

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Cyntia Camilo Franco Borges Zago

Avaliação dos podócitos nas diferentes classes da Nefrite Lúpica

Uberaba

2023

Cyntia Camilo Franco Borges Zago

Avaliação dos podócitos nas diferentes classes da Nefrite Lúpica

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

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva
Coorientadoras: Profas. Dras. Marlene Antônia dos Reis e Crislaine Aparecida da Silva

Uberaba

2023

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

Z23a Zago, Cyntia Camilo Franco Borges
Avaliação dos podócitos nas diferentes classes de nefrite lúpica
/ Cyntia Camilo Franco Borges Zago. – 2023.
89 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023
Orientadora: Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva
Coorientadoras: Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis e Dra. Crislaine
Aparecida da Silva

1. Nefrite lúpica. 2. Lúpus eritematoso sistêmico. 3. Podócitos I. Silva,
Juliana Reis Machado e. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

Sônia Maria Rezende Paolinelli - Bibliotecária CRB-6/1191

CYNTIA CAMILO FRANCO BORGES ZAGO

Avaliação dos podócitos nas diferentes classes de Nefrite Lúpica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa” (Linha de Pesquisa: Aspectos morfológicos, celulares e moleculares das doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

22 de dezembro de 2023

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva – Orientadora - UFTM

Profa. Dra. Aline Cristina Souza da Silva - UFTM

Prof. Dr. Lúcio Roberto Caçado Castellano - Universidade Federal da Paraíba



Documento assinado eletronicamente por **JULIANA REIS MACHADO E SILVA**, **Professor do Magistério Superior**, em 19/02/2024, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALINE CRISTINA SOUZA DA SILVA**, **Técnico-Administrativo em Educação**, em 20/02/2024, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lúcio Roberto Caçado Castellano**, **Usuário Externo**, em 20/02/2024, às 09:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 165, de 16 de junho de 2023](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1192120** e o código CRC **OFE454B7**.

Dedico ao meu marido, Aurélio, pelo incentivo e inspiração a encarar os desafios da vida com cautela e sabedoria.

Às minhas filhas Luiza e Heloísa por despertar em mim todos os dias a reflexão da razão da vida.

Aos meus pais por me incentivar sempre ir em busca de novas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva, por partilhar com maestria os seus conhecimentos científicos e docentes. Sou grata pela confiança entregue a mim durante todo trabalho desempenhado.

Agradeço as minhas coorientadoras, Profa. Dra. Crislaine Aparecida da Silva, por todos os ensinamentos partilhados durante toda a pós-graduação. Serei sempre grata por transmitir a mim segurança e me acolher de forma atenciosa e com muita presteza, e Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis, pelos ensinamentos durante a realização das disciplinas.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa em Rim (CePrim-UFTM) pela disponibilidade e ajuda na realização do estudo.

“O crescimento na vida ocorre unicamente quando as pessoas confrontam seus problemas, lutam por resolvê-los e, por essa luta, desenvolvem novas habilidades, capacidades e pontos de vista.”

Carl Rogers

RESUMO

Introdução: O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune caracterizada por produção de autoanticorpos em resposta a presença de autoantígeno, o que resulta na formação de imunocomplexos (IC). Uma das manifestações mais grave do LES é a Nefrite Lúpica (NL), uma glomerulonefrite resultante da deposição de IC circulantes ou formados *in situ* nos glomérulos. Morfologicamente o diagnóstico da NL é estabelecido por meio da biópsia renal, pela classificação histopatológica da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal, onde a doença é dividida em 6 classes histopatológicas e também é avaliada sua atividade e cronicidade de maneira semiquantitativa, sendo a pontuação total de 24 para o índice de atividade e 12 para o índice de cronicidade. Clinicamente a NL pode cursar com síndrome nefrótica ocasionada por alteração da barreira de filtração glomerular (BFG) que é formada pelos podócitos, que são células epiteliais viscerais, a membrana basal glomerular e as células do endotélio fenestrado. A patogênese da NL envolve complexas interações entre depósitos de imunocomplexos, citocinas inflamatórias e a resposta imunológica, afetando diretamente os podócitos. Portanto, pesquisas relacionadas aos podócitos podem detalhar mecanismos envolvidos na patogênese da NL, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas.

Objetivos: Avaliar os podócitos nas diferentes classes da NL em biópsias renais realizadas pelo Centro de Pesquisa em Rim (CePRim), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Métodos: Foi realizada a quantificação dos podócitos por imuno-histoquímica com WT1 para análise da densidade de podócitos e foi mensurado a largura dos pedicelos por meio de microscopia eletrônica de transmissão para avaliação do apagamento dos pedicelos. Foram selecionados 20 casos controles e 29 casos de biópsia renal com diagnóstico de NL, divididos de acordo com as classes histopatológicas da doença e de acordo com os depósitos encontrados na imunofluorescência, sendo os grupos IgG+IgM+C1q+C3 e Ful-House (IgA+IgG+IgM+C1q+C3).

Resultados: A densidade dos podócitos foi menor no grupo NL em relação ao grupo controle e essa redução foi observada em todas as classes analisadas quando comparadas com o grupo controle. Observamos mais apagamento de pedicelos no grupo NL em relação ao grupo controle e houve mais apagamento nos grupos classes I/II e classe IV em comparação ao grupo controle. Comparando as classes, no grupo classe IV foi observado mais apagamento dos pedicelos em relação ao grupo classe III. Foi observado aumento nos níveis de proteinúria conforme a evolução das classes e o grupo classe IV apresentou maior nível de proteinúria em relação ao grupo classes I/II. Foi observada uma correlação forte, positiva e

significativa entre o índice de atividade e o apagamento de pedicelos no grupo classe IV. Foi observado uma redução da densidade de podócitos nos grupos IgG+IgM+C1q+C3 e Ful-House, e maior apagamento dos pedicelos nesses grupos em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A evolução das classes da Nefrite Lúpica tem relação com a redução de podócitos e apagamento dos pedicelos. Os podócitos têm papel importante no desenvolvimento da Nefrite Lúpica, especialmente na classe IV. Essa classe apresenta mais apagamento dos pedicelos e essa lesão tem relação com a atividade da doença.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico, Nefrite Lúpica, Podócitos.

ABSTRACT

Introduction: Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease characterized by the production of autoantibodies in response to the presence of autoantigen, resulting in the formation of immune complexes (IC). One of the most severe manifestations of SLE is Lupus Nephritis (LN), a glomerulonephritis resulting from the deposition of circulating IC or those formed in situ in the glomeruli. Morphologically, the diagnosis of LN is established through renal biopsy, by the histopathological classification of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society, where the disease is divided into 6 histopathological classes and its activity and chronicity are also evaluated semi-quantitatively, with a total score of 24 for the activity index and 12 for the chronicity index. Clinically, LN may present with nephrotic syndrome caused by alterations in the glomerular filtration barrier (GFB) formed by podocytes, which are visceral epithelial cells, the glomerular basement membrane, and fenestrated endothelial cells. The pathogenesis of LN involves complex interactions between immune complex deposits, inflammatory cytokines, and the immune response, directly affecting podocytes. Therefore, research related to podocytes can elucidate mechanisms involved in the pathogenesis of LN, contributing to the development of more effective and specific therapeutic strategies. **Objectives:** To evaluate podocytes in different classes of LN in renal biopsies performed by the Kidney Research Center (CePRim) at the Federal University of Triângulo Mineiro. **Methods:** Podocyte quantification was performed by immunohistochemistry with WT1 for analysis of podocyte density, and the width of the podocyte foot process was measured by transmission electron microscopy to assess foot process effacement. Twenty control cases and 29 renal biopsy cases diagnosed with LN were selected, divided according to the histopathological classes of the disease and according to the deposits found in immunofluorescence, with the groups IgG+IgM+C1q+C3 and Full-House (IgA+IgG+IgM+C1q+C3). **Results:** Podocyte density was lower in the LN group compared to the control group, and this reduction was observed in all classes analyzed when compared to the control group. We observed more foot process effacement in the LN group compared to the control group, and there was more effacement in groups classes I/II and class IV compared to the control group. Comparing the classes, in the class IV group, more foot process effacement was observed compared to the class III group. An increase in proteinuria levels was observed as the classes progressed, and the class IV group presented higher proteinuria levels compared to the classes I/II group. A strong, positive, and significant correlation was observed between the activity index and foot process effacement in the class IV group. A reduction in podocyte

density was observed in the IgG+IgM+C1q+C3 and Full-House groups, and greater foot process effacement was observed in these groups compared to the control group. **Conclusion:** The progression of Lupus Nephritis classes is related to the reduction of podocytes and foot process effacement. Podocytes play an important role in the development of Lupus Nephritis, especially in class IV. This class presents more pedicel effacement, and this lesion is related to disease activity.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, Lupus Nephritis, Podocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Rim..... | 16 |
| Figura 2 - Alça glomerular visualizada sob microscopia eletrônica de transmissão..... | 18 |
| Figura 3 - Microscopia de luz de um glomérulo imunomarcado por WT1 | 29 |
| Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de uma alça glomerular | 30 |
| Figura 5 - Distribuição dos casos estudados de acordo com a classificação da Nefrite Lúpica | 32 |
| Figura 6 - Análise da densidade de podócitos em casos de Nefrite Lúpica e grupo controle .. | 34 |
| Figura 7 - Análise da densidade de podócitos nas diferentes classes da Nefrite Lúpica e no grupo controle..... | 35 |
| Figura 8 - Avaliação do apagamento dos pedicelos em casos de Nefrite Lúpica | 37 |
| Figura 9 - Avaliação do apagamento dos pedicelos nas diferentes classes da Nefrite Lúpica. | 38 |
| Figura 10 – Análise da correlação entre a densidade de podócitos e o apagamento dos pedicelos no grupo Nefrite Lúpica | 39 |
| Figura 11 - Níveis de proteinúria nos pacientes com Nefrite Lúpica..... | 41 |
| Figura 12 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos nas classes III e IV | 42 |
| Figura 13 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos na classe III..... | 43 |
| Figura 14 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos na classe IV | 44 |
| Figura 15 - Análise da densidade de podócitos de acordo com os depósitos encontrados na imunofluorescência direta..... | 45 |
| Figura 16 - Análise do apagamento dos pedicelos de acordo com os depósitos na imunofluorescência..... | 46 |
| | |
| Prancha 1 - Imunomarcção glomerular de WT1 no grupo controle e classes estudadas da Nefrite Lúpica..... | 36 |
| Prancha 2 – Apagamento de pedicelos na microscopia eletrônica de transmissão no grupo controle e nos casos de Nefrite Lúpica..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais | 33 |
| Tabela 2 – Depósitos de imunocomplexos, apagamento de pedicelos e densidade de podócitos do grupo NL..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFG: barreira de filtração glomerular
C3: proteína C3 do complemento
C1q: proteína C1q do complemento
FPW: foot process width (apagamento de pedicelos)
GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago
IgG: imunoglobulina G
IgA: imunoglobulina A
IC: imunocomplexos
IgM: imunoglobulina M
IL-6: interleucina 6
IL-8: interleucina 8
IL-10: interleucina 10
IF: imunofluorescência
IFN- γ : interferon
IP-10: proteína 10 indutora de interferon gama
LES: Lúpus Eritematoso sistêmico
MBG: membrana basal glomerular
M-CSF: fator estimulador de macrófago
MET: microscopia eletrônica de transmissão
ML: microscopia de luz
NL: nefrite lúpica
PEC: célula epitelial parieral
RNA: ácido ribonucleico
TNF α : fator de necrose tumoral α
UCH-L1: Ubectina C terminal hydrolase L1
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
WT1: gene supressor do Tumor de Wilms

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 RIM | 15 |
| 1.1.1 Néfron | 15 |
| 1.1.2 Glomérulo | 16 |
| 1.1.3 Podócitos | 17 |
| 1.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO | 18 |
| 1.3 NEFRITE LÚPICA | 20 |
| 1.4 NEFRITE LÚPICA E ALTERAÇÕES PODOCITÁRIAS | 22 |
| 2 HIPÓTESE..... | 24 |
| 3 JUSTIFICATIVA..... | 25 |
| 4 OBJETIVO GERAL | 26 |
| 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 26 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS..... | 27 |
| 5.1 MATERIAL | 27 |
| 5.2 MÉTODOS | 27 |
| 5.2.1 Microscopia de fluorescência | 27 |
| 5.2.2 Imuno-histoquímica para WT1 | 28 |
| 5.2.2.1 Morfometria da Imunomarcção..... | 28 |
| 5.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão | 29 |
| 5.2.3.1 Morfometria do apagamento dos pedicelos | 29 |
| 5.2.4 Análise estatística | 30 |
| 5.2.5 Normas para confecção da dissertação científica..... | 30 |
| 5.2.6 Aspectos éticos | 31 |
| 6 RESULTADOS..... | 32 |
| 6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE NEFRITE LÚPICA..... | 32 |
| 6.2 PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL DOS CASOS COM NEFRITE LÚPICA..... | 32 |
| 6.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS PODOCITOS | 33 |
| 6.4 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS PEDICELOS | 36 |
| 6.5 ANÁLISE DO GRAU DE PROTEINÚRIA NAS CLASSES DE NEFRITE LÚPICA | 40 |
| 6.6 CORRELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE ATIVIDADE E DE CRONICIDADE COM O APAGAMENTO DOS PEDICELOS NAS CLASSES III E IV DA NEFRITE LÚPICA..... | 41 |
| 6.7 AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO NA NEFRITE LÚPICA..... | 44 |
| 7 DISCUSSÃO | 47 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 51 |
| 9 CONCLUSÃO | 52 |
| REFERÊNCIAS..... | 53 |

| | |
|---------------|----|
| ANEXO I..... | 60 |
| ANEXO II..... | 71 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 RIM

Os rins são um dos órgãos que compõem o sistema urinário e desempenham como funções manutenção do equilíbrio hídrico; manutenção do equilíbrio eletrolítico; manutenção do equilíbrio ácido-básico; excreção de catabólitos e função reguladora hormonal. Realizam a maior parte da excreção, filtrando o sangue e eliminando deste, os resíduos metabólicos do corpo. O rim possui um sistema de tubos condutores do produto deste filtrado, que é a urina, o qual chamamos de vias urinárias que são compostas por pelve renal, ureteres, bexiga urinária e uretra que completam o sistema urinário. São componentes específicos do rim os néfrons, os tubos coletores e uma microvasculatura exclusiva. Uma característica do rim humano é ser multi-papilar, contendo aproximadamente um milhão de néfrons, embora esse número possa variar. Durante a embriogênese, a quantidade de néfrons é estabelecida não modificando após o nascimento, fazendo com que cada néfron perdido não possa ser substituído (KAYE; GOLDBERG, 1982).

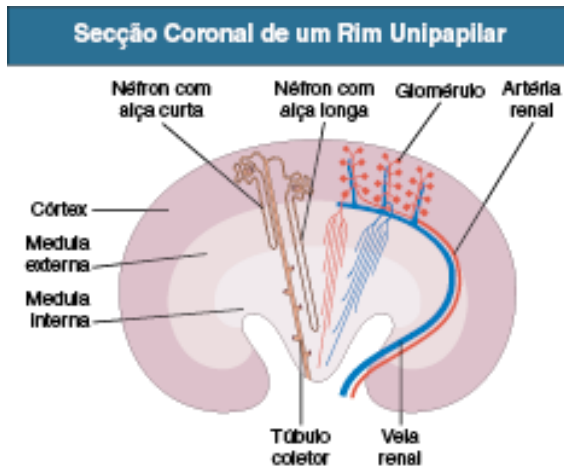
1.1.1 Néfron

O néfron representa a unidade funcional primordial do rim, desempenhando um papel essencial na produção de urina altamente concentrada por meio da criação de um ultrafiltrado a partir do sangue. Compreende um corpúsculo renal, conhecido como glomérulo, interligado a um complexo e sinuoso sistema tubular que se encaminha para um tubo coletor. Vale ressaltar a existência de três distintas categorias de néfrons, identificadas com base na localização dos corpúsculos renais ao longo do córtex renal, a saber: néfrons superficiais, subcorticais e justamedulares. A porção tubular do néfron abarca o túbulo proximal e distal, unidos pela alça de Henle. Importante mencionar que existem dois subtipos de néfrons, aqueles dotados de uma alça de Henle longa e aqueles com uma alça de Henle curta. As alças curtas regressam na medula externa ou, até mesmo, no córtex, sendo referidas como alças corticais, enquanto as alças longas se estendem em direção aos níveis consecutivos da medula interna (QUAGGIN; KREIDBERG, 2008).

Cada néfron (Figura 1) é cercado por uma rede de capilares. Os ramos das artérias interlobulares renais entram num néfron como arteríola aferente, formam um tufo capilar (glomérulo) e depois saem do néfron na forma de arteríola eferente. A rede capilar, continua a circundar o sistema tubular renal dos néfrons na forma de capilares peritubulares, formando vasos retos (vasa recta) ao redor da alça de Henle. O corpúsculo renal é o aparelho de filtração

do néfron. Cada corpúsculo é composto pelo glomérulo, cápsula glomerular (de Bowman) e espaço de Bowman (CHADE, 2013).

Figura 1 - Rim



Fonte: Richard J. Johnson, 2016

Ilustração de uma secção coronal de um rim unipapilar, exemplificando a localização da artéria e veia renal, do glomérulo, do néfron de alça longa, do néfron de alça curta, do túbulo coletor, assim como as porções do córtex renal, abaixo dessa porção se encontra a medula externa e a medula interna.

1.1.2 Glomérulo

O glomérulo constitui uma trama de capilares, fixados no mesângio, derivados de ramos da artéria renal (arteríolas aferente e eferente). As arteríolas aferente e eferente entram e saem, respectivamente, no corpúsculo renal no polo vascular, enquanto o local onde a cápsula glomerular se estreita e continua como segmento espesso proximal do néfron é chamado de polo urinário. A cápsula glomerular envolve integralmente o glomérulo, compreendendo duas camadas distintas (parietal e visceral) que delineiam uma cavidade denominada espaço capsular glomerular, também conhecido como espaço de Bowman ou espaço urinário. A camada parietal externa é formada por epitélio pavimentoso (escamoso) simples e é contínua com os túbulos dos néfrons. A camada visceral interna é constituída por células especializadas, denominadas podócitos. Os podócitos (células epiteliais viscerais) recobrem as paredes dos capilares glomerulares, interdigitando-se entre si e formando fendas estreitas entre as suas projeções (POLLAK; QUAGGIN; HOENIG; DWORKIN, 2014).

A formação da urina se inicia no corpúsculo renal. O sangue proveniente da circulação sistêmica passa através dos capilares glomerulares resultando na produção do ultrafiltrado (urina primária). Nesse processo atua uma barreira de filtração especializada (Figura 2), a qual seletivamente retira da corrente sanguínea a água e os solutos que passam pelos capilares glomerulares. O ultrafiltrado glomerular é, então, coletado no espaço glomerular e direcionado

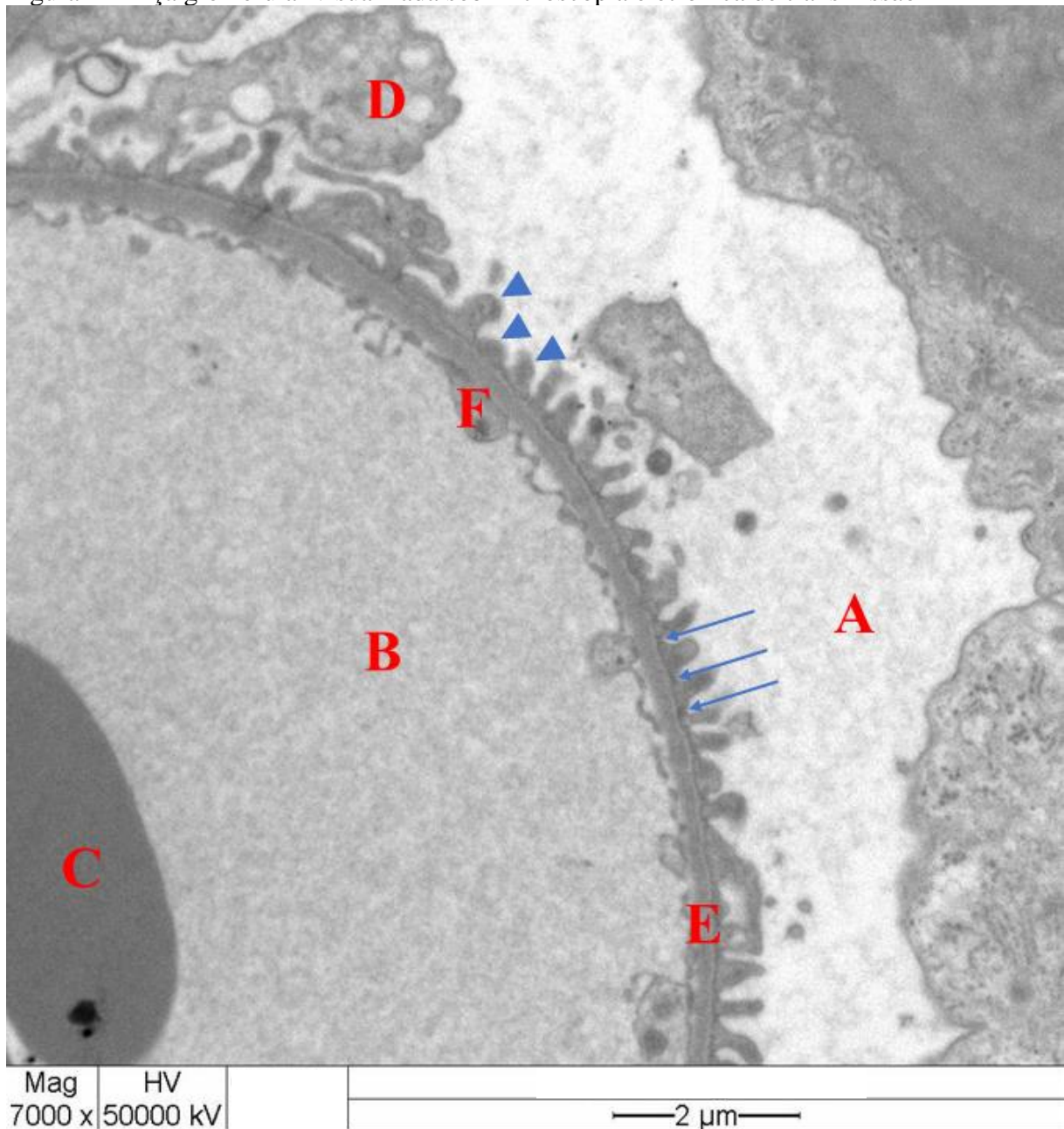
para os túbulos renais. O aparato de filtração renal é composto por três camadas de tecidos distintas: o endotélio dos capilares glomerulares, a membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos, que compõem a camada visceral da cápsula renal. Os capilares glomerulares são constituídos por um endotélio fenestrado, no qual as fenestras desempenham o papel de poros. A MBG é notavelmente mais complexa em comparação com outras membranas basais epiteliais, consistindo em três camadas: uma lâmina densa central espessa e duas camadas mais finas, a lâmina rara interna e a lâmina rara externa (SCOTT; QUAGGIN, 2015).

Os podócitos revestem as paredes dos capilares glomerulares, sendo que suas projeções em forma de dedos, conhecidas como pedicelos, se entrelaçam, formando estreitas fendas de filtração, também chamadas de diafragmas de filtração. Essas três camadas atuam em conjunto como um filtro seletivo e é denominada barreira de filtração glomerular (BFG). Esta permite a passagem apenas de moléculas com tamanho e carga específicos, enquanto retêm componentes como células sanguíneas, plaquetas, algumas proteínas e alguns ânions. A água e os solutos, por outro lado, são liberados para entrar no sistema tubular renal. O sangue não filtrado restante é encaminhado para fora do glomérulo através da arteríola eferente, retornando assim ao sistema venoso (CHENG; HARRIS, 2010).

1.1.3 Podócitos

Os podócitos são células epiteliais viscerais altamente especializadas, com uma arquitetura única, que revestem a superfície exterior dos capilares glomerulares, onde se ligam à membrana basal glomerular da parede do capilar, mantendo a BFG que é seletiva para proteínas e células sanguíneas em termos de carga e tamanho específico (PAVENSTÄDT; KRIZ; KRETZLER, 2003). Sua arquitetura tridimensional é sustentada por um citoesqueleto de actina e apresentam um corpo celular que emite prolongamentos chamados pedicelos que se interdigitam formando a fenda de filtração glomerular (WELSH; SALEEM, 2012). A fenda de filtração glomerular é uma estrutura celular única formada por proteínas específicas dos podócitos. Os podócitos e o diafragma em fenda possuem moléculas proteicas como a proteína de tumor de Wilms (WT1), nefrina, synaptopodina, e podocalyxina, fundamentais para a manutenção da BFG, impedindo a migração de proteínas e solutos da circulação para urina (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010).

