, n. 1, p. 20-29, Jul 05 2012.
- JAFAR, T. H.; STARK, P. C.; SCHMID, C. H.; LANDA, M. *et al.* Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. **Ann Intern Med**, 139, n. 4, p. 244-252, Aug 19 2003.
- JAVA, A.; ATKINSON, J.; SALMON, J. Defective complement inhibitory function predisposes to renal disease. **Annu Rev Med**, 64, p. 307-324, 2013.
- JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Adv Chronic Kidney Dis**, 21, n. 5, p. 408-416, Sep 2014.
- JOSE, R. J.; MANUEL, A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. **Lancet Respir Med**, 8, n. 6, p. e46-e47, 06 2020.
- KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: From physiology to clinical application. **Eur J Intern Med**, 72, p. 9-14, 02 2020.
- KIRSZTAJN, G. M.; FILHO, N. S.; DRAIBE, S. A.; NETTO, M. V. *et al.* [Fast reading of the KDIGO 2012: guidelines for evaluation and management of chronic kidney disease in clinical practice]. **J Bras Nefrol**, 36, n. 1, p. 63-73, 2014 Jan-Mar 2014.
- KITIYAKARA, C.; EGGERS, P.; KOPP, J. B. Twenty-one-year trend in ESRD due to focal segmental glomerulosclerosis in the United States. **Am J Kidney Dis**, 44, n. 5, p. 815-825, Nov 2004.
- KLIMOVICH, V. B. IgM and its receptors: structural and functional aspects. **Biochemistry (Moscow)**, 76, n. 5, p. 534-549, May 2011.

Referências bibliográficas

- KODNER, C. Diagnosis and Management of Nephrotic Syndrome in Adults. **Am Fam Physician**, 93, n. 6, p. 479-485, Mar 15 2016.
- KOPP, J. B.; ANDERS, H. J.; SUSZTAK, K.; PODESTÀ, M. A. *et al.* Podocytopathies. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 68, 08 13 2020.
- KWAN, W. H.; VAN DER TOUW, W.; HEEGER, P. S. Complement regulation of T cell immunity. **Immunol Res**, 54, n. 1-3, p. 247-253, Dec 2012.
- LAURIN, L. P.; GASIM, A. M.; POULTON, C. J.; HOGAN, S. L. *et al.* Treatment with Glucocorticoids or Calcineurin Inhibitors in Primary FSGS. **Clin J Am Soc Nephrol**, 11, n. 3, p. 386-394, Mar 07 2016.
- LEGENDRE, C. M.; LICHT, C.; MUUS, P.; GREENBAUM, L. A. *et al.* Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome. **N Engl J Med**, 368, n. 23, p. 2169-2181, Jun 06 2013.
- LEI, X.; LIU, C.; AZADZOI, K.; LI, C. *et al.* A novel IgM-H-ficolin complement pathway to attack allogenic cancer cells in vitro. **Sci Rep**, 5, p. 7824, Jan 16 2015.
- LENNON, R.; RANGLES, M. J.; HUMPHRIES, M. J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 5, p. 160, 2014.
- LU, C. C.; WANG, G. H.; LU, J.; CHEN, P. P. *et al.* Role of Podocyte Injury in Glomerulosclerosis. **Adv Exp Med Biol**, 1165, p. 195-232, 2019.
- LUYCKX, V. A.; PERICO, N.; SOMASCHINI, M.; MANFELLOTTI, D. *et al.* A developmental approach to the prevention of hypertension and kidney disease: a report from the Low Birth Weight and Nephron Number Working Group. **Lancet**, 390, n. 10092, p. 424-428, 07 22 2017.
- MACHADO, S. G. M. R.; QUADROS, T.; WATANABE, Y.; AQUINO, C. F. *et al.* Most common histopathological patterns of the Minas Gerais Association of the Centers of Nephrology. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, 65, n. 3, p. 441-445, Mar 2019.
- MACÉ, C.; CHUGH, S. S. Nephrotic syndrome: components, connections, and angiotensin-like 4-related therapeutics. **J Am Soc Nephrol**, 25, n. 11, p. 2393-2398, Nov 2014.
- MCCLOSKEY, O.; MAXWELL, A. P. Diagnosis and management of nephrotic syndrome. **Practitioner**, 261, n. 1801, p. 11-15, 02 2017.
- MCMULLEN, M. E.; HART, M. L.; WALSH, M. C.; BURAS, J. *et al.* Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. **Immunobiology**, 211, n. 10, p. 759-766, 2006.

Referências bibliográficas

- MIRIOGLU, S.; CALISKAN, Y.; OZLUK, Y.; DIRIM, A. B. *et al.* Co-Deposition of IgM and C3 May Indicate Unfavorable Renal Outcomes in Adult Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Kidney Blood Press Res**, 44, n. 5, p. 961-972, 2019.
- MORIGI, M.; LOCATELLI, M.; ROTA, C.; BUELLI, S. *et al.* A previously unrecognized role of C3a in proteinuric progressive nephropathy. **Sci Rep**, 6, p. 28445, 06 27 2016.
- MULAY, S. R.; THOMASOVA, D.; RYU, M.; KULKARNI, O. P. *et al.* Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe. **J Pathol**, 230, n. 3, p. 322-335, Jul 2013.
- MURATA, K.; BALDWIN, W. M. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. **Transplant Rev (Orlando)**, 23, n. 3, p. 139-150, Jul 2009.
- NASR, S. H.; KOPP, J. B. COVID-19-Associated Collapsing Glomerulopathy: An Emerging Entity. **Kidney Int Rep**, 5, n. 6, p. 759-761, Jun 2020.
- OXBURGH, L. Kidney Nephron Determination. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 34, p. 427-450, 10 06 2018.
- OZEKI, T.; MARUYAMA, S.; IMASAWA, T.; KAWAGUCHI, T. *et al.* Clinical manifestations of focal segmental glomerulosclerosis in Japan from the Japan Renal Biopsy Registry: age stratification and comparison with minimal change disease. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 2602, 01 28 2021.
- PANZER, S. E.; LASKOWSKI, J.; RENNER, B.; KULIK, L. *et al.* IgM exacerbates glomerular disease progression in complement-induced glomerulopathy. **Kidney Int**, 88, n. 3, p. 528-537, Sep 2015.
- PAČIĆ, A.; ŠENJUG, P.; BACALJA, J.; TIŠLJAR, M. *et al.* IgM as a novel predictor of disease progression in secondary focal segmental glomerulosclerosis. **Croat Med J**, 58, n. 4, p. 281-291, Aug 31 2017.
- PEREIRA, L. H. M.; DA SILVA, C. A.; MONTEIRO, M. L. G. D.; ARAÚJO, L. S. *et al.* Podocin and uPAR are good biomarkers in cases of Focal and segmental glomerulosclerosis in pediatric renal biopsies. **PLoS One**, 14, n. 6, p. e0217569, 2019.
- PODESTÀ, M. A.; PONTICELLI, C. Autoimmunity in Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Long-Standing Yet Elusive Association. **Front Med (Lausanne)**, 7, p. 604961, 2020.
- POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. **Nephrol Dial Transplant**, 25, n. 2, p. 490-496, Feb 2010.
- QUAGGIN, S. E.; KREIDBERG, J. A. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. **Development**, 135, n. 4, p. 609-620, Feb 2008.

Referências bibliográficas

RICE, W. L.; VAN HOEK, A. N.; PĂUNESCU, T. G.; HUYNH, C. *et al.* High resolution helium ion scanning microscopy of the rat kidney. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e57051, 2013.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol**, 11, n. 9, p. 785-797, Sep 2010.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; HERRERA-ACOSTA, J.; JOHNSON, R. J. Interstitial inflammation, sodium retention, and the pathogenesis of nephrotic edema: a unifying hypothesis. **Kidney Int**, 62, n. 4, p. 1379-1384, Oct 2002.

RONCO, P. Proteinuria: is it all in the foot? **J Clin Invest**, 117, n. 8, p. 2079-2082, Aug 2007.

ROSENBERG, A. Z.; KOPP, J. B. Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Clin J Am Soc Nephrol**, 12, n. 3, p. 502-517, Mar 07 2017.

RÜSTER, C.; WOLF, G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. **J Am Soc Nephrol**, 17, n. 11, p. 2985-2991, Nov 2006.

SACKS, S.; ZHOU, W. New boundaries for complement in renal disease. **J Am Soc Nephrol**, 19, n. 10, p. 1865-1869, Oct 2008.

SADOWSKI, C. E.; LOVRIC, S.; ASHRAF, S.; PABST, W. L. *et al.* A single-gene cause in 29.5% of cases of steroid-resistant nephrotic syndrome. **J Am Soc Nephrol**, 26, n. 6, p. 1279-1289, Jun 2015.

SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. Review series: The cell biology of renal filtration. **J Cell Biol**, 209, n. 2, p. 199-210, Apr 27 2015.

SEELE, J.; BEINEKE, A.; HILLERMANN, L. M.; JASCHOK-KENTNER, B. *et al.* The immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeSsuis, is involved in complement evasion. **Vet Res**, 46, p. 45, Apr 19 2015.

SETHI, S.; NASR, S. H.; DE VRIESE, A. S.; FERVENZA, F. C. C4d as a Diagnostic Tool in Proliferative GN. **J Am Soc Nephrol**, 26, n. 11, p. 2852-2859, Nov 2015.

SHABAKA, A.; TATO RIBERA, A.; FERNÁNDEZ-JUÁREZ, G. Focal Segmental Glomerulosclerosis: State-of-the-Art and Clinical Perspective. **Nephron**, 144, n. 9, p. 413-427, 2020.

SHALHOUB, R. J. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. **Lancet**, 2, n. 7880, p. 556-560, Sep 07 1974.

SHIN, D. H.; LIM, B. J.; HAN, I. M.; HAN, S. G. *et al.* Glomerular IgG deposition predicts renal outcome in patients with IgA nephropathy. **Mod Pathol**, 29, n. 7, p. 743-752, 07 2016.

Referências bibliográficas

SPRANGERS, B.; MEIJERS, B.; APPEL, G. FSGS: Diagnosis and Diagnostic Work-Up. **Biomed Res Int**, 2016, p. 4632768, 2016.

STRASSHEIM, D.; RENNER, B.; PANZER, S.; FUQUAY, R. *et al.* IgM contributes to glomerular injury in FSGS. **J Am Soc Nephrol**, 24, n. 3, p. 393-406, Feb 2013.

SWARTZ, S. J.; ELDIN, K. W.; HICKS, M. J.; FEIG, D. I. Minimal change disease with IgM+ immunofluorescence: a subtype of nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, 24, n. 6, p. 1187-1192, Jun 2009.

