

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

BÁRBARA ROCHA RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA DE PODÓCITOS E DE MOLÉCULAS DO
SISTEMA IMUNE REGULADORAS DA AUTOFAGIA EM BIÓPSIAS RENAIIS
PEDIÁTRICAS DIAGNOSTICADAS COM PODOCITOPATIAS

UBERABA
2024

BÁRBARA ROCHA RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA DE PODÓCITOS E DE MOLÉCULAS DO
SISTEMA IMUNE REGULADORAS DA AUTOFAGIA EM BIÓPSIAS RENAIIS
PEDIÁTRICAS DIAGNOSTICADAS COM PODOCITOPATIAS

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

Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana Reis Machado e
Silva

UBERABA
2024

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

R611a Rodrigues, Bárbara Rocha
Avaliação da autofagia de podócitos e de moléculas do sistema imune
reguladoras da autofagia em biópsias renais pediátricas diagnosticadas com
podocitopatias / Bárbara Rocha Rodrigues. – 2024.
74 f.: il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientadora: Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva

1. Glomerulonefrite. 2. Síndrome nefrótica. 3. Pediatria. 4. Nefrose
lipoide. 5. Podócitos. 6. Autofagia. I. Silva, Juliana Reis Machado e. II.
Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.61-008.6

Cicera Daniele da Silva - Bibliotecária - CRB-6/3012

BÁRBARA ROCHA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA AUTOFAGIA DE PODÓCITOS E DE MOLÉCULAS DO
SISTEMA IMUNE REGULADORAS DA AUTOFAGIA EM BIÓPSIAS
RENAIS PEDIÁTRICAS DIAGNOSTICADAS COM PODOCITOPATIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Medicina Translacional” (Linha de Pesquisa: Aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos das doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 20 de dezembro de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Juliana Reis Machado e Silva – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Marlene Antônia dos Reis
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Sérgio Veloso Brant Pinheiro
Faculdade de Medicina / Universidade Federal de Minas Gerais



Documento assinado eletronicamente por **JULIANA REIS MACHADO E SILVA, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2024, às 15:41, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **MARLENE ANTONIA DOS REIS, Técnico-Administrativo em Educação**, em 14/01/2025, às 18:36, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Veloso Brant Pinheiro, Usuário Externo**, em 06/02/2025, às 13:54, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1413099** e o código CRC **340104ED**.

Aos meus pais, Virmondes e Denise, por seu amor e apoio incondicional, e ao meu marido, Abel, por sua paciência e companheirismo. Agradeço também à minha orientadora, professora Juliana, por sua orientação e confiança. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força, sabedoria e paz que me acompanharam durante toda a jornada de realização desta tese.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado e Silva, por toda a formação que tive sob sua orientação. Sou grata pelas oportunidades que me foram concedidas, pelo exemplo de pesquisadora dedicada, sua orientação e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho, e serei eternamente grata.

Aos meus pais, Virmondes e Denise, que me inspiram diariamente a ser uma pessoa melhor, e ao meu marido, por sua paciência, apoio e amor incondicional. Agradeço também à minha família pelo suporte constante.

Um agradecimento especial a toda a equipe da Patologia e do CePRim da UFTM, que tornaram tudo isso possível, em especial a Liliane Silvano Araújo, Crislaine Aparecida da Silva, à professora Dra. Marlene Antônia dos Reis e às alunas de Iniciação Científica Ludmila Fonseca Ruy e Maria Eduarda Gomes da Costa. Obrigada por todas as oportunidades, apoio e incentivo constantes.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pela atenção e prontidão.

E a todos os pacientes, que, sem eles, nada disso seria possível.

RESUMO

A glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e a doença de lesão mínima (DLM) são as principais podocitopatias na infância, manifestando-se clinicamente com síndrome nefrótica. A patogênese dessas doenças ainda não foi completamente elucidada, entretanto, sabe-se que o sistema imunológico desempenha papel central no desenvolvimento e progressão das lesões. O estudo se destaca como inovador ao avaliar, de forma inédita, a presença de autofagia em podócitos e sua associação com a expressão de CD36, TNF, IL-10 e inflamassoma (NLRP3). Foram analisados dados epidemiológicos e fragmentos de biópsias renais de 37 crianças, entre 3 e 18 anos, diagnosticadas com GESF (n=16) e DLM (n=21) no Centro de Pesquisa em Rim (CePRim) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). A expressão de CD36, TNF, IL-10 e inflamassoma NLRP3 foi analisada por imuno-histoquímica. A presença de autofagia e apagamento de pedicelos foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Ambos os grupos apresentaram proteinúria, hipercolesterolemia e hipoalbuminemia, sem diferença significativa. Observou-se redução na expressão do CD36 no grupo DLM em comparação ao controle e ao grupo GESF, já a expressão do NLRP3 foi significativamente maior no grupo GESF, comparado ao controle. Contribuindo com este achado, a atividade autofágica em GESF foi significativamente maior comparado com a DLM. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de TNF e IL-10. Os resultados indicam perfis inflamatórios distintos entre GESF e DLM, sendo GESF caracterizado por maior atividade inflamatória, mediada pelo inflamassoma NLRP3, enquanto a DLM apresenta menor inflamação, evidenciada pela redução significativa na expressão do CD36. Estes achados indicam o CD36 como potencial biomarcador no diagnóstico diferencial entre GESF e DLM, além de contribuir para o entendimento das vias inflamatórias específicas e abrir perspectivas para estratégias terapêuticas individualizadas.

Palavras chaves: Síndrome nefrótica; Pediatria; GESF: Glomeruloesclerose segmentar focal; DLM: Doença por lesão mínima; Podócitos; Autofagia; Biomarcadores; CD36; inflamassoma NLRP3; TNF; IL-10.

ABSTRACT

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) and minimal change disease (MCD) are the main podocytopathies in childhood, clinically manifesting as nephrotic syndrome. The pathogenesis of these diseases has not yet been fully elucidated; however, the immune system is known to play a central role in the development and progression of glomerular damage. This study stands out as innovative by uniquely evaluating the presence of autophagy in podocytes and its association with the expression of CD36, TNF, IL-10, and inflammasome (NLRP3). Epidemiological data and renal biopsy fragments from 37 children, aged 3 to 18 years, diagnosed with FSGS (n=16) and MCD (n=21) at the Kidney Research Center (CePRim) of the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM) were analyzed. The expression of CD36, TNF, IL-10, and NLRP3 inflammasome was assessed by immunohistochemistry. The presence of autophagy and foot process effacement were evaluated using Transmission Electron Microscopy. Both groups presented proteinuria, hypercholesterolemia, and hypoalbuminemia, with no significant difference. A reduction in CD36 expression was observed in the MCD group compared to the control and FSGS groups, whereas NLRP3 expression was significantly higher in the FSGS group compared to the control. Supporting this finding, autophagic activity in FSGS was significantly higher compared to MCD. No significant differences were observed in TNF and IL-10 expression. The results indicate distinct inflammatory profiles between FSGS and MCD, with FSGS characterized by higher inflammatory activity mediated by the NLRP3 inflammasome, while MCD exhibits lower inflammation, as evidenced by the significant reduction in CD36 expression. These findings suggest CD36 as a potential biomarker for the differential diagnosis between FSGS and MCD and contribute to understanding specific inflammatory pathways, opening new perspectives for individualized therapeutic strategies.