Figura 2 - Alça glomerular visualizada sob microscopia eletrônica de transmissão



Fonte: Centro de Pesquisa em Rim – CePRim UFTM

Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando uma alça glomerular. A) Espaço urinário. B) Luz do capilar. C) Hemácia dentro do capilar. D) Podócito e pedicelos (cabeça de seta) voltados para o espaço urinário. Entre um podócito e outro se encontra o diafragma em fenda (setas). E) Membrana basal glomerular. F) Endotélio fenestrado. A barreira de filtração glomerular é formada pelo endotélio fenestrado, pela membrana basal glomerular e os pedicelos.

1.2 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune, com considerável morbidade e mortalidade, caracterizada pela produção de autoanticorpos e deposição de complexos imunes, afetando diferentes órgãos. Embora sua patogênese não esteja totalmente definida ainda, sabe-se que ocorre a síntese de autoanticorpos combinados com

fatores genéticos, hormonais e ambientais. Clinicamente, o LES é uma doença altamente heterogênea e multissistêmica, resultado da produção de autoanticorpos contra autoantígenos e da resposta inflamatória *in situ* causada pela deposição de imunocomplexos (PAN; LU; WANG; XU *et al.*, 2020).

Dentre as manifestações do LES, a cutânea é a mais comum, atingindo cerca de 75% a 89% dos pacientes, com o *rash* malar sendo a sua principal característica. Essa doença pode afetar também os sistemas hematológico, respiratório, neurológico, gastrointestinal, oftalmológico e renal (KIRIAKIDOU; CHING, 2020). A manifestação hematológica é caracterizada por trombocitopenia, leucopenia, anemia, linfopenia no momento da alta atividade da doença (VILÁ; ALARCÓN; MCGWIN; BASTIAN *et al.*, 2006). Aproximadamente, 30% a 50% dos pacientes podem apresentar repercussões pulmonares (MITTOO; FELL, 2014) como a pleurite lúpica. As manifestações neurológicas são decorrentes de vasculopatias, autoanticorpos e mediadores inflamatórios, o que pode levar o paciente a apresentar cefaleias, meningites assépticas, neuropatias periféricas, distúrbio do sistema autônomo, entre outras condições. No sistema gastrointestinal, observa-se vasculites mesentéricas e doenças hepatobiliares (KIRIAKIDOU; CHING, 2020). As manifestações oculares do LES incluem ceratoconjuntivite, ceratites, uveítes, vasculite da retina, oclusão de artéria e veia da retina, e retinopatia (SILPA-ARCHA; LEE; FOSTER, 2016).

Grande parte dos pacientes com LES apresentam envolvimento renal e no rim leva a Nefrite Lúpica (NL) cujo diagnóstico precoce é fundamental, pois quando é dado de forma tardia, pode levar a perda da função renal. A NL é uma forma de glomerulonefrite que afeta aproximadamente 56% dos pacientes com LES, porém em alguns casos a manifestação da NL antecede o diagnóstico de LES (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS *et al.*, 2020).

A incidência e a prevalência do LES e da NL podem variar de acordo com a população a ser estudada, levando em consideração a especificidade da raça e do território (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS *et al.*, 2020). Uma pesquisa realizada no período de 2000 a 2004 com base em dados coletados de solicitações de atendimentos médicos, revelou que a incidência e a prevalência de NL é maior em afro-americanos (10,65 por 100.000 pessoas ao ano e de 59,69 para 100.000 pessoas), hispânicos (6,88 para 100.000 pessoas ao ano, 29,84 -100.000 pessoas e asiáticos (5,46 por 100.000 pessoas ao ano e de 56,56 por 100.000 pessoas). Já na população branca, a ocorrência é menor, com incidência de 4,07 por 100.000 pessoas ao ano e prevalência de 15,83 por 100.000 pessoas (FELDMAN; HIRAKI; LIU; FISCHER *et al.*, 2013).

Estudos mostraram que pacientes jovens com LES, do sexo masculino e de etnia africana, asiática ou hispânica são mais propícios ao desenvolvimento de NL (BASTIAN;

ROSEMAN; MCGWIN; ALARCÓN *et al.*, 2002; SELIGMAN; LUM; OLSON; LI *et al.*, 2002). No Brasil, dados numéricos a respeito do LES e NL são escassos, possivelmente devido à vasta extensão territorial do país. A maioria dos dados coletados é da região sul e sudeste ou provém de estudos de coortes da América Latina (CONSIGLIO; JULIANA DA SILVEIRA; MONTICIELO; XAVIER *et al.*, 2014). É importante ressaltar que o Brasil é um país marcado por uma grande miscigenação racial e pela presença significativa de ascendência africana, o que pode contribuir para a alta incidência e gravidade do LES no país (GLESSE; VIANNA; PAIM; MATTE *et al.*, 2017).

1.3 NEFRITE LÚPICA

A NL normalmente desenvolve em pacientes jovens com LES e foi identificada como a terceira causa mais comum de glomerulopatias em pacientes pediátricos em um centro de diagnóstico em Minas Gerais (ROCHA; CARMINATI; MACHADO; LATERZA *et al.*, 2013). Apesar dos avanços dos conhecimentos e das melhores opções de tratamento, a NL continua sendo uma causa significativa de morbidade e mortalidade entre pacientes com LES (BERNATSKY; BOIVIN; JOSEPH; MANZI *et al.*, 2006) e cerca de 10% a 30% dos pacientes evoluem para insuficiência renal, necessitando de terapia de substituição renal (PARIKH; ALMAANI; BRODSKY; ROVIN, 2020).

Morfologicamente, o diagnóstico da NL é estabelecido por meio da biópsia renal, que possibilita a identificação da etiologia subjacente ao fenótipo clínico observado e a caracterização do subtipo da NL com base nos diferentes padrões histológicos (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS *et al.*, 2020) e é de extrema importância o diagnóstico de NL, especialmente a silenciosa (FONT; TORRAS; CERVERA; DARNELL *et al.*, 1987). Os achados histológicos obtidos na biópsia renal indicam o grau da evolução da doença e a extensão do dano tecidual causado, fornecendo informações fundamentais para o planejamento do tratamento terapêutico do paciente (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS *et al.*, 2020). A realização da biópsia renal é recomendada para pacientes com LES, que apresentam uma proteinúria acima de 500 mg/dia, ou cilindros hemáticos na urina e diminuição da função renal (ROVIN; PARIKH; ALVARADO, 2014).

Para análise histopatológica da amostra, são imprescindíveis o manuseio adequado e o uso de colorações especiais para avaliar o número de glomérulos, a celularidade e as alterações das paredes dos capilares (WEENING; D'AGATI; SCHWARTZ; SESHAN *et al.*, 2004). É recomendável que a biópsia contenha, no mínimo, 10 glomérulos para possibilitar a avaliação da presença de lesão focal ou difusa. A análise completa da biópsia renal, por meio da técnica

de imunofluorescência direta é indispensável e deve incluir pesquisa para as cadeias pesadas de imunoglobulinas IgG, IgA, IgM, e cadeias leves *Kappa* e *Lambda*, além dos componentes do complemento C3 e C1q. A microscopia eletrônica deverá ser levada em consideração, pois é indispensável para análise de alguns casos (AMANN; HAAS, 2006).

A classificação histopatológica atualmente aceita da NL é a Classificação da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal, que se baseia na localização dos depósitos de imunocomplexos nos glomérulos, na extensão do envolvimento glomerular (lesão proliferativa mesangial, endocapilar, extracapilar) e se o padrão de lesão reflete inflamação aguda (doença ativa) ou esclerose (doença crônica). Nessa classificação, a NL é diferenciada em 6 classes histopatológicas (WEENING; D'AGATI; SCHWARTZ; SESHAN *et al.*, 2004; BAJEMA; WILHELMUS; ALPERS; BRUIJN *et al.*, 2018).

A classe I é definida como NL mesangial mínima, sendo característico o acúmulo de imunocomplexos no mesângio, observados somente na microscopia eletrônica de transmissão e na imunofluorescência. Na microscopia de luz, não é visível nenhuma alteração. A classe II apresenta como característica um aumento de hiper celularidade no mesângio além dos depósitos de imunocomplexos, sendo denominada como NL proliferativa mesangial. Na classe III como há um comprometimento de menos de 50% dos glomérulos da amostra, é nomeada como NL focal. Nessa classe, podem ser observadas lesões proliferativas endocapilares com ou sem necrose nas paredes dos capilares e crescentes. A classe IV, conhecida como glomerulonefrite proliferativa difusa, é a classe com 50% ou mais dos glomérulos da amostra comprometidos. Essa classe apresenta depósitos de imunocomplexos subendoteliais, mesangiais e hiper celularidade. São características marcantes da classe IV: a presença de lesões do tipo “*Wire loop*”, trombo hialino, proliferação celular endocapilar, infiltrados de células inflamatórias, necrose fibrinoide, crescente celular, crescente fibrocelular e inflamação intersticial. A classe V, também conhecida como glomerulonefrite membranosa, é caracterizada pela presença de depósitos de imunocomplexos subepiteliais e pode estar associada às classes III e IV. A classe VI, glomerulonefrite esclerosante, representa um estágio avançado da NL, com 90% ou mais dos glomérulos esclerosados (BAJEMA; WILHELMUS; ALPERS; BRUIJN *et al.*, 2018; WEENING; D'AGATI; SCHWARTZ; SESHAN *et al.*, 2004).

A classificação também propõe o uso de um sistema de avaliação da atividade e de cronicidade da doença de maneira semiquantitativa, sendo a pontuação total de 24 para o índice de atividade e 12 para o índice de cronicidade. Para avaliação do índice de atividade, os critérios são hiper celularidade endocapilar, infiltrado neutrofílico e cariorrexe, necrose fibrinoide, depósitos hialinos, crescentes celulares ou fibrocelulares e inflamação intersticial. Já para

avaliação do índice de cronicidade os critérios são glomeruloesclerose, crescente fibrosa, atrofia tubular e fibrose intersticial (BAJEMA; WILHELMUS; ALPERS; BRUIJN *et al.*, 2018; CHOI; FOGO; LIM, 2023).

A patogênese da NL está relacionada à deposição de imunocomplexos circulantes nos rins e à produção dos imunocomplexos *in situ*. Esses imunocomplexos depositados no rim, desencadeiam ativação do sistema complemento pela via clássica, bem como ativação de macrófagos e neutrófilos, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e na produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando inflamação tecidual. Mediadores inflamatórios, pró-fibróticos, fatores de crescimento como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ), contribuem para a lesão glomerular, lesão em podócitos, hiperplasia mesangial, endotelial, e epitelial parietal, além do aumento da produção e deposição de matriz extracelular resultando na alteração da função renal (FLORES-MENDOZA; SANSÓN; RODRÍGUEZ-CASTRO; CRISPÍN *et al.*, 2018).

A lesão glomerular leva ao mal funcionamento da BFG, da qual os podócitos fazem parte, juntamente com as células endoteliais e a membrana basal glomerular. Na presença de glomerulonefrite na NL é bem caracterizada a proteinúria que é o sinal clínico decorrente de lesão aos podócitos (YU; HAAS; GLASSOCK; ZHAO, 2017) e já foi demonstrado aumento de expressão urinária de podócitos em casos de NL (BOLLAIN-Y-GOYTIA; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA; TORRES-DEL-MURO; DAZA-BENITEZ *et al.*, 2011) o que destaca a importância das lesões podocitárias na NL.

1.4 NEFRITE LÚPICA E ALTERAÇÕES PODOCITÁRIAS

Lesão dos podócitos é uma etapa fundamental na progressão da doença glomerular e na NL está relacionada com as alterações estruturais e moleculares dos podócitos (DOS SANTOS; POLETTI; MILHORANSA; MONTICIELO *et al.*, 2017).

Os podócitos são alvos tanto diretos quanto indiretos dos depósitos de imunocomplexos na NL (WANG; YU; SONG; WANG *et al.*, 2014), contribuindo tanto com a imunidade adaptativa atuando como célula apresentadora de antígenos (BRUSCHI; GALETTI; SINICO; MORONI *et al.*, 2015), quanto com a imunidade inata, expressando receptores toll-like (MACHIDA; ITO; HIROSE; TAKESHITA *et al.*, 2010). Os podócitos também participam para o ambiente inflamatório aumentando a produção de TNF- α , IL-6, IL-8, VEGF, GM-CSF, M-CSF, além da produção de proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10) e IL-10 o que leva a diferenciação e maturação das células imunes e perpetuação da resposta inflamatória. Os

podócitos também são alvos de autoanticorpos produzidos contra α -actina4 (MASON; RAVIRAJAN; RAHMAN; PUTTERMAN *et al.*, 2004) e respondem aos estímulos inflamatórios com o apagamento de pedicelos (WRIGHT; BERESFORD, 2018).

A lesão podocitária é observada em várias classes da doença e o apagamento dos pedicelos está associado à proteinúria grave, tanto nas formas não proliferativas (DESAI; CIMBALUK; LEWIS; WHITTIER, 2013) quanto nas proliferativas (WANG; YU; SONG; WANG *et al.*, 2014). Na NL proliferativa foi observada uma diminuição da expressão de marcadores de podócitos tanto em nível proteico quanto em nível de RNAm (REZENDE; VIANA; MALHEIROS; BORBA *et al.*, 2014). Além disso, a NL proliferativa pode apresentar formação de crescente, sendo chamada de glomerulonefrite crescêntica. Essa forma pode manifestar em 35% dos pacientes com diagnóstico de NL (CHEN; TANG; XIANG; LI *et al.*, 2016). A formação de crescentes resulta da proliferação de células glomerulares locais e infiltração de células inflamatórias no espaço de Bowman, e os podócitos contribuem para a formação dessas crescentes. Durante a formação de crescente, há alteração no fenótipo dos podócitos com a perda de marcadores específicos e os podócitos desdiferenciados podem migrar e entrar em ciclo celular (MOELLER; SOOFI; HARTMANN; LE HIR *et al.*, 2004). Existe também uma relação entre os podócitos e células parietais epiteliais (PECs). Essas últimas desempenham um papel importante na formação de crescentes (SHANKLAND; SMEETS; PIPPIN; MOELLER, 2014). A regulação negativa de podocina e sinaptopodina está relacionada com ativação de PECs na formação de crescentes (OKAMOTO; SASAKI; YAMAZAKI; SATO *et al.*, 2013).

A NL, como uma das manifestações mais graves do LES, pode levar a danos renais irreversíveis e comprometer seriamente a função renal. A patogênese da NL envolve complexas interações entre depósitos de imunocomplexos, citocinas inflamatórias e a resposta imunológica, afetando diretamente os podócitos, células fundamentais para integridade da barreira de filtração glomerular. O apagamento de pedicelos e a sua alteração estrutural e molecular têm sido associados a uma série de eventos que culminam em proteinúria e lesões renais. As classes da NL não são entidades estáticas e podem se transformar de uma classe em outra, evoluindo de forma espontânea ou após terapia realizada (BOMBACK, 2018). Portanto, pesquisas relacionadas aos podócitos podem detalhar mecanismos envolvidos na patogênese da NL, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas.

2 HIPÓTESE

A evolução da doença resulta em diminuição no número de podócitos e maior apagamento de pedicelos.

3 JUSTIFICATIVA

O LES é uma doença inflamatória crônica, autoimune, com considerável morbidade e mortalidade. Caracterizada pela deposição de complexos imunes, afetando diferentes órgãos. Embora sua patogênese não esteja completamente elucidada, sabe-se que ocorre a síntese de autoanticorpos combinados com fatores genéticos, hormonais e ambientais. Clinicamente, o LES é uma doença altamente heterogênea e multissistêmica, sendo que 50% dos pacientes desenvolvem a NL, e desses de 10% a 30% evoluem para insuficiência renal.

A NL é uma glomerulonefrite resultante do depósito de imunocomplexos nos glomérulos. O glomérulo é formado por podócitos, endotélio e célula mesangial. Portanto, a compreensão dos mecanismos de lesão nessas células, é de extrema importância para entendimento da patogênese da NL. Considerando as funções dos podócitos e sua importância para manutenção da BFG torna-se extremamente relevante estudar suas alterações morfológicas, que resultam no desenvolvimento da síndrome nefrótica que é uma importante característica sindrômica da NL. Dessa forma, pesquisas que relacionam as lesões podocitárias e gravidade da doença, podem contribuir para melhor entendimento da patogênese com vistas no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar os podócitos nas diferentes classes da NL em biópsias renais realizadas pelo Centro de Pesquisa em Rim (CePRim), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, no período de 2004 a 2021.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Quantificar o número de podócitos nas biópsias renais com diagnóstico de Nefrite Lúpica e no grupo controle por meio da imunomarcação de WT1;
- II. Comparar a densidade de podócitos nas diferentes classes da NL e no grupo controle;
- III. Avaliar o apagamento de pedicelos por meio da microscopia eletrônica de transmissão;
- IV. Comparar o apagamento de pedicelos nas diferentes classes da NL e no grupo controle;
- V. Relacionar a densidade dos podócitos com o apagamento de pedicelos;
- VI. Avaliar parâmetros clínicos relevantes em casos de NL;
- VII. Avaliar a relação da densidade de podócitos e o apagamento dos pedicelos com os critérios de cronicidade e atividade da doença;
- VIII. Avaliar a relação da densidade de podócitos e o apagamento dos pedicelos com os depósitos de imunocomplexos presentes na microscopia de fluorescência.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

O grupo teste foi composto por 29 amostras de casos de biópsias renais com diagnóstico de Nefrite Lúpica, realizadas por indicação clínica pelo Centro de Pesquisa em Rim (CePRim), no período de 2004 a 2021. Todo material utilizado apresentava três amostras completas [microscopia de luz comum (ML), imunofluorescência (IF) direta e microscopia eletrônica de transmissão (MET)] para análise. O grupo controle foi composto de 20 amostras de fragmentos de rim, provenientes de necropsias de indivíduos adultos cuja causa de morte não foi relacionada com doença renal ou doenças infecciosas.

Foram utilizados laudos e solicitações das biópsias para estudo descritivo referentes aos dados morfológicos e clínicos-epidemiológicos, respectivamente.

O diagnóstico foi realizado seguindo a última classificação da Nefrite Lúpica da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (ISN/RPS) incluindo a divisão em classes e os índices de atividade e cronicidade nas classes III e IV (BAJEMA; WILHELMUS; ALPERS; BRUIJN *et al.*, 2018).

Os critérios de exclusão foram: casos de pacientes cujas biópsias não haviam fragmentos para ML ou para IF e ME; pacientes pediátricos; pacientes que não apresentavam no pedido da biópsia, informações clínicas necessárias para o estudo; pacientes com diagnóstico de NL classe V por ser tratar de uma entidade independente; pacientes com diagnóstico de NL classe VI pois possui apenas 2 casos com esse diagnóstico em nosso setor. Iniciamos com 100 casos de NL e após aplicados os critérios de exclusão, obtivemos um número total de 29 casos, que foram divididos em grupos de acordo com o diagnóstico, sendo: grupo classes I/II (n=9), grupo classe III (n=6) e grupo classe IV (n=14).

Foi elaborada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) com os seguintes dados: Análise do exame anatomopatológico (NL e suas classes, índices de atividade e cronicidade e depósitos de imunocomplexos); epidemiológicos (idade, gênero); dados clínicos (presença ou não de hipertensão) e laboratoriais (proteinúria, creatinina, taxa de filtração glomerular estimada, albumina e hematúria).

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Microscopia de fluorescência

Para realização da técnica de imunofluorescência direta o fragmento a fresco foi lavado em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e congelado no nitrogênio líquido em solução para inclusão

em criostato. Foram confeccionadas lâminas para pesquisa das cadeias pesadas de imunoglobulinas A, M e G (IgA, IgM e IgG), cadeias leves das imunoglobulinas (*kappa* e *lambda*), proteínas do complemento (C3 e C1q) e fibrinogênio.

A análise desta técnica foi utilizada para identificar os imunocomplexos presentes em casos de NL.

5.2.2 Imuno-histoquímica para WT1

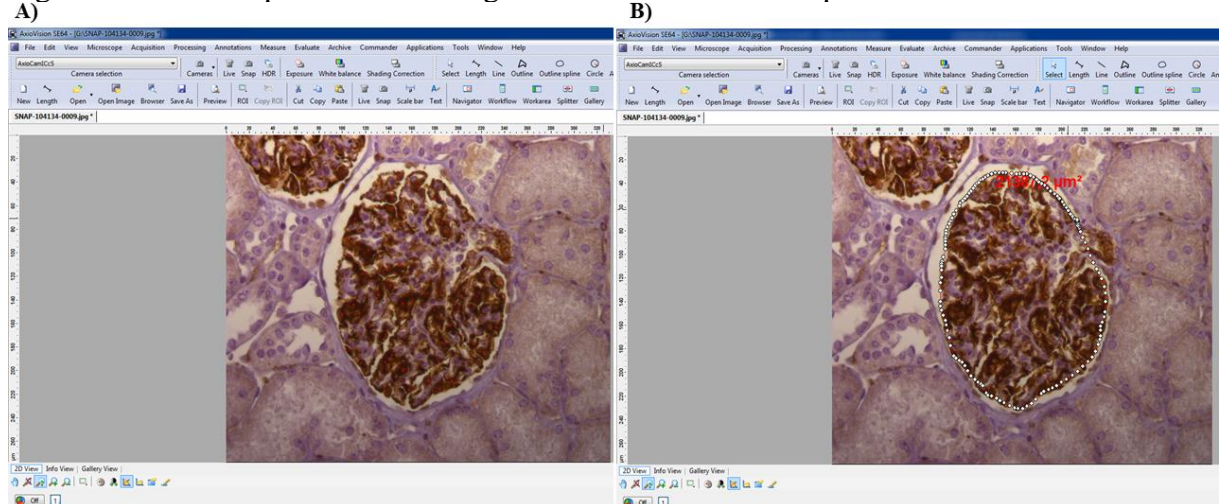
Para análise da expressão de WT1 foi realizada a técnica de imunoperoxidase nas lâminas selecionadas. Secções histológicas sequenciais de 2 µm de espessura de fragmentos emblocados em parafina foram submetidas a imuno-histoquímica, que foi realizada manualmente usando o sistema de polímero não biotilado Novolink (Novolink Polymer Detection System Kit, BL, UK). As lâminas foram desparafinizadas em xilol por 30 minutos e hidratadas em álcoois decrescentes (absoluto, 90%, 80% e 70%) até a água destilada. Posteriormente, foi realizada a recuperação dos antígenos à 121°C e 23 psi na panela Pascal (DAKO) com tampão citrato pH 6,0. Após essa etapa, as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS e incubadas em câmara úmida e escura com uma gota de bloqueador de peroxidase (Peroxidase block, Kit Novolink, BL, UK) por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com o bloqueador de proteínas (Protein block Kit Novolink, BL, UK) por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-WT1 (Dako) na diluição 1:500 por 2 horas, em câmara úmida e escura à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o reagente pós-primário (Post primary Kit Novolink, BL, UK) por 30 minutos à temperatura ambiente, depois lavadas com PBS e incubadas com o reagente polímero (Polymer Kit Novolink, BL, UK) por 30 minutos. Após, foram lavadas com PBS e incubadas com o cromógeno (Liquid DAB, Dako) por 2 minutos. Posteriormente, foram lavadas com água corrente e contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após, as lâminas foram 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 lamínula.

5.2.2.1 Morfometria da Imunomarcção

Foi realizada a quantificação dos números de podócitos nas lâminas imunomarcadas com WT1. As imagens dos glomérulos foram capturadas e digitalizadas por meio de uma câmera digital AxionCam ICc55 (Zeiss, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz com lente de aumento de 40X. Todos os podócitos imunomarcados de cor acastanhada foram contados

manualmente (Figura 3A) em cada glomérulo e a área de cada tufo glomerular foi medida (Figura 3B). Os resultados foram expressos em densidade de podócitos conforme (VENKATAREDDY; WANG; YANG; PATEL *et al.*, 2014).

Figura 3 - Microscopia de luz de um glomérulo imunomarcado por WT1



Fonte: da autora, 2023

Estudo morfométrico da imunomarcagem de WT1, composto por (A) contagem dos podócitos imunomarcados (cor marrom) evidenciados pelos asteriscos vermelhos e (B) mensuração da área glomerular.

5.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão

Fragmentos de biópsias renais fixados em Karnovsk+Vermelho de Rutênio foram processados para inclusão em resina e submetidos a cortes semi-finos de 250 nm de espessura e corados pelo azul de toluidina, a fim de identificar os melhores glomérulos para avaliação no microscópio eletrônico de transmissão. Uma vez escolhidos os glomérulos, o bloco foi aparado para realização dos cortes ultrafinos com espessura de 50 a 70 nm. A grade contendo o corte ultrafino foi examinada no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900.