TEDLA, F. M.; YAP, E. Apolipoprotein L1 and kidney transplantation. **Curr Opin Organ Transplant**, 24, n. 1, p. 97-102, 02 2019.

THURMAN, J. M. Therapeutic regulation of complement in patients with renal disease - where is the promise? **Clin Nephrol**, 77, n. 5, p. 413-423, May 2012.

THURMAN, J. M.; WONG, M.; RENNER, B.; FRAZER-ABEL, A. *et al.* Complement Activation in Patients with Focal Segmental Glomerulosclerosis. **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0136558, 2015.

TSUJI, S.; KIMATA, T.; YAMANOUCHI, S.; KITAO, T. *et al.* Regulatory T cells and CTLA-4 in idiopathic nephrotic syndrome. **Pediatr Int**, 59, n. 5, p. 643-646, May 2017.

TURNBERG, D.; LEWIS, M.; MOSS, J.; XU, Y. *et al.* Complement activation contributes to both glomerular and tubulointerstitial damage in adriamycin nephropathy in mice. **J Immunol**, 177, n. 6, p. 4094-4102, Sep 15 2006.

VAN DE LEST, N. A.; ZANDBERGEN, M.; WOLTERBEEK, R.; KREUTZ, R. *et al.* Glomerular C4d deposition can precede the development of focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney Int**, 96, n. 3, p. 738-749, 09 2019.

VAN DER VEN, A. T.; CONNAUGHTON, D. M.; ITYEL, H.; MANN, N. *et al.* Whole-Exome Sequencing Identifies Causative Mutations in Families with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract. **J Am Soc Nephrol**, 29, n. 9, p. 2348-2361, 09 2018.

VIVARELLI, M.; EMMA, F. Treatment of C3 glomerulopathy with complement blockers. **Semin Thromb Hemost**, 40, n. 4, p. 472-477, Jun 2014.

VIVARELLI, M.; MASSELLA, L.; RUGGIERO, B.; EMMA, F. Minimal Change Disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, 12, n. 2, p. 332-345, 02 07 2017.

WALDMAN, M.; CREW, R. J.; VALERI, A.; BUSCH, J. *et al.* Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. **Clin J Am Soc Nephrol**, 2, n. 3, p. 445-453, May 2007.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, 344, n. 14, p. 1058-1066, Apr 05 2001.

Referências bibliográficas

XU, T.; SHENG, Z.; YAO, L. Obesity-related glomerulopathy: pathogenesis, pathologic, clinical characteristics and treatment. **Front Med**, 11, n. 3, p. 340-348, Sep 2017.

ZACHO, R. M.; JENSEN, L.; TERP, R.; JENSENIUS, J. C. *et al.* Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: specificity and purification. **J Biol Chem**, 287, n. 11, p. 8071-8081, Mar 09 2012.

ZEIS, P. M.; KAVAZARAKIS, E.; NAKOPOULOU, L.; MOUSTAKI, M. *et al.* Glomerulopathy with mesangial IgM deposits: long-term follow up of 64 children. **Pediatr Int**, 43, n. 3, p. 287-292, Jun 2001.

ZHANG, Y. M.; GU, Q. H.; HUANG, J.; QU, Z. *et al.* Clinical Significance of IgM and C3 Glomerular Deposition in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Clin J Am Soc Nephrol**, 11, n. 9, p. 1582-1589, 09 07 2016.

ZHOU, W.; MARSH, J. E.; SACKS, S. H. Intrarenal synthesis of complement. **Kidney Int**, 59, n. 4, p. 1227-1235, Apr 2001.

ZUBER, J.; FRIMAT, M.; CAILLARD, S.; KAMAR, N. *et al.* Use of Highly Individualized Complement Blockade Has Revolutionized Clinical Outcomes after Kidney Transplantation and Renal Epidemiology of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome. **J Am Soc Nephrol**, 30, n. 12, p. 2449-2463, 12 2019.

ANEXO 1 – Parecer do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel do sistema complemento na patogênese das podocitopatias

Pesquisador: Juliana Reis Machado e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42775221.5.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.735.380

Apresentação do Projeto:

O projeto está sendo reapresentado com o objetivo de atender pendência(s) apontada(s) no parecer 4.609.586.

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO, de 05/05/2021) e do Projeto Detalhado (Projeto_de_pesquisa.docx, de 05/05/2021).

Segundo os pesquisadores:

"INTRODUÇÃO: GLOMERULOPATIAS - O glomérulo é a unidade do néfron onde o sangue é filtrado, sendo composto por uma rede de capilares que advêm da arteríola aferente e que culmina na arteríola eferente, sustentada pela matriz mesangial composta por células mesangiais. Forçado pela pressão intracapilar, o plasma é filtrado através da barreira de filtração glomerular (BFG), cuja permeabilidade seletiva evita a perda urinária de macromoléculas em estado normal. Esta barreira consiste em três camadas: o endotélio capilar fenestrado, a membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos (SCOTT; QUAGGIN, 2015).

As doenças glomerulares estão entre as principais causas de doença renal crônica terminal (DRCT) dialítica no mundo sendo importante causa de morbidade e mortalidade (MAHMUD; KUMAR; IRUM;

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 4.735.380

FARMAN ALI, 2015). Porém com cuidado adequado, a taxa de progressão dessas doenças pode ser retardada fazendo com que o aparecimento de insuficiência renal terminal seja adiado (MAHMUD; KUMAR; IRUM; FARMAN ALI, 2015). As glomerulopatias são doenças que cursam com injúrias glomerulares, que podem ser causadas por numerosos insultos como os hemodinâmicos, os tóxicos, os infecciosos e os imunes, e também por doenças hereditárias e metabólicas (WEENING; RONCO; REMUZZI, 2013).

Os podócitos tem sido apontados como as células principalmente acometidas nas doenças glomerulares que culminam em proteinúria (JEFFERSON; NELSON; NAJAFIAN; SHANKLAND, 2011). As podocitopatias, Doença de Lesões Mínimas (DLM) e Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF), são entidades que cursam com síndrome nefrótica (SN) ou proteinúria isolada e essas duas doenças apresentam em comum lesão glomerular causada por alterações intrínsecas e/ou extrínsecas nos podócitos (BÜSCHER; WEBER, 2012).

PODOCITOPATIAS - A GESF pode acometer tanto as crianças quanto os adultos, sendo responsável por aproximadamente 20% dos casos de SN em crianças e 40% dos casos em adultos, com uma incidência estimada de 7 por 1 milhão. Além disso, é a doença glomerular primária mais comum que leva a DRCT nos Estados Unidos, com uma prevalência de 4% (KITIYAKARA; EGGERS; KOPP, 2004). Como há uma resposta desfavorável aos corticoides, está associada a um pior prognóstico (CRAVEDI; KOPP; REMUZZI, 2013). A recorrência pós-transplante tem sido relatada em 86% nas crianças e em 36% nos adultos. Estas recorrências são frequentemente precoces e podem resultar na perda rápida do enxerto (LECA, 2014).

Na biópsia renal, os achados histopatológicos desta entidade podem variar dependendo da amostragem, pois como o próprio nome sugere, as lesões são "segmentares", ou seja, acometem apenas parte do glomérulo e "focais" porque somente alguns glomérulos possuem alterações (menos de 50%). Nos casos de GESF amostrada, quando a lesão é observada, sob a microscopia de luz (ML) é possível visualizar esclerose segmentar com aumento de matriz mesangial e colapso de alças capilares adjacentes. Pode-se encontrar ainda depósitos hialinos na região afetada como também, aderências entre o tufo glomerular esclerosado e a cápsula de Bowman (BARISONI; SCHNAPER; KOPP, 2007). Geralmente a imunofluorescência (IF) é negativa, mas pode apresentar Imunoglobulina M (IgM) e/ou partícula do complemento 3 (C3) nos segmentos esclerosados (MATHIESON, 2007). À avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão (MET), com a esclerose amostrada ou não, é observado o achatamento dos pedicelos ou apagamento que se distribui difusamente, mas pode ser focal em alguns casos, em geral nas formas secundárias (SETHI; ZAND; NASR; GLASSOCK et al., 2014).

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 02 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

Clinicamente esta entidade apresenta uma evolução desfavorável, pois habitualmente não responde a corticoterapia e progride para insuficiência renal em intervalo de tempo variável (CRAVEDI; KOPP; REMUZZI, 2013). Foi observado que entre 25-50% dos pacientes apresentam função renal diminuída. A presença de hematúria e hipertensão arterial sistêmica (HAS) também são mais frequentes nos pacientes com GESF, sendo que a hematúria acomete cerca de 50% dos pacientes e a HAS está presente em torno de 60% dos casos (JEFFERSON; NELSON; NAJAFIAN; SHANKLAND, 2011). No geral, declínio da função renal, presença de hematúria e HAS é mais frequente nos pacientes com GESF (KORBET, 1999; MATHIESON, 2007; PAIK; LEE; CHO; KANG et al., 2007). Ainda, casos mais complexos e de pior evolução apresentam fibrose intersticial e atrofia tubular secundárias à injúria podocitária, o que faz com que essa doença progrida para DRCT.

Sua fisiopatologia vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, já tendo sido correlacionada com diversos distúrbios renais hemodinâmicos, fatores imunológicos circulantes e defeitos genéticos (hereditários ou não), porém o efeito sobre os podócitos é semelhante em todas as formas (ROSENBERG; KOPP, 2017). Os podócitos parecem ser o principal contribuinte para o mecanismo de lesão da GESF (GRISHMAN; CHURG, 1975; WEN; SHAH; CAMPBELL, 2018). Sendo assim, qualquer alteração morfológica nos podócitos pode ter importância na sua patogênese (TANEDA; HONDA; OHNO; UCHIDA et al., 2015). Como os podócitos são células altamente diferenciadas ou terminais, eles são incapazes de sofrer reparação por divisão celular, sendo assim, não são capazes de se recuperarem a partir de uma lesão inicialmente grave. A morte celular resultante e/ou o destacamento destes da MBG leva a uma podocitopenia, ou seja, redução do número de células (CHENG; HARRIS, 2010). As células remanescentes não são suficientes para evitar o desnudamento da MBG, favorecendo a aderência desta região ao epitélio parietal com formação de sinéquias, obliteração dos capilares e posteriormente esclerose (JEFFERSON; SHANKLAND, 2014).