Keywords: Nephrotic syndrome; Pediatrics; FSGS: Focal segmental glomerulosclerosis; MCD: Minimal change disease; Podocytes; Autophagy; Biomarkers; CD36; NLRP3 inflammasome; TNF; IL-10.

LISTA DE ABREVIATURAS

CD36: Cluster of Differentiation 36

DLM: Doença de Lesão Mínima

GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica

IF - Imunofluorescência

IL-10: Interleucina 10

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

ML - Microscopia de Luz

NF- κ B: Fator nuclear Nuclear kappa B

NI: não informado

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

TNF: Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática do manejo inicial da síndrome nefrótica pediátrica. Do autor, 2024.

Figura 2: Alterações morfológicas na microscopia de luz comum evidenciando glomérulo (g) com esclerose segmentar com aumento da matriz mesangial, fechamento das alças capilares adjacentes e aderência à cápsula de Bowman, entre o pólo urinário e o pólo vascular, caracterizando padrão “NOS” – sem outras especificações (setas) corado por (A) Hematoxilina-eosina (20x), (B) Tricrômico de Masson (20x), (C) Picrosirius (20x) e (D) Prata Metenamina (20x). Alterações morfológicas da GESF sob MET. (E) menor aumento mostrando alças capilares com apagamento dos pedicelos (cabeça de seta) (3000x) e em (F) maior aumento evidenciando o apagamento dos pedicelos caracterizado pela retificação do citoplasma, com alargamento dos pedicelos (seta) (12000x). MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fonte: CePRim UFTM. *Atualizações em Nefropatologia* (2022).

Figura 3: Alterações morfológicas sob microscopia de luz comum e MET. (A) (HE,20x), (B) (TM,20x), (C) (PS,20x) e (D) (PAMS,20x). Glomérulos (g) sem alterações quanto a celularidade, matriz mesangial e membrana basal glomerular. Na MET em (E) menor aumento é possível observar alças capilares com apagamentos dos pedicelos (seta) (4400x) e em (F) maior aumento evidenciando o apagamento dos pedicelos caracterizado pela retificação e perda de estrutura do citoesqueleto do pedicelo (seta) e aumento da distância entre os diafragmas slit (cabeça da seta) (12000x). HE: Hematoxilina-eosina. PAMS: Prata Metenamina. PS: Picrosirius. TM: Tricrômio de Masson. MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fonte: CePRim UFTM. *Atualizações em Nefropatologia* (2022).

Figura 4: desenho esquemático representando regulação do CD36 e ativação do inflamassoma NLRP3. Representação referente a nefrite lúpica, o CD36 foi regulado positivamente no podócito. O CD36 elevado ativa o inflamassoma NLRP3 e regula negativamente a autofagia. Fonte: Modificado de: LV et al. (2022).

Figura 5: Avaliação dos dados clínicos/laboratoriais dos pacientes diagnosticados com GESF(n=12) e DLM(n=16). Figura A: níveis de proteinúria (mg/24 horas); Figura B: Níveis de creatinina (mg/dL); Figura C: Níveis séricos de albumina (mg/dL); Figura D: níveis séricos de colesterol (mg/dL). Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. Não houve diferença significativa entre os grupos. Fonte: Extraídos do formulário de solicitação dos exames anatomopatológicos. Do autor, 2024.

Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão avaliada em biópsias renais do grupo controle, com diagnóstico de GESF e DLM. Na figura 1A (seta) ilustra presença de autofagossomo em podócitos de pacientes do grupo controle, e em 1B (seta) autofagossomo em podócitos dos pacientes do grupo com GESF. Na figura 2A ilustra o apagamento de pedicelos FPW (Foot Process Width) no grupo controle, comparadas com o grupo GESF (figura 2B) e do grupo com DLM (figura 2C). Do autor, 2024.

Figura 7: Autofagossomos/mm² e de apagamento de pedicelos (FPW) em pacientes com GESF (n= 13), DLM (n= 17) de grupo controle (n=12). Os dados de autofagia são expressos em número de autofagossomos por mm² e os de apagamento de pedicelos pela avaliação do FPW. Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. Níveis de autofagia significativamente inferiores dos pacientes com GESF em relação ao grupo controle (Mann-Whitney, p=0,047) e DLM em relação ao grupo controle (Mann-Whitney, p=0,038). O apagamento de pedicelos foi maior nos grupos GESF e DLM em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, p< 0,0001). Do autor, 2024.

Figura 8: Correlação entre o número de autofagossomos e o apagamento dos pedicelos em biópsias renais de pacientes com GESF e DLM. Houve uma correlação negativa e significativa entre o número de autofagossomos e o apagamento de podócitos no grupo GESF (p= 0,034; r=-0,58) e no grupo DLM (p= 0,026; r= -0,53) (Correlação de Spearman). Do autor, 2024.

Figura 9: Avaliação da imunomarcação por imuno-histoquímica nos glomérulos renais, no grupo controle, com GESF e com DLM, respectivamente. A marcação positiva (seta) do CD36 (Figura A, B e C) e do NLRP3 (Figura D, E e F) foi expressa pela densidade

de células marcadas por mm^2 . A avaliação da positividade da IL-10 (Figura G, H e I) e do TNF (Figura J, K e L) foi expressa em porcentagem de área. Do autor, 2024.

Figura 10: Avaliação da expressão de CD36, NLRP3, IL-10 e TNF em biópsias renais de crianças do grupo controle, GESF e DLM. Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. A expressão do CD36 foi expressa pela densidade de células marcadas por mm^2 . A expressão do CD36 no grupo DLM foi significativamente menor que do grupo controle e GESF ($p=0,0087$) (Kruskal-Wallis). A expressão do NLRP3 foi expressa pela densidade de células marcadas por mm^2 . A expressão do NLRP3 no grupo GESF foi significativamente maior que no grupo controle ($p= 0,020$) Mann-Whitney. A expressão de IL-10 e do TNF foi expressa em porcentagem de área. Do autor, 2024.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos de pacientes com Podocitopatias, GESF e DLM. Do autor, 2024.