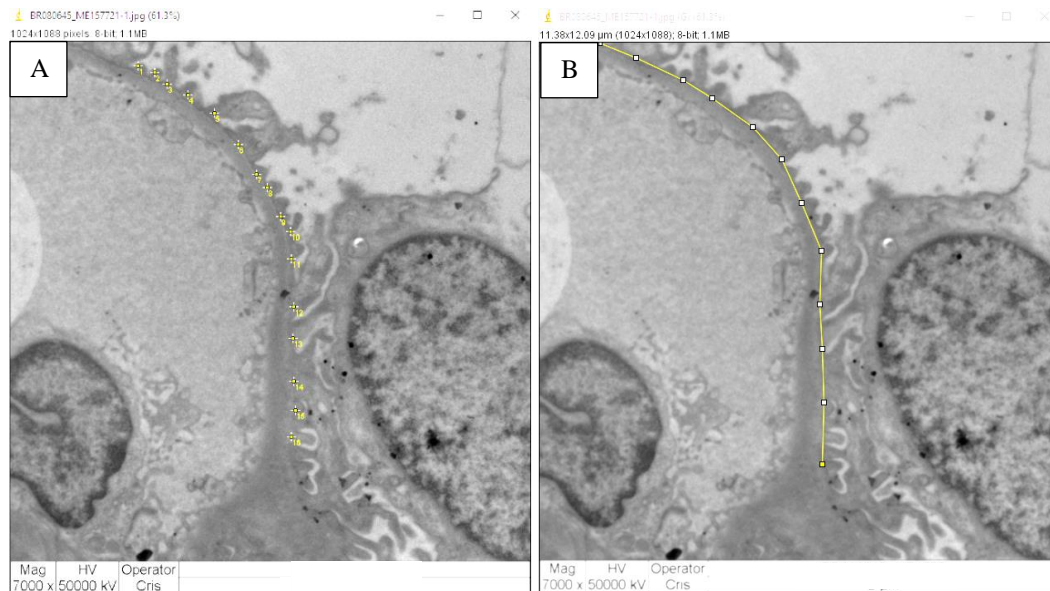
5.2.3.1 Morfometria do apagamento dos pedicelos

Imagens de todas as alças glomerulares disponíveis foram capturadas em uma amplificação de 7000x. A análise das imagens foi realizada com o programa semiautomático ImageJ 1.53t e o sistema foi calibrado usando a barra de escala nas micrografias eletrônicas.

Os pedicelos identificados foram contados e marcados manualmente (Figura 4A). Posteriormente, foi realizada a medição do comprimento da alça glomerular a ser estudada (Figura 4B). A estimativa da largura do pedicelo foi realizada por meio da fórmula $FPW = (\pi/4) \times (\Sigma \text{ comprimento de alça glomerular} / \Sigma \text{ do número de pedicelos})$ (MARTINS; BERNARDES; FERREIRA; WANDERLEY *et al.*, 2023; VAN DEN BERG; VAN DEN BERGH

WEERMAN; ASSMANN; WEENING *et al.*, 2004), sendo ($\pi/4$) um fator de correção para corrigir uma variação randomizada presumida no ângulo da seção relativa do eixo axial do pedicelo (GUNDERSEN; SEEFELDT; OSTERBY, 1980). A medida da largura dos pedicelos foi utilizada para avaliar o apagamento de pedicelos.

Figura 4 - Microscopia eletrônica de transmissão de uma alça glomerular



Fonte: elaborada pela autora, 2023

Estudo morfométrico da microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a (A) contagem dos pedicelos na alça glomerular e a (B) medida do comprimento da alça glomerular

5.2.4 Análise estatística

Para análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) e a análise dos dados foi realizada no programa GraphPad Prism (versão 7.0). As variáveis foram testadas e verificadas se apresentaram distribuição normal ou não normal, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e foi feita a análise de variância. Foram aplicados os testes não paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste de Mann-Whitney e o teste Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's na comparação entre 3 ou mais grupos. Para correlações foi utilizado o teste Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o p foi menor de 5% ($p < 0,05$).

5.2.5 Normas para confecção da dissertação científica

A redação do trabalho científico foi realizada com base no Manual para apresentação de trabalhos acadêmicos baseados nas normas de documentação de Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), elaborado pela biblioteca central da UFTM.

5.2.6 Aspectos éticos

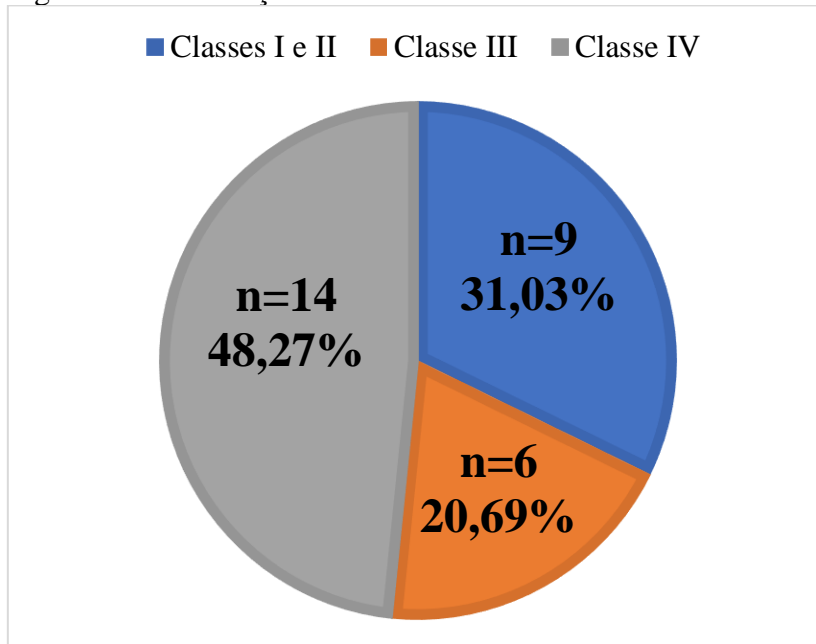
O projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Triângulo Mineiro, parecer 5.609.537 (Anexo I).

6 RESULTADOS

6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS DE NEFRITE LÚPICA

Esse estudo analisou 29 casos de biópsias renais com diagnóstico de NL realizadas pelas três técnicas de análises, microscopia de luz, imunofluorescência direta e microscopia eletrônica de transmissão, entre 2004 e 2021. Os casos estudados foram distribuídos em relação as classes da NL da seguinte maneira: 09 casos classes I e II, 06 casos classe III, 14 casos classe IV, sendo esta última a mais prevalente (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição dos casos estudados de acordo com a classificação da Nefrite Lúpica



Fonte: Elaborada pelo autor, 2023
n: número de casos

A predominância de casos no grupo NL corresponde a pacientes do sexo feminino, totalizando 27 pacientes, o que equivale a 93,10% do grupo. A minoria é composta por apenas 2 pacientes do sexo masculino, representando 6,90% do estudo. No que diz respeito à idade dos pacientes, a mediana foi de 31 anos, com uma variação de 18 a 54 anos e uma média de $32 \pm 9,55$ anos (Tabela 1).

6.2 PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL DOS CASOS COM NEFRITE LÚPICA

Os níveis séricos de creatinina variaram de 0,34 mg/dL a 11,40 mg/dL nas biópsias analisadas, apresentando uma média de $1,83 \pm 2,45$ mg/dL. A Taxa de filtração glomerular estimada variou de 4,00 mL/min/1,73 m² a 149,00 mL/min/1,73 m², registrando uma média de

77,78±41,98 mL/min/1,73 m². Em relação à proteinúria, seus níveis oscilaram de 0,0 g/24h a 8,60 g/24h, apresentando uma média de 2,57±2,49 g/24h. Dos casos estudados, os níveis de albumina variaram de 1,70 mg/dL a 4,0 mg/dL. A presença de hematúria foi constatada em 55,17% dos casos, enquanto 31,03% não apresentaram essa ocorrência. Doze pacientes foram diagnosticados com hipertensão arterial sistêmica, representando 41,37% dos casos, enquanto 12 pacientes (41,37%) não apresentaram esse achado clínico (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados clínico-epidemiológicos e laboratoriais

| | Nefrite Lúpica | Classes I/II | Classe III | Classe IV |
|--|-------------------|--------------------|----------------------|------------------|
| Idade (Anos) | | | | |
| <i>Média ±DP</i> | 32±9,55 | 37,00±9,40 | 27,83±6,55 | 30,57±9,89 |
| <i>Mediana (Min-Máx)</i> | 31 (18-54) | 35 (25-54) | 28,50 (19-35) | 29 (18-53) |
| Gênero n (%) | | | | |
| <i>Masculino</i> | 2 (6,90) | 1 (11,11) | 0 (0,00) | 1 (7,14) |
| <i>Feminino</i> | 27 (93,10) | 8 (88,89) | 6 (100,00) | 13 (92,86) |
| Creatinina (mg/dL) | | | | |
| <i>Média ±DP</i> | 1,83±2,45 | 1,70±2,40 | 0,95±0,56 | 2,28±2,95 |
| <i>Mediana (Min-Máx)</i> | 1,00 (0,34-11,40) | 0,80 (0,55-7,62) | 0,88 (0,36-1,98) | 1,00 (0,34-11,4) |
| <i>NI (n)</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| TFGe (mL/min/1,73m²) | | | | |
| <i>Média ±DP</i> | 77,78±41,98 | 85,38±39,47 | 96,00±41,65 | 65,64±42,53 |
| <i>Mediana (Min-Máx)</i> | 81 (4,00-149,00) | 98,50(5,00-125,00) | 93,50 (33,00-149,00) | 64 (4-141) |
| <i>NI (n)</i> | 1 | 1 | 0 | 0 |
| Proteinúria (g/24h) | | | | |
| <i>Média ±DP</i> | 2,57±2,49 | 1,36±1,11 | 2,23±2,90 | 3,55±2,71 |
| <i>Mediana (Min-Máx)</i> | 1,54 (0,00-8,60) | 1,30 (0,00-3,59) | 1,11 (0,57-8,08) | 3,0 (0,67-8,60) |
| <i>NI (n)</i> | 3 | 1 | 0 | 2 |
| Albumina(mg/dL) | | | | |
| <i>Média ±DP</i> | 2,90±0,66 | 3,11±0,77 | 3,17±0,76 | 2,60±0,50 |
| <i>Mediana (Min-Máx)</i> | 2,9 (1,70-4,00) | 3,16 (2,10-4,00) | 3,60 (2,30-3,87) | 3,0 (1,7-3,2) |
| <i>NI (n)</i> | 11 | 5 | 1 | 5 |
| Hematúria n (%) | | | | |
| <i>Sim</i> | 16 (55,17) | 4 (44,44) | 3 (50,00) | 9 (64,28) |
| <i>Não</i> | 9 (31,03) | 4 (44,44) | 0 (0,00) | 5 (35,71) |
| <i>NI</i> | 4 (13,79) | 1 (11,11) | 3 (50,00) | 0 |
| HAS n (%) | | | | |
| <i>Sim</i> | 12 (41,37) | 4 (44,44) | 0 (0,00) | 8 (57,14) |
| <i>Não</i> | 12 (41,37) | 3 (33,33) | 4 (66,67) | 5 (35,71) |
| <i>NI</i> | 5 (17,24) | 2 (22,22) | 2 (33,33) | 1 (7,14) |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

DP: Desvio padrão

Máx.: Máximo

Mín: Mínimo

n: Número de casos

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

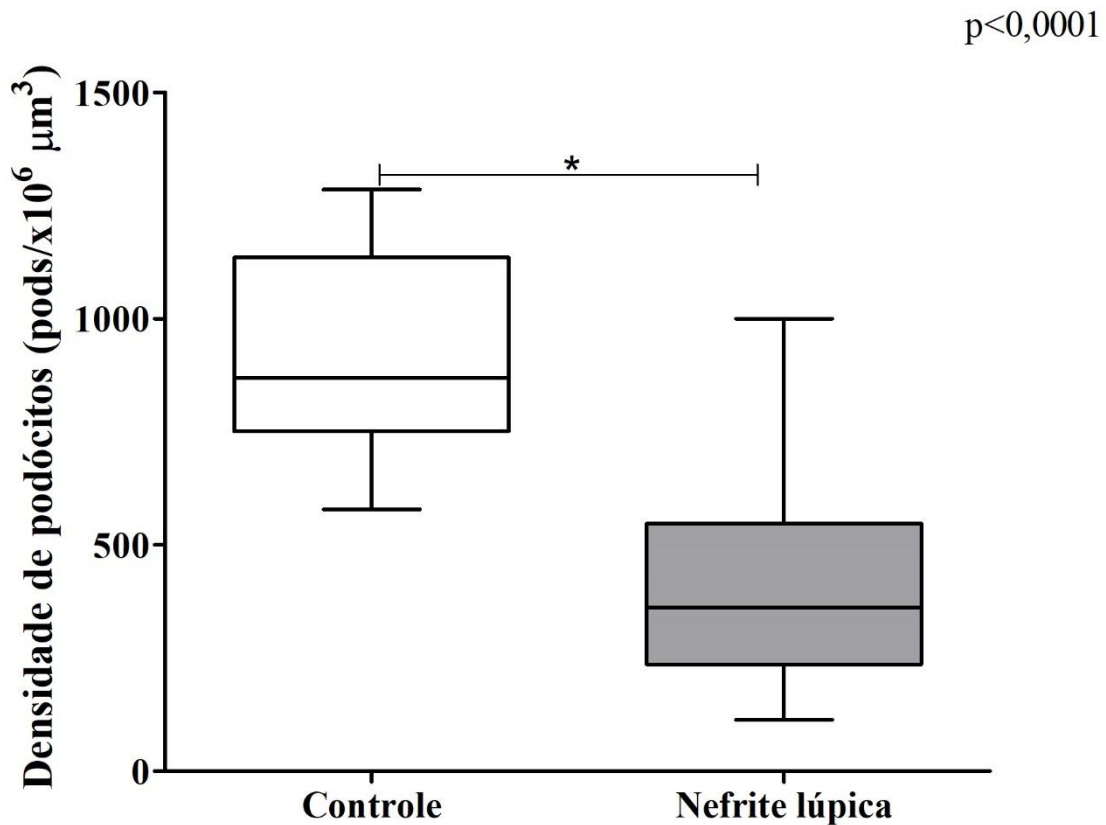
TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada

NI: não informado

6.3 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DOS PODÓCITOS

Em relação a densidade de podócitos, foi observada uma redução significativa da densidade de podócitos do grupo NL em comparação ao grupo controle (Figura 6, p<0,0001).

Figura 6 - Análise da densidade de podócitos em casos de Nefrite Lúpica e grupo controle

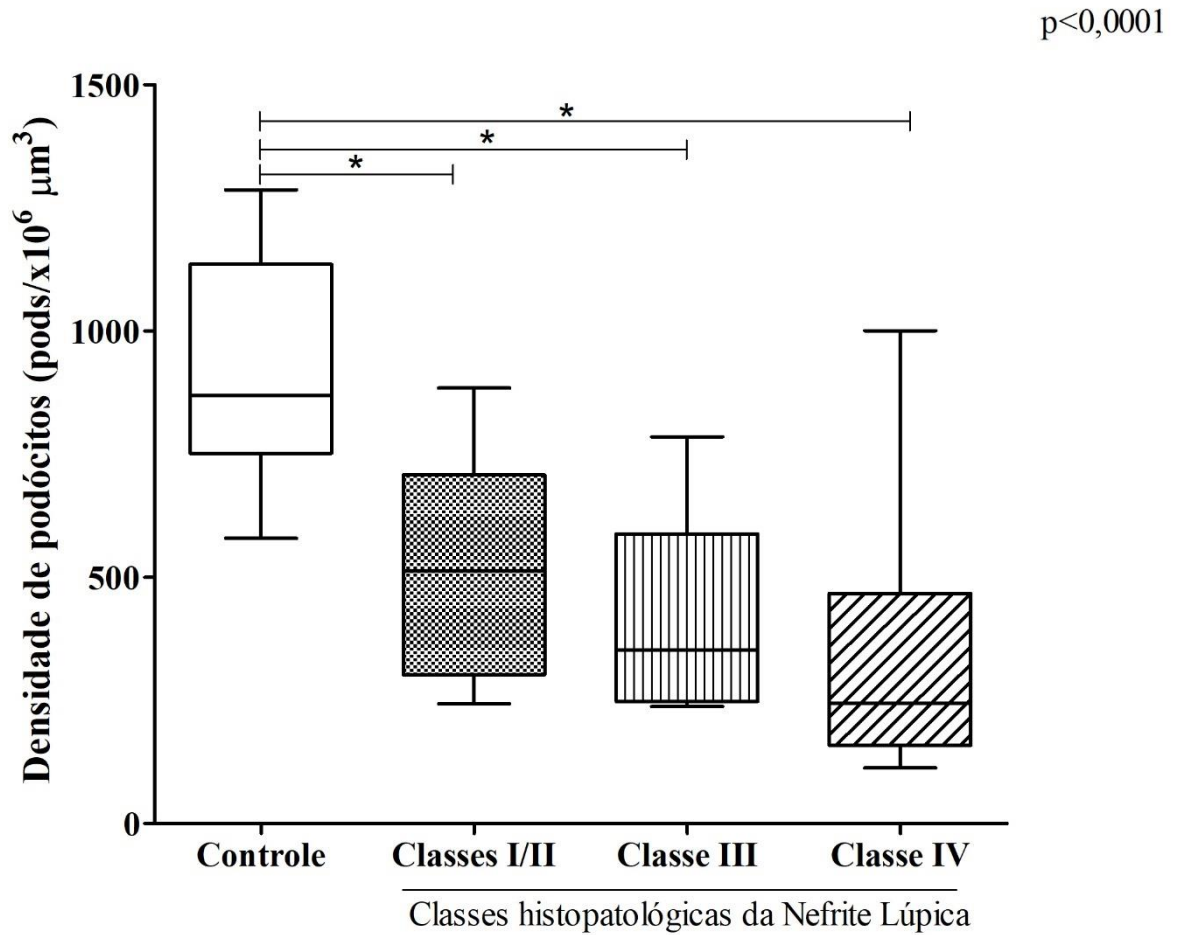


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Análise da densidade de podócitos entre o grupo controle e o grupo Nefrite Lúpica, pela técnica de imunohistoquímica para WT1. Teste de comparação Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,0001$.

Além dessa análise, foi realizada a comparação entre o grupo controle com as classes de NL. Essa segunda avaliação confirmou a redução significativa do número de podócitos conforme a evolução da doença. Demonstrou, portanto, uma redução da densidade de podócitos de forma progressiva em todas as classes avaliadas em relação ao grupo controle (Figura 7, $p < 0,0001$, Prancha 1).

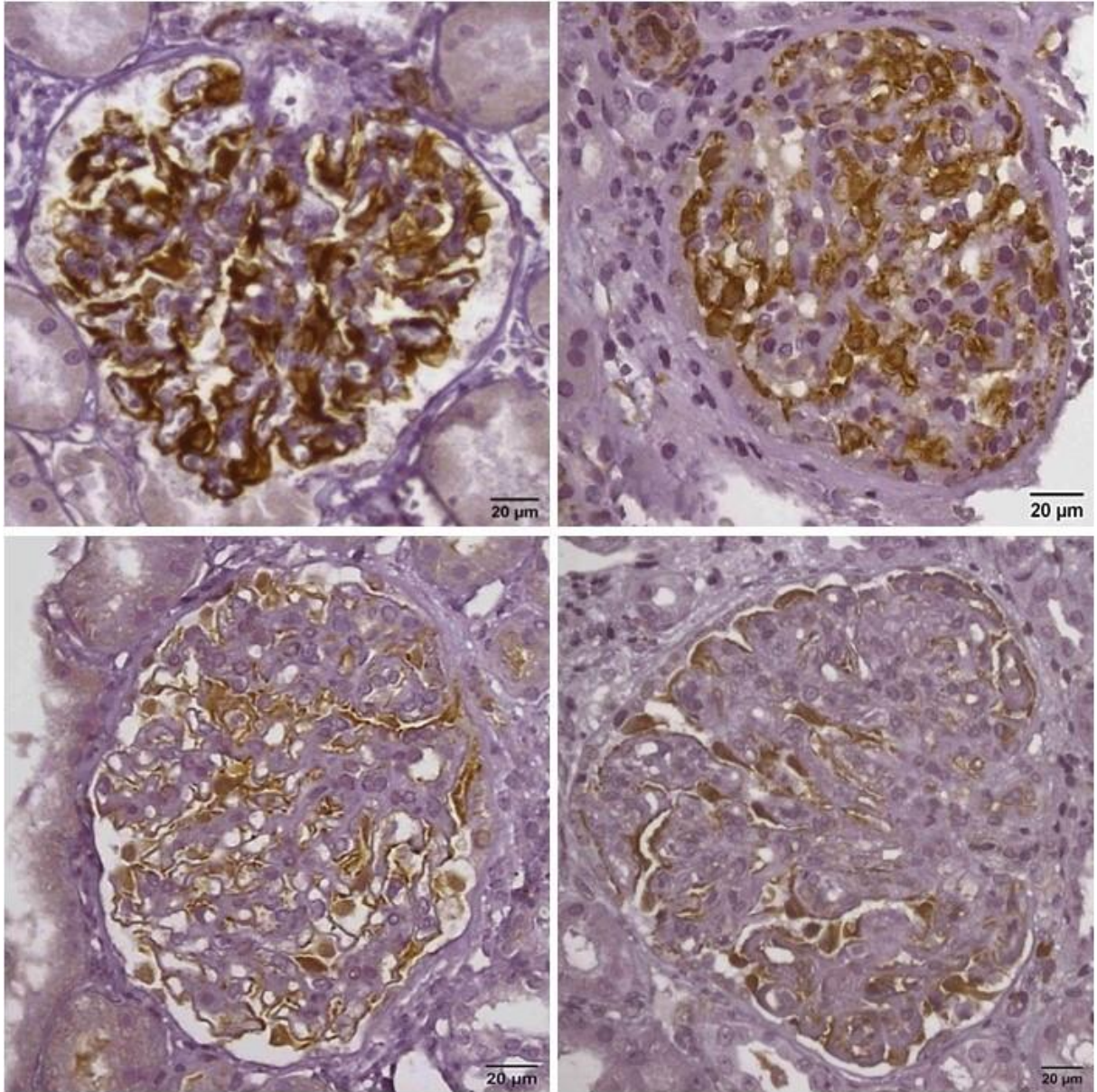
Figura 7 - Análise da densidade de podócitos nas diferentes classes da Nefrite Lúpica e no grupo controle



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Análise da densidade de podócitos entre o grupo controle e os grupos classes I/II, classe III e classe IV pela técnica de imuno-histoquímica para WT1. Teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn's. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,0001$.

Prancha 1- Imunomarcção glomerular de WT1 no grupo controle e nas classes estudadas da Nefrite Lúpica



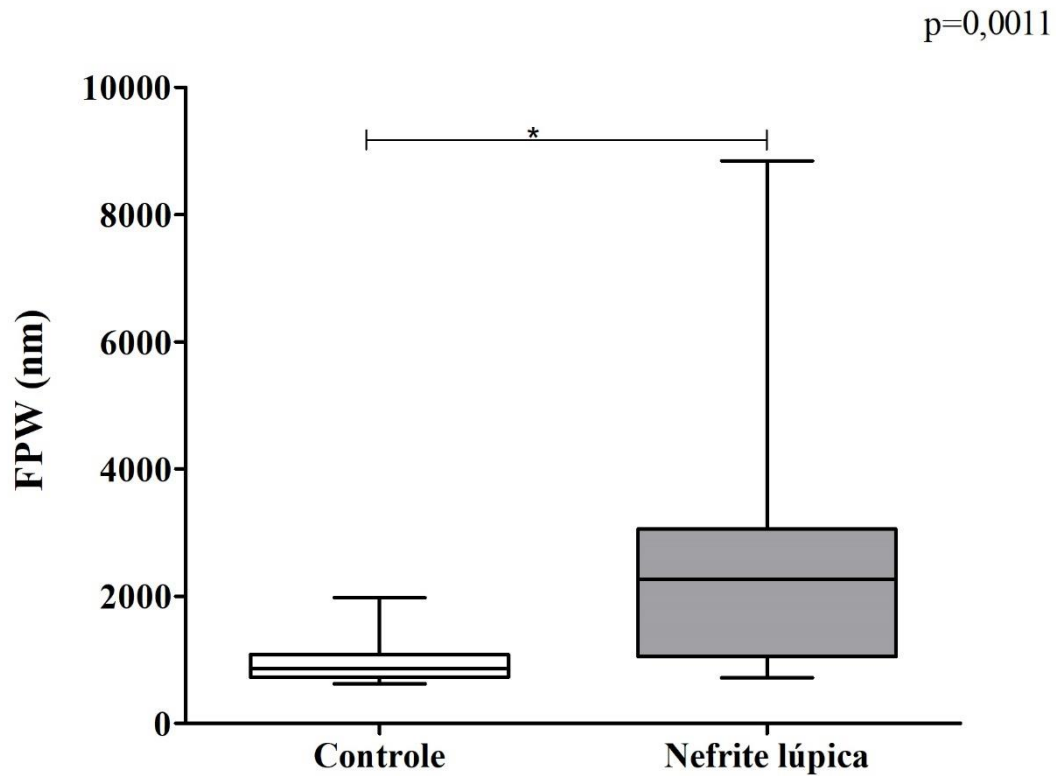
Fonte: Centro de Pesquisa em Rim – CePRim UFTM

Imagens de glomérulos imunomarcados por imuno-histoquímica para WT1, destacando os podócitos com coloração marrom (ML, 40X). A) Caso controle. B) Nefrite Lúpica classe II; C) Nefrite Lúpica classe III; D) Nefrite Lúpica classe IV.