Algumas proteínas foram associadas a danos renais e proteinúria, dentre elas o receptor do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (uPAR) foi proposto como participante na patogênese da GESF (CARA-FUENTES; WEI; SEGARRA; ISHIMOTO et al., 2014; WEI; EL HINDI; LI; FORNONI et al., 2011; WEI; TRACHTMAN; LI; DONG et al., 2012). Foi observado em modelos animais de proteinúria, maior expressão glomerular de uPAR (WEI; MÖLLER; ALTINTAS; LI et al., 2008) e em biópsias renais de pacientes com GESF, houve uma maior expressão em podócitos tanto em casos adultos (DA SILVA; ARAÚJO; DOS REIS MONTEIRO; DE MORAIS PEREIRA et al., 2019; PEREIRA; DA SILVA; MONTEIRO; ARAÚJO et al., 2019) quanto pediátricos em relação a casos de DLM e casos controle.

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 03 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

A DLM é a principal causa de SN em crianças, porém pode acometer em torno de 10% dos adultos. Cerca de 95% dos pacientes respondem a corticoterapia, enquanto que a maioria dos pacientes com GESF são resistentes à terapia com esteroides (BRUCHFELD; BENEDEK; HILDERMAN; MEDIN et al., 2014).

Comumente pacientes com DLM tem a função renal normal e o início da doença pode ser abrupto a partir de um desencadeador tal como uma infecção (MATHIESON, 2007). Em adultos, hematúria pode estar presente em 30% dos casos, hipertensão em 40% e trombose em 5%, mas também pode ocorrer lesão renal aguda entre 10% a 25% dos pacientes. Em crianças, a hipertensão é menos comum e pode haver lesão renal aguda (JEFFERSON; NELSON; NAJAFIAN; SHANKLAND, 2011).

Na biópsia renal não há alterações na ML e não cursa com depósitos de imunocomplexos na IF. A única alteração morfológica encontrada é o extenso apagamento dos pedicelos na MET (FOGO; LUSCO; NAJAFIAN; ALPERS, 2015).

Estudos sugerem que DLM possa ser causada por um distúrbio imunológico relacionado à função das células T. Essa hipótese foi proposta quando observado uma concomitância entre essa doença e o sistema imune, sendo: uma remissão diante do tratamento de infecção com imunossupressão; ocorrência com linfoma de Hodgkin, que é uma doença relacionada com desordem de células T; uma boa resposta ao tratamento com esteroides, que são supressores da resposta imune mediada por células; ausência de depósitos de imunocomplexos no glomérulo e o fato de DLM normalmente ser desencadeada por infecções virais do trato respiratório (PRASAD; JAISWAL; AGARWAL; YADAV et al., 2015; SHALHOUB, 1974).

A patogênese da DLM vem sendo bem discutida com o passar dos anos. Em 1957, foi proposto que a nefrose lipóide, hoje chamada DLM, poderia cursar com evolução para GESF (RICH, 1957). Em 1990, analisando a área glomerular de pacientes com GESF e DLM, pacientes diagnosticados com DLM, em uma biópsia posterior foi observada a presença de esclerose, o que sugere que a DLM poderia ter evoluído para GESF (FOGO; HAWKINS; BERRY; GLICK et al., 1990). Em 2003, um revisão destas duas doenças também afirmou que trata-se de uma mesma doença (HOWIE, 2003). Posteriormente, outro trabalho afirmou serem duas doenças diferentes, mas que apresentam características comuns como a lesão nos podócitos, fazendo com que ambas fossem classificadas como podocitopatias (MATHIESON, 2007).

MECANISMO DE LESÃO NAS PODOCITOPATIAS - Acredita-se que os podócitos estão no centro das doenças glomerulares e lesões de natureza variada nestas células, levam a diversas doenças.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas, com uma arquitetura única, que cobrem as superfícies exteriores dos capilares glomerulares, onde estão aderidos à MBG da parede

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 04 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

do capilar, sustentando a função da BFG e ainda participam da produção de seus constituintes, na manutenção da arquitetura do tufo glomerular e na endocitose de proteínas filtradas (LENNON; RANGLES; HUMPHRIES, 2014). Sua arquitetura tridimensional é mantida por um citoesqueleto de actina e esta célula apresenta um corpo celular que emite prolongamentos chamados pedicelos que se interdigitam, deixando entre eles, fendas por onde o sangue é filtrado e essas fendas são mantidas por uma estrutura extracelular conhecida como diafragma da fenda (WELSH; SALEEM, 2012), sendo assim, são considerados elementos chave para a manutenção da permeabilidade da barreira de filtração glomerular.

As podocitopatias, GESF e DLM, estão entre as principais causas de Síndrome nefrótica, sendo o podócito a célula primariamente agredida (SINGH; SINGH; DINDA, 2015). Essas células apresentam capacidade limitada de divisão, o que é explicado pela necessidade de manutenção da sua arquitetura complexa, pois as células não podem usar simultaneamente o seu citoesqueleto de actina para a manutenção de uma ultra-estrutura sofisticada e para a formação do fuso mitótico para divisão celular (BUTTITTA; EDGAR, 2007). Diante disso, agressões aos podócitos por meio de agentes de natureza variada (medicamentos, toxinas circulantes, infecções virais, stress mecânico), assim como fatores sistêmicos, mediadores intraglomerulares e mediadores no próprio podócito, podem levar a alterações estruturais que culminam em uma retificação do citoesqueleto dos podócitos gerando apagamento dos pedicelos ou ainda destacamento da MBG, o que leva a proteinúria (CHENG; HARRIS, 2010).

Essas alterações – apagamento dos pedicelos e proteinúria - foram observadas em um modelo experimental de nefropatia em que algumas partículas do sistema complemento foram significativamente mais expressas (MIAO; FAN; CUI; ZHANG et al., 2009). Ademais, várias linhas de evidência reconhecem a ativação do complemento como causa de lesão em muitos tipos de doenças renais (THURMAN, 2012), especialmente na GESF (HUANG; CUI; GU; ZHANG et al., 2020).

SISTEMA COMPLEMENTO - O Sistema Complemento é um sistema de defesa do organismo e faz parte da imunidade inata (ANDRIGHETTO; LEVENTHAL; ZAZA; CRAVEDI, 2019). Uma de suas características principais é a rapidez da resposta, pois leva apenas segundos para opsonizar ou destruir uma bactéria e simultaneamente libera peptídeos pró-inflamatórios e quimiotáticos (JAVA; ATKINSON; SALMON, 2013). Esse sistema é formado por mais de 30 proteínas que em sua maioria, são produzidos no fígado, porém outros órgãos como cérebro, pulmões, intestinos e rins também podem sintetizar pequenas quantidades, sendo os rins um dos principais locais de síntese extra-hepático do complemento (SACKS; ZHOU, 2008). Essas proteínas podem ser ativadas em cascata por meio de três vias: a via

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 05 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

clássica, a via da lectina e a via alternativa. A via clássica é desencadeada pela ligação de complexos imunes (IgG ou IgM) à porção C1q da proteína C1, a via da lectina por carboidratos (serina protease associada a manose – MASP) presentes na superfície das bactérias e a via alternativa, hidrólise espontânea de C3 (CRAVEDI; VAN DER TOUW; HEEGER, 2013). A ativação das três vias, converge na formação de C3 convertase, o componente central da cascata, e sua clivagem é capaz de produzir C3a e C3b, sendo que este último permite a formação de C5 convertase. A clivagem de C5 causa a formação do complexo de ataque a membrana (MAC, C5b-9) e a subsequente destruição do patógeno (KWAN; VAN DER TOUW; HEEGER, 2012).

A imunoglobulina IgM é um anticorpo natural, possui a capacidade de ativar o sistema complemento e proteger o organismo contra infecções. No entanto, também pode colaborar para a lesão/inflamação do tecido. Várias glomerulopatias apresentam IgM na biópsia, porém o papel da IgM glomerular permanece obscuro. Pesquisadores acreditam na hipótese de que a IgM glomerular e a ativação do sistema complemento podem representar uma via final comum de lesão glomerular após agressões diversas, e isso levar a uma exacerbação da doença (PANZER; LASKOWSKI; RENNER; KULIK et al., 2015). Estudo em modelo experimental de GESF induzida por adriamicina, demonstrou que a IgM contribui para a progressão da doença e sugeriu que esse anticorpo se liga ao glomérulo danificado, ativa o sistema complemento e gera mais lesão glomerular. Além disso, estratégias que reduzem os anticorpos da IgM ou evitam a ativação do complemento podem retardar a progressão da GESF (STRASSHEIM; RENNER; PANZER; FUQUAY et al., 2013). Pesquisa semelhante observou que o desenvolvimento de GESF foi acompanhado por deposição de C3 glomerular e a deficiência deste, foi fator de proteção de lesões e também reduziu proteinúria, glomeruloesclerose, lesão tubulointersticial e disfunção renal nos animais (TURNBERG; LEWIS; MOSS; XU et al., 2006). Em pacientes com GESF primária, 54,7% apresentavam deposição glomerular de IgM em segmentos escleróticos e, desses, 34,5% também tinham depósitos de C3. Nos pacientes que possuíam deposição combinada de IgM e C3, a porcentagem de lesões de esclerose foi significativamente maior, bem como a quantidade de pacientes refratários, e os resultados renais foram piores. Essa deposição glomerular conjunta de IgM e C3 foi identificada como um dos fatores de risco para disfunção renal em pacientes com GESF primária e também como fator de risco independente para pacientes refratários (ZHANG; GU; HUANG; QU et al., 2016).

Outro componente do sistema complemento é o C4d, um produto da ativação de C4 pelas vias clássica e da lectina, e pode ser utilizado como evidência da ativação do complemento (COHEN; COLVIN; DAHA; DRACHENBERG et al., 2012). A deposição de C4d em transplantes renais é usada para diagnosticar rejeição mediada por anticorpos humanos e está associado a um pior

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 06 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

prognóstico (MURATA; BALDWIN, 2009). A deposição de C4d também auxilia na avaliação de várias glomerulonefrites e especificamente naquelas mediadas por complexos imunes. A presença de C4d e C1q na imunofluorescência, indica a ativação da via clássica do complemento, porém C4d sem C1q aponta para a ativação pela via das lectinas (SETHI; NASR; DE VRIESE; FERVENZA, 2015). Independentemente da via de ativação, a presença de C4d também é considerada um fator de mau prognóstico em algumas doenças renais (ESPINOSA; ORTEGA; SÁNCHEZ; SEGARRA et al., 2014). Pesquisa realizada para avaliar a deposição de C4d em pacientes com e sem doenças glomerulares, identificou que a coloração de C4d em biópsias de pacientes sem doenças glomerulares foi insignificante, assim como em pacientes com DLM, onde o padrão de coloração de C4d não foi útil para distinguir entre casos normais e casos de DLM (DRACHENBERG; PAPANIMITRIU; CHANDRA; HARIRIAN et al., 2019). Acredita-se que a patogênese dessa doença não envolva o sistema complemento e geralmente as biópsias renais com DLM são usadas como controle em estudos que avaliam a ativação desse sistema (CHANDRA, 2019). Pacientes com GESF apresentaram níveis plasmáticos de C4d significativamente mais elevados que controles normais e os níveis plasmáticos de C1q foram significativamente mais baixos em pacientes com GESF primária comparados com controles saudáveis (HUANG; CUI; GU; ZHANG et al., 2020). Em modelos de glomeruloesclerose induzida por adriamicina, camundongos deficientes em C1q desenvolveram doença semelhante aos controles, o que indica que o sistema complemento não foi ativado pela via clássica, uma vez que a ausência de C1q não alterou a gravidade da doença (TURNBERG; LEWIS; MOSS; XU et al., 2006). Isso sugere que o desenvolvimento de glomeruloesclerose pode estar relacionado com a ativação da via clássica do complemento.