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 GLOMÉRULOS E PODÓCITOS	01
1.2 PODOCITOPATIAS.....	02
1.2.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL (GESF).....	04
1.2.2 DOENÇA DE LESÕES MÍNIMAS (DLM).....	07
1.3 MECANISMOS DE LESÃO E PROTEÇÃO.....	09
2.0 JUSTIFICATIVA.....	14
3.0 HIPÓTESE DO ESTUDO.....	15
4.0 OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GERAL.....	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5.0 MÉTODOS.....	17
5.1. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	18
5.1.2 QUANTIFICAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES	18
5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	18
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
6.0 RESULTADOS.....	20
6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	20
6.2 ANÁLISE DA AUTOFAGIA EM PODÓCITOS E DO APAGAMENTO DOS PEDICELOS.....	24
6.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO CD36, DO NLRP3, DO TNF E DA IL-10 NOS GLOMÉRULOS RENAI.....	28
7.0 DISCUSSÃO.....	31
8.0 CONCLUSÃO.....	35
9.0 REFERÊNCIAS.....	36
10.0 ARTIGO.. ..	44

1. INTRODUÇÃO

Os rins desempenham papel primordial na manutenção da homeostase do organismo, atuando na regulação do equilíbrio hídrico, no controle das concentrações de eletrólitos e na excreção de produtos metabólicos, como dióxido de carbono, ureia, amônia e ácido úrico. Além disso, os rins exercem função central na filtração do sangue e na formação da urina. Essa dinâmica é crucial para o controle da pressão arterial, da manutenção do pH sanguíneo e para remoção de substâncias potencialmente tóxicas para o organismo (Hall; Guyton, 2021).

A unidade funcional do rim, o néfron, é composta por diversas estruturas interconectadas, que desempenham funções específicas no processo de formação da urina. Durante a filtração glomerular, o plasma sanguíneo é submetido a uma pressão hidrostática, que permite a passagem seletiva de água e solutos, enquanto células sanguíneas e proteínas de maior massa molecular permanecem na circulação (Hall; Guyton, 2021; Mescher, 2013). O processo de filtração é essencial para a formação da urina, desempenhando um papel crucial na excreção de resíduos metabólicos e na manutenção do equilíbrio hídrico e eletrolítico do organismo (Scott; Quaggin, 2015).

1.1 GLOMÉRULOS E PODÓCITOS

Os glomérulos consistem em uma rede de capilares sanguíneos revestidos por células epiteliais específicas e envoltos pela cápsula de Bowman. A formação da urina tem início nos capilares glomerulares, onde o líquido filtrado flui para a cápsula de Bowman e, posteriormente, para o sistema de alças e túbulos. A membrana dos capilares glomerulares é composta por camadas que formam uma barreira de filtração: o endotélio capilar, caracterizado pela presença de fenestras; a membrana basal, composta por uma rede de colágeno; e o epitélio dos podócitos (Pollak et al., 2014; Hall; Guyton, 2021).

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que fazem parte dos capilares glomerulares, desempenhando papel crucial na formação do ultrafiltrado glomerular. Sua função está diretamente relacionada às características de sua arquitetura celular, bem como sua carga elétrica negativa (Pavenstädt; Kriz; Kretzler, 2003). Morfologicamente, os podócitos são constituídos por um grande corpo celular que emite prolongamentos, denominados processos primários, os quais se estendem formando os processos secundários, ou pedicelos que interdigitam-se com pedicelos de podócitos vizinhos, formando uma fenda, denominada como fenda diafragmática. Esta é constituída por uma rede

de proteínas que forma uma membrana permeável e altamente seletiva quanto a carga elétrica, tamanho e forma de moléculas presentes no sangue, contribuindo não apenas para filtração, mas permitindo a sinalização e comunicação entre os podócitos (Pavenstädt; Kriz; Kretzler, 2003; Huber; Benzing, 2005; Kocylowski et al., 2022).

Por serem células complexas e terminalmente diferenciadas, as lesões podocitárias levam a alteração em sua arquitetura estrutural, com comprometimento do citoesqueleto e consequente apagamento dos pedicelos e até mesmo destacamento da membrana basal glomerular. Esse comprometimento em sua arquitetura leva à incapacidade de manter a integridade da barreira de filtração, resultando por exemplo na perda de substâncias do sangue para a urina, como no caso da proteinúria (Tryggvason; Wartiovaara, 2001; Feng et al., 2018).

Além de seu papel essencial na filtração glomerular, os podócitos também atuam na produção de fatores de crescimento e na mediação de respostas inflamatórias, o que os torna essenciais na resposta renal frente a injúrias. Entretanto, devido à sua complexidade e terminalmente diferenciada, os podócitos são vulneráveis a diversas lesões que podem comprometer sua estrutura e função (Kerjaschki; Sharkey; Farquhar, 1984; Jefferson; Shankland, 2014).

1.2 PODOCITOPATIAS

As podocitopatias representam um grupo de doenças glomerulares caracterizadas por lesões primárias nas células podocíticas. Essas lesões decorrem de disfunção intrínseca dos próprios podócitos, podendo apresentar causas variadas, incluindo fatores genéticos, por estresse oxidativo, disfunções metabólicas, influências ambientais ou envolvendo mecanismos imunológicos (Kopp et al., 2020).

Dentre as podocitopatias mais prevalentes na infância, destacam-se a glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) e a doença de lesão mínima (DLM). Ambas apresentam características morfológicas semelhantes, como o apagamento dos pedicelos, e manifestam-se clinicamente por proteinúria e síndrome nefrótica (Büscher; Weber, 2012; Kodner, 2016).

A síndrome nefrótica pediátrica, de acordo com as diretrizes do Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO), é caracterizada pela presença de proteinúria na faixa nefrótica, com níveis iguais ou superiores a 1.000 mg/m²/dia ou razão proteína urinária/creatinina urinária $\geq 2,0$ g/g, correspondendo a 3+ ou 4+ no teste de fita urinária. Além disso, é acompanhada de hipoalbuminemia (albumina sérica abaixo de 3,0 g/dL) ou edema, caso a dosagem de albumina sérica não esteja disponível

(Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2021).