6.4 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS PEDICELOS

Após a análise da densidade de podócitos, foi realizado o estudo da ultraestrutura dos podócitos a fim de analisar o comportamento dos pedicelos. Visualizamos um maior apagamento de pedicelos no grupo Nefrite Lúpica em comparação ao grupo controle, um resultado significativo $p=0,0011$ (Figura 8).

Figura 8 - Avaliação do apagamento dos pedicelos em casos de Nefrite Lúpica

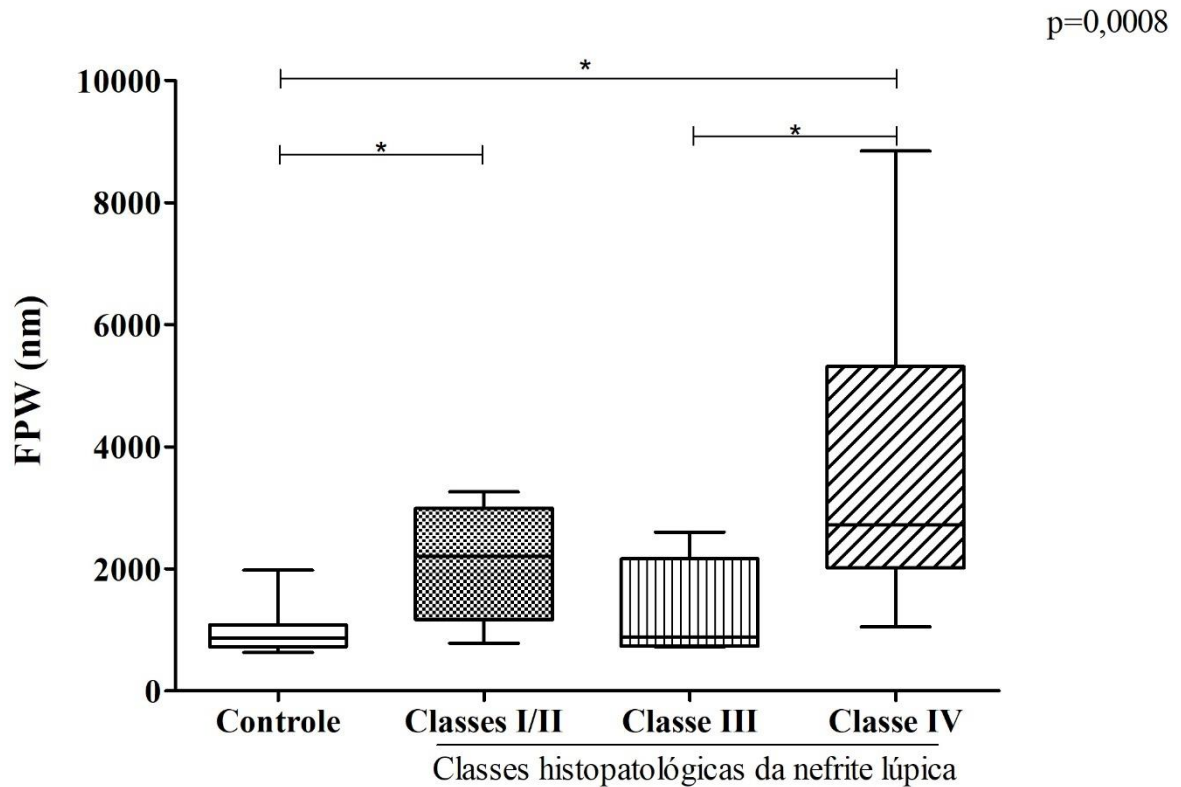


Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Análise de comparação do apagamento de pedicelos entre o grupo controle e grupo Nefrite Lúpica, pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Teste de comparação Mann-Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. p=0,0011. FPW: foot process width. nm: nanômetros

A seguir, comparou-se o apagamento dos pedicelos das classes I/II, classe III e classe IV com o grupo controle. Foi visualizado mais apagamento nos grupos classes I/II e classe IV em relação ao grupo controle e entre as classes houve mais apagamento de pedicelos no grupo classe IV comparado com o grupo classe III (Figura 9, p=0,0008, prancha 2).

Figura 9 - Avaliação do apagamento dos pedicelos nas diferentes classes de Nefrite Lúpica

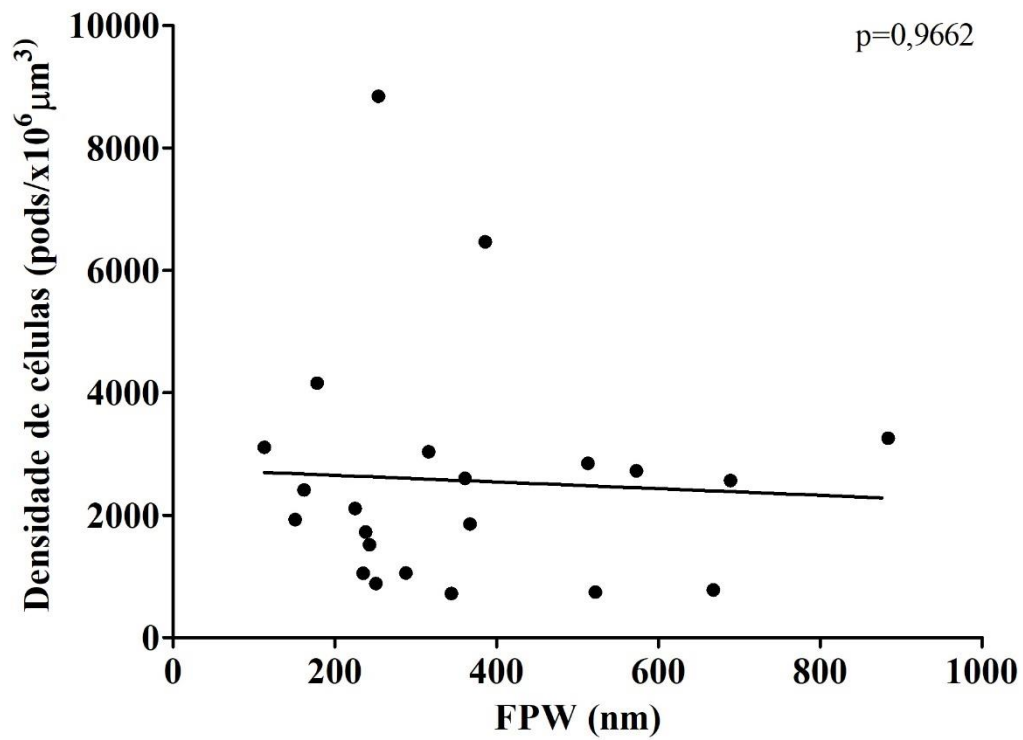


Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Análise de comparação do apagamento de pedicelos entre o grupo controle e os grupos Classe I/II, III e IV pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn's. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. p=0,0008. FPW: foot process width. nm: nanômetros.

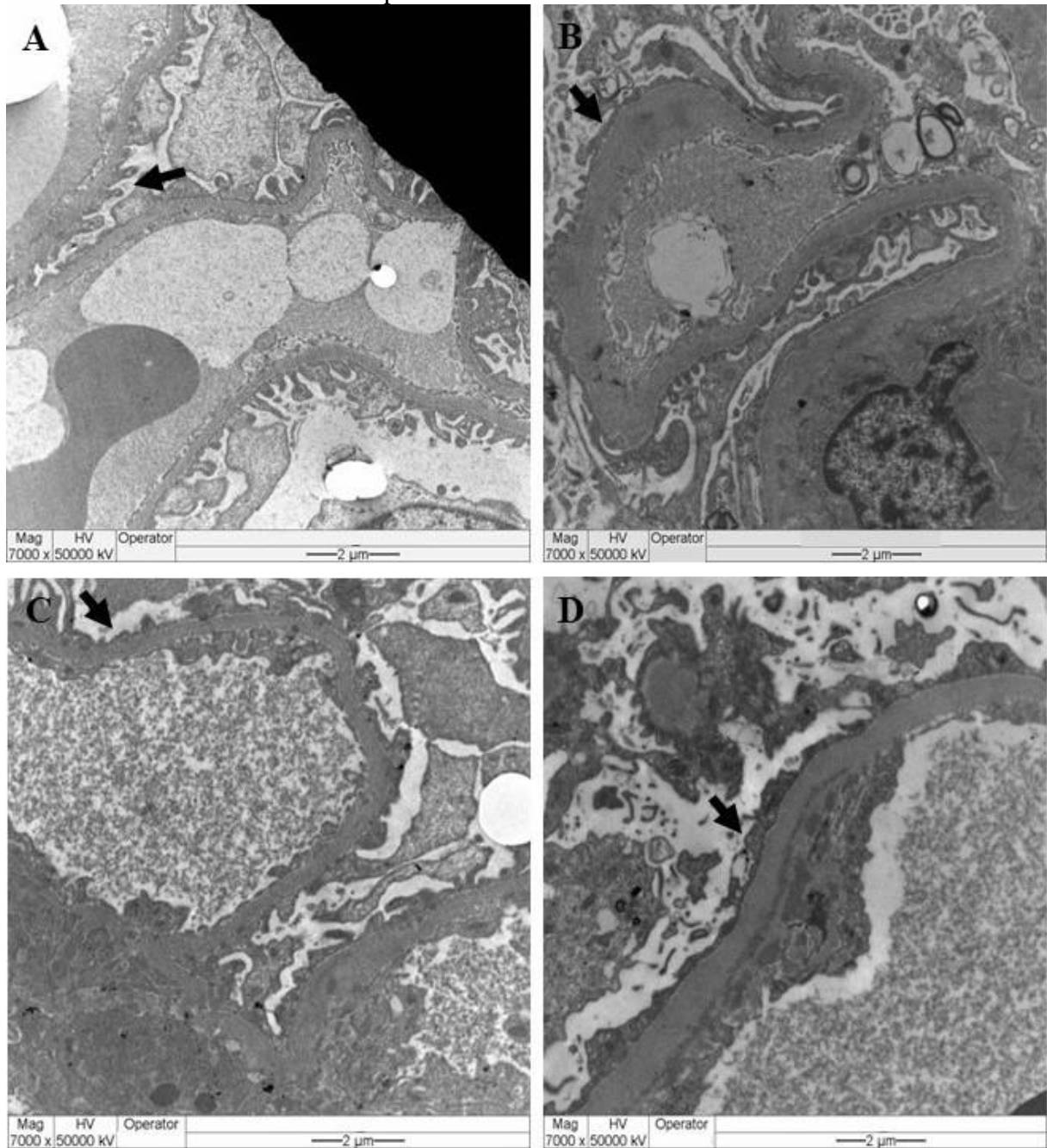
Não foi encontrada correlação entre o apagamento dos pedicelos e a densidade de podócitos no grupo Nefrite Lúpica (Figura 10, p=0,9662).

Figura 10 – Análise da correlação entre a densidade de podócitos e o apagamento dos pedicelos no grupo Nefrite Lúpica



Correlação entre a densidade de podócitos e o apagamento de pedicelos no grupo Nefrite Lúpica. Teste Spearman, $p=0,9662$.

Prancha 2– Apagamento de pedicelos na microscopia eletrônica de transmissão no grupo controle e nos casos de Nefrite Lúpica



Fonte: Centro de Pesquisa em Rim – CePRim UFTM

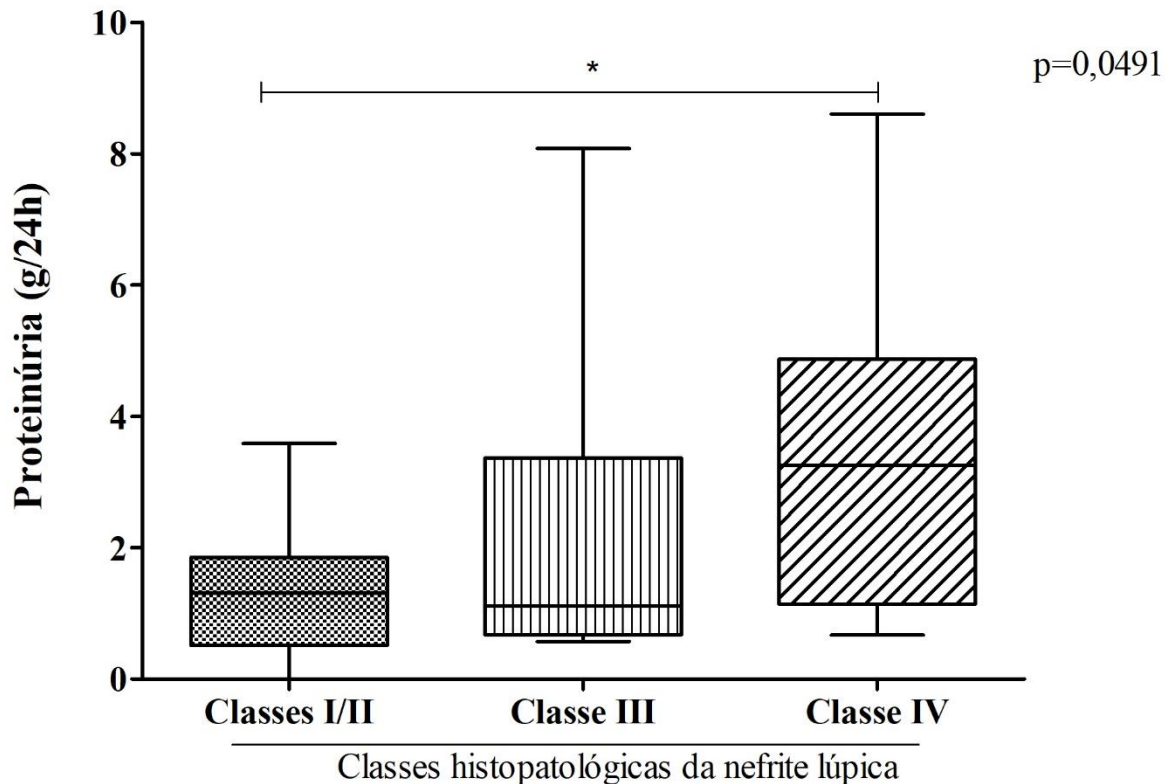
Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alças glomerulares no aumento de 7000x.

A) Alça glomerular de uma amostra do grupo controle. B) Alça glomerular de uma amostra de Nefrite Lúpica classe II. C) Alça glomerular de uma amostra de Nefrite Lúpica classe III. D) Alça glomerular de uma amostra de Nefrite Lúpica classe IV.

6.5 ANÁLISE DO GRAU DE PROTEINÚRIA NAS CLASSES DE NEFRITE LÚPICA

Quando comparada a proteinúria entre as classes estudadas, foi observado aumento dos níveis de proteinúria conforme a evolução das classes. O grupo classe IV em comparação ao grupo classes I/II apresentou maiores níveis de proteinúria (Figura 11, $p=0,0491$).

Figura 11 - Níveis de proteinúria nos pacientes com Nefrite Lúpica



Fonte: Elaborado pela autora, 2023

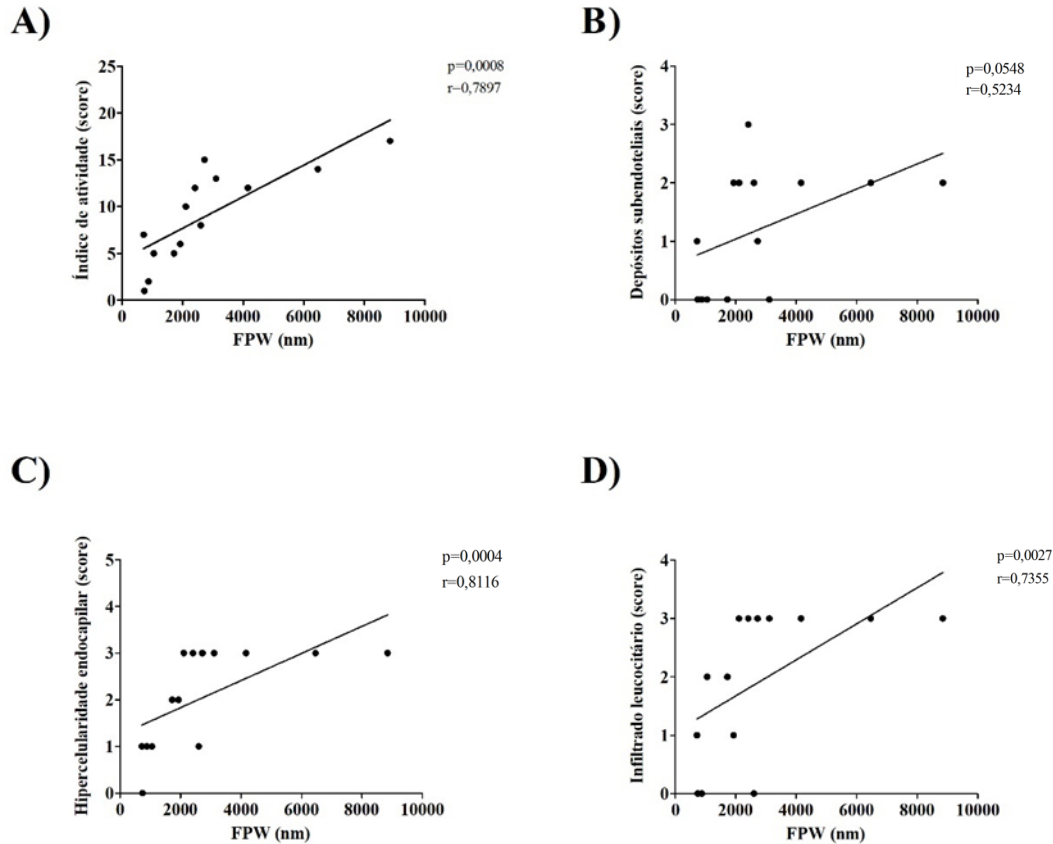
Análise da proteinúria entre as classes estudadas. Teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn's. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p=0,0491$.

6.6 CORRELAÇÃO ENTRE O ÍNDICE DE ATIVIDADE E DE CRONICIDADE COM O APAGAMENTO DOS PEDICELOS NAS CLASSES III E IV DA NEFRITE LÚPICA

Ao avaliar as classes proliferativas (classe III e classe IV) foi elaborada uma análise de correlação entre os índices de atividade e cronicidade, respectivamente, com o apagamento dos pedicelos. Em relação ao índice de atividade e o apagamento dos pedicelos, houve uma correlação positiva, forte e significativa com $p=0,0008$, demonstrando que quanto maior o índice de atividade, maior o apagamento de pedicelos (Figura 12A). Houve uma correlação positiva e significativa entre a presença de depósitos subendoteliais e o apagamento dos pedicelos ($p=0,0548$, Figura 12B). Quanto maior a presença de depósito subendotelial maior o apagamento. Outro parâmetro analisado foi a presença de hiperplasia endocapilar. A correlação entre esse dado e o apagamento dos pedicelos demonstrou ser estatisticamente positiva e significativa sendo $p=0,0004$ (Figura 12C). A análise de correlação realizada entre o apagamento de pedicelos e o infiltrado leucocitário foi estatisticamente positiva e significativa

sendo $p=0,0027$, portanto a presença de infiltrado leucocitário influencia diretamente no apagamento de pedicelos (figura 12D).

Figura 12 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos nas classes III e IV

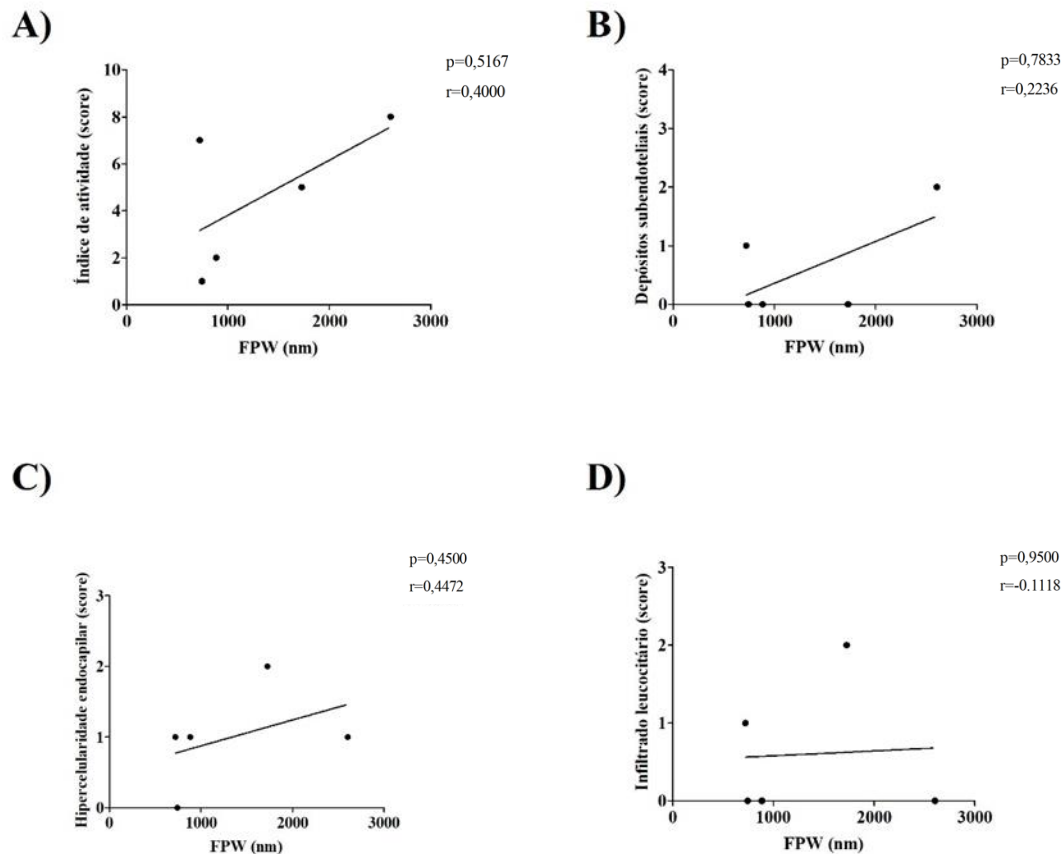


Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Correlação entre (A) o índice de atividade, (B) depósitos subendoteliais, (C) hipercelularidade endocapilar e (D) infiltrado leucocitário e o apagamento de pedicelos no grupo classe III e IV.

Ao analisar a classe III individualmente, não houve correlação estatisticamente significativa quando se correlacionou o índice da atividade com o apagamento dos pedicelos ($p=0,5167$, Figura 13A), assim como não houve correlação estatisticamente significativa entre os depósitos subendoteliais ($p=0,7833$, Figura 13B), a hipercelularidade endotelial ($p=0,4500$, Figura 13C) e o infiltrado leucocitário ($p=0,9500$, Figura 13D).

Figura 13 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos na classe III

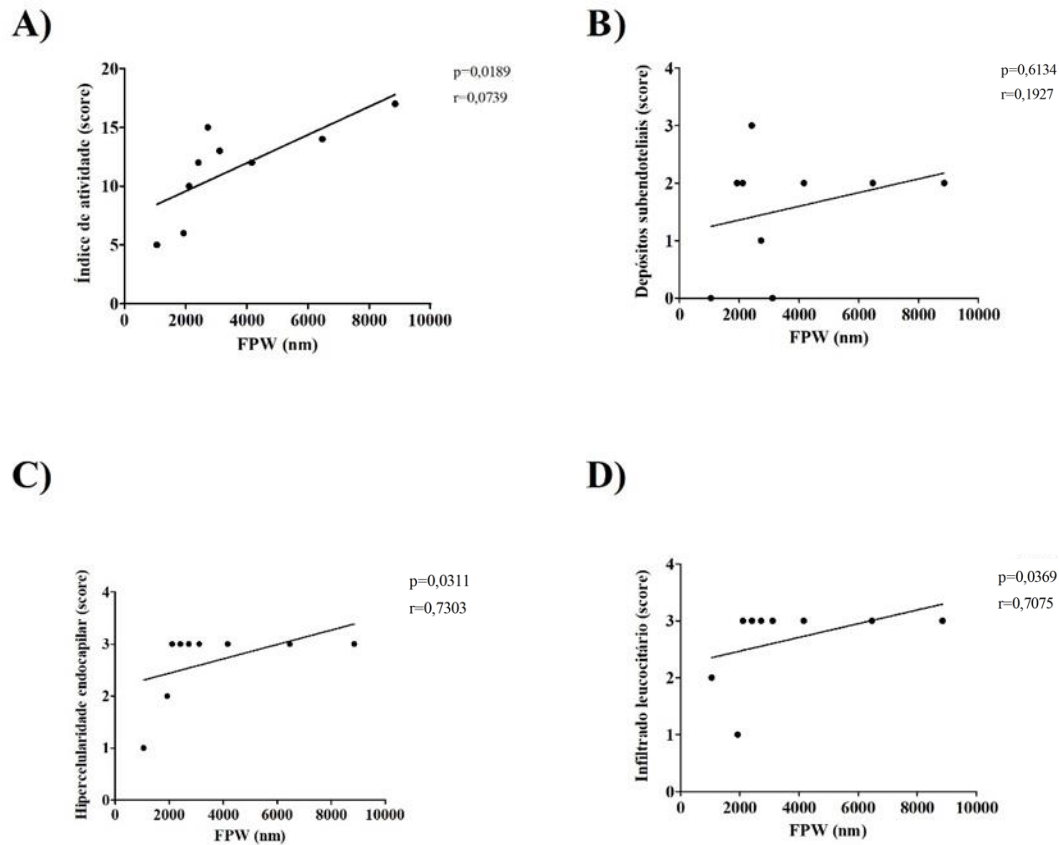


Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Correlação entre (A) índice de atividade, (B) depósitos subendoteliais, (C) hiper celularidade endocapilar e (D) infiltrado leucocitário e o apagamento de pedicelos no grupo Nefrite Lúpica classe III.