A identificação da ativação do sistema complemento como causa de doença renal, estimulou a indústria farmacêutica a desenvolver medicamentos que bloqueiam essa ativação (ANDRIGHETTO; LEVENTHAL; ZAZA; CRAVEDI, 2019). O Eculizumab é um anticorpo monoclonal humanizado que melhorou a morbidade renal e reduziu o risco de desenvolvimento de doença renal em estágio terminal em pacientes com síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa) (LEGENDRE; LICHT; MUUS; GREENBAUM et al., 2013) e também reduziu a recorrência dessa doença após o transplante renal (ZUBER; LE QUINTREC; KRID; BERTOYE et al., 2012). No entanto ainda não há estudos sobre esse tipo de medicamento em casos de podocitopatias. Diante do exposto, este projeto visa avaliar a ativação do sistema complemento na patogênese das podocitopatias em busca de compreender os mecanismos envolvidos com o desenvolvimento destas doenças.

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 07 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

"MÉTODO(S) A SER(EM) UTILIZADO(S) DELINEAMENTO DO ESTUDO: Estudo quantitativo, com seres humanos, observacional, transversal, retrospectivo e descritivo. Pertencente à área de Ciências da Saúde, Patologia Geral, subárea de Patologia Humana.

DETALHAMENTO DOS MÉTODOS E ADEQUAÇÃO PARA ATINGIR OS OBJETIVOS

COLETA DOS DADOS: Será confeccionada uma planilha eletrônica com informações contidas nas solicitações de biópsias relativas aos dados clínicos (doenças diagnosticadas, hipertensão arterial), laboratoriais (creatinina, hematuria e proteinúria), epidemiológicos (idade, gênero, cor e procedência) e com informações contidas nos laudos sobre a análise da biópsia (Microscopia de Luz, Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica). Estas solicitações serão preenchidas pelo médico solicitante no momento da realização da biópsia renal e enviadas juntamente com o material para análise e diagnóstico. Sendo assim, não serão utilizadas informações de prontuários, apenas informações que já são fornecidas no formulário de solicitação da biópsia renal.

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA: Todos os casos, serão separados de acordo com o diagnóstico já dado pela Nefropatologista, de acordo com achados da biópsia renal associados com a clínica do paciente. Tais grupos serão pareados pela idade, gênero (feminino e masculino), cor (branca ou não branca) e procedência.

Serão formados 3 grupos, sendo um grupo controle composto por fragmento de necropsia de pacientes cuja causa de morte não foi relacionada a doença renal ou doença infecciosa. O restante dos grupos serão formados de acordo com a associação de achados morfológicos e clínicos. Dessa forma serão considerados os seguintes grupos: GESF quando for observado na análise histológica, aumento de matriz mesangial de forma segmentar, ausência de depósito de imunocomplexos e apagamento dos pedicelos e o grupo LM quando houver pelo menos 20 glomérulos na amostra sem esclerose segmentar, ausência de imunocomplexos e apagamento dos pedicelos. Os grupos serão avaliados quanto a expressão maior ou menor das proteínas estudadas e/ou de forma descritiva apresentados como percentual em relação ao total. **HISTOQUÍMICA:** O exame anatomopatológico será composto da avaliação microscópica por meio da análise da microscopia de luz (histoquímica e imunohistoquímica), da microscopia de imunofluorescência e pela microscopia eletrônica de transmissão. As análises das alterações serão feitas de acordo com o compartimento em que se encontra a lesão: 1) glomérulos (membrana basal, células e matriz mesangial), 2) túbulos, 3) interstício e 4) vasos, levando-se em consideração as áreas atingidas pela biópsia (córtex e medular) e o número de glomérulos apropriados para estudo. Serão avaliadas informações relativas às características e ao número de fragmentos e tipos de fixadores usados. O processamento do material será realizado no

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 08 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

laboratório de Histopatologia e Imunohistoquímica da Disciplina de Patologia Geral da UFTM.

MICROSCOPIA DE LUZ: A amostra proveniente do frasco de glutaraldeído será deixada no mínimo por seis horas fixando na geladeira, contando a partir do horário da biópsia. As biópsias provenientes de outras cidades coletadas no dia anterior serão processadas imediatamente ao chegar ao laboratório. O fragmento será desidratado em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%) e diafanizado em xilol (I, II e III). Após esse processamento, o fragmento será incluído em parafina e o bloco será submetido a cortes seriados de 2 m de espessura. Após a confecção, as lâminas serão colocadas na estufa por 30 minutos. A seguir serão realizadas as colorações de hematoxilina e eosina (HE), picro-sírius (PS), prata metenamina (PAMS) e tricrômico de masson azul (TMA).

MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA: Serão pesquisadas as cadeias pesadas de imunoglobulina IgA, IgG, IgM, cadeias leves, Kappa e Lambda, partículas do complemento C3 e C1q, fibrinogênio por meio da técnica de imunofluorescência direta. A amostra em líquido de transporte, referentes às biópsias provenientes de outras cidades, serão lavadas em PBS, por três vezes durante 5 minutos cada e congeladas em nitrogênio líquido. Os fragmentos em soro fisiológico, referentes às biópsias provenientes de Uberaba, serão apenas congelados. Posteriormente, os fragmentos serão cortados no criostato na espessura de 2 m.

As lâminas serão colocadas em câmara úmida e os cortes serão hidratados com PBS. Uma lâmina será utilizada para coloração de HE e a outra será o controle negativo (incubado apenas com PBS). Nas outras lâminas será colocado 25l de anticorpo FITC-conjugated da DAKO: anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, anti-C1q, anti-Kappa, anti-Lambda, anti-fibrinogênio. Após a adição do anticorpo as lâminas serão incubadas em câmara escura e úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, será retirado o excesso de anticorpo e as lâminas serão lavadas com PBS. Posteriormente, as lâminas serão secadas e montadas com lamínula e meio de montagem aquoso.

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: Os fragmentos fixados em glutaraldeído e pós-fixados em tetróxido de ósmio serão processados para inclusão em resina e submetidos a cortes semifinos de 0,5m de espessura e corados pelo azul de toluidina. Após análise desses cortes em microscópio de luz serão feitos cortes ultrafinos com espessura de 50 a 70 nm contrastados com uranila e citrato de chumbo que serão examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900.

IMUNO-HISTOQUÍMICA: Na imunohistoquímica para detecção de C4d será utilizada uma lâmina reserva proveniente do material parafinado. As lâminas serão pré tratadas com solução Trilogy na

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 09 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

panela "Paschal" a 121°C (DAKO) para desparafinização, reidratação e recuperação antigênica. Após essa etapa, as lâminas serão incubadas em câmara úmida e escura com uma gota de bloqueador de peroxidase (Peroxidase block, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 30 minutos. Após, serão incubadas com o bloqueador de proteínas (Protein block, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 15 minutos. Posteriormente serão incubadas com anticorpo primário anti-C4d (1:250, ALPCO) por 2 horas em temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com o reagente pós-primário (Post Primary, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 30 minutos e depois incubadas com o reagente polímero (Polymer, Kit Novolink Polymer Detection System, LEICA) por 30 minutos. Em seguida, foram incubadas com o cromógeno diamino benzidina (DAKO) e contra coradas com hematoxilina de Harris. Após, as lâminas serão desidratadas em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%), diafanizadas em xilol (I, II e III) e montadas com meio de montagem permanente e laminula.

MORFOMETRIA: As lâminas da imuno-histoquímica serão analisadas no microscópio de luz comum e todos os glomérulos de cada amostra serão analisados. Imagens digitais de cada glomérulo serão capturadas usando a câmera digital AxionCam ICc5 (Zeiss, Germany) acoplada ao microscópio de luz na lente objetiva de 40x. As células imunomarcadas com coloração acastanhada intensa e localizadas fora da alça glomerular serão definidas como podócitos positivos para C4d. Para cada caso, todos os podócitos de cor acastanhada imunocorados serão quantificados em cada glomérulo e a área de cada glomérulo será medida. O resultado será expresso em densidade celular por área glomerular de acordo com (VENKATAREDDY; WANG; YANG; PATEL et al., 2014).

As lâminas da imunofluorescência serão analisadas em microscópio de luz ultravioleta para fluorescência e avaliadas segundo sua positividade (sim ou não), intensidade (discreto, moderado e acentuado), a localização (mesangial e/ou alça capilar: intramembranoso, subendotelial e subepitelial) e o padrão do depósito (linear ou granular)

ANÁLISE ESTATÍSTICA: Para a análise estatística será elaborada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) e a análise dos dados será feita no programa GraphPad Prism (versão 7.0). As variáveis serão testadas para verificar se apresentam distribuição normal, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e também será feita à análise da variância. Caso a distribuição seja normal e os grupos homogêneos, aplicaremos testes paramétricos, teste "t" de Student ou ANOVA. Caso contrário, aplicaremos testes não paramétricos, o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis.

As diferenças serão consideradas estatisticamente significantes quando p for menor que 5% ($p < 0,05$).

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

Página 10 de 14



Continuação do Parecer: 4.735.380

05).

DETALHAMENTO DAS INSTALAÇÕES E INFRAESTRUTURA NECESSÁRIA: A pesquisa será realizada na Disciplina de Patologia Geral, que além da infraestrutura necessária, já dispõem dos seguintes itens: Laudos das biópsias realizadas pelo Serviço de Nefropatologia da UFTM, microcomputador com os softwares necessários para confecção de Banco de Dados (Microsoft Excel), análise estatística (GraphPad Prism) e confecção da dissertação e apresentações (Microsoft Word e Power Point).

"CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Pacientes adultos com diagnóstico de Podocitopatias no período de 1996 a 2020, que realizaram a biópsia renal no Serviço de Nefropatologia da UFTM;

Apresentarem as três amostras (Microscopia de luz, Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão) completas para análise;

Possuírem o registro completo das informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: Pacientes que realizaram a biópsia renal no Serviço de Nefropatologia da UFTM cujo diagnóstico não seja podocitopatias;

Não apresentarem as três amostras completas para análise;

Não possuírem o registro completo das informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

"**OBJETIVO GERAL:** Avaliar a ativação do sistema complemento na patogênese das Podocitopatias em biópsias renais de pacientes com diagnóstico de GESF e de DLM, do Serviço de Nefropatologia da Disciplina de Patologia Geral da UFTM, entre os anos de 1996 a 2020.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 4.735.380

- Realizar a caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes diagnosticados com Podocitopatias;
- Analisar a deposição das Imunoglobulinas IgM e IgG em biópsias renais de pacientes diagnosticados com podocitopatias;
- Analisar a deposição de C1q em biópsias renais de pacientes diagnosticados com podocitopatias;
- Analisar a deposição de C3 e C4d em biópsias renais de pacientes diagnosticados com podocitopatias;
- Correlacionar a expressão desses fatores imunes com as lesões e os dados clínicos."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores;

"Na nossa opinião, não vislumbramos riscos aos pacientes uma vez que os exames utilizados para a realização desta pesquisa já foram realizados previamente, caracterizando, portanto, um estudo retrospectivo, com a utilização de materiais e dados já arquivados. Essa pesquisa não traz desconfortos e o único risco potencial é de perda da confidencialidade, porém o risco de perda da confidencialidade será minimizado com a identificação dos pacientes e de suas respectivas biópsias apenas por letras e números, sem divulgação de nomes e registros dos pacientes, mantendo assim, o sigilo e a privacidade.

Em relação aos benefícios da pesquisa espera-se que o maior conhecimento científico sobre a elucidação dos mecanismos envolvidos na patogênese das podocitopatias auxilie em uma terapêutica mais adequada que contribua para uma evolução mais lenta da doença e melhor prognóstico para o paciente."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de retorno de parecer anterior, em que os pesquisadores atenderam totalmente as solicitações do CEP-UFTM (parecer n. 4.609.586).

Os pesquisadores propõem realizar um estudo quantitativo, com seres humanos, observacional, transversal, retrospectivo e descritivo a partir da análise de biópsias para se verificar a participação do sistema complemento em podocitopatias. O estudo será realizado com 100 biópsias de indivíduos.

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões	
Bairro: Abadia	CEP: 38.025-440
UF: MG	Município: UBERABA
Telefone: (34)3700-6803	E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 4.735.380

Equipe de pesquisadores vinculada na Plataforma Brasil: Juliana Reis Machado e Silva (Responsável Principal), Crislaine Aparecida da Silva, Veronica A Ferreira, Marlene Antônia dos Reis e Maria Julia Granero Rosa (pesquisadores assistentes).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados adequadamente, atendendo às exigências do CEP-CONEP, bem como a(s) pendência(s) apontadas em parecer anterior nº 4.609.586.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e Norma Operacional 001/2013, o Colegiado do CEP-UFTM manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O CEP-UFTM informa que de acordo com as orientações da CONEP, o pesquisador deve notificar na página da Plataforma Brasil, o início do projeto. A partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestrais), assim como também é obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1692838.pdf	05/05/2021 16:02:37		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.docx	05/05/2021 16:01:48	Juliana Reis Machado e Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaopatologiageral.pdf	05/05/2021 16:00:28	Juliana Reis Machado e Silva	Aceito

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 4.735.380

Outros	Autorizacaogep.pdf	05/05/2021 15:59:40	Juliana Reis Machado e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Ausencia_TCLE.pdf	03/02/2021 13:34:30	Juliana Reis Machado e Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	03/02/2021 13:32:10	Juliana Reis Machado e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 26 de Maio de 2021

Assinado por:

Alessandra Cavalcanti de Albuquerque e Souza
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br

ANEXO 2 – Comprovante de aceite do artigo para publicação

Veronica Ferreira <veronicaferreira0609@gmail.com>

Manuscript no. 254_22 entitled Analysis of glomerular deposition of IgM and C3 in patients with Podocytopathies

1 mensagem

sjkdt <sjkdt@sjkdt.org>

18 de setembro de 2022 03:48

Para: "veronicaferreira0609@gmail.com" <veronicaferreira0609@gmail.com>

Dear Mrs. Veronica Ferreira,

The Editorial Board of Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation is pleased to inform you that the **manuscript no. 254_22** is **acceptable** for publication in the Journal. However, we cannot guarantee an early publication since we have a very long waiting list and due to our overload of manuscripts and frequency of publication.

Please note that the journal reserves the rights to make changes in the language, grammar, presentation, etc. to suit the journal's requirements.

We thank you for submitting your valuable research work to Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation.

Yours sincerely,

The Editorial Team
Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation
Riyadh, Saudi Arabia

ANEXO 3 – Artigo completo**Analysis of glomerular deposition of IgM and C3 in patients with Podocytopathies****Authors:**

Ferreira Verônica A¹, Silva Crislaine A¹, Carmo Neto José R², Martins Ana Luisa M S¹, Reis Marlene A¹, Machado Juliana R^{1,2}

Department(s) and institution(s):

¹Discipline of General Pathology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, 8025-180 Uberaba, Minas Gerais, Brazil

²Department of Bioscience and Technology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, 74605-450 Goiania, GO, Brazil

Corresponding Author:

Juliana Reis Machado

General Pathology Professor

Federal University of Triângulo Mineiro Praça Manoel Terra, 330

CEP: 38025-015 Uberaba – MG

e-mail: juliana.patologiageral@gmail.com

Phone: 55 (34) 3700-6452

Ethical Approval: The present study was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro (n° 4.735.380).

Conflicting Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

Abstract. Minimal Change Disease (MCD) and Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) are the main causes of nephrotic syndrome in the world. The complement system appears to play an important role in the pathogenesis of these diseases. To evaluate the deposition of immunoglobulins and particles of the complement system in renal biopsies of patients with FSGS and MCD and relate to laboratory data, we selected 59 renal biopsies from patients with podocytopathies, 31 from patients with FSGS and 28 with MCD. Epidemiological, clinical, laboratory information and the prognosis of these patients were evaluated. Analysis of the deposition of IgM, IgG, C3, C1q and C4d in renal biopsies was performed. We related IgM and C3 deposition with laboratory parameters. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.0. Glomerular deposition of IgM was significantly higher in the FSGS group, as was codeposition of IgM and C3. The clinical course of patients and laboratory data were also worse in cases of FSGS, with a higher percentage progressing to chronic kidney disease and death. Patients with C3 deposition had significantly higher mean serum creatinine and significantly lower eGFR, regardless of disease. Patients with FSGS had more IgM and C3 deposition in renal biopsies, worse laboratory data and prognosis than patients with MCD. C3 deposition, both in FSGS and MCD, appears to be related to worsening renal function.

Keywords: Complement C3, Immunoglobulin M, Podocytopathies, Complement System.

Key Messages:

Patients with FSGS have more IgM and C3 deposition in renal biopsies.

The clinical evolution of the patients was worse in the cases of FSGS.

C3 deposition appears to be related to worsening renal function in patients with podocytopathy.

1. Introduction

Podocytopathies, Minimal Change Disease (MCD) and Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS), represent the main causes of nephrotic syndrome worldwide.¹ However, its causes are still not well defined.

Activation of the complement system has been recognized as a cause of injury² and as a poor prognostic factor in FSGS.³

Therefore, we investigated the deposition of immunoglobulins and particles of the complement system in renal biopsies of patients with podocytopathies and related them to their laboratory data.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and data obtained

Were used renal biopsies of 59 patients aged between 18 and 62 years, with diagnosis of podocytopathies (FSGS or MCD) of primary cause. Biopsies collected between 1996 and 2021 with the diagnosis of podocytopathies confirmed by MET.

Clinical (presence of arterial hypertension and hematuria), laboratory (serum levels of creatinine, albumin, proteinuria and eGFR) and epidemiological data (age, color, and gender) of the patients were evaluated. Analysis of the deposition of IgM, IgG, C3, C1q and C4d in renal biopsies was performed. Information regarding the treatment and clinical evolution of the patients was obtained through a form sent via email to the nephrologists or through telephone contact with the patient.

Exclusion criteria were patients younger than 18 years of age; patients whose biopsies did not have the three fragments for analysis; patients who did not have the information necessary to carry out the study; as well as those patients diagnosed with FSGS or MCD of secondary cause.

2.2 Antibodies

Polyclonal antibodies anti-IgM (Kent, 1032 GD1, dilution 1:40), anti-C3 (Kent, 1052BE6, dilution 1:20), anti-C1q (Kent, 1112 X3, dilution 1:40), anti-IgG (Kent, 1032MJ6, 1:40 dilution) and anti-C4d (ALPCO, RCD181, 1:250 dilution).

2.3 Renal biopsy, evaluation of complement components and immunoglobulins

The anatomopathological examination consisted of microscopic evaluation through analysis of light microscopy (histochemistry and immunohistochemistry), fluorescence microscopy and transmission electron microscopy. For light microscopy, hematoxylin, and eosin (HE), picosirius (PS), silver methenamine (PAMS) and trichrome masson blue (TMA) were stained.

In immunohistochemistry, we searched for the presence of C4d only in cases with IgM and C3 codeposition, and in fluorescence microscopy, immunoglobulin heavy chains, IgG and IgM, and complement particles, C3 and C1q, were investigated using the technique of direct immunofluorescence. The glomeruli were analyzed according to their positivity (yes or no) for C4d, IgM, IgG, C3 and C1q.

For TEM, the fragments fixed in glutaraldehyde or Karnovsky + Ruthenium Red and post-fixed in osmium tetroxide were processed for inclusion in resin and submitted to semi-thin sections from 0.4 to 0.5 μm in thickness and stained with toluidine blue. After analyzing these sections in a light microscope, ultra-thin sections with a thickness of 50 to 70 nm were made to be examined in a transmission electron microscope Zeiss EM-900.

2.4 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.0. Normality was tested by the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Categorical variables were compared by Fisher's exact test and numerical variables by Student's t test, when the distribution of variables was normal and variances were similar, or by the test of Mann-Whitney, in the other cases. Differences were considered statistically significant when "p" was less than 0.05.

3. Results

Fifty-nine renal biopsies from patients with podocytopathies were evaluated, being 28 patients with MCD and 31 patients with FSGS. Most were white (57.6%), male (55.9%) and had a median age of 34 years (Table 1).