A síndrome nefrótica pode ser classificada com base na resposta ao tratamento com corticosteroides, sendo essa resposta crucial para o manejo, além de ser considerada um fator de prognóstico importante. A síndrome nefrótica sensível a corticosteroides caracteriza-se por uma redução significativa da proteinúria e melhora dos sintomas clínicos após o tratamento. A síndrome nefrótica dependente de corticosteroides os pacientes alcançam remissão apenas enquanto fazem uso da medicação, apresentando recidivas quando o tratamento é interrompido. Síndrome nefrótica resistente a corticosteroides caracteriza-se por uma resposta inadequada ao tratamento, com persistência de proteinúria ou de sintomas clínicos, apesar do uso adequado da medicação (Vivarelli et al., 2023).

Dado ao prognóstico e evolução geralmente favoráveis dos casos de síndrome nefrótica em crianças, após o diagnóstico clínico e laboratorial, inicia-se o tratamento empírico com corticosteroides. Embora a biópsia renal seja considerada ferramenta padrão ouro para diagnóstico etiológico de síndrome nefrótica, sua realização é reservada para casos específicos, que requerem investigações adicionais, devido seu caráter invasivo. Sendo indicada em casos de: resistência ao tratamento com corticosteroides, quando a criança apresenta resposta insatisfatória após um período de aproximadamente 4 a 6 semanas de terapia; presença de sinais de doença subjacente ou manifestações atípicas, como hipertensão, hematúria importante ou outras anormalidades não esperadas; ocorrência em idade atípicas, em crianças menores de 1 ano ou maiores de 12 anos, que podem sugerir etiologias diferentes; caso de recorrência após a remissão, com resposta inicial positiva, porém com recidiva após, conforme esquematizado na figura 1 (Alshami et al., 2017; Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2021).

Apesar das semelhanças nos achados clínicos e histológicos, a GESF e a DLM apresentam diferenças significativas em suas evoluções naturais e nas respostas ao tratamento. A DLM é frequentemente associada a boas respostas ao tratamento com corticosteroides, enquanto a GESF pode demonstrar resistência a essa terapia, tornando a abordagem terapêutica mais complexa (Gipson et al., 2016; Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2021).

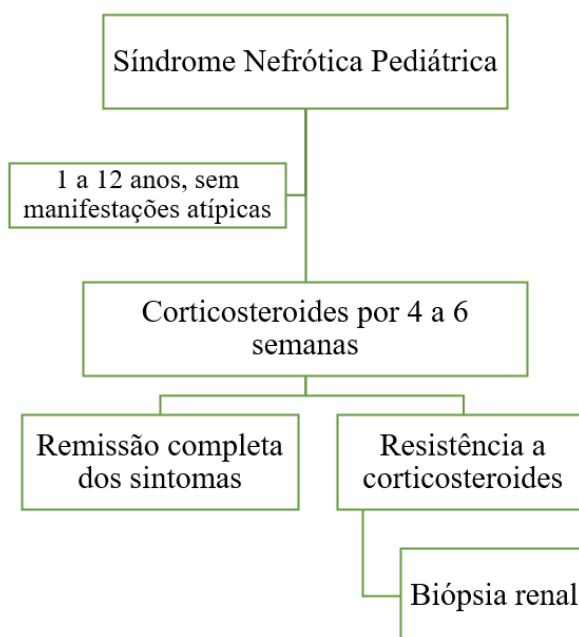


Figura 1: Representação esquemática do manejo inicial da síndrome nefrótica pediátrica. Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados epidemiológicos referentes às podocitopatias pediátricas permanecem incertos, sobretudo pelo fato de o diagnóstico definitivo depender da análise de biópsias renais. Essa limitação resulta na subnotificação da prevalência das podocitopatias, uma vez que diversas crianças não são submetidas à biópsia de forma rotineira. Estima-se que a GESF seja uma das causas mais comuns de doença glomerular idiopática em diversas populações, com taxas de incidência anual mundial variando de 0,2 a 1,1 por 100.000 habitantes (Kitiyakara; Eggers; Kopp, 2004). A DLM, por sua vez, é considerada a glomerulopatia mais prevalente em crianças, correspondendo a aproximadamente 70 a 90% dos casos de síndrome nefrótica idiopática pediátrica e entre 11% a 16% na população adulta (McGrogan; Franssen; De Vries, 2011).

1.2.1 GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL (GESF):

A glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) pode acometer crianças e adultos, apresentando potencial evolução para doença renal crônica e sendo considerada como uma causa frequente de doença renal terminal (Haas et al., 1997). Clinicamente, manifesta-se como síndrome nefrótica, caracterizada, em crianças, pela presença de proteinúria maciça, hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia. Em alguns casos, a GESF também pode apresentar com hematúria e hipertensão arterial sistêmica (Eddy; Symons, 2003).

Histologicamente, na Microscopia de Luz a GESF é caracterizada pela presença de esclerose em segmentos de alguns glomérulos, podendo observar aumento da matriz mesangial, fechamento das alças capilares adjacentes e aderência à cápsula de Bowman, entre os polos urinário e vascular, podendo ser visualizado em diversas colorações, como evidenciado na figura 2. A Imunofluorescência (IF) geralmente apresenta resultados negativos, no entanto, em alguns casos, pode haver fraca deposição granular de IgM e C3 nas áreas de esclerose. Na Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) é observado um extenso apagamento dos pedicelos, evidenciado na figura 2 (Silva et al., 2022).

A fisiopatologia da GESF, assim como seu tratamento e progressão tem sido amplamente discutida na literatura. Evidências sugerem que alterações genéticas e disfunções imunológicas atuam como fatores correlacionados às lesões podocitárias, criando um ambiente pró-inflamatório que favorece o processo de fibrose (Durand et al., 2023; Kronbichler et al., 2016).

O tratamento da GESF deve ser individualizado, considerando a história clínica do paciente. Geralmente, o tratamento inicial inclui terapias com corticosteroides, cuja resposta pode ser variável. Em alguns casos, pode ser necessário escalonar para tratamentos com imunossupressores. A resposta ao tratamento é considerada como preditor importante de gravidade e prognóstico, tornando fundamental o acompanhamento contínuo da função renal e monitorização da resposta terapêutica (Han; Kim, 2016).