Em contrapartida, ao correlacionar o índice de atividade e o apagamento de pedicelos no grupo classe IV, o resultado dessa análise foi estatisticamente positivo e significativo ($p=0,0189$, Figura 14A). Posteriormente, foram realizadas as correlações dos fatores que compõem o índice de atividade como os depósitos subendoteliais, a hiper celularidade endotelial e o infiltrado leucocitário com o apagamento dos pedicelos no grupo classe IV. Já a correlação dos depósitos subendoteliais com apagamento dos pedicelos não foi estatisticamente significativa ($p=0,6134$, Figura 14B), ao contrário da correlação da hiper celularidade endotelial a qual resultou em uma correlação estatística positiva e significativa ($p=0,0311$, Figura 14C). E o último fator do índice de atividade analisado, o infiltrado leucocitário quando correlacionado com apagamento dos pedicelos apresentou uma correlação positiva e significativa ($p=0,0369$, Figura 14D).

Figura 14 - Análise da relação entre o índice de atividade e o apagamento dos pedicelos na classe IV



Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Correlação entre (A) índice de atividade, (B) depósitos subendoteliais (C) hiperplasmicidade endocapilar e (D) infiltrado leucocitário e o apagamento de pedicelos no grupo classe IV.

Não foi observada correlação entre o índice de cronicidade e o apagamento de pedicelos ($p=0,8243$).

6.7 AVALIAÇÃO DOS DEPÓSITOS DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO NA NEFRITE LÚPICA

Foram analisados os depósitos presentes nas amostras estudadas do grupo NL e os tipos destes (IgG e complemento). A maioria dos casos apresentou depósitos de todos os imunoreagentes analisados IgA+IgG+IgM+C1q+C3 (Tabela 2).

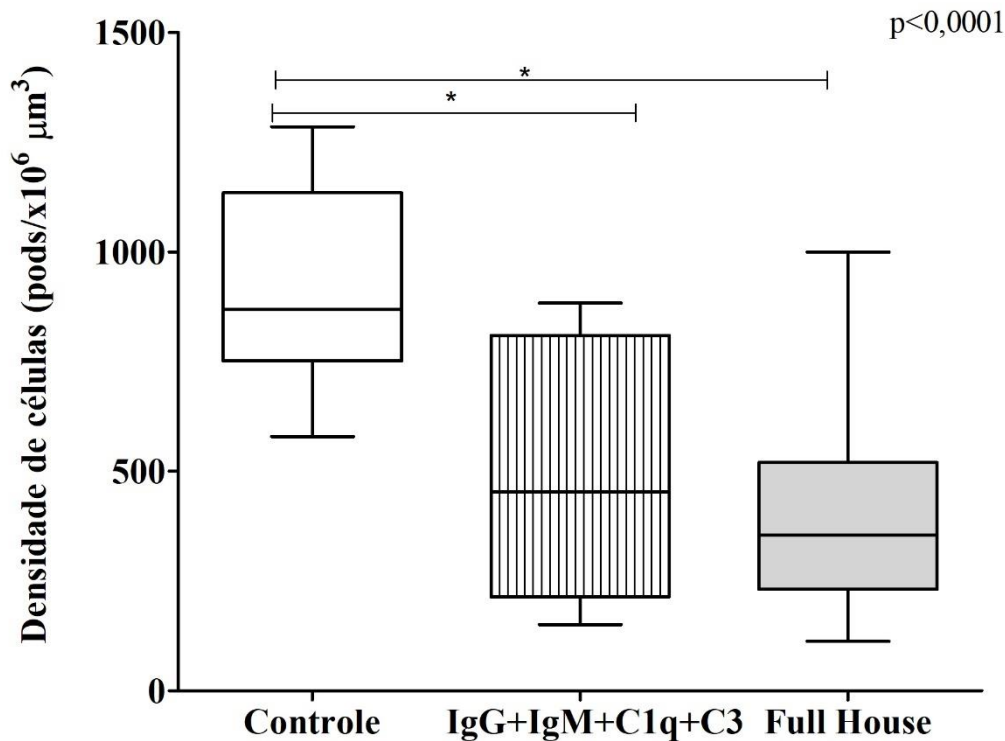
Tabela 2 – Depósitos de imunocomplexos, apagamento de pedicelos e densidade de podócitos do grupo NL

| | n (%) | FPW (nm) | Cell density (pods/ $\times 10^6 \mu\text{m}^3$) |
|-----------------------|-------------|----------|---|
| IgG+IgM+C1q+C3 | 6 (20,70%) | 1749 | 494 |
| Full House | 20 (68,96%) | 2906 | 395 |

Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Após o levantamento dos tipos de depósitos presentes nas biópsias realizou-se a comparação entre a densidade de podócitos do grupo controle e os dois grupos de NL, separados de acordo com os tipos de depósitos encontrados, sendo o grupo IgG+IgM+C1q+C3 e o grupo Full-House (IgG+IgM+IgA+C1q+C3). Há uma maior densidade de podócitos no grupo controle quando comparado com os grupos IgG+IgM+C1q+C3 e Full-House (Figura 15).

Figura 15 - Análise da densidade de podócitos de acordo com os depósitos encontrados na imunofluorescência direta



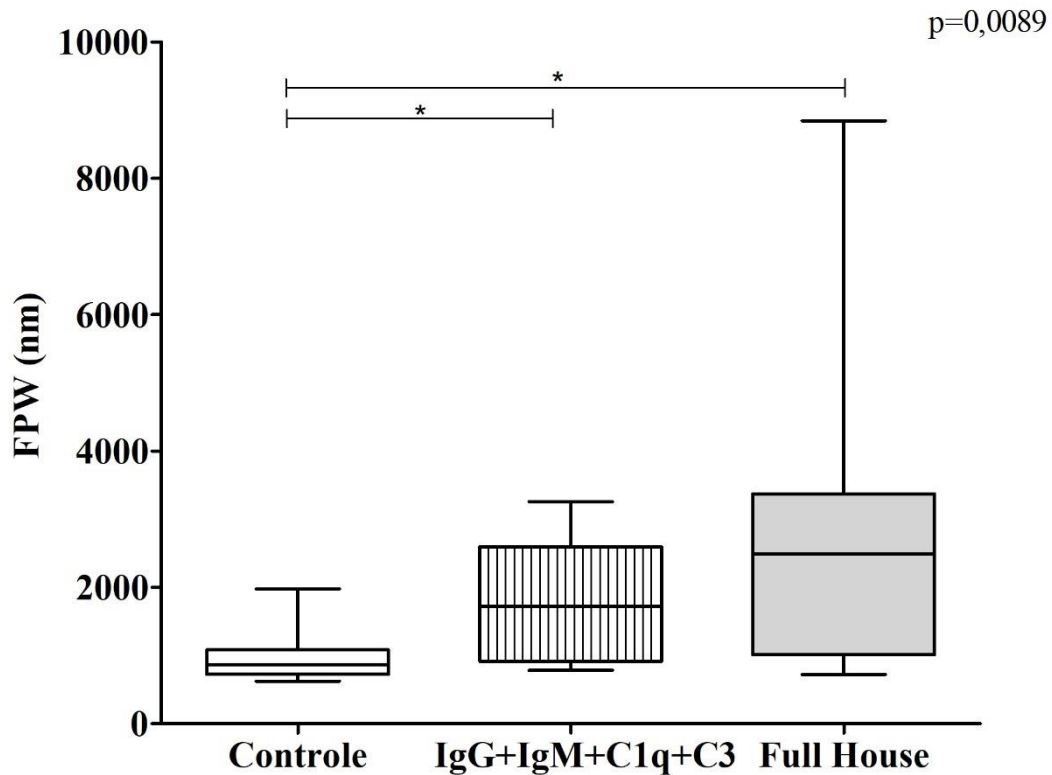
Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Análise de comparação entre a densidade de podócitos do grupo controle e dos grupos separados de acordo com a presença de depósitos. Teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn's. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%, $p < 0,0001$. Full house: IgG+IgM+IgA+C1q+C3.

Após a avaliação da densidade de podócitos e o tipo de depósitos realizou-se a última comparação afim de compreender a repercussão dos tipos de depósitos no apagamento dos

pedicelos. O resultado foi significativo $p=0,0089$, portanto confirmou o quanto os depósitos influenciam na estrutura dos podócitos causando o apagamento (Figura 16).

Figura 16 - Análise do apagamento dos pedicelos de acordo com os depósitos na imunofluorescência



Fonte: Elaborado pela autora, 2023

Análise de comparação entre o apagamento de pedicelos do grupo controle e dos grupos separados de acordo com a presença de depósito. Teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de Dunn's. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%, $p=0,0089$. Full house: IgG+IgM+IgA+C1q+C3.

7 DISCUSSÃO

Em nossos resultados, observamos uma maior prevalência de NL classe IV. A maior prevalência de NL classe IV foi observada por estudos anteriores que trazem dados relacionados com as manifestações da NL no Brasil (KLUMB; SCHEINBERG; SOUZA; XAVIER *et al.*, 2021). Um estudo que correlacionou dados clínico-patológicos, também apresentou, como nosso estudo, uma maior prevalência de NL classe IV (PAN; FENG; LI; HE *et al.*, 2021). A classe IV, denominada Nefrite Lúpica difusa é caracterizada por glomerulonefrite endo ou extracapilar difusa, segmentar ou global, ativa ou inativa, envolvendo $\geq 50\%$ de todos os glomérulos, tipicamente com depósitos imunes subendoteliais difusos, com ou sem alterações mesangiais. Apresenta o prognóstico mais grave e está associada ao maior risco de progressão para doença renal terminal (WANG; REN; CHANG; GU *et al.*, 2018). Preditores de piores prognósticos foram mais encontrados na NL classe IV, como dano intersticial crônico na biópsia renal inicial, sem resposta após um ano de terapia e com recidiva (PARIKH; ALMAANI; BRODSKY; ROVIN, 2020). Dessa forma é indicada a biópsia renal, o que pode justificar o aumento da prevalência dessa classe nos trabalhos que utilizam a classificação morfológica da NL.

A maior parte do grupo NL é formado por pacientes do sexo feminino, como já afirmado anteriormente em estudos que mostraram que a prevalência do LES é maior em pacientes do sexo feminino, jovens em idade fértil (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS *et al.*, 2020). Estudos correlacionam a maior prevalência do LES em pacientes do sexo feminino com a influência dos efeitos do hormônio estrogênio, bem como outros hormônios sexuais (PETRI, 2008) e a presença do cromossomo X duplo que aumenta a chance do TLR 7 no cromossomo X levar ao escape da inativação da resposta imune inata, ligando-se ao RNA de fita simples e ativando a sinalização do interferon tipo 1 (SOUYRIS; CENAC; AZAR; DAVIAUD *et al.*, 2018).

No presente estudo observamos uma redução na densidade de podócitos no grupo NL em relação ao grupo controle. Nosso grupo também já demonstrou diminuição de podócitos e consequente apagamento de pedicelos em outras doenças glomerulares que culminam com envolvimento podocitário, como Glomeruloesclerose Segmentar e Focal, Doenças de Lesões Mínimas e Nefropatia Diabética (DA SILVA; MONTEIRO; ARAÚJO; URZEDO *et al.*, 2020; MARTINS; BERNARDES; FERREIRA; WANDERLEY *et al.*, 2023). Acreditamos que essa diminuição seja resultante da lesão no podócito devido a inflamação com deposição de imunocomplexos.

O podócitos possuem sistema intrínseco que suportam injúrias, mas podem sofrer danos quando as tensões excedem essa capacidade, como morte celular. Por ser uma célula terminalmente diferenciada, resulta em redução do número, como observado no presente estudo e comumente estas células podem aparecer na urina, o que denominamos de podocitúria. Por isso, nos últimos anos a avaliação da podocitúria surgiu como ferramenta indireta na análise da injúria podocitária em alguns casos de doenças glomerulares (PETERMANN; FLOEGE, 2007) incluindo casos de NL (MANSUR; SABINO; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2016). Essa perda de podócitos parece ocorrer por apoptose o que resulta podocitopenia *in situ* (CUI; QIAO; GUO; ZHANG *et al.*, 2012; JERUC; VIZJAK; ROZMAN; FERLUGA, 2006). Na NL a apoptose do podócito está relacionada com a ativação do perfil Th17 e a produção de IL-17 que culmina em alterações do seu citoesqueleto com perda dos pedicelos, aumento da motilidade, diminuição da expressão de proteínas que mantém a homeostase celular, aumento do estresse oxidativo e ativação de inflamação e de caspases (PAQUISSI; ABENSUR, 2021; ZHOU; CHEN; WEI; ZHAO *et al.*, 2020; ZHOU; CHEN; WEI; ZHAO *et al.*, 2019).

Em um estudo que demonstrou a densidade de podócitos nas diferentes classes da NL em amostras de biópsia renal de pacientes adultos diagnosticados com NL, menos de 10% dos pacientes classificados com classe IV apresentam expressão preservada de marcadores podocitários, sugerindo a presença do dano estrutural sofrido pelos podócitos nessa classe (YU; HAAS; GLASSOCK; ZHAO, 2017). Observamos mais apagamento de pedicelos no grupo classe IV. Os podócitos na NL podem sofrer ação de autoanticorpos que reagem diretamente com proteínas podocitárias, como α -actinina-4 (MASON; RAVIRAJAN; RAHMAN; PUTTERMAN *et al.*, 2004) e também acredita-se que a imunidade mediada por células pode desempenhar um papel importante na lesão podocitária, especialmente na classe IV da NL, onde observa-se um grande número de macrófagos, células Th1 e células CD40+ (MASUTANI; AKAHOSHI; TSURUYA; TOKUMOTO *et al.*, 2001). Com isso, os podócitos respondem com a reorganização do citoesqueleto podocitário que culmina morfológicamente com apagamento dos pedicelos.

Entre as classes, foi observado maior proteinúria na classe IV que foi a classe que apresentou maior apagamento de pedicelos, no entanto não encontramos correlação entre a proteinúria e o apagamento dos pedicelos como foi encontrado em estudos de NL (ICHINOSE; KITAMURA; SATO; FUJIKAWA *et al.*, 2018; WANG; YU; SONG; WANG *et al.*, 2014) e em outras doenças glomerulares como a GESF (DA SILVA; MONTEIRO; ARAÚJO; URZEDO *et al.*, 2020) e nefropatia por IgA (TEWARI; NADA; RAYAT; BORUAH *et al.*, 2015). Em modelo consagrado de proteinúria o apagamento dos pedicelos precede a proteinúria

(INOKUCHI; SHIRATO; KOBAYASHI; KOIDE *et al.*, 1996). Alguns trabalhos que também não encontraram relação entre o apagamento dos pedicelos e a proteinúria sugeriram que a proteinúria depende principalmente da natureza da doença subjacente e não necessariamente do apagamento dos pedicelos (DEEGENS; DIJKMAN; BORM; STEENBERGEN *et al.*, 2008; VAN DEN BERG; VAN DEN BERGH WEERMAN; ASSMANN; WEENING *et al.*, 2004).

Observamos uma correlação positiva e significativa entre o apagamento dos pedicelos e o índice de atividade, bem como com a hiper celularidade endocapilar e leucocitária na classe IV. Acreditamos que a relação “cross-talk” podócito e endotélio seja a responsável por essas correlações (YUAN; TAN; WANG; WANG *et al.*, 2019). Sendo assim, o depósito de imunocomplexos leva à produção de mediadores e fatores de crescimento que irá alterar o citoesqueleto do podócito e resultará no apagamento dos pedicelos (LIU; WEN; PENG; ZHAO *et al.*, 2023). Os podócitos produzem citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas no recrutamento, maturação e ativação de células imunes no contexto da Nefrite Lúpica. Foi demonstrado que em resposta à estímulo inflamatório, há um aumento significativo nos níveis de IL-6, IL-8, VEGF e M-CSF que os podócitos expressam em níveis basais para manutenção da homeostase, bem como nova produção de IP-10 e IL-10. Além disso, em resposta ao ambiente inflamatório, há aumento do nível de cálcio intracelular nos podócitos, levando a desregulação do citoesqueleto de actina que resulta em apagamento (WRIGHT; BERESFORD, 2018).

Ainda é incerto as vias de sinalização podocitária induzidas especificamente em lesões proliferativas. Tem-se observado que a via da proteína indutora de C-maf (CMIP) que foi relatada em várias glomerulopatias (SENDEYO; AUDARD; ZHANG; FAN *et al.*, 2013; ZHANG; KAMAL; DAHAN; PAWLAK *et al.*, 2010) é superexpressa na NL não proliferativa (classes II e V), mas quase indetectável em pacientes com NL classe III/IV (BOUACHI; MOKTEFI; ZHANG; ONISZCZUK *et al.*, 2018). A ativação de NFκB pode levar a diminuição da expressão de CMIP (IZZEDINE; MANGIER; ORY; ZHANG *et al.*, 2014) e já foi demonstrado em modelo murino de NL a ativação de NFκB com consequente regulação positiva da hidrolase-L1 C-terminal da ubiquitina (UCH-L1) associada à lesão podocitária (ZHANG; SUN; HU; LUO *et al.*, 2013) e ao FPW (SUN; ZOU; HAN; WU *et al.*, 2019) demonstrando uma possível ligação entre os depósitos de imunocomplexos e a sinalização podocitária de UCH-L1 na NL (SAKHI; MOKTEFI; BOUACHI; AUDARD *et al.*, 2019).

Foi observado uma redução da densidade de podócitos e maior apagamento de pedicelos nos grupos IgG+IGM+C1q+C3 e Ful-House. Os imunocomplexos depositados no glomérulo promovem ativação da via clássica do complemento e de macrófagos e neutrófilos, a partir da

ligação entre os receptores Fc superficiais das células fagocitárias e as imunoglobulinas complexadas. Como consequência da ativação e recrutamento local dos neutrófilos, ocorre liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), produção de citocinas pró-inflamatórias e amplificação da resposta imunoinflamatória no tecido renal (FLORES-MENDOZA; SANSÓN; RODRÍGUEZ-CASTRO; CRISPÍN *et al.*, 2018). Já foi demonstrado que a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) pode causar lesão citotóxica aos podócitos na NL classe V sugerindo que a formação do MAC é indispensável na lesão podocitária (AUSTIN; ILLEI, 2005). Além disso, produção de EROS pode danificar ainda mais os podócitos na NL e o uso de o inibidor da síntese do óxido nítrico mostrou ter um efeito protetor contra a proteinúria (SEMENIKHINA; STEFANENKO; SPIRES; ILATOVSKAYA *et al.*, 2022).

Acreditamos que durante o desenvolvimento da NL, os podócitos são alvo da imunidade adaptativa, pois podem expressar vários antígenos alvo (BRUSCHI; GALETTI; SINICO; MORONI *et al.*, 2015; BRUSCHI; SINICO; MORONI; PRATESI *et al.*, 2014; MASON; RAVIRAJAN; RAHMAN; PUTTERMAN *et al.*, 2004) e da imunidade inata já que expressam o receptor do tipo toll durante o desenvolvimento da doença (MACHIDA; ITO; HIROSE; TAKESHITA *et al.*, 2010). Porém, acredita-se que os podócitos também tenham envolvimento direto como um ator imunológico no processo da NL, uma vez que eles podem se comunicar com outras células do sistema imunológico. Os podócitos podem agir como células apresentadoras de antígeno (GOLDWICH; BURKARD; OLKE; DANIEL *et al.*, 2013) e foi demonstrado que a molécula B7-1 (CD80), que induz a co-estimulação de células T, é expressa em podócitos em vários modelos de doenças renais proteinúricas, incluindo a NL (REISER; VON GERSDORFF; LOOS; OH *et al.*, 2004) contribuindo com a imunidade adaptativa.

Em síntese, nosso estudo sugere que a investigação mais detalhada dos podócitos, associada aos achados morfológicos da biópsia renal, pode ser útil para relacionar a uma maior atividade da NL. Uma vez que, os pacientes com mais apagamento dos pedicelos e consequente maiores níveis de proteinúria apresentam NL classe IV, possivelmente a extensão do apagamento dos pedicelos está mais relacionada com a proliferação inflamatória/celular de forma difusa e não focal como acontece na NL classe III.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- I. Há uma redução de podócitos em casos de Nefrite Lúpica.
- II. A redução de podócitos na Nefrite Lúpica é progressiva de acordo com a evolução da gravidade da doença.
- III. Há maior apagamento de pedicelos no grupo Nefrite Lúpica.
- IV. A extensão do apagamento dos pedicelos foi maior na classe proliferativa difusa.
- V. Não houve relação entre a densidade de podócitos e o apagamento de pedicelos nos casos de Nefrite Lúpica.
- VI. Casos com Nefrite Lúpica classe IV apresentaram maiores níveis de proteinúria.
- VII. O grau de atividade da Nefrite Lúpica está relacionado com o apagamento dos pedicelos na classe IV.
- VIII. A redução de podócitos e o apagamento dos pedicelos depende dos depósitos imunocomplexos.

9 CONCLUSÃO

A evolução das classes da Nefrite Lúpica tem relação com a redução de podócitos e apagamento dos pedicelos. Os podócitos têm papel importante no desenvolvimento da Nefrite Lúpica, especialmente na classe IV. Essa classe apresenta mais apagamento dos pedicelos e essa lesão tem relação com a atividade da doença.

REFERÊNCIAS

AMANN, K.; HAAS, C.S. What you should know about the work-up of renal biopsy. **Nephrol. Dial Transplant**, 26, p.1157-1161, 09 01 2006.

ANDERS, H. J.; SAXENA, R.; ZHAO, M. H.; PARODIS, I. *et al.* Lupus nephritis. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 7, 01 23 2020.

AUSTIN, H. A.; ILLEI, G. G. Membranous lupus nephritis. **Lupus**, 14, n. 1, p. 65-71, 2005.

BAJEMA, I. M.; WILHELMUS, S.; ALPERS, C. E.; BRUIJN, J. A. *et al.* Revision of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and chronicity indices. **Kidney Int**, 93, n. 4, p. 789-796, Apr 2018.

BASTIAN, H. M.; ROSEMAN, J. M.; MCGWIN, G.; ALARCÓN, G. S. *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. **Lupus**, 11, n. 3, p. 152-160, 2002.

BERNATSKY, S.; BOIVIN, J. F.; JOSEPH, L.; MANZI, S. *et al.* Mortality in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 54, n. 8, p. 2550-2557, Aug 2006.

BOLLAIN-Y-GOYTIA, J. J.; GONZÁLEZ-CASTAÑEDA, M.; TORRES-DEL-MURO, F.; DAZA-BENITEZ, L. *et al.* Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. **Indian J Nephrol**, 21, n. 3, p. 166-171, Jul 2011.

BOMBACK, A. S. Nonproliferative Forms of Lupus Nephritis: An Overview. **Rheum Dis Clin North Am**, 44, n. 4, p. 561-569, Nov 2018.

BOUACHI, K.; MOKTEFI, A.; ZHANG, S. Y.; ONISZCZUK, J. *et al.* Expression of CMIP in podocytes is restricted to specific classes of lupus nephritis. **PLoS One**, 13, n. 11, p. e0207066, 2018.

BRUSCHI, M.; GALETTI, M.; SINICO, R. A.; MORONI, G. *et al.* Glomerular Autoimmune Multicomponents of Human Lupus Nephritis In Vivo (2): Planted Antigens. **J Am Soc Nephrol**, 26, n. 8, p. 1905-1924, Aug 2015.

BRUSCHI, M.; SINICO, R. A.; MORONI, G.; PRATESI, F. *et al.* Glomerular autoimmune multicomponents of human lupus nephritis in vivo: α -enolase and annexin AI. **J Am Soc Nephrol**, 25, n. 11, p. 2483-2498, Nov 2014.

CHADE, A. R. Renal vascular structure and rarefaction. **Compr Physiol**, 3, n. 2, p. 817-831, Apr 2013.

CHEN, S.; TANG, Z.; XIANG, H.; LI, X. *et al.* Etiology and Outcome of Crescentic Glomerulonephritis From a Single Center in China: A 10-Year Review. **Am J Kidney Dis**, 67, n. 3, p. 376-383, Mar 2016.

CHENG, H.; HARRIS, R. C. The glomerulus--a view from the outside--the podocyte. **Int J Biochem Cell Biol**, 42, n. 9, p. 1380-1387, Sep 2010.

CHOI, S. E.; FOGO, A. B.; LIM, B. J. Histologic evaluation of activity and chronicity of lupus nephritis and its clinical significance. **Kidney Res Clin Pract**, 42, n. 2, p. 166-173, Mar 2023.

CONSIGLIO, C. R.; JULIANA DA SILVEIRA, S.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R. M. *et al.* SIRT1 promoter polymorphisms as clinical modifiers on systemic lupus erythematosus. **Mol Biol Rep**, 41, n. 7, p. 4233-4239, Jul 2014.