Regarding clinical and laboratory data, patients with FSGS showed a trend towards a higher prevalence of systemic arterial hypertension ($p=0.07$) and higher levels of proteinuria ($p=0.06$) when compared with patients with MCD (Table 2). The therapy of choice for the treatment of MCD and FSGS were steroids in 88.2% ($n=15$) of cases, being used alone in 55.5% of patients with MCD and associated with calcineurin inhibitors in 50% of patients with FSGS (Table 3). Patients with FSGS showed a worse clinical outcome, with 37.5% progressing to CKD and 25% dying. In the case of MCD, 77.8% had an improvement after treatment (Table 4).

When analyzing the glomerular deposition mesangial ou no local de esclerose of particles from the complement system, we found 37 (62.7%) patients with glomerular deposition of IgM, and patients with FSGS had more deposition when compared to those with MCD (64.9% vs 35.1%, $p=0.02$, figure 1A). C3 deposition was present in 21 cases (35.6%), and patients with FSGS showed a tendency towards greater deposition when compared to those with MCD (71.4% vs 28.6%, $p=0.05$, figure 1B). Immunofluorescence with positive IgM and C3 deposition is shown in Figure 2.

We found 17 (28.8%) renal biopsies with IgM and C3 codeposition, and a significantly higher prevalence in FSGS cases (76.5%) compared to MCD cases (23.5%, $p=0.02$, Figure 1C). Considering the biopsies that showed IgM and C3 codeposition, we evaluated whether they also showed C4d deposition. We could observe that only 6 cases (35.3%) had IgM+C3+C4d+ codeposition, and these biopsies were from patients diagnosed with FSGS ($p=0.02$, Figure 1D).

The deposition of C1q ($n=2$) and IgG ($n=1$) was shown exclusively in FSGS patients who had IgM.

After verifying the presence of IgM and C3 in the samples, these components were related to laboratory data (proteinuria, creatinine and eGFR). Thus, it was observed that IgM deposition did not significantly alter any of the laboratory data evaluated in patients with podocytopathies (MCD + FSGS) and in the groups separately (MCD or FSGS). Unlike IgM, patients with podocytopathies and C3 deposition had higher levels of serum creatinine (1.6, 0.6-6.7 vs 0.9, 0.4-2.5 mg/dL, $p=0.04$, Figure 3A) and lower levels of eGFR (63.8 ± 36.8 vs 92.0 ± 32.9 ml/min/1.73m², $p=0.03$, $t=2.26$, Figure 3B) when compared to patients without C3 deposition.

Patients diagnosed with FSGS and C3 positive on biopsy had a tendency ($p=0.08$) to have lower eGFR levels than patients with FSGS and C3 negative (53, 19-127 vs 112, 43-162 ml/ min/1.73m², Figure 3C). In patients with MCD, no significant difference was found ($p=0.30$).

When evaluating IgM and C3 codeposition, we found a trend towards higher serum creatinine values when compared to patients without this codeposition (1.6, 0.6-6.7 vs 0.9, 0.6-2.5 mg /dL, $p=0.08$, Figure 4). In patients with FSGS and MCD, the difference was not significant ($p=0.46$ and $p=0.45$, respectively).

4. Discussion

Glomerular deposits of IgM and C3 are frequently found in patients with primary FSGS, however the functional consequences are still questioned. In this study, we also identified the presence of these deposits in individuals with MCD and observed that C3 deposition seems to be related to worsening of renal function, both in FSGS and MCD cases.

The clinical profile of patients with podocytopathies was characterized by massive proteinuria, decreased eGFR, hypoalbuminemia and normal serum creatinine. These data agree with the literature, which cites nephrotic proteinuria and hypoalbuminemia as typical clinical manifestations of podocytopathies, whereas a reduction in eGFR may or may not occur.⁴ Patients with FSGS showed worse laboratory and clinical patterns, tending to have higher levels of proteinuria and a higher prevalence of SAH, in addition to having unfavorable prognoses when compared to patients with MCD. Literature data show that FSGS has a worse clinical outcome, and, among the primary nephrotic diseases, it is the one with the highest probability of progressing to chronic kidney disease (CKD).⁵ One explanation for this situation is that patients with FSGS tend to have a worse response to treatment due to steroid resistance.⁶

Regarding treatment, the therapy of choice for both FSGS and MCD cases, in our study, was steroids. The therapy currently used for patients with primary podocytopathies is based on immunosuppressive drugs, with steroids, such as prednisone, being the first option⁷ and the second therapeutic line are calcineurin inhibitors, such as cyclosporine and tacrolimus.⁴ The goal of treatment is the remission of proteinuria and prevention of CKD⁴. However, these conventional immunosuppressive treatments have limited efficacy.⁸

Currently, newer medications that inhibit the complement system are being tested in some diseases such as C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome.^{9,10} Researchers have suggested considering these complement-targeting therapies also in the treatment of patients with primary FSGS.²

The pathogenesis of FSGS and MCD is still unclear, recent studies suggest an important role of complement system activation in the development of Podocytopathies. It has been observed that activation of the complement system can be a cause of FSGS injury² and strategies that reduce IgM antibodies or avoid complement activation can delay FSGS progression.¹¹

Thus, we analyzed the deposition of immunoglobulins and complements in renal biopsies of patients with podocytopathies by immunofluorescence. These deposits were also observed at MET in the form of non-specific deposits. IgM was the most frequently found immunoglobulin, present in 62.7% of the biopsies evaluated, being more prevalent in FSGS than in MCD. Patients with FSGS also had a worse clinical outcome, since 37.5% of the individuals progressed to CKD and 25% to death. IgM deposition has been associated with non-responsiveness to steroids¹², the development of renal failure¹³ and has also been considered a marker of progression to ESRD^{12, 14}. This information suggests that glomerular IgM deposits are associated with worse prognoses, and this may be a possible explanation for the worse clinical outcome in our FSGS patients.

IgM is a natural antibody and a potent activator of the classical pathway of the complement system.^{15, 16} Furthermore, *in vitro*, and *in vivo* research has found that IgM can also activate the lectin pathway. This activation can occur through the interaction of IgM with the mannose-binding lectin¹⁷ and/or ficolins¹⁸, molecules that have similar structures to C1q¹⁹. The discovery of the activation pathway is carried out through the detection of other complement particles, for example, IgM and C1q, demonstrating that the activation of the complement system occurred through the classical pathway.²⁰ In our study, we found only two patients with C1q deposition and one with IgG, exclusively in patients with FSGS and with IgM codeposition. We can suggest that in these patients the complement activation pathway was the classic one. However, most patients with IgM did not have C1q, demonstrating that possibly the activation of the lectin pathway was more prevalent.

It was previously believed that glomerular IgM deposition was attributed to passive entrapment of the large macromolecule within sclerotic areas. However, IgM is also present in non-sclerotic areas in the glomeruli of patients with FSGS and its presence is not uniform in glomeruli with global sclerosis.¹⁶ The nonspecific entrapment also does not explain the frequent codeposition of C3, but not of other particles that have the same molecular weight.²¹ A currently well-accepted hypothesis is that IgM binds to specific antigens generated after insults and activates complement within the glomeruli.^{11,16,21}

Researchers have demonstrated a prevalence above 60% of IgM in patients with FSGS.²⁰ The deposition of this particle is quite common in these patients and is responsible for accelerating injury to the glomeruli in experimental models.¹¹ In addition to FSGS, IgM can also be found in several other kidney diseases such as MCD and diabetic nephropathy.²²

C3 deposition was the second most frequent, present in 35.6% of patients with podocytopathies and showed a trend towards a higher prevalence in patients with FSGS than in MCD. We also observed a significantly higher prevalence of IgM and C3 codeposition in patients with FSGS compared to patients with MCD.

C3 is the most abundant particle of the complement system and its cleavage results in the formation of C3a, an anaphylatoxin that is released into the environment, and C3b, an opsonin that binds to the surface of the antigen and is a component of the C3 and C5 convertases.²³ In vitro experiments indicated that C3a was able to activate podocytes to release neurotrophic factor and thus recruit parietal epithelial cells and form sclerotic lesions in FSGS patients.²⁴ In a study of mice with adriamycin nephropathy, it was observed that C3-deficient mice were protected from early proteinuria, had less renal dysfunction, and less pedicel effacement.²⁵

In this study, we found significantly higher levels of serum creatinine and significantly lower levels of eGFR in C3-positive patients compared with those without C3. This demonstrates worse renal function in patients with C3 deposition. Patients with FSGS and C3+ demonstrated a tendency to lower eGFR levels compared to patients without this particle deposition. C3 deposition has been associated with significantly shorter renal survival time.²⁶

Patients with IgM and C3 codeposition showed a tendency to worse renal function, with higher serum creatinine values. Our data corroborate the literature, which shows significantly worse laboratory data in patients with IgM+C3+ when compared to IgM-C3-³.

This codeposition has also been identified as a risk factor for refractory nephrotic syndrome in patients with primary FSGS.²⁶

Intraglomerular IgM deposition is significantly associated with C3 deposition.²⁰ In FSGS mice, the absence of C3 particle and IgM depletion reduced the degree of glomerular sclerosis, showing that complement activation contributes to glomerular injury in FSGS.^{11,25}

The codeposition of IgM, C3 and C4d particles in our work has been shown exclusively in FSGS patients. Researchers found immunostaining for C4d in 73% of biopsies from FSGS patients and in only 21% of MCD cases, and suggested that C4d can significantly increase treatment failures, in addition to being associated with poor renal survival, with progression to ESRD in approximately 36.6% of patients and significantly lower remission rates.²⁰

The present study demonstrates that the complement system is associated with worse laboratory data in patients with podocytopathies, but does not establish that complement activation is involved in the pathogenesis of these diseases. The complement activation pathway in these patients was possibly the lectin pathway, however the small number of patients is an important limitation of our study. Thus, future research with a larger sample should be carried out to confirm our findings, investigate whether complement activation can lead to the development of podocytopathies and, thus, identify inhibitors so that patients have better treatment and prognosis.

5. Conclusion

C3 deposition in both mesangial and sclerotic areas appears to be related to worsening renal function in patients with podocytopathies. Patients with FSGS had more IgM and C3 deposition in renal biopsies, worse clinical and evolution than patients with MCD and were also the only ones to have IgM+C3+C4d+.