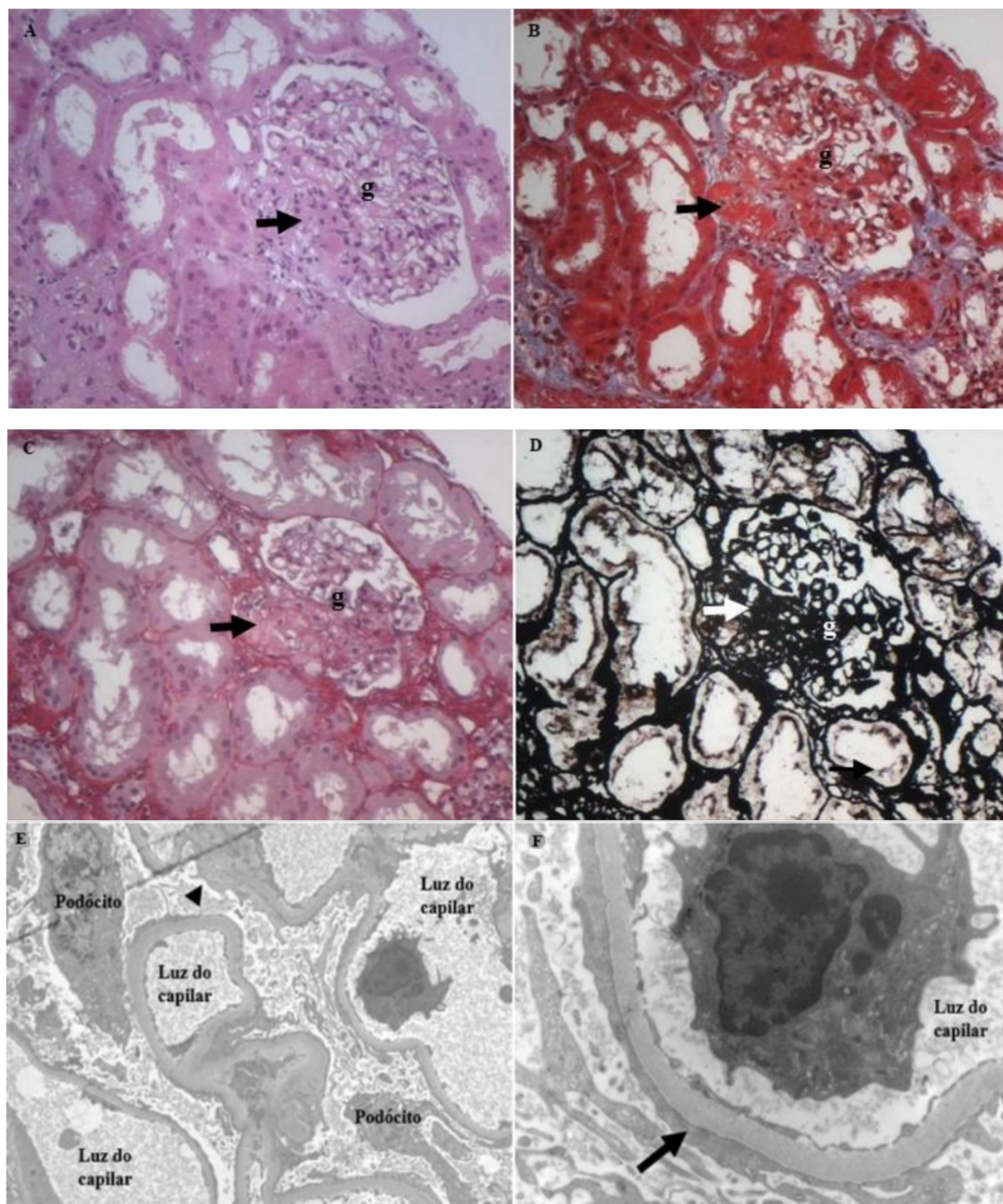


Figura 2:

Alterações morfológicas na microscopia de luz comum evidenciando glomérulo (g) com esclerose segmentar com aumento da matriz mesangial, fechamento das alças capilares adjacentes e aderência à cápsula de Bowman, entre o pólo urinário e o pólo vascular, caracterizando padrão “NOS” – sem outras especificações (setas) corado por (A) Hematoxilina-eosina (20x), (B) Tricrômico de Masson (20x), (C) Picrosirius (20x) e (D) Prata Metenamina (20x). Alterações morfológicas da GESF sob MET. (E) menor aumento mostrando alças capilares com apagamento dos pedicelos (cabeça de seta) (3000x) e em (F) maior aumento evidenciando o apagamento dos pedicelos caracterizado pela retificação do citoplasma,

com alargamento dos pedicelos (seta) (12000x). MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fonte: CePRim UFTM. *Atualizações em Nefropatologia* (2022).

1.2.2 DOENÇA DE LESÕES MÍNIMAS (DLM):

A Doença de lesões mínimas (DLM) é considerada como uma das principais causas de síndrome nefrótica em crianças e adolescentes, tal como a GESF, a DLM se manifesta clinicamente com síndrome nefrótica, caracterizada pela proteinúria maciça, edema e hipoalbuminemia. A DLM, em geral, apresenta resposta positiva ao uso de corticosteroides, sendo mais raramente associada a lesões renais crônicas (Fogo et al., 2015; Vivarelli et al., 2017).

Em relação às propriedades histopatológicas, a DLM é caracterizada por uma aparência normal dos glomérulos à ML e à IF, enquanto à MET observa-se um extenso apagamento de, pedicelos ilustrados na figura 3 (Fogo, 2015; Silva et al., 2022). A fisiopatologia da DLM ainda não está completamente elucidada, evidências sugerem que fatores imunológicos desempenham um papel central na sua manifestação, possivelmente relacionados a alterações na produção de citocinas, que levam a lesões de podócitos, comprometendo a barreira de filtração glomerular (Nachman et al., 2015; Floege; Amann, 2016; Purohit et al., 2021).

A abordagem terapêutica de crianças com DLM envolve o uso de corticosteroides, apresentando uma alta taxa de resposta positiva. A literatura ressalta que a maioria dos pacientes alcançam a remissão dos sintomas em poucas semanas, entretanto alguns casos podem apresentar necessidade de terapias imunossupressoras adicionais para melhor controle da doença (Vivarelli et al., 2017).