CUI, J. H.; QIAO, Q.; GUO, Y.; ZHANG, Y. Q. *et al.* Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. **J Nephrol**, 25, n. 2, p. 255-261, 2012 Mar-Apr 2012.

DA SILVA, C. A.; MONTEIRO, M. L. G. D.; ARAÚJO, L. S.; URZEDO, M. G. *et al.* In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. **PLoS One**, 15, n. 11, p. e0241745, 2020.

DEEGENS, J. K.; DIJKMAN, H. B.; BORM, G. F.; STEENBERGEN, E. J. *et al.* Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney Int**, 74, n. 12, p. 1568-1576, Dec 2008.

DESAI, N.; CIMBALUK, D.; LEWIS, E. J.; WHITTIER, W. L. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. **Lupus**, 22, n. 5, p. 461-468, Apr 2013.

DOS SANTOS, M.; POLETTI, P. T.; MILHORANSA, P.; MONTICIELO, O. A. *et al.* Unraveling the podocyte injury in lupus nephritis: Clinical and experimental approaches. **Semin Arthritis Rheum**, 46, n. 5, p. 632-641, Apr 2017.

FELDMAN, C. H.; HIRAKI, L. T.; LIU, J.; FISCHER, M. A. *et al.* Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. **Arthritis Rheum**, 65, n. 3, p. 753-763, Mar 2013.

FLORES-MENDOZA, G.; SANSÓN, S. P.; RODRÍGUEZ-CASTRO, S.; CRISPÍN, J. C. *et al.* Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. **Trends Mol Med**, 24, n. 4, p. 364-378, Apr 2018.

FONT, J.; TORRAS, A.; CERVERA, R.; DARNELL, A. *et al.* Silent renal disease in systemic lupus erythematosus. **Clin Nephrol**, 27, n. 6, p. 283-288, Jun 1987.

GLESSE, N.; VIANNA, P.; PAIM, L. M. G.; MATTE, M. C. C. *et al.* Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to systemic lupus erythematosus. **Lupus**, 26, n. 7, p. 746-755, Jun 2017.

GOLDWICH, A.; BURKARD, M.; OLKE, M.; DANIEL, C. *et al.* Podocytes are nonhematopoietic professional antigen-presenting cells. **J Am Soc Nephrol**, 24, n. 6, p. 906-916, May 2013.

GUNDERSEN, H. J.; SEEFELDT, T.; OSTERBY, R. Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. **Cell Tissue Res**, 205, n. 1, p. 147-155, 1980.

ICHINOSE, K.; KITAMURA, M.; SATO, S.; FUJIKAWA, K. *et al.* Podocyte foot process width is a prediction marker for complete renal response at 6 and 12 months after induction therapy in lupus nephritis. **Clin Immunol**, 197, p. 161-168, Dec 2018.

INOKUCHI, S.; SHIRATO, I.; KOBAYASHI, N.; KOIDE, H. *et al.* Re-evaluation of foot process effacement in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. **Kidney Int**, 50, n. 4, p. 1278-1287, Oct 1996.

IZZEDINE, H.; MANGIER, M.; ORY, V.; ZHANG, S. Y. *et al.* Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy. **Kidney Int**, 85, n. 2, p. 457-470, Feb 2014.

JERUC, J.; VIZJAK, A.; ROZMAN, B.; FERLUGA, D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 as a marker of apoptosis in glomeruli of human lupus nephritis. **Am J Kidney Dis**, 48, n. 3, p. 410-418, Sep 2006.

KAYE, K. W.; GOLDBERG, M. E. Applied anatomy of the kidney and ureter. **Urol Clin North Am**, 9, n. 1, p. 3-13, Feb 1982.

KIRIAKIDOU, M.; CHING, C. L. Systemic Lupus Erythematosus. **Ann Intern Med**, 172, n. 11, p. ITC81-ITC96, Jun 02 2020.

KLUMB, E. M.; SCHEINBERG, M.; SOUZA, V. A.; XAVIER, R. M. *et al.* The landscape of systemic lupus erythematosus in Brazil: An expert panel review and recommendations. **Lupus**, 30, n. 10, p. 1684-1695, Sep 2021.

LIU, R.; WEN, X.; PENG, X.; ZHAO, M. *et al.* Immune podocytes in the immune microenvironment of lupus nephritis (Review). **Mol Med Rep**, 28, n. 5, Nov 2023.

MACHIDA, H.; ITO, S.; HIROSE, T.; TAKESHITA, F. *et al.* Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. **Nephrol Dial Transplant**, 25, n. 8, p. 2530-2537, Aug 2010.

MANSUR, J. B.; SABINO, A. R.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Is there a role for urinary podocyte excretion assessment in lupus nephritis? **Ren Fail**, 38, n. 4, p. 643-647, 2016.

MARTINS, A. L. M. D.; BERNARDES, A. B.; FERREIRA, V. A.; WANDERLEY, D. C. *et al.* In situ assessment of Mindin as a biomarker of podocyte lesions in diabetic nephropathy. **PLoS One**, 18, n. 5, p. e0284789, 2023.

MASON, L. J.; RAVIRAJAN, C. T.; RAHMAN, A.; PUTTERMAN, C. *et al.* Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? **Arthritis Rheum**, 50, n. 3, p. 866-870, Mar 2004.

MASUTANI, K.; AKAHOSHI, M.; TSURUYA, K.; TOKUMOTO, M. *et al.* Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. **Arthritis Rheum**, 44, n. 9, p. 2097-2106, Sep 2001.

MITTOO, S.; FELL, C. D. Pulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. **Semin Respir Crit Care Med**, 35, n. 2, p. 249-254, Apr 2014.

MOELLER, M. J.; SOOFI, A.; HARTMANN, I.; LE HIR, M. *et al.* Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol**, 15, n. 1, p. 61-67, Jan 2004.

OKAMOTO, T.; SASAKI, S.; YAMAZAKI, T.; SATO, Y. *et al.* Prevalence of CD44-positive glomerular parietal epithelial cells reflects podocyte injury in adriamycin nephropathy. **Nephron Exp Nephrol**, 124, n. 3-4, p. 11-18, 2013.

PAN, B. P.; FENG, Z. J.; LI, X. L.; HE, L. P. *et al.* An Analysis of the Correlation Between Clinical Indexes and Pathological Classifications in 202 Patients with Lupus Nephritis. **J Inflamm Res**, 14, p. 6917-6927, 2021.

PAN, L.; LU, M. P.; WANG, J. H.; XU, M. *et al.* Immunological pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **World J Pediatr**, 16, n. 1, p. 19-30, Feb 2020.

PAQUISSI, F. C.; ABENSUR, H. The Th17/IL-17 Axis and Kidney Diseases, With Focus on Lupus Nephritis. **Front Med (Lausanne)**, 8, p. 654912, 2021.

- PARIKH, S. V.; ALMAANI, S.; BRODSKY, S.; ROVIN, B. H. Update on Lupus Nephritis: Core Curriculum 2020. **Am J Kidney Dis**, 76, n. 2, p. 265-281, 08 2020.
- PATRAKKA, J.; TRYGGVASON, K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. **Biochem Biophys Res Commun**, 396, n. 1, p. 164-169, May 21 2010.
- PAVENSTÄDT, H.; KRIZ, W.; KRETZLER, M. Cell biology of the glomerular podocyte. **Physiol Rev**, 83, n. 1, p. 253-307, Jan 2003.
- PETERMANN, A.; FLOEGE, J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. **Nephron Clin Pract**, 106, n. 2, p. c61-66, 2007.
- PETRI, M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, 17, n. 5, p. 412-415, May 2008.
- POLLAK, M. R.; QUAGGIN, S. E.; HOENIG, M. P.; DWORKIN, L. D. The glomerulus: the sphere of influence. **Clin J Am Soc Nephrol**, 9, n. 8, p. 1461-1469, Aug 2014.
- 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.
- REISER, J.; VON GERSDORFF, G.; LOOS, M.; OH, J. *et al.* Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. **J Clin Invest**, 113, n. 10, p. 1390-1397, May 2004.
- REZENDE, G. M.; VIANA, V. S.; MALHEIROS, D. M.; BORBA, E. F. *et al.* Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? **Lupus**, 23, n. 3, p. 255-262, Mar 2014.
- ROCHA, L. P.; CARMINATI, C. R.; MACHADO, J. R.; LATERZA, V. L. *et al.* Prevalence of nephropathies in children and adolescents and alterations in renal biopsies in Minas Gerais, Brazil, from 1996 to 2010. **Ann Diagn Pathol**, 17, n. 1, p. 22-27, Feb 2013.
- ROVIN, B. H.; PARIKH, S. V.; ALVARADO, A. The kidney biopsy in lupus nephritis: is it still relevant? **Rheum Dis Clin North Am**, 40, n. 3, p. 537-552, ix, Aug 2014.
- SAKHI, H.; MOKTEFI, A.; BOUACHI, K.; AUDARD, V. *et al.* Podocyte Injury in Lupus Nephritis. **J Clin Med**, 8, n. 9, Aug 29 2019.
- SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. Review series: The cell biology of renal filtration. **J Cell Biol**, 209, n. 2, p. 199-210, Apr 2015.

SELIGMAN, V. A.; LUM, R. F.; OLSON, J. L.; LI, H. *et al.* Demographic differences in the development of lupus nephritis: a retrospective analysis. **Am J Med**, 112, n. 9, p. 726-729, Jun 15 2002.

SEMENIKHINA, M.; STEFANENKO, M.; SPIRES, D. R.; ILATOVSKAYA, D. V. *et al.* Nitric-Oxide-Mediated Signaling in Podocyte Pathophysiology. **Biomolecules**, 12, n. 6, May 25 2022.

SENDEYO, K.; AUDARD, V.; ZHANG, S. Y.; FAN, Q. *et al.* Upregulation of c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. **Kidney Int**, 83, n. 3, p. 414-425, Mar 2013.

SHANKLAND, S. J.; SMEETS, B.; PIPPIN, J. W.; MOELLER, M. J. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. **Nat Rev Nephrol**, 10, n. 3, p. 158-173, Mar 2014.

SILPA-ARCHA, S.; LEE, J. J.; FOSTER, C. S. Ocular manifestations in systemic lupus erythematosus. **Br J Ophthalmol**, 100, n. 1, p. 135-141, Jan 2016.

SOUYRIS, M.; CENAC, C.; AZAR, P.; DAVIAUD, D. *et al.* escapes X chromosome inactivation in immune cells. **Sci Immunol**, 3, n. 19, Jan 26 2018.

SUN, L.; ZOU, L. X.; HAN, Y. C.; WU, L. *et al.* A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1. **J Cell Physiol**, Feb 25 2019.

TEWARI, R.; NADA, R.; RAYAT, C. S.; BORUAH, D. *et al.* Correlation of proteinuria with podocyte foot process effacement in IgA nephropathy: an ultrastructural study. **Ultrastruct Pathol**, 39, n. 2, p. 147-151, Apr 2015.

VAN DEN BERG, J. G.; VAN DEN BERGH WEERMAN, M. A.; ASSMANN, K. J.; WEENING, J. J. *et al.* Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human glomerulopathies. **Kidney Int**, 66, n. 5, p. 1901-1906, Nov 2004.

VENKATAREDDY, M.; WANG, S.; YANG, Y.; PATEL, S. *et al.* Estimating podocyte number and density using a single histologic section. **J Am Soc Nephrol**, 25, n. 5, p. 1118-1129, May 2014.

VILÁ, L. M.; ALARCÓN, G. S.; MCGWIN, G.; BASTIAN, H. M. *et al.* Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort, XXXVII: association of lymphopenia with clinical manifestations, serologic abnormalities, disease activity, and damage accrual. **Arthritis Rheum**, 55, n. 5, p. 799-806, Oct 15 2006.

WANG, H.; REN, Y. L.; CHANG, J.; GU, L. *et al.* A Systematic Review and Meta-analysis of Prevalence of Biopsy-Proven Lupus Nephritis. **Arch Rheumatol**, 33, n. 1, p. 17-25, Mar 2018.

WANG, Y.; YU, F.; SONG, D.; WANG, S. X. *et al.* Podocyte involvement in lupus nephritis based on the 2003 ISN/RPS system: a large cohort study from a single centre. **Rheumatology (Oxford)**, 53, n. 7, p. 1235-1244, Jul 2014.

WEENING, J. J.; D'AGATI, V. D.; SCHWARTZ, M. M.; SESHAN, S. V. *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Kidney Int**, 65, n. 2, p. 521-530, Feb 2004.

WELSH, G. I.; SALEEM, M. A. The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease. **Nat Rev Nephrol**, 8, n. 1, p. 14-21, Jan 2012.

WRIGHT, R. D.; BERESFORD, M. W. Podocytes contribute, and respond, to the inflammatory environment in lupus nephritis. **Am J Physiol Renal Physiol**, 315, n. 6, p. F1683-F1694, 12 01 2018.

YU, F.; HAAS, M.; GLASSOCK, R.; ZHAO, M. H. Redefining lupus nephritis: clinical implications of pathophysiologic subtypes. **Nat Rev Nephrol**, 13, n. 8, p. 483-495, Aug 2017.

YUAN, M.; TAN, Y.; WANG, Y.; WANG, S. X. *et al.* The associations of endothelial and podocyte injury in proliferative lupus nephritis: from observational analysis to in vitro study. **Lupus**, 28, n. 3, p. 347-358, Mar 2019.

ZHANG, H.; SUN, Y.; HU, R.; LUO, W. *et al.* The regulation of the UCH-L1 gene by transcription factor NF- κ B in podocytes. **Cell Signal**, 25, n. 7, p. 1574-1585, Jul 2013.

ZHANG, S. Y.; KAMAL, M.; DAHAN, K.; PAWLAK, A. *et al.* c-mip impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. **Sci Signal**, 3, n. 122, p. ra39, May 18 2010.

ZHOU, X.; CHEN, H.; WEI, F.; ZHAO, Q. *et al.* α -mangostin attenuates pristane-induced lupus nephritis by regulating Th17 differentiation. **Int J Rheum Dis**, 23, n. 1, p. 74-83, Jan 2020.

ZHOU, X.; CHEN, H.; WEI, F.; ZHAO, Q. *et al.* 3. **J Immunol Res**, 2019, p. 2431617, 2019.

ANEXO I

Parecer do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo das doenças renais diagnosticadas no Centro de Pesquisa em Rim da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Pesquisador: JULIANA REIS MACHADO E SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61450322.8.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triangulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.609.537

Apresentação do Projeto:

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_1996337.pdf, de 11/08/2022) e do Projeto Detalhado (Projeto.docx, de 11/08/2022).

Segundo os pesquisadores:

"INTRODUÇÃO: Os néfrons são as unidades funcionais do rim e o ser humano saudável possui aproximadamente 1 milhão de néfrons. Cada néfron é composto por um glomérulo e um sistema tubular que é dividido em túbulo contorcido proximal, alça de Henle, túbulo contorcido distal e ducto coletor. Esse sistema é responsável por secretar resíduos e reabsorver água, íons, aminoácidos e glicose (KAYE; GOLDBERG, 1982). O glomérulo é formado por um tufo de capilares, como se fosse um novelo de lã, e possui na sua composição quatro células: as células endoteliais glomerulares (CEGs), as células epiteliais viscerais - os podócitos-, as células mesangiais (CMs) e células epiteliais parietais (CEPs). As CMs e sua matriz mesangial formam o mesângio, o qual é responsável por manter a estrutura da vasculatura do glomérulo. As CEPs formam um envoltório chamado de cápsula de Bowman, onde o filtrado urinário é coletado e posteriormente eliminado por meio dos túbulos. Os podócitos e as CEGs possuem uma matriz extracelular em comum, sendo denominada de membrana basal glomerular (MBG). A principal função do glomérulo é filtrar

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: 5.609.537

seletivamente o sangue, que entra pela arteríola aferente e sai pela arteríola eferente, e isso ocorre por meio da Barreira de Filtração Glomerular (BFG), composta por três camadas distintas: o endotélio capilar fenestrado, a MBG e os podócitos (SCOTT; QUAGGIN, 2015). Caso a BFG não esteja funcionando adequadamente, ocorre a perda de proteínas na urina, que é conhecida como proteinúria (KODNER, 2016). As glomerulopatias, doenças que acometem os glomérulos, são responsáveis por 20% das doenças renais crônicas, que são consideradas grande problema de saúde pública e possui uma prevalência global de 9,1%, o que representa aproximadamente 700 milhões de casos (COCKWELL; FISHER, 2020). Além disso, é a causa mais frequente de doença renal crônica em estágio terminal, que cursa com necessidade de terapia de substituição renal, seja por meio de diálise ou por transplante renal (COCKWELL; FISHER, 2020). Em relação a apresentação clínica as doenças renais podem ser divididas em: proteinúria isola; síndrome nefrótica; hematúria isolada; síndrome nefrítica; insuficiência renal.

A proteinúria, definida como perda de proteína na urina, geralmente é um sinal de permeabilidade aumentada do glomérulo. Pode ser assintomática ou sintomática, sendo considerada assintomática quando a perda varia de 1 a 3g/24h. Níveis mais elevados levam a edema e síndrome nefrótica. A síndrome nefrótica é caracteriza por proteinúria > 3,5 g/25h, seguida de hipoalbuminemia, edema, hiperlipidemia, lipidúria (POLITANO; COLBERT; HAMIDUZZAMAN, 2020). A hematúria é presença de hemácias na urina e significa inflamação glomerular. Pode se apresentar de forma microscópica ou macroscópica, sendo considerada sintomática quando macroscópica. Pode ocorrer de forma isolada ou combinada com insuficiência renal aguda, causando a síndrome nefrítica. Dessa forma, a síndrome nefrítica é caracterizada por hematúria, proteinúria, creatinina elevada, hipertensão e edema (LAMBA; NAM; CONTRACTOR; KIM, 2020).

A insuficiência renal pode ser de forma aguda ou crônica. A insuficiência renal aguda é definida como um aumento na creatinina sérica ou uma diminuição na produção de urina ao longo de horas a dias tendo como base os valores de creatinina nos 6 meses anteriores. Pode se dar por causa subjacente como pré-renal, renal intrínseca - causada por alguma doença renal - ou pós-renal (JACOB; DANNENHOFFER; RUTTER, 2020). A insuficiência renal crônica é caracterizada como anormalidades função renal presentes por mais de 3 meses com repercussões para a saúde. É definida por taxa de filtração glomerular estimada menor que 60 mL/min/1,73m² ou alteração em um ou mais marcadores de disfunção renal, incluindo albuminúria. Pode ocorrer como consequência de 2 mecanismos, sendo um gatilho inicial e um mecanismo de perpetuação. O estímulo inicial pode ser um problema renal inicial, um problema inflamatório ou imunológico e esse dano renal é então perpetuado pelo processo de hiperfiltração e hipertrofia dos néfrons

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: 5.609.537

remanescentes (CHARLES; FERRIS, 2020).

Em relação a etiopatogênese das doenças renais, elas podem ser divididas de acordo com o principal mecanismo de lesão, sendo: alteração primária no podócito; alteração na membrana basal; doenças imunomediadas; relacionadas com doenças metabólicas e glomerulopatias rapidamente progressivas que levam a insuficiência renal aguda.

As podocitopatias são o grupo de doenças glomerulares que levam a síndrome nefrótica devido à lesão ou disfunção dos podócitos (SINGH; SINGH; DINDA, 2015). As podocitopatias primárias são a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e a doença de lesões mínimas (DLM), que morfológicamente apresentam em comum, o apagamento dos pedicelos observado na microscopia eletrônica (BARISONI; SCHNAPER; KOPP, 2007). As podocitopatias hereditárias constituem em um grupo de doenças raras cuja etiologia envolve a mutação em alguma proteína que faz parte da composição dos podócitos ou do diafragma slit (BIERZYNSKA; SODERQUEST; KOZIELL, 2014). As alterações morfológicas encontradas em biópsias renais podem variar, pois dependerá da proteína mutada, mas de maneira geral pode cursar com alterações morfológicas compatíveis com doença de lesão mínima, esclerose mesangial difusa e GESF (BÜSCHER; KRANZ; BÜSCHER; HILDEBRANDT et al., 2010).

As glomerulopatias cuja alteração é na membrana basal glomerular, incluem a síndrome de Alport e a doença da membrana fina. A síndrome de Alport é uma doença renal hereditária caracterizada por anormalidades estruturais e disfunção na MBG, bem como nas membranas basais de outros tecidos como olho e ouvido, o que faz com que os pacientes com síndrome de Alport frequentemente apresentem perda progressiva da função renal, perda auditiva neurossensorial e anormalidades oculares variáveis (SAVIGE, 2014). Na síndrome de Alport, mutações nos genes COL4A3, COL4A4 ou COL4A5, que resultam em lamelação e irregularidades da espessura da MBG observadas na MET, culminando clinicamente em hematúria e proteinúria. A doença da membrana basal fina é uma doença autossômica dominante e causa mais comum de hematúria persistente em crianças, definida como hematúria familiar benigna. Nessa doença ocorre mutações nos genes COL4A3 e COL4A4 das cadeias de colágeno tipo IV, o que resulta em uma diminuição da espessura da MBG (<200 um). Na MET é observada uma MBG fina de forma difusa, sem o aparecimento de lamelações que são encontradas na síndrome de Alport (TRYGGVASON; PATRAKKA, 2006).

As principais glomerulopatias imunomediadas são a nefropatia por IgA, a glomerulopatia membranosa, a nefrite lúpica e as glomerulopatias com C3 dominante.

A nefropatia por IgA é uma doença renal primária mais comum do mundo caracterizada pela deposição de IgA no mesângio glomerular. A doença pode ocorrer em qualquer idade, mas atinge

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: 5.609.537

mais adultos jovens na faixa etária dos 20 e 40 anos. Ela é caracterizada por ter progressão clínica lenta, no entanto 20-40% dos casos evoluem para doença renal terminal (GHARAVI; YAN; SCOLARI; SCHENA et al., 2000). Sua manifestação clínica frequente é a hematúria macroscópica, no entanto, ela pode variar desde de anormalidades urinárias assintomáticas como hematúria microscópica com ou sem proteinúria, até anormalidades bem evidentes como síndrome nefrótica ou insuficiência renal progressiva (PATRAPORNPISTUT; AVILA-CASADO; REICH, 2021).

A glomerulopatia membranosa (GM) é caracterizada morfológicamente pela presença de imunoglobulina G (IgG) e fator do complemento C3, sob a forma de depósitos granulares acima da membrana basal glomerular (MBG), na região subepitelial (BECK; SALANT, 2010). Na MET são visualizados depósitos amorfos, elétron-densos, nas regiões subepiteliais e intramembranosa (HOGAN; MOHAN; APPEL, 2014). Classicamente é uma doença que cursa com proteinúria, sendo que em 80% dos casos encontra-se na faixa nefrótica. Hipertensão arterial (10-20% a 30-50%) e insuficiência renal (10-20%) ao diagnóstico estão presentes em graus variados, porém são menos frequentes e hematúria pode ocorrer em 30-50% dos pacientes (PONTICELLI; GLASSOCK, 2014). Cerca de 80% dos casos de GM são do tipo primário (GMP), ou seja, que não tem associação com nenhuma doença identificável, enquanto que os demais casos apresentam etiologia definida tais como infecções, medicamentos, neoplasias (10% dos casos) ou doenças autoimunes, sendo definidos como GM secundária (GMS) (LARSEN; MESSIAS; SILVA; MESSIAS et al., 2013).

A nefrite lúpica (NL), que é uma das manifestações orgânica mais graves do lúpus eritematoso sistêmico (LES), acomete cerca de 50% dos pacientes com LES, em média dentro de 5 anos do diagnóstico (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS et al., 2020), normalmente desenvolve em pacientes com LES com idade mais jovem e foi a 3ª causa mais comum de glomerulopatias na faixa etária pediátrica em um centro de diagnóstico em Minas Gerais (ROCHA; CARMINATI; MACHADO; LATERZA et al., 2013). Apesar da evolução do conhecimento e melhores opções de tratamento, a NL continua sendo uma causa substancial de morbidade e morte entre pacientes com LES (BERNATSKY; BOIVIN; JOSEPH; MANZI et al., 2006) e de 10% a 30% dos pacientes evoluem para insuficiência renal, necessitando de terapia de substituição renal (PARIKH; ALMAANI; BRODSKY; ROVIN, 2020). A apresentação clínica e os achados laboratoriais para NL podem diferir, variando de NL "silenciosa" (resultados normais de urinálise, função renal normal e ausência de proteinúria em pacientes assintomáticos) a proteinúria grave e síndrome nefrótica (mais de 3,5 g de proteína por dia) ou síndrome nefrítica, que pode resultar em insuficiência renal aguda. No entanto, os pacientes mais comumente apresentam proteinúria leve e/ou hematúria e, em alguns casos, leucocitúria (ANDERS; SAXENA; ZHAO; PARODIS et al., 2020).