References

1. McCloskey O, Maxwell AP. Diagnosis and management of nephrotic syndrome. *Practitioner*. 2017;261(1801):11-5. PubMed PMID: 29020719.
2. Huang J, Cui Z, Gu QH, Zhang YM, Qu Z, Wang X, et al. Complement activation profile of patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *PLoS One*. 2020;15(6):e0234934. Epub 20200622. doi: 10.1371/journal.pone.0234934. PubMed PMID: 32569286; PubMed Central PMCID: PMC7307932.
3. Mirioglu S, Caliskan Y, Ozluk Y, Dirim AB, Istemihan Z, Akyildiz A, et al. Co-Deposition of IgM and C3 May Indicate Unfavorable Renal Outcomes in Adult Patients with Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Blood Press Res*. 2019;44(5):961-72. Epub 20190822. doi: 10.1159/000501827. PubMed PMID: 31437846.
4. Ahn W, Bomback AS. Approach to Diagnosis and Management of Primary Glomerular Diseases Due to Podocytopathies in Adults: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis*. 2020;75(6):955-64. Epub 20200421. doi: 10.1053/j.ajkd.2019.12.019. PubMed PMID: 32331832.
5. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(3):502-17. Epub 20170227. doi: 10.2215/CJN.05960616. PubMed PMID: 28242845; PubMed Central PMCID: PMC5338705.
6. Cravedi P, Kopp JB, Remuzzi G. Recent progress in the pathophysiology and treatment of FSGS recurrence. *Am J Transplant*. 2013;13(2):266-74. Epub 20130111. doi: 10.1111/ajt.12045. PubMed PMID: 23312002; PubMed Central PMCID: PMC3558619.
7. Hahn D, Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(3):CD001533. Epub 20150318. doi: 10.1002/14651858.CD001533.pub5. PubMed PMID: 25785660; PubMed Central PMCID: PMC7025788.
8. Cameron JS. Focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 Suppl 6:vi45-51. doi: 10.1093/ndt/gfg1058. PubMed PMID: 12953042.
9. Cofiell R, Kukreja A, Bedard K, Yan Y, Mickle AP, Ogawa M, et al. Eculizumab reduces complement activation, inflammation, endothelial damage, thrombosis, and renal injury markers in aHUS. *Blood*. 2015;125(21):3253-62. Epub 20150401. doi: 10.1182/blood-2014-09-600411. PubMed PMID: 25833956; PubMed Central PMCID: PMC4449039.
10. Vivarelli M, Emma F. Treatment of C3 glomerulopathy with complement blockers. *Semin Thromb Hemost*. 2014;40(4):472-7. Epub 20140505. doi: 10.1055/s-0034-1375299. PubMed PMID: 24799307.
11. Strassheim D, Renner B, Panzer S, Fuquay R, Kulik L, Ljubanović D, et al. IgM contributes to glomerular injury in FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):393-406. Epub 20130207. doi: 10.1681/ASN.2012020187. PubMed PMID: 23393315; PubMed Central PMCID: PMC3582199.
12. Swartz SJ, Eldin KW, Hicks MJ, Feig DI. Minimal change disease with IgM+ immunofluorescence: a subtype of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(6):1187-92. Epub 20090214. doi: 10.1007/s00467-009-1130-0. PubMed PMID: 19219463.

13. Zeis PM, Kavazarakis E, Nakopoulou L, Moustaki M, Messaritaki A, Zeis MP, et al. Glomerulopathy with mesangial IgM deposits: long-term follow up of 64 children. *Pediatr Int*. 2001;43(3):287-92. doi: 10.1046/j.1442-200x.2001.01396.x. PubMed PMID: 11380926.
14. Alexopoulos E, Papagianni A, Stangou M, Pantzaki A, Papadimitriou M. Adult-onset idiopathic nephrotic syndrome associated with pure diffuse mesangial hypercellularity. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(7):981-7. doi: 10.1093/ndt/15.7.981. PubMed PMID: 10862635.
15. Klimovich VB. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry (Mosc)*. 2011;76(5):534-49. doi: 10.1134/S0006297911050038. PubMed PMID: 21639833.
16. Panzer SE, Laskowski J, Renner B, Kulik L, Ljubanovic D, Huber KM, et al. IgM exacerbates glomerular disease progression in complement-induced glomerulopathy. *Kidney Int*. 2015;88(3):528-37. Epub 20150506. doi: 10.1038/ki.2015.120. PubMed PMID: 25945405; PubMed Central PMCID: PMC4556608.
17. McMullen ME, Hart ML, Walsh MC, Buras J, Takahashi K, Stahl GL. Mannose-binding lectin binds IgM to activate the lectin complement pathway in vitro and in vivo. *Immunobiology*. 2006;211(10):759-66. Epub 20060728. doi: 10.1016/j.imbio.2006.06.011. PubMed PMID: 17113913.
18. Lei X, Liu C, Azadzi K, Li C, Lu F, Xiang A, et al. A novel IgM-H-ficolin complement pathway to attack allogenic cancer cells in vitro. *Sci Rep*. 2015;5:7824. Epub 20150116. doi: 10.1038/srep07824. PubMed PMID: 25592840; PubMed Central PMCID: PMC4296296.
19. Zacho RM, Jensen L, Terp R, Jensenius JC, Thiel S. Studies of the pattern recognition molecule H-ficolin: specificity and purification. *J Biol Chem*. 2012;287(11):8071-81. Epub 20120111. doi: 10.1074/jbc.M111.301044. PubMed PMID: 22238349; PubMed Central PMCID: PMC3318710.
20. Heybeli C, Oktan MA, Yıldız S, Ünlü M, Celik A, Sarioglu S. Mesangial C4d deposition is independently associated with poor renal survival in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Exp Nephrol*. 2019;23(5):650-60. Epub 20190107. doi: 10.1007/s10157-018-01688-0. PubMed PMID: 30617839.
21. Pačić A, Šenjug P, Bacalja J, Tišljarić M, Horvatić I, Bulimbašić S, et al. IgM as a novel predictor of disease progression in secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Croat Med J*. 2017;58(4):281-91. doi: 10.3325/cmj.2017.58.281. PubMed PMID: 28857521; PubMed Central PMCID: PMC5577650.
22. Habib R, Girardin E, Gagnadoux MF, Hinglais N, Levy M, Broyer M. Immunopathological findings in idiopathic nephrosis: clinical significance of glomerular "immune deposits". *Pediatr Nephrol*. 1988;2(4):402-8. doi: 10.1007/BF00853431. PubMed PMID: 3153051.
23. Seele J, Beineke A, Hillermann LM, Jaschok-Kentner B, von Pawel-Rammingen U, Valentin-Weigand P, et al. The immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, IdeS_{suis}, is involved in complement evasion. *Vet Res*. 2015;46:45. Epub 20150419. doi: 10.1186/s13567-015-0171-6. PubMed PMID: 25928761; PubMed Central PMCID: PMC4404118.

24. Morigi M, Locatelli M, Rota C, Buelli S, Corna D, Rizzo P, et al. A previously unrecognized role of C3a in proteinuric progressive nephropathy. *Sci Rep.* 2016;6:28445. Epub 20160627. doi: 10.1038/srep28445. PubMed PMID: 27345360; PubMed Central PMCID: PMC4921969.
25. Turnberg D, Lewis M, Moss J, Xu Y, Botto M, Cook HT. Complement activation contributes to both glomerular and tubulointerstitial damage in adriamycin nephropathy in mice. *J Immunol.* 2006;177(6):4094-102. doi: 10.4049/jimmunol.177.6.4094. PubMed PMID: 16951374.
26. Zhang YM, Gu QH, Huang J, Qu Z, Wang X, Meng LQ, et al. Clinical Significance of IgM and C3 Glomerular Deposition in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11(9):1582-9. Epub 20160623. doi: 10.2215/CJN.01190216. PubMed PMID: 27340287; PubMed Central PMCID: PMC5012474.

Table 1. Epidemiological profile of patients with MCD and FSGS.

	MCD (n=28)	FSGS (n=31)	Total (n=59)	<i>p</i>
Color				
<i>White</i>	18 (64.3%)	16 (51.6%)	34 (57.6%)	0.61
<i>Not white</i>	2 (7.1%)	3 (9.7%)	5 (8.5%)	
<i>NI</i>	8 (28.6%)	12 (38.7%)	20 (33.9%)	
Gender				
<i>Male</i>	15 (53.6%)	18 (58.1%)	33 (55.9%)	0.73
<i>Feminine</i>	13 (46.4%)	13 (41.9%)	26 (44.1%)	
Age				
<i>Median (min-max)</i>	33.5 (18-62)	37 (18-60)	34 (18-62)	0.65

MCD: Minimal Change Disease; FSGS: Segmental and Focal Glomerulosclerosis; n: Number of cases; NI: Not informed.

Table 2. Clinical and laboratory data of patients with MCD and FSGS.

	MCD (n=28)	FSGS (n=31)	Total (n=59)	<i>p</i>
Hematuria				
<i>Yes</i>	10 (35.7%)	11 (35.5%)	21 (35.6%)	0.50
<i>No</i>	14 (50%)	12 (38.7%)	26 (44.1%)	
<i>NI</i>	4 (14.3%)	8 (25.8%)	12 (20.3%)	
SAH				
<i>Yes</i>	9 (32.1%)	19 (61.3%)	28 (47.4%)	0.07
<i>No</i>	16 (57.2%)	9 (29%)	25 (42.4%)	
<i>NI</i>	3 (10.7%)	3 (9.7%)	6 (10.2%)	
Proteinuria (g/24h)				
<i>Median (min-max)</i>	3.8(0.2-17.7)	4.8(1.1-25.0)	4.3(0.2-25.0)	0.06
Creatinine (mg/dL)				
<i>Median (min-max)</i>	0.9(0.4-2.5)	1.3(0.5-6.7)	1.0(0.4-6.7)	0.20
Albumin (g/dL)				
<i>Median (min-max)</i>	2.6(1.3-4.1)	2.3(1.2-4.1)	2.3(1.2-4.1)	0.88
eGFR (ml/min/1.73m²)				
<i>Mean ± SD</i>	85.6±29.5	80.5±42.9	83.1±36.1	0.68

MCD: Minimal Change Disease; FSGS: Segmental and Focal Glomerulosclerosis; SAH: Systemic arterial hypertension; n: Number of cases; NI: Not informed; eGFR: Estimated glomerular filtration rate.

Table 3. Therapeutic regimen used by patients with MCD and FSGS

	MCD	FSGS
Steroids	5 (55.5%)	1 (12.5%)
Steroids + Calcineurin Inhibitors	1 (11.1%)	4 (50%)
Steroids + Antihypertensives	2 (22.3%)	1 (12.5%)
Steroids + Cyclophosphamide	1 (11.1%)	-
Not informed	-	2 (25%)

MCD: Minimal Change Disease; FSGS: Segmental and Focal Glomerulosclerosis.