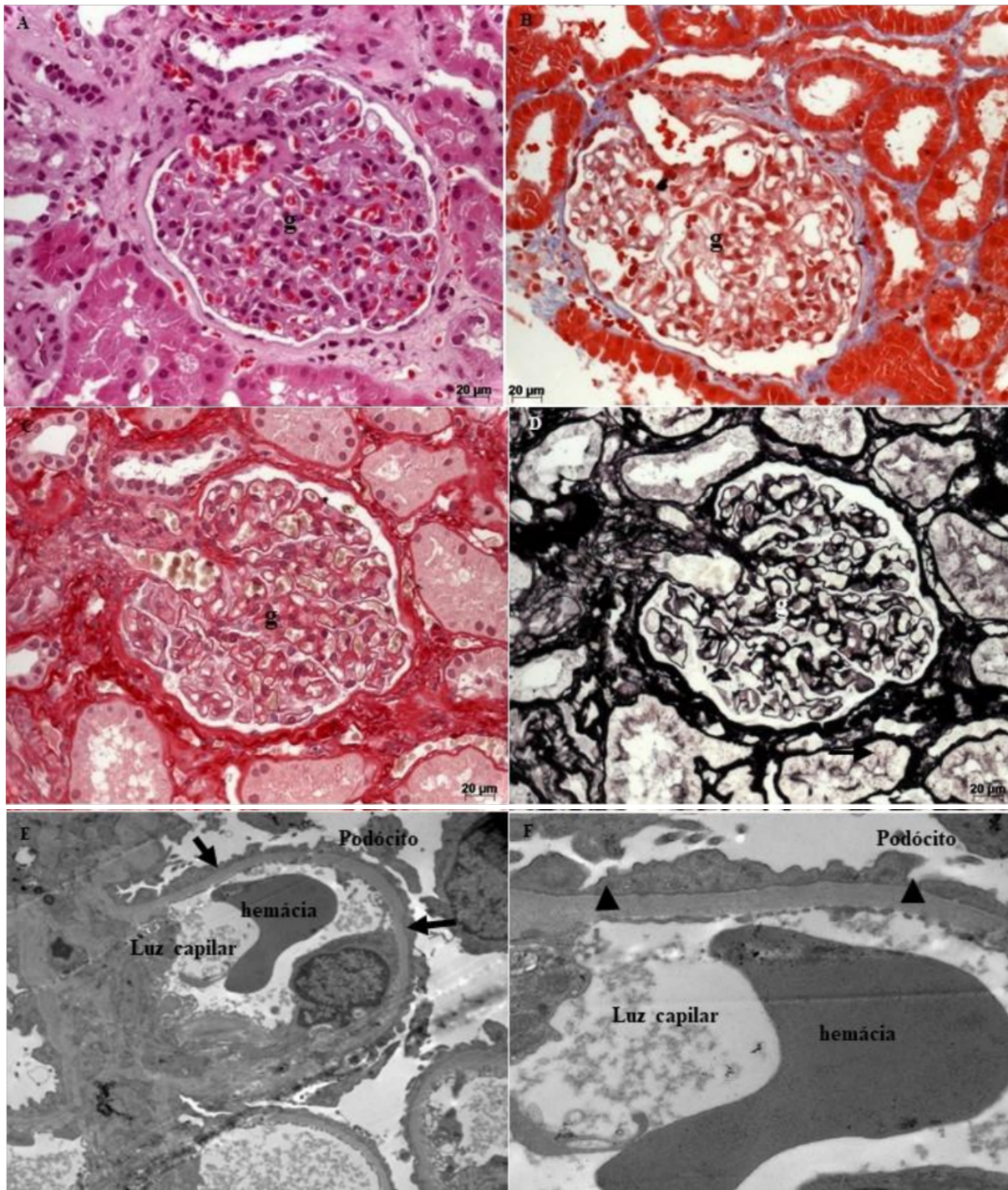


Figura 3:

Alterações morfológicas sob microscopia de luz comum e MET. (A) (HE,20x), (B) (TM,20x), (C) (PS,20x) e (D) (PAMS,20x). Glomérulos (g) sem alterações quanto a celularidade, matriz mesangial e membrana basal glomerular. Na MET em (E) menor aumento é possível observar alças capilares com apagamentos dos pedículos (seta) (4400x) e em (F) maior aumento evidenciando o apagamento dos pedículos caracterizado pela retificação e perda de estrutura do citoesqueleto do pedicelo (seta) e aumento da distância entre os diafragmas slit (cabeça da seta) (12000x). HE: Hematoxilina-eosina.

PAMS: Prata Metenamina. PS: Picrosirius. TM: Tricrômio de Masson. MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão. Fonte: CePRim UFTM. *Atualizações em Nefropatologia* (2022).

1.3 MECANISMOS DE LESÃO E PROTEÇÃO

Acredita-se que o sistema imunológico desempenhe um papel central na patogênese das podocitopatias, evidenciado pela eficácia dos corticosteroides e dos medicamentos imunossupressores no tratamento dessas condições. Essa eficácia sugere uma base imunológica relevante na origem e progressão das podocitopatias (Campbell; Thurman, 2022). Estudos recentes demonstraram que os podócitos, além de serem alvos de lesão mediada por fatores imunológicos, apresentam características que os assemelham a células do sistema imune, permitindo sua participação ativa como mediadores na resposta imune (Jiang et al., 2024).

A autofagia é um processo fisiológico e catabólico essencial, responsável pela degradação e reciclagem de proteínas e organelas danificadas, sendo considerado crucial para manutenção da homeostase dos podócitos. Este processo é ativado em resposta a estímulos endógenos ou exógenos, promovendo o sequestro de moléculas ou elementos subcelulares em vesículas de membrana dupla, denominadas como autofagossomos. Posteriormente, os autofagossomos se ligam aos lisossomos e seu conteúdo é degradado, sendo os produtos resultantes desse processo liberados no citosol, contribuindo para a homeostase celular (Mizushima, 2007; Ponticelli et al., 2023).

Nos podócitos, a autofagia desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo e contra o acúmulo de proteínas danificadas. A perda da capacidade autofágica nestas células tem sido associada à disfunção mitocondrial e ao estresse do retículo endoplasmático, fatores que contribuem para a patogênese das glomerulopatias, como evidenciado em modelos experimentais utilizando camundongos (Hartleben et al., 2010; Tagawa et al., 2016). Estudo em biópsias renais de adultos mostraram que a atividade autofágica nos podócitos de pacientes com DLM encontravam-se mais elevada em comparação aos pacientes com GESF, sugerindo que a manutenção da autofagia nos podócitos pode ser um fator protetor contra a progressão das glomerulopatias (Zeng et al., 2014). Além disso, em pacientes com diabetes, observou-se que o excesso de nutrientes e energia leva à inibição da atividade autofágica, contribuindo para lesões renais (Yang et al., 2018).

Devido ao papel protetor da autofagia contra a progressão das glomerulopatias, estudo demonstram, por meio da deleção específicas de genes, que a inibição da autofagia nos podócitos resulta

em alterações significativas tanto nas estruturas glomerulares quanto nas estruturas tubulares, com disfunções mitocondriais e evidência de estresse do retículo endoplasmático tanto em podócitos como em células tubulares (Kawakami et al., 2015). Portanto, a regulação da autofagia nos podócitos é considerada um mecanismo crucial na patogênese e progressão das podocitopatias, sendo alvo de estudos que buscam compreender seu impacto na manutenção da função renal e no desenvolvimento de novas terapias.