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: 5.609.537

As glomerulopatias com C3 dominante são um conjunto de doenças renais raras caracterizadas pela por marcação na IF de C3 isoladamente ou predominante (predominância superior a pelo menos duas ordens de grandeza em relação a qualquer outro marcador). São subdivididas em glomerulonefrite difusa aguda, glomerulopatia por C3 e doença do depósito denso. Sua etiopatogênese ainda não completamente compreendida. Acredita-se decorrer de uma disfunção em diversos pontos da via alternativa do complemento. Pode estar associada à presença de mutações e variantes nos genes do complemento e fatores (H, I e B) e à presença de fator nefrítico C3 ou outros autoanticorpos. A apresentação clínica é extremamente heterogênea, podendo associar-se à história de infecção prévia, à presença de gamopatias monoclonais e a doenças autoimunes. Os principais achados são hematúria (87,7%), proteinúria de faixa nefrótica (42,1%) ou Síndrome Nefrótica (17,5%), acometimento da função renal e queda da dosagem de C3 (44,6%) de C4 (12%). Na biópsia renal, são observados padrões membranoproliferativo e mesangioproliferativo na ML. Na IF, há deposição glomerular isolada de C3 com forte marcação (2+/3+) ou predominante de C3 (2+/3+), com marcação de 1+ para imunoglobulinas (45,1%) e cadeias leves. Já na ME, são observados depósitos elétron-densos em “fita” ou amorfos, podendo ser subepiteliais, subendoteliais, transmembranosos e/ou mesangiais (SMITH; APPEL; BLOM; COOK et al., 2019).

Dentro das alterações metabólicas que causam repercussões renais estão a nefropatia diabética e as doenças relacionadas com o metabolismo lipídico como a deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase e doença de Fabry.

A nefropatia diabética (ND) é definida como uma síndrome caracterizada por lesões glomerulares e alterações laboratoriais como excesso de albumina na urina e diminuição da taxa de filtração glomerular (MCFARLANE; CHERNEY; GILBERT; SENIOR et al., 2018). É a causa mais frequente de doença renal terminal na maioria dos países, sendo que os mecanismos ainda permanecem obscuros. Morfologicamente, na microscopia de luz são frequentemente visualizados: o espessamento da membrana basal glomerular, a expansão mesangial, expansão da matriz mesangial de forma gradual e difusa que evolui para lesões nodulares a hialinose das arteríolas e capilares glomerulares e a expansão fibrótica do interstício. Na IF, pode ser observado marcação linear difusa (ou pseudolinear) de IgG na membrana basal do capilar glomerular, como também na membrana basal dos túbulos e depósitos inespecíficos de IgM e C3 nas lesões de esclerose segmentar (glomérulo) e hialinose arteriolar. Na MET é observado espessamento ultraestrutural difuso da MBG, mais evidente na lâmina densa, sendo essa alteração a única observada nas fases iniciais da doença, perda de podócitos e apagamento de pedicelos (FIORETTO; MAUER, 2007).

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: 5.609.537

A deficiência de lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT) é uma doença renal autossômica recessiva muito rara causada por deficiência completa ou parcial de LCAT que causa defeito na formação de éster de colesterol mediado por LCAT levando a falha em secretar LCAT ativo no plasma e depósitos de colesterol não esterificado nos rins, fígado e córnea. Clinicamente cursa com opacidades da córnea e catarata, anemia hemolítica, proteinúria que pode começar na infância e insuficiência renal na 4ª década. Morfologicamente, na ML há expansão mesangial acompanhada hiperplasia e células espumosas, espessamento da alça capilar com espículas, vacúolos e duplicação e atrofia tubular, fibrose intersticial e células espumosas. A IF é negativa e na MET há depósitos de lipídeos como resíduo granular arredondado e material denso lamelar em na MBG e no mesângio (PAVANELLO; CALABRESI, 2020).

A doença de Fabry é uma doença de depósito lisossomal causada por deficiência genética na enzima - galactosidase A (Gal), levando ao acúmulo de globotriaosilceramida (Gb3) em muitos tipos de células, que afeta rim, coração, glândula sudorípara e nervos. É uma doença recessiva ligada ao X. Os sintomas e sinais variam com a mutação e conseqüente nível funcional de Gal (mais grave com deleção) e Gb3 se acumula nas células endoteliais e musculares lisas, podócitos, túbulos distais e muitas outras células. Cursa com perda da função renal, sendo que 0,3% dos pacientes evoluem para diálise e mulheres variam de assintomáticas à insuficiência renal. Na ML pode se observar lesões semelhante a GESF e o citoplasma podócitos expandido com aspecto pálido e rendilhado devido aos depósitos de lipídios perdidos no processamento histológico além de atrofia tubular e fibrose intersticial com fibroblastos xantomizados. A IF geralmente é negativa mas pode cursar com depósitos inespecíficos de IgM e C3. Na MET, onde é observada a característica diagnóstica dessa doença, há depósitos lipídicos elétron-densos laminados em podócitos, células endoteliais, células mesangiais, células musculares lisas, túbulos distais e fibroblastos intersticiais (BERNARDES; FORESTO; KIRSZTAJN, 2020).

A Glomerulonefrite (GN) crescêntica ou Glomerulonefrite rapidamente progressiva é caracterizada pela formação de uma lesão grave e típica denominada crescente, que ocorre em mais de 50% dos glomérulos. Esta lesão se forma a partir da proliferação e diferenciação de células parietais e viscerais que se acumulam no espaço de Bowman circundando e comprimindo o tufo glomerular. Como consequência clínica, há perda de função renal rápida em um curto período (dias ou semanas), cilindros hemáticos, eritrócitos dismórficos, hematúria e proteinúria (SMEETS; UHLIG; FUSS; MOOREN et al., 2009). A GN crescêntica é classificada em 3 categorias: A tipo I é denominada GN anti membrana basal glomerular, corresponde a 10% dos casos e na análise pela imunofluorescência é caracterizada por depósitos imunes com aspecto linear (JENNETTE, 2003). 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



Continuação do Parecer: 5.609.537

tipo II varia entre 15 a 20% dos casos e na análise pela imunofluorescência é caracterizada por depósitos imunes com aspecto granular devido a depósitos de imunocomplexos circulantes na membrana basal glomerular. Este tipo de GN crescêntica é secundário a diferentes doenças associadas a formação de imunocomplexos como GN aguda pós-infecciosa (MORONI; POZZI; QUAGLINI; SEGAGNI et al., 2002), Nefropatia IgA (YU; CHIANG, 2014), Nefrite Lúpica (BORCHERS; LEIBUSHOR; NAGUWA; CHEEMA et al., 2012), Púrpura de Henoch–Schonlein (KAWASAKI; SUZUKI; MURAI; TAKAHASHI et al., 2004), Cryoglobulinemia (TSUBOI; ICHINOSE; KAWAMURA; JOH et al., 2010), Nefropatia Diabética (NASR; D'AGATI; SAID; STOKES et al., 2008), GN membranoproliferativa mediada por imuno-complexo (KORZETS; BERNHEIM, 1987) e amiloidose (MORONI; BANFI; MACCARIO; MEREGHETTI et al., 1996). A tipo III corresponde a 60-80% dos casos e é caracterizada na imunofluorescência por ausência de depósitos imunes nos glomérulos, sendo denominada GN Pauci-immune. A maioria dos pacientes apresentam vasculite sistêmica e anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (ANCA) aumentados. Esta vasculite associada a ANCA pode ser subdividida em: poliangiite microscópica, granulomatose com poliangiite (Wegener) e granulomatose eosinofílica com poliangiite (Churg-Strauss) (JENNETTE; FALK; BACON; BASU et al., 2013).

Qualquer doença renal pode evoluir para doença renal terminal que cursa com necessidade de terapia de substituição, sendo o transplante renal uma das alternativas. No entanto, pode ocorrer doenças no enxerto renal que incluem: necrose tubular aguda devido a isquemia que o enxerto sofre; doença proveniente do doador; qualquer doença renal que possa acometer o rim; doença renal recorrente que retorna no rim transplantado; doença “de novo” que é diferente da doença que levou a perda da função renal do rim nativo; e doenças específicas do transplante que são as rejeições que podem se dar por mecanismo celular ou mecanismo humoral (LIM; SHINGDE; WONG, 2019; SHRESTHA, 2017)."

"CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DOS PARTICIPANTES

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

- Biópsias de pacientes que apresentarem as três amostras (Microscopia de luz, Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão) completas para análise;
- Registro completo das informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

- Biópsias de pacientes que não apresentarem as três amostras (Microscopia de luz,

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões

Bairro: Abadia

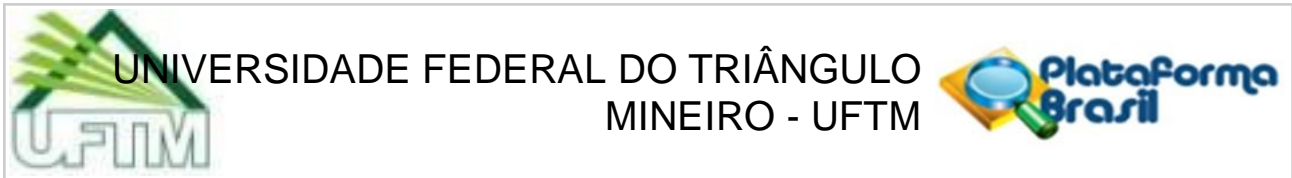
CEP: 38.025-440

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6803

E-mail: cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 5.609.537

Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão) completas para análise;

- Registro incompleto das informações clínicas, laboratoriais e epidemiológicas."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores:

"Objetivo Geral: Estudar o perfil clínico, epidemiológico, morfológico e molecular das doenças renais afim de elucidar características que possam auxiliar no melhor entendimento da patogênese, assertividade no diagnóstico e prognóstico com vista a uma terapêutica mais racional."

"Objetivos Específicos:

1. Avaliar o perfil clínico e epidemiológico das doenças renais diagnosticadas no Centro de Pesquisa em Rim – CePRim da UFTM;
2. Avaliar o perfil morfológico das doenças renais por meio da morfometria digital;
3. Avaliar o perfil molecular das doenças renais por diferentes técnicas utilizadas em Patologia molecular."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

"O material no qual será realizada a pesquisa é proveniente de biópsias renais solicitadas e realizadas pelo médico e encaminhadas ao serviço do CePRim para análise e diagnóstico. Dessa forma, para o paciente não haverá riscos adicionais, a não ser aos que já estaria exposto no momento da coleta de material para o diagnóstico. 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 doenças renais auxilie em uma terapêutica mais adequada que contribua para uma evolução mais lenta da doença e melhor

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: 5.609.537

prognóstico para o paciente."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores propõem realizar um estudo "no Centro de Pesquisa em Rim - CePRim, situado no setor de Patologia Geral, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais. Serão utilizadas biópsias renais diagnosticadas no Centro de Pesquisa em Rim - CePRim da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) no período 2012 a 2022.

O grupo controle será composto por fragmentos de necropsia de rim de pacientes cuja causa de morte não foi relacionada a doença renal ou doença infecciosa."

Equipe de pesquisadores vinculada na Plataforma Brasil: Profa Dra Juliana Reis Machado (Responsável Principal) e pesquisadores assistentes descritos no projeto original.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória adequados.

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 | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P | 11/08/2022 | 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: 5.609.537

| | | | | |
|---|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|--------|
| Básicas do Projeto | ETO_1996337.pdf | 10:12:40 | Aceito | |
| Outros | Autorizacao.pdf | 11/08/2022 10:11:27 | JULIANA REIS MACHADO E SILVA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | JustificativaausenciaTCLE.pdf | 11/08/2022 10:10:20 | JULIANA REIS MACHADO E SILVA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.docx | 11/08/2022 08:47:08 | JULIANA REIS MACHADO E SILVA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhaderosto.pdf | 11/08/2022 08:46:41 | JULIANA REIS MACHADO E SILVA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 28 de Agosto de 2022

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 II

Artigo enviado para
publicação

1 **Influence of podocyte injury on the development of Class IV Lupus**
2 **Nephritis**

3

4 **Short title: Podocyte injury in Class IV Lupus Nephritis**

5

6 Cyntia Camilo Franco Borges Zago¹, Bruna de Freitas Oliveira¹, Giovanna Uehara¹, Ana
7 Laura Carvalho Da Silva¹, Laura Penna Rocha¹, Fabiano Bichuette Custódio¹, Liliane
8 Silvano Araújo¹, Régia Caroline Peixoto Lira¹, Crislaine Aparecida da Silva¹, Marlene
9 Antônia dos Reis¹, Juliana Reis Machado^{1*}.

10

11 ¹Discipline of General Pathology, Institute of Biological and Natural Sciences of Federal
12 University of Triângulo Mineiro, Praça Manoel Terra, 330, Nossa Senhora da Abadia, Zip
13 Code: 38025-015, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

14

15 ***Corresponding author:**

16 E-mail: juliana.patologiageral@gmail.com (JRM)

17 **Abstract**

18 Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease,
19 characterized by the production of autoantibodies and immune complex deposition, affecting
20 various organs. In the kidneys, SLE leads to Lupus Nephritis (LN), a form of glomerulonephritis
21 in which podocytes appear to play a role in the pathogenesis and progression of the disease.
22 Therefore, evaluating the *in situ* morphological characteristics of podocytes becomes relevant
23 for a better understanding of the processes involved in their pathogenesis. This study
24 investigated podocytes in different classes of LN in renal biopsies performed by the Kidney
25 Research Center at the Federal University of Triângulo Mineiro. Twenty control cases and 29
26 biopsy cases diagnosed with LN were selected, divided according to the histopathological
27 classes of the disease. Podocyte density was assessed through immunohistochemistry for WT1,
28 and the evaluation of foot process effacement was performed by transmission electron
29 microscopy. Podocyte density was lower in the LN group compared to the control group, and
30 this reduction was observed in all analyzed classes when compared to the control group. More
31 foot process effacement was observed in the LN group compared to the control group, with
32 more effacement in classes I/II and class IV compared to the control group. Comparing classes,
33 the class IV group showed more foot process effacement than the class III group. An increase
34 in proteinuria levels was observed with the progression of classes, and the class IV group
35 presented higher proteinuria levels compared to the classes I/II group. A strong, positive, and
36 significant correlation was observed between the activity index and foot process effacement in
37 the class IV group. So, podocytes play an important role in the development of LN, and
38 possibly, injuries to these cells are more closely related to the inflammatory/diffuse proliferative
39 cellular process developed in class IV LN.

40 **Keywords:** Lupus Nephritis, podocyte density, foot processes effacement, renal biopsy.

42 **Introduction**

43 Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a highly heterogeneous and multisystemic
44 chronic autoimmune inflammatory disease resulting from the production of autoantibodies
45 against autoantigens and the *in situ* inflammatory response caused by the deposition of immune
46 complexes [1]. In the kidneys, SLE leads to Lupus Nephritis (LN), a form of glomerulonephritis
47 that constitutes one of the most severe manifestations of SLE, affecting approximately 60% of
48 patients [2]. Despite advances in knowledge and improved treatment options, LN remains a
49 significant cause of morbidity and mortality among SLE patients, with 10% to 30% of patients
50 progressing to chronic kidney disease, requiring renal replacement therapy [3].

51 The clinical presentation of Lupus Nephritis (LN) is highly heterogeneous, with the
52 possibility of presenting silent urinary abnormalities or features such as hematuria,
53 leukocyturia, cellular casts, and mild proteinuria. Moreover, more severe cases may manifest
54 as nephrotic syndrome and/or acute nephritic syndrome or rapidly progressive renal failure [4,
55 5].

56 Through renal biopsy, the diagnosis of LN is established utilizing the classification of
57 LN from the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS). This
58 classification is based on the location of immune complex deposits in the glomeruli, the extent
59 of glomerular involvement (mesangial, endocapillary, and extracapillary proliferative lesions),
60 and whether the pattern of injury reflects acute inflammation (active disease) or sclerosis
61 (chronic disease). The classification also proposes a semiquantitative assessment of activity and
62 chronicity for classes III and IV, with a total score of 24 for the activity index and 12 for the
63 chronicity index [6-8].

64 The pathogenesis of NL is related to the deposition of circulating immune complexes
65 and the *in situ* production of immune complexes in the kidneys, triggering the activation of the
66 complement system through the classical pathway, as well as the activation of macrophages and

67 neutrophils. This results in the release of reactive oxygen species and the production of pro-
68 inflammatory cytokines, leading to tissue inflammation that causes malfunctioning of the
69 glomerular filtration barrier, of which podocytes are a part [9].

70 Podocytes are terminally differentiated cells that, in response to injury, undergo cell
71 death due to an imbalance between adaptive responses that maintain homeostasis and cellular
72 dysfunction [10]. Morphologically, they respond to injuries with foot process effacement,
73 resulting in proteinuria and/or nephrotic syndrome [11]. Our previous studies have already
74 demonstrated a reduction in podocyte density and foot process effacement in renal biopsies of
75 other glomerular diseases such as Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS), Minimal
76 Change Disease (MCD), and Diabetic Nephropathy (DN) [12, 13].

77 Taking into consideration that one of the greatest challenges in monitoring SLE and NL
78 is that their course is marked by episodes of reactivation and that there is a role of podocyte
79 injury in the pathogenesis and progression of NL, the evaluation of *in situ* morphological
80 characteristics of podocytes becomes relevant for a better understanding of the processes
81 involved in its physiopathology.

82

83 **Materials and Methods**

84 **Study subjects**

85 This study was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal
86 University of Triângulo Mineiro with the number CAAE 61450322.8.0000.5154. All samples
87 were archived and cases were identified by codes with letters and numbers to ensure that
88 individuals were anonymized. The data was accessed for research purposes from March 1,
89 2022. Because it is a retrospective study, ethics committee waived the requirement for informed
90 consent.

91 Renal biopsies diagnosed with Lupus Nephritis (LN) were utilized, diagnosed at the
92 Kidney Research Center of the Federal University of Triângulo Mineiro. The diagnosis was
93 conducted according to the latest classification of LN from the International Society of
94 Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS), including the division into classes and the
95 activity and chronicity indices in classes III and IV [6].

96 In the present study, classes I, II, III, and IV were included. Classes V and VI were
97 excluded since Class V corresponds to Membranous Nephropathy associated with LN, and
98 Class VI had only two cases in our service. Cases with insufficient material for the three
99 analyses (common light microscopy, fluorescence, and electron microscopy) or lacking relevant
100 clinical data for correlations with morphology were also excluded.

101 Epidemiological, clinical, and laboratory data were obtained from the biopsy request form.

102 We started with 100 cases of LN, and after applying the exclusion criteria, we obtained
103 a total of 29 cases, which were divided into groups according to the diagnosis: Class I/II group
104 (n=9), Class III group (n=6), and Class IV group (n=14). The control group consisted of 20
105 samples of kidney fragments from autopsy of adult individuals, whose cause of death was not
106 related to renal disease or infectious diseases, and who did not present alterations in any of the
107 renal compartments: glomeruli, vessels, tubules, and interstitium.

108

109 **Evaluation of Podocytes**

110 Paraffin-embedded renal biopsy fragments with a thickness of 2 μm underwent
111 immunohistochemical techniques. For podocyte labeling, the primary antibody anti-WT1
112 (Dako) was used at a dilution of 1:500. The antibody was incubated in a dark, humid chamber
113 at room temperature for 2 hours. The technique was performed manually using the non-
114 biotinylated Novolink polymer system (Novolink Polymer Detection System Kit, BL, UK),

115 following the manufacturer's instructions. Subsequently, the slides were counterstained with
116 Hematoxylin and subjected to morphometric analysis.

117 Digital images of glomeruli were captured using the AxionCam ICc55 digital camera
118 (Zeiss, Germany) attached to a light microscope with a 40X objective lens. All immunolabeled
119 podocytes were counted in each glomerulus, and the area of each glomerular tuft was measured
120 [12, 13]. The results were expressed in podocyte density [14].

121

122 **Evaluation of Foot Processes**

123 Renal biopsy fragments fixed in Karnovsky + Ruthenium Red were processed for resin
124 embedding and subjected to semi-thin sections of 250 nm thickness, stained with toluidine blue,
125 to identify the best glomeruli for evaluation under the transmission electron microscope. Once
126 the glomeruli were selected, the block was trimmed for the preparation of ultra-thin sections
127 with a thickness of 50 to 70 nm. The grid containing the ultra-thin section was examined under
128 the Zeiss EM-900 transmission electron microscope.

129 Images of all available glomerular capillaries were evaluated at a magnification of
130 7000x, with at least two capillaries per glomerulus. Subsequently, the images were analyzed
131 using the semi-automatic ImageJ 1.53t program. To do this, the system was calibrated using the
132 scale bar in the electron micrographs. Identified foot processes were manually counted and
133 marked. Subsequently, the length of the glomerular capillary to be studied was measured. The
134 estimation of the width of the foot process was performed using the formula $FPW = (\Sigma \text{ length}$
135 $\text{ of glomerular capillary} / \Sigma \text{ number of foot processes}) \times \pi/4$ [13, 15], where $\pi/4$ is a correction
136 factor to adjust for a presumed random variation in the angle of the relative section of the axial
137 axis of the foot process [16]. The results were expressed in nanometers.

138

139

140 **Statistical Analysis**

141 For statistical analysis, a spreadsheet was created using Microsoft Excel, and data
142 analysis was conducted using the GraphPad Prism program (version 7.0). The variables were
143 tested to determine whether they exhibited a normal or non-normal distribution through the
144 Kolmogorov-Smirnov test, and analysis of variance was performed. Non-parametric tests were
145 applied, with the Mann-Whitney test and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test for
146 the comparison between two groups and three or more groups, respectively. The Spearman test
147 was employed for correlation analysis. Differences were considered statistically significant
148 when the "p" value was less than 5% ($p < 0.05$).

149

150 **Results**

151

152 **Clinical-epidemiological profile**

153 Given that LN accounts for 10% of the cases evaluated in our service, we initiated our
154 study with 100 cases. After applying the exclusion criteria, we were left with 29 cases for
155 analysis. Among these, the majority were female (93.10%), with a mean age of 32 ± 9.55 years.
156 The clinical-laboratory profile is detailed in Table 1.

157

158

159

160

161

162

163

164 **Table 1 - Clinical and laborarory characteristics of pacientes with Lupus Nephritis**

| | Lupus Nephritis | Classes I/ II | Class III | Class IV |
|--|-------------------|--------------------|----------------------|---------------------|
| Age (Years) | | | | |
| <i>Mean±SD</i> | 32±9.55 | 37±9.40 | 27.83±6.55 | 30.57±9.89 |
| <i>Median (min-max)</i> | 31 (18-54) | 35 (25-54) | 28.50 (19-35) | 29 (18-53) |
| Gender n (%) | | | | |
| <i>Male</i> | 2 (6.90) | 1 (11.11) | 0 (0.00) | 1 (7.14) |
| <i>Female</i> | 27 (93.10) | 8 (88.89) | 6 (100.00) | 13 (92.86) |
| Creatinine (mg\dl) | | | | |
| <i>Mean ± SD</i> | 1.83±2.45 | 1.70±2.40 | 0.95±0.56 | 2.28±2.95 |
| <i>Median (min-max)</i> | 1.00 (0.34-11.40) | 0.80 (0.55-7.62) | 0.88 (0.36-1.98) | 1.00 (0.34-11.4) |
| | | | | |
| eGFR (mL/min/1.73m²) | | | | |
| <i>Mean ± SD</i> | 77.78±41.98 | 85.38±39.47 | 96.00±41.65 | 65.64±42.53 |
| <i>Median (min-max)</i> | 81 (4.00-149.00) | 98.50(5.00-125.00) | 93.50 (33.00-149.00) | 64.00 (4.00-141.00) |
| | | | | |
| Proteinuria (g/24h) | | | | |
| <i>Mean ± SD</i> | 2.57±2.49 | 1.36±1.11 | 2.23±2.90 | 3.55±2.71 |
| <i>Median (min-max)</i> | 1.54 (0.00-8.60) | 1.30 (0.00-3.59) | 1.11 (0.57-8.08) | 3.0 (0.67-8.60) |

165 SD: Standard deviation

166 Max: Maximum

167 Min: Minimum

168 n: Number of cases

169 eGFR: Glomerular filtration rate estimated

170

171 **Podocyte alterations in Lupus Nephritis**

172 Whereas the crucial role of podocytes in glomerular diseases, we assessed the number
173 of podocytes through the expression of WT1 in LN cases, observing a significant reduction in
174 podocyte density compared to the control group (Fig 1A, $p < 0.0001$). When separated by class,
175 this reduction was also observed in all LN classes compared to the control group (Figs 1B-F, p
176 < 0.0001); however, there was no statistical difference between the classes.

177

178 **Fig 1. Analysis of podocyte density using immunohistochemical technique for WT1. (A)**

179 Comparison between the control group and the Lupus Nephritis group. Mann-Whitney
180 comparison test, $p < 0.0001$. Comparison between (B) control group and the classes of Lupus
181 Nephritis. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison, $p < 0.0001$. Horizontal
182 lines represent the medians, bars represent the 25-75 percentiles, and vertical lines represent the

183 10-90 percentiles. WT1 immunostaining in (C) control sample, (D) in classes II of lupus
184 nephritis, (E) in classes III of lupus nephritis, and (F) in classes IV of lupus nephritis.