Table 4. Evolution of patients with podocytopathies.

	MCD	FSGS
Frame improvement *	7 (77.8%)	2 (25%)
Relapse	1 (11.1%)	1 (12.5%)
CKD*	1 (11.1%)	3 (37.5%)
Death *	-	2 (25%)

MCD: Minimal Change Disease; CKD: Chronic kidney disease; FSGS: Focal and Segmental Glomerulosclerosis.

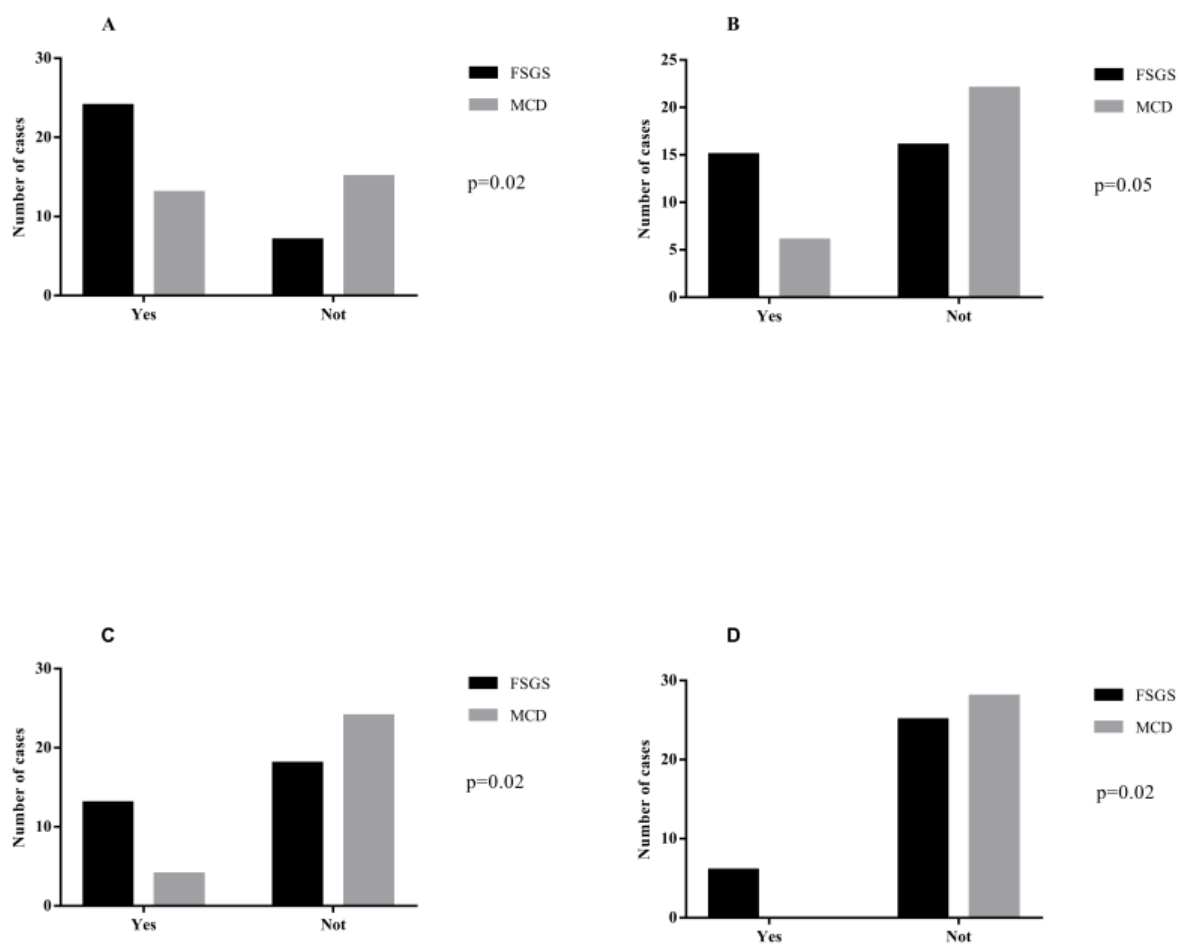


Figure 1. Deposition of IgM and complement system particles in patients with MCD and FSGS. A) Glomerular deposition of IgM. B) Glomerular deposition of C3. C) Glomerular codeposition of IgM and C3. D) Glomerular codeposition of IgM, C3 and C4d.

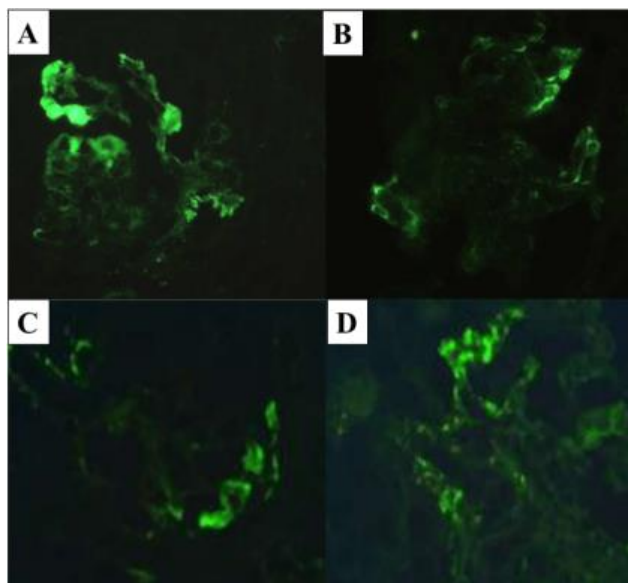


Figure 2. Glomerular deposits of IgM and C3 in patients with MCD and FSGS. A) Glomerular IgM deposition in a patient with FSGS. B) Glomerular deposition of IgM in a patient with MCD. C) Glomerular deposition of C3 in a patient with FSGS. D) Glomerular deposition of C3 in a patient with MCD.

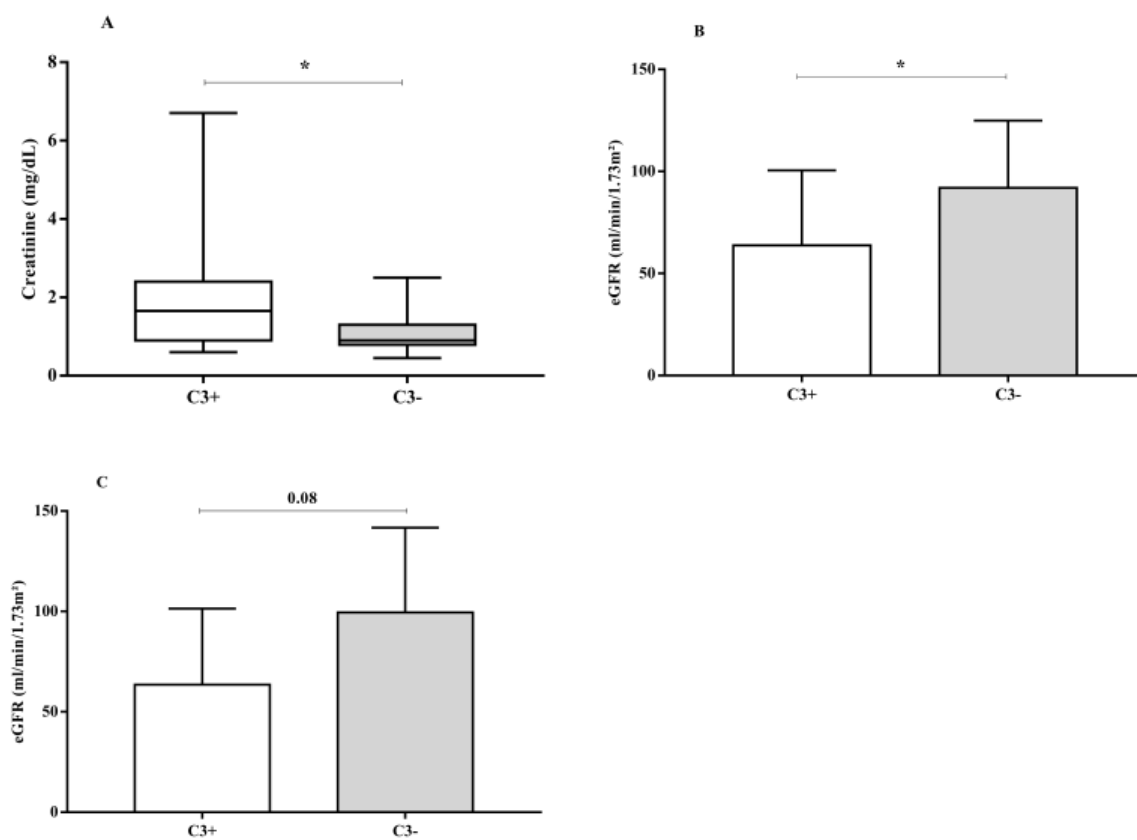


Figure 3. Laboratory parameters in patients with podocytopathies (FSGS and MCD) and C3 expression. A) Serum creatinine in patients with podocytopathies with or without glomerular C3. B) eGFR in patients with podocytopathies with or without glomerular C3. C) eGFR in FSGS patients with or without glomerular C3.

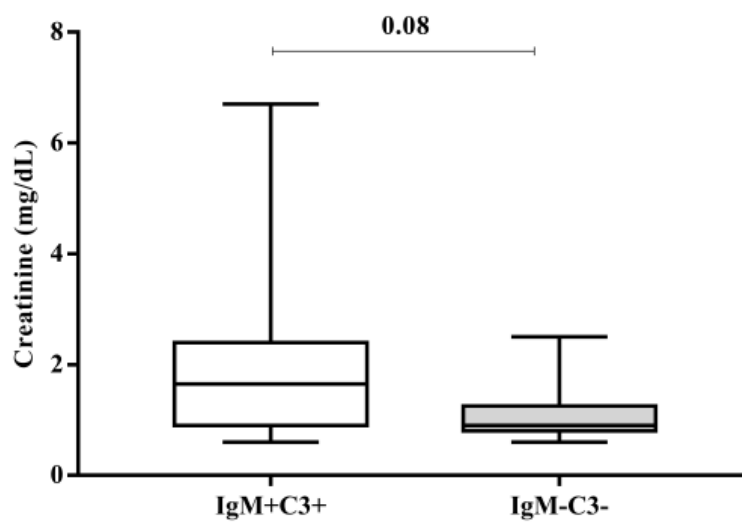


Figure 4. Serum creatinine in patients with podocytopathies and IgM and C3 codeposition. Serum creatinine values in patients with podocytopathies with or without IgM and C3 codeposition in renal biopsies.