O CD36 é uma glicoproteína transmembrana pertencente à família dos receptores scavenger tipo B, amplamente expressa em diferentes tipos celulares, como adipócitos, células hematopoiéticas, células endoteliais, macrófagos e podócitos (Endemann et al., 1993). Estudos já demonstraram seu papel na patogênese de diversas doenças metabólicas, como aterosclerose, doença hepática gordurosa não alcoólica e diabetes mellitus (Nicholson et al., 2000; Miquilena-Colina et al., 2011; Handberg et al., 2010).

No contexto renal, o CD36 é expresso em células do epitélio tubular proximal e distal, podócitos, células mesangiais e endoteliais da microvasculatura (Kennedy et al., 2013; Bezaire et al., 2006). Embora sua expressão ocorra em diversos tipos celulares, nos rins, o CD36 está associado à regulação do metabolismo lipídico e na regulação da imunidade inata (Silverstein; Febbraio, 2009; Yang; Ming, 2011). Em modelos animais, estudos demonstraram que o aumento da expressão do CD36 pode exacerbar o estresse oxidativo e ativar vias de inflamação, promovendo a lipotoxicidade e favorecendo o desenvolvimento de processos fibróticos (Yang et al., 2017).

Nos podócitos, o CD36 agrava lesões ao ativar o inflamassoma NLRP3, um componente central da resposta inflamatória. A ativação do inflamassoma NLRP3 resulta na liberação de citocinas inflamatórias, sobretudo a interleucina 1 beta ativa (IL-1 β ativa), favorecendo um ambiente de inflamação crônica que exacerba as lesões renais e contribui para a progressão das podocitopatias (Zhao et al., 2019; HUA et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que o aumento da expressão de CD36, juntamente com a ativação do inflamassoma NLRP3, está associado à inibição da autofagia, o que agrava ainda mais as lesões podocitárias (ilustração Figura 4) (Lv et al., 2022).

Dando suporte à hipótese de que o CD36 desempenha um papel crucial nas podocitopatias, estudos apontam que a sua inibição pode atenuar a progressão da doença renal crônica. A inibição do CD36 foi associada à redução da inflamação e da fibrose, além de diminuir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Yokoi; Yanagita, 2016). Em modelos experimentais de glomerulopatias relacionadas à

obesidade, o bloqueio do CD36 resultou ainda em menor ativação do inflamassoma NLRP3 e redução das lesões podocitárias, sugerindo que o CD36 é um alvo terapêutico promissor (Yang et al., 2017; Zhao et al., 2019).

O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico que desempenha um papel crucial na resposta imune inata, mediando a ativação da caspase-1 e, consequentemente, a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-18 (IL-18) (Swanson; Deng; Ting, 2019). Este inflamassoma é fundamental na detecção de sinais de perigo, atuando no mecanismo de defesa. Quando ativado, o inflamassoma NLRP3 forma um complexo proteico que culmina na maturação e liberação de citocinas inflamatórias, desempenhando, assim, um papel central na resposta inflamatória (Xu; Núñez, 2023).

A ativação desregulada do inflamassoma NLRP3 tem sido associada a uma variedade de doenças inflamatórias, autoimunes e metabólicas, o que revela sua relevância clínica (Swanson; Deng; Ting, 2019). Em doenças como a nefropatia lúpica e glomerulopatias relacionadas à obesidade, foi observada uma ativação aumentada do CD36. Essa ativação está ligada ao aumento da atividade do inflamassoma NLRP3, resultando em uma cascata inflamatória, que contribui para diminuição da atividade autofágica. A diminuição da autofagia exacerba os danos nos podócitos, comprometendo ainda mais a função renal. Estudos demonstraram que a inibição do CD36 leva a diminuição da ativação do inflamassoma NLRP3 e a um aumento da atividade autofágica, resultando em redução das lesões de podócitos (Zhao et al., 2019; Lv et al., 2022). Adicionalmente, a inibição da autofagia em podócitos pode resultar na liberação de componentes intracelulares, como o DNA mitocondrial, que também têm o potencial de ativar o inflamassoma NLRP3, criando um ciclo de inflamação e lesão celular que perpetua a disfunção podocitária e a progressão de doenças renais (Song et al., 2023).

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória, produzida predominantemente por macrófagos, mas também expressa é liberada por outras células, incluindo os podócitos, em resposta a estímulos inflamatórios (Nishad et al., 2022). A produção de TNF pelos podócitos tem sido identificada como agravante em quadros de inflamação glomerular e lesão renal, exacerbando condições como a nefropatia diabética e a nefrite lúpica (Nishad et al., 2022; Rosa et al., 2012).

A liberação de TNF pelos podócitos não apenas intensifica a resposta inflamatória local, mas também interfere na homeostase do colesterol, contribuindo para o agravamento da inflamação e induzindo a apoptose (Pedigo et al., 2016). Além disso, o TNF pode ativar o inflamassoma NLRP3 e

atuar na regulação negativa da autofagia, contribuindo para a lesão dos podócitos (Shahzad et al., 2022).

Por outro lado, a interleucina-10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória, produzida por vários tipos celulares, incluindo linfócitos T reguladores, macrófagos, desempenha um papel importante na manutenção da homeostase tecidual, inibindo respostas inflamatórias excessivas, regulando a supressão imunológica, retardando a fibrose tecidual e promovendo a reparação tecidual (WEI et al., 2022). A IL-10 pode contrabalançar os efeitos pró-inflamatórios de citocinas como o TNF, que contribuem para a lesão dos podócitos e a progressão das podocitopatias. Ao modular a atividade do inflamassoma NLRP3 e a autofagia, a IL-10 pode ajudar a proteger os podócitos de danos adicionais e a preservar a função glomerular (Wright e Beresford, 2018).