185

186 After we observed a reduction in podocyte density in LN cases, we sought to analyze
187 possible ultrastructural alterations such as foot process effacement, which was assessed by
188 measuring the width of the foot processes (FPW). We observed a higher FPW in the LN group
189 compared to the control group (Fig 2A, $p = 0.0011$), indicating a greater degree of foot process
190 effacement in this group. Concerning LN classes, we observed a higher FPW in the classes I/II
191 group and the class IV group compared to the control group, and among the classes, there was
192 more foot process effacement in the class IV group compared to the class III group (Figs 2B-F,
193 $p = 0.0008$).

194

195 **Fig 2. Analysis of podocyte foot process effacement by transmission electron microscopy.**

196 (A) Comparison between the control group and the Lupus Nephritis group. Mann-Whitney
197 comparison test, $p=0.0011$. Comparison between (B) control group and the classes of Lupus
198 Nephritis. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison, $p=0.0008$. Horizontal
199 lines represent the medians, bars represent the 25-75 percentiles, and vertical lines represent the
200 10-90 percentiles. (C) Image of the glomerular loop from a case-control study showing
201 preserved podocyte processes (arrow). Foot process effacement evidenced by arrows in a case
202 of (D) LN class II, (E) LN class III, and (F) LN class IV.

203

204 **Proteinuria is associated with podocyte alterations in lupus**
205 **nephritis**

206 Because that podocyte alterations clinically manifest with proteinuria, we sought to
207 assess proteinuria in LN cases divided according to histopathological classification. We

208 observed an increase in proteinuria levels as the classes progressed, and the class IV group
209 presented significantly higher proteinuria levels compared to the classes I/II group (Fig 3, $p =$
210 0.0491), suggesting a clinical worsening in classes with more inflammation/cellular
211 proliferation.

212

213 **Fig 3. Analysis of proteinuria among the classes of Lupus Nephritis.** Kruskal-Wallis test
214 followed by Dunn's multiple comparison. Horizontal lines represent the medians, bars represent
215 the 25-75 percentiles, and vertical lines represent the 10-90 percentiles. $p=0.0491$.

216

217 **Podocyte alterations are more prevalent in proliferative classes with greater inflammation**

218 Considering that more inflammatory classes of the disease are associated with more
219 morphological alterations and worse levels of proteinuria, we sought to relate the activity and
220 chronicity indices to podocyte alterations in cases diagnosed with LN class IV.

221 No correlations were observed between podocyte density and foot process effacement,
222 respectively, with the chronicity index of the disease. Regarding the activity index, when
223 analyzing class III patients individually, there was no statistically significant correlation when
224 correlating the activity index and its criteria with foot process effacement ($p = 0.5167$).
225 Conversely, when analyzing class IV patients individually, a strong, positive, and significant
226 correlation was observed between the activity index and foot process effacement (Fig 4A, $p =$
227 0.0189), as well as between the criteria that make up the activity index: endocapillary
228 hypercellularity ($p = 0.0311$, Fig 4C) and leukocyte infiltration ($p = 0.0369$, Fig 4D) with foot
229 process effacement. This demonstrates that the positive correlation between the disease's
230 activity index and foot process effacement in the inflammatory classes is due to class IV. There
231 was no significant correlation between foot process effacement and subendothelial deposits in
232 class IV (Fig 4B, $p = 0.6134$).

233

234 **Fig 4. Assessment of foot process effacement and LN class IV activity** .Correlation between
235 (A) activity index, (B) subendothelial deposits, (C) endocapillary hypercellularity, (D)
236 leukocyte infiltration and foot process effacement in NL class IV. Spearman's correlation
237 coefficient.

238

239 **Discussion**

240 Lupus Nephritis is a clinical manifestation of Systemic Lupus Erythematosus
241 considered the most severe condition of the disease, affecting about 60% of diagnosed patients.
242 Its pathogenesis is related to glomerulonephritis, resulting from the deposition of immune
243 complexes and complement system activation [9]. The deposition of immune complexes in the
244 glomerulus triggers changes in all cells in this compartment: endothelial cells, mesangial cells,
245 and podocytes. Podocyte injury clinically results in proteinuria and/or nephrotic syndrome [17].

246 In the present study, we observed a reduction in podocyte density in the LN group
247 compared to the control group. Our group has also demonstrated a decrease in podocytes and
248 consequent foot process effacement in FSGS, MCD and ND [12, 13]. We believe that this
249 reduction is a result of podocyte injury due to inflammation caused by the deposition of immune
250 complexes.

251 Podocytes have an intrinsic system that supports injuries, but they can be damaged when
252 stresses exceed this capacity, leading to cell death. As a terminally differentiated cell, this results
253 in a reduction in numbers, as observed in the present study. These cells can commonly appear
254 in the urine, a phenomenon referred to as podocyturia. In recent years, the evaluation of
255 podocyturia has emerged as an indirect tool in the analysis of podocyte injury in some cases of
256 glomerular diseases [18], including cases of LN [19]. This loss of podocytes appears to occur
257 through apoptosis, resulting in *in situ* podocytopenia [20]. In LN, podocyte apoptosis is related

258 to the activation of the Th17 profile and the production of IL-17, leading to changes in their
259 cytoskeleton with loss of foot processes, increased motility, decreased expression of proteins
260 maintaining cellular homeostasis, increased oxidative stress, and activation of inflammasomes
261 and caspases [21-23].

262 We observed a higher prevalence of class IV cases, which is consistent with previous
263 studies that have shown a higher prevalence of class IV LN [24, 25]. Class IV, known as diffuse
264 LN, is characterized by diffuse, segmental, or global endo- or extracapillary glomerulonephritis,
265 active or inactive, involving $\geq 50\%$ of all glomeruli, typically with diffuse subendothelial
266 immune deposits, with or without mesangial changes [8]. It has the most severe prognosis and
267 is associated with a higher risk of progression to end-stage renal disease [26]. Thus, renal biopsy
268 is indicated, which may justify the increased prevalence of this class in studies using the
269 morphological classification of LN.

270 When evaluating the number of podocytes and foot process effacement in LN classes,
271 we did not observe a difference in the number of podocytes between classes. However, class IV
272 showed greater foot process effacement. Podocytes in LN can be targeted by autoantibodies
273 that react directly with podocyte proteins, such as α -actinin-4 [27], and it is also believed that
274 cell-mediated immunity may play a significant role in podocyte injury, especially in class IV
275 LN, where a large number of macrophages, Th1 cells, and CD40+ cells are observed [28]. As a
276 result, podocytes respond with reorganization of the podocyte cytoskeleton, morphologically
277 culminating in foot process effacement.

278 Among the classes, higher proteinuria was observed in class IV, which was the class that
279 showed greater foot process effacement. However, we did not find a correlation between
280 proteinuria and foot process effacement, as found in studies of LN [29, 30] and in other
281 glomerular diseases such as FSGS [12] and IgA nephropathy [31]. In a well-established model
282 of proteinuria, foot process effacement preceded proteinuria [32]. Some studies that also did

283 not find a relationship between foot process effacement and proteinuria suggested that
284 proteinuria depends mainly on the nature of the underlying disease and not necessarily on foot
285 process effacement [15, 33].

286 Considering that class IV presented more podocyte alterations, we made correlations
287 between foot process effacement and the activity index and its criteria (subendothelial deposits,
288 endocapillary hypercellularity, and leukocyturia). We observed a strong, positive, and
289 significant correlation between foot process effacement and the activity index, as well as
290 endocapillary hypercellularity and leukocyturia. We believe that the "cross-talk" between
291 podocytes and endothelium is responsible for these correlations [34]. Thus, immune complex
292 deposition leads to the production of mediators and growth factors that will alter the podocyte
293 cytoskeleton, resulting in foot process effacement [35].

294 Podocytes produce pro-inflammatory cytokines and chemokines that are involved in the
295 recruitment, maturation, and activation of immune cells in the context of LN, justifying the
296 correlation with inflammatory infiltrate. It has been demonstrated that in response to
297 inflammatory stimuli, there is a significant increase in levels of IL-6, IL-8, VEGF, and M-CSF
298 that podocytes express at basal levels for homeostasis maintenance, as well as new production
299 of IP-10 and IL-10. In response to the inflammatory environment, there is an increase in
300 intracellular calcium levels in podocytes, leading to actin cytoskeleton dysregulation resulting
301 in effacement [36].

302 The signaling pathways specifically induced in proliferative lesions in podocytes are
303 still uncertain. It has been observed that the C-maf-inducing protein (CMIP) pathway, reported
304 in various glomerulopathies [37, 38], is overexpressed in non-proliferative LN (classes II and
305 V) but is almost undetectable in patients with class III/IV LN [39]. NF κ B activation may lead
306 to decreased CMIP expression [40], and NF κ B activation with subsequent positive regulation
307 of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) associated with podocyte injury has been

308 demonstrated in a murine model of LN [41] and FPW [42], showing a possible connection
309 between immune complex deposition and UCH-L1 podocyte signaling in LN [43].

310 We believe that during the development of LN, podocytes are targets of adaptive
311 immunity as they can express various target antigens [27, 44] and innate immunity since they
312 express toll-like receptor during the disease development [45]. However, it is believed that
313 podocytes also have a direct involvement as an immunological actor in the process of LN, as
314 they can communicate with other cells of the immune system. Podocytes can act as antigen-
315 presenting cells [46], and it has been demonstrated that the molecule B7-1 (CD80), which
316 induces T cell co-stimulation, is expressed in podocytes in various models of proteinuric renal
317 diseases, including LN [47], contributing to adaptive immunity.

318 In summary, our study suggests that a more detailed investigation of podocytes,
319 associated with morphological findings from renal biopsy, may be useful in relating to higher
320 LN activity. Since patients with more foot process effacement and consequently higher levels
321 of proteinuria present with LN class IV, the extent of foot process effacement is possibly more
322 related to diffuse inflammatory/cellular proliferation rather than focal, as in LN class III.

323

324 **Conclusion**

325 Podocytes play an important role in the development and progression of LN, especially in class
326 IV. This class showed more foot process effacement, and this injury is related to the activity of
327 the disease.

328

329 **Data availability**

330 The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the
331 corresponding author on reasonable request.

332 Acknowledgments

333 The authors would like to thank the Discipline of General Pathology and the employees
334 of Kidney Research Center at the Federal University of Triângulo Mineiro.

335

336 References

- 337 1. Pan L, Lu MP, Wang JH, Xu M, Yang SR. Immunological pathogenesis and treatment
338 of systemic lupus erythematosus. *World J Pediatr.* 2020;16(1):19-30. Epub 20190222. doi:
339 10.1007/s12519-019-00229-3. PubMed PMID: 30796732; PubMed Central PMCID:
340 PMCPMC7040062.
- 341 2. Anders HJ, Saxena R, Zhao MH, Parodis I, Salmon JE, Mohan C. Lupus nephritis. *Nat*
342 *Rev Dis Primers.* 2020;6(1):7. Epub 20200123. doi: 10.1038/s41572-019-0141-9. PubMed
343 PMID: 31974366.
- 344 3. Parikh SV, Almaani S, Brodsky S, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis: Core
345 Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis.* 2020;76(2):265-81. Epub 20200324. doi:
346 10.1053/j.ajkd.2019.10.017. PubMed PMID: 32220510.
- 347 4. Gasparotto M, Gatto M, Binda V, Doria A, Moroni G. Lupus nephritis: clinical
348 presentations and outcomes in the 21st century. *Rheumatology (Oxford).* 2020;59(Suppl5):v39-
349 v51. doi: 10.1093/rheumatology/keaa381. PubMed PMID: 33280015; PubMed Central
350 PMCID: PMCPMC7751166.
- 351 5. Wada Y, Ito S, Ueno M, Nakano M, Arakawa M, Gejyo F. Renal outcome and predictors
352 of clinical renal involvement in patients with silent lupus nephritis. *Nephron Clin Pract.*
353 2004;98(4):c105-11. doi: 10.1159/000081551. PubMed PMID: 15627787.
- 354 6. Bajema IM, Wilhelmus S, Alpers CE, Bruijn JA, Colvin RB, Cook HT, et al. Revision
355 of the International Society of Nephrology/Renal Pathology Society classification for lupus
356 nephritis: clarification of definitions, and modified National Institutes of Health activity and
357 chronicity indices. *Kidney Int.* 2018;93(4):789-96. Epub 20180216. doi:
358 10.1016/j.kint.2017.11.023. PubMed PMID: 29459092.
- 359 7. Choi SE, Fogo AB, Lim BJ. Histologic evaluation of activity and chronicity of lupus
360 nephritis and its clinical significance. *Kidney Res Clin Pract.* 2023;42(2):166-73. Epub
361 20230315. doi: 10.23876/j.krcp.22.083. PubMed PMID: 37037479; PubMed Central PMCID:
362 PMCPMC10085727.
- 363 8. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The
364 classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.*
365 2004;65(2):521-30. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00443.x. PubMed PMID: 14717922.
- 366 9. Flores-Mendoza G, Sansón SP, Rodríguez-Castro S, Crispín JC, Rosetti F. Mechanisms
367 of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Trends Mol Med.* 2018;24(4):364-78. Epub 20180308. doi:
368 10.1016/j.molmed.2018.02.003. PubMed PMID: 29526595.
- 369 10. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* 2016;89(6):1221-30.
370 Epub 2016/03/19. doi: 10.1016/j.kint.2016.01.012. PubMed PMID: 27165817.
- 371 11. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress:
372 the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(4):F333-47.
373 Epub 20121212. doi: 10.1152/ajprenal.00478.2012. PubMed PMID: 23235479.

- 374 12. da Silva CA, Monteiro MLGD, Araújo LS, Urzedo MG, Rocha LB, Dos Reis MA, et
375 al. In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis and
376 minimal change disease. *PLoS One*. 2020;15(11):e0241745. Epub 20201104. doi:
377 10.1371/journal.pone.0241745. PubMed PMID: 33147279; PubMed Central PMCID:
378 PMCPMC7641434.
- 379 13. Martins ALMD, Bernardes AB, Ferreira VA, Wanderley DC, Araújo SA, do Carmo Neto
380 JR, et al. In situ assessment of Mindin as a biomarker of podocyte lesions in diabetic
381 nephropathy. *PLoS One*. 2023;18(5):e0284789. Epub 20230502. doi:
382 10.1371/journal.pone.0284789. PubMed PMID: 37130106; PubMed Central PMCID:
383 PMCPMC10153717.
- 384 14. Venkatarreddy M, Wang S, Yang Y, Patel S, Wickman L, Nishizono R, et al. Estimating
385 podocyte number and density using a single histologic section. *J Am Soc Nephrol*.
386 2014;25(5):1118-29. Epub 20131219. doi: 10.1681/ASN.2013080859. PubMed PMID:
387 24357669; PubMed Central PMCID: PMCPMC4005315.
- 388 15. van den Berg JG, van den Bergh Weerman MA, Assmann KJ, Weening JJ, Florquin S.
389 Podocyte foot process effacement is not correlated with the level of proteinuria in human
390 glomerulopathies. *Kidney Int*. 2004;66(5):1901-6. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00964.x.
391 PubMed PMID: 15496161.
- 392 16. Gundersen HJ, Seefeldt T, Osterby R. Glomerular epithelial foot processes in normal
393 man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. *Cell Tissue*
394 *Res*. 1980;205(1):147-55. doi: 10.1007/bf00234450. PubMed PMID: 7363304.
- 395 17. Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? *Nat Rev Rheumatol*.
396 2016;12(3):143-53. Epub 20151119. doi: 10.1038/nrrheum.2015.159. PubMed PMID:
397 26581344; PubMed Central PMCID: PMCPMC4820834.
- 398 18. Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential
399 diagnostic marker to assess glomerular disease activity. *Nephron Clin Pract*. 2007;106(2):c61-
400 6. Epub 20070606. doi: 10.1159/000101799. PubMed PMID: 17570931.
- 401 19. Mansur JB, Sabino AR, Nishida SK, Kirsztajn GM. Is there a role for urinary podocyte
402 excretion assessment in lupus nephritis? *Ren Fail*. 2016;38(4):643-7. Epub 20160224. doi:
403 10.3109/0886022X.2016.1150099. PubMed PMID: 26906105.
- 404 20. Cui JH, Qiao Q, Guo Y, Zhang YQ, Cheng H, He FR, et al. Increased apoptosis and
405 expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. *J Nephrol*.
406 2012;25(2):255-61. doi: 10.5301/JN.2011.8451. PubMed PMID: 21725926.
- 407 21. Paquissi FC, Abensur H. The Th17/IL-17 Axis and Kidney Diseases, With Focus on
408 Lupus Nephritis. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:654912. Epub 20210903. doi:
409 10.3389/fmed.2021.654912. PubMed PMID: 34540858; PubMed Central PMCID:
410 PMCPMC8446428.
- 411 22. Zhou X, Chen H, Wei F, Zhao Q, Su Q, Lei Y, et al. α -mangostin attenuates pristane-
412 induced lupus nephritis by regulating Th17 differentiation. *Int J Rheum Dis*. 2020;23(1):74-83.
413 Epub 20191125. doi: 10.1111/1756-185X.13743. PubMed PMID: 31769201.
- 414 23. Zhou X, Chen H, Wei F, Zhao Q, Su Q, Liang J, et al. 3. *J Immunol Res*.
415 2019;2019:2431617. Epub 20190522. doi: 10.1155/2019/2431617. PubMed PMID: 31240232;
416 PubMed Central PMCID: PMCPMC6556267.
- 417 24. Klumb EM, Scheinberg M, Souza VA, Xavier RM, Azevedo VF, McElwee E, et al. The
418 landscape of systemic lupus erythematosus in Brazil: An expert panel review and
419 recommendations. *Lupus*. 2021;30(10):1684-95. Epub 20210713. doi:
420 10.1177/09612033211030008. PubMed PMID: 34255586; PubMed Central PMCID:
421 PMCPMC8489682.
- 422 25. Pan BP, Feng ZJ, Li XL, He LP, Jiang D, Zhang RX, et al. An Analysis of the Correlation
423 Between Clinical Indexes and Pathological Classifications in 202 Patients with Lupus

- 424 Nephritis. *J Inflamm Res.* 2021;14:6917-27. Epub 20211216. doi: 10.2147/JIR.S339744.
 425 PubMed PMID: 34938094; PubMed Central PMCID: PMCPCMC8687693.
- 426 26. Wang H, Ren YL, Chang J, Gu L, Sun LY. A Systematic Review and Meta-analysis of
 427 Prevalence of Biopsy-Proven Lupus Nephritis. *Arch Rheumatol.* 2018;33(1):17-25. Epub
 428 20170725. doi: 10.5606/ArchRheumatol.2017.6127. PubMed PMID: 29900975; PubMed
 429 Central PMCID: PMCPCMC5864167.
- 430 27. Mason LJ, Ravirajan CT, Rahman A, Putterman C, Isenberg DA. Is alpha-actinin a
 431 target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):866-
 432 70. doi: 10.1002/art.20103. PubMed PMID: 15022329.
- 433 28. Masutani K, Akahoshi M, Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Kohsaka T, et al.
 434 Predominance of Th1 immune response in diffuse proliferative lupus nephritis. *Arthritis*
 435 *Rheum.* 2001;44(9):2097-106. doi: 10.1002/1529-0131(200109)44:9<2097::AID-
 436 ART360>3.0.CO;2-6. PubMed PMID: 11592372.
- 437 29. Ichinose K, Kitamura M, Sato S, Fujikawa K, Horai Y, Matsuoka N, et al. Podocyte foot
 438 process width is a prediction marker for complete renal response at 6 and 12 months after
 439 induction therapy in lupus nephritis. *Clin Immunol.* 2018;197:161-8. Epub 20181005. doi:
 440 10.1016/j.clim.2018.10.002. PubMed PMID: 30296591.
- 441 30. Wang Y, Yu F, Song D, Wang SX, Zhao MH. Podocyte involvement in lupus nephritis
 442 based on the 2003 ISN/RPS system: a large cohort study from a single centre. *Rheumatology*
 443 *(Oxford).* 2014;53(7):1235-44. Epub 20140304. doi: 10.1093/rheumatology/ket491. PubMed
 444 PMID: 24599917.
- 445 31. Tewari R, Nada R, Rayat CS, Boruah D, Dudeja P, Joshi K, et al. Correlation of
 446 proteinuria with podocyte foot process effacement in IgA nephropathy: an ultrastructural study.
 447 *Ultrastruct Pathol.* 2015;39(2):147-51. Epub 2014/09/30. doi: 10.3109/01913123.2014.960543.
 448 PubMed PMID: 25268180.
- 449 32. Inokuchi S, Shirato I, Kobayashi N, Koide H, Tomino Y, Sakai T. Re-evaluation of foot
 450 process effacement in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.*
 451 1996;50(4):1278-87. PubMed PMID: 8887289.
- 452 33. Deegens JK, Dijkman HB, Borm GF, Steenbergen EJ, van den Berg JG, Weening JJ, et
 453 al. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis.
 454 *Kidney Int.* 2008;74(12):1568-76. Epub 2008/08/27. doi: 10.1038/ki.2008.413. PubMed
 455 PMID: 18813290.
- 456 34. Yuan M, Tan Y, Wang Y, Wang SX, Yu F, Zhao MH. The associations of endothelial and
 457 podocyte injury in proliferative lupus nephritis: from observational analysis to in vitro study.
 458 *Lupus.* 2019;28(3):347-58. Epub 20190212. doi: 10.1177/0961203319828509. PubMed PMID:
 459 30755145.
- 460 35. Liu R, Wen X, Peng X, Zhao M, Mi L, Lei J, et al. Immune podocytes in the immune
 461 microenvironment of lupus nephritis (Review). *Mol Med Rep.* 2023;28(5). Epub 20230915.
 462 doi: 10.3892/mmr.2023.13091. PubMed PMID: 37711069; PubMed Central PMCID:
 463 PMCPCMC10540031.
- 464 36. Wright RD, Beresford MW. Podocytes contribute, and respond, to the inflammatory
 465 environment in lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018;315(6):F1683-F94. Epub
 466 20180912. doi: 10.1152/ajprenal.00512.2017. PubMed PMID: 30207171; PubMed Central
 467 PMCID: PMCPCMC6336988.
- 468 37. Sendeyo K, Audard V, Zhang SY, Fan Q, Bouachi K, Ollero M, et al. Upregulation of
 469 c-mip is closely related to podocyte dysfunction in membranous nephropathy. *Kidney Int.*
 470 2013;83(3):414-25. Epub 20130109. doi: 10.1038/ki.2012.426. PubMed PMID: 23302718;
 471 PubMed Central PMCID: PMCPCMC3927461.
- 472 38. Zhang SY, Kamal M, Dahan K, Pawlak A, Ory V, Desvaux D, et al. c-mip impairs
 473 podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci Signal.* 2010;3(122):ra39. Epub

20100518. doi: 10.1126/scisignal.2000678. PubMed PMID: 20484117; PubMed Central PMCID: PMCPMC2897853.
39. Bouachi K, Moktefi A, Zhang SY, Oniszcuk J, Sendeyo K, Remy P, et al. Expression of CMIP in podocytes is restricted to specific classes of lupus nephritis. *PLoS One*. 2018;13(11):e0207066. Epub 20181115. doi: 10.1371/journal.pone.0207066. PubMed PMID: 30439969; PubMed Central PMCID: PMCPMC6237342.
40. Izzedine H, Mangier M, Ory V, Zhang SY, Sendeyo K, Bouachi K, et al. Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy. *Kidney Int*. 2014;85(2):457-70. Epub 20130925. doi: 10.1038/ki.2013.344. PubMed PMID: 24067439.
41. Zhang H, Sun Y, Hu R, Luo W, Mao X, Zhao Z, et al. The regulation of the UCH-L1 gene by transcription factor NF- κ B in podocytes. *Cell Signal*. 2013;25(7):1574-85. Epub 20130406. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.018. PubMed PMID: 23567262.
42. Sun L, Zou LX, Han YC, Wu L, Chen T, Zhu DD, et al. A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1. *J Cell Physiol*. 2019. Epub 20190225. doi: 10.1002/jcp.28282. PubMed PMID: 30805933.
43. Sakhi H, Moktefi A, Bouachi K, Audard V, Hénique C, Remy P, et al. Podocyte Injury in Lupus Nephritis. *J Clin Med*. 2019;8(9). Epub 20190829. doi: 10.3390/jcm8091340. PubMed PMID: 31470591; PubMed Central PMCID: PMCPMC6780135.
44. Bruschi M, Galetti M, Sinico RA, Moroni G, Bonanni A, Radice A, et al. Glomerular Autoimmune Multicomponents of Human Lupus Nephritis In Vivo (2): Planted Antigens. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(8):1905-24. Epub 20141114. doi: 10.1681/ASN.2014050493. PubMed PMID: 25398787; PubMed Central PMCID: PMCPMC4520170.
45. Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, et al. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2530-537. Epub 20100224. doi: 10.1093/ndt/gfq058. PubMed PMID: 20181802.
46. Goldwich A, Burkard M, Olke M, Daniel C, Amann K, Hugo C, et al. Podocytes are nonhematopoietic professional antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(6):906-16. Epub 20130328. doi: 10.1681/ASN.2012020133. PubMed PMID: 23539760; PubMed Central PMCID: PMCPMC3665387.
47. Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2004;113(10):1390-7. doi: 10.1172/JCI20402. PubMed PMID: 15146236; PubMed Central PMCID: PMCPMC406528.