A autofagia representa um mecanismo crucial de proteção celular em relação às situações de estresse. O estresse, metabólico ou inflamatório, pode ser mediado por moléculas de superfície como o CD36 e por moléculas intracelulares que se relacionam diretamente com o complexo do inflamassoma NLRP3, além de ser influenciada indiretamente por citocinas que podem ativá-lo ou inibi-lo, como IL-1 β , TNF e IL-10. Um estudo realizado pelo grupo da UFTM demonstrou que pacientes adultos com GESF apresentam níveis reduzidos de autofagia em comparação com pacientes com doença de lesões mínimas (DLM) ou indivíduos saudáveis. No entanto, os mecanismos subjacentes a essa diferença ainda não foram completamente elucidativos (Silva et al., 2020). Portanto, acredita-se que mediadores imunológicos possam interferir na biologia dos podócitos, influenciando os mecanismos de autofagia, como observado em outras doenças renais. A ausência de informações sobre esses mecanismos nas podocitopatias, particularmente nas mais comuns na infância, destaca a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre essas entidades.

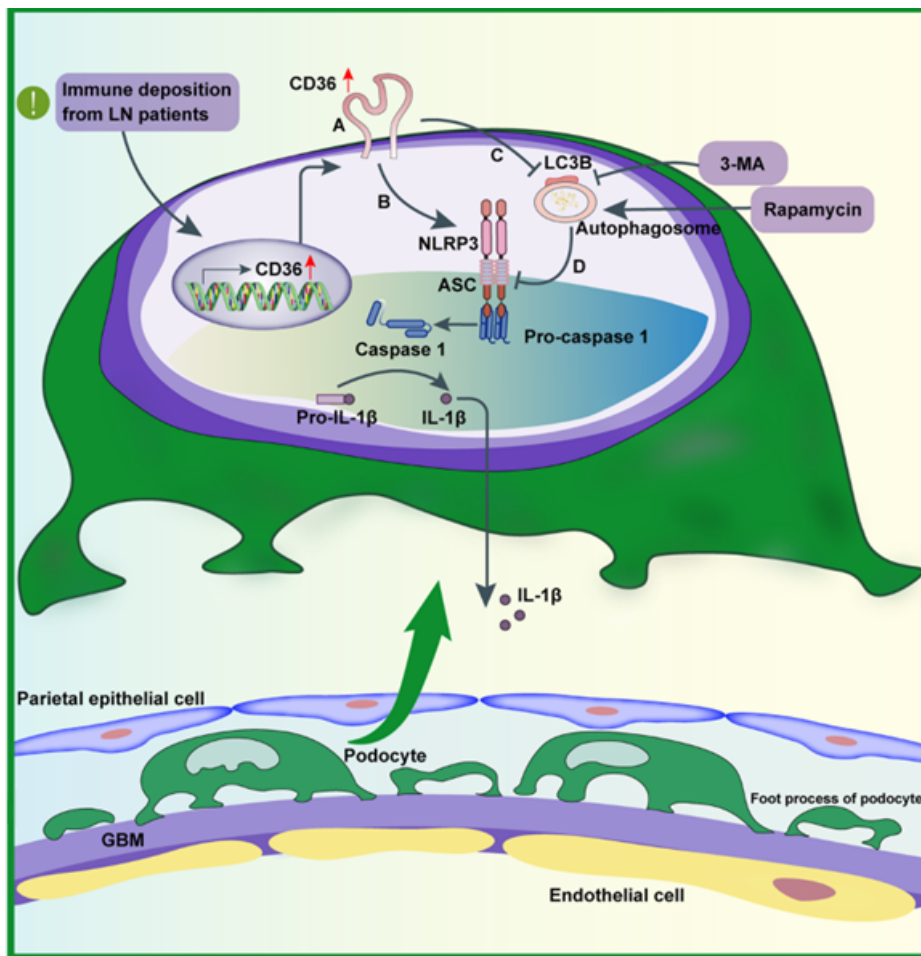


Figura 4: desenho esquemático representando regulação do CD36 e ativação do inflamassoma NLRP3. Representação referente a nefrite lúpica, o CD36 foi regulado positivamente no podócito. O CD36 elevado ativa o inflamassoma NLRP3 e regula negativamente a autofagia. Fonte: Modificado de: Lv et al. (2022).

2.0 JUSTIFICATIVA

A compreensão da patogênese das glomerulopatias na infância é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas, abordagens terapêuticas e manejo que visem à promoção da saúde infantil.

A GESF e a DLM destacam-se como as glomerulopatias mais prevalentes na população pediátrica, mas suas bases patológicas permanecem insuficientemente compreendidas. A investigação da presença de marcadores inflamatórios tem se tornado central, pois a inflamação desempenha um papel crucial na progressão e gravidade dessas condições. Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da UFTM indicaram que a autofagia, um mecanismo de proteção celular, pode estar comprometida em adultos com GESF, sugerindo que a disfunção autofágica também pode influenciar nas formas infantis da doença.

No entanto, até o momento, não foram encontrados na literatura estudos que tenham avaliado essas moléculas inflamatórias em associação com a disfunção podocitária, especificamente em crianças com GESF e DLM. A presente pesquisa se destaca como inovadora ao investigar, de maneira integrada, a relação entre os marcadores inflamatórios, os mecanismos de autofagia e as características dos podócitos na população pediátrica. Essa abordagem poderá preencher lacunas importantes no conhecimento sobre a patogênese dessas glomerulopatias, permitindo avanços no entendimento da doença e na proposição de novas estratégias terapêuticas direcionadas.

Compreender os mecanismos inflamatórios subjacentes pode abrir novas possibilidades para intervenções que modulam a resposta imune, contribuindo assim, para a redução do impacto das glomerulopatias na saúde infantil.

3.0 HIPÓTESE DO ESTUDO

A GESF e a DLM são as podocitopatias mais prevalentes na faixa etária pediátrica e suas patogêneses apresentam associações positivas com a diminuição da autofagia e com citocinas pró-inflamatórias, como CD36, TNF e o inflamassoma NLRP3 e negativa com a IL-10.

4.0 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar, em biópsias renais de crianças diagnosticadas com GESF e DLM, a presença de autofagia em podócitos e sua associação com a expressão de CD36, TNF, IL-10 e inflamassoma (NLRP3).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a caracterização epidemiológica e clínica dos pacientes pediátricos diagnosticados com Podocitopatias (DLM e GESF)
- Analisar a expressão *in situ* por meio da imunomarcção das moléculas CD36, TNF, IL-10 e inflamassomas (NLRP3).
- Comparar a expressão das moléculas CD36, TNF, IL-10 e inflamassoma (NLRP3) entre os grupos de pacientes com DLM e GESF
- Explorar potenciais associações de critérios clínicos e de prognóstico com o padrão das imunomarcações.

5.0 MÉTODOS

O estudo é de cunho observacional, em seres humanos, retrospectivo e descritivo. As variáveis utilizadas são de aspecto qualitativo e quantitativo. O projeto foi aprovado em 2022, pelo comitê de ética da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob o protocolo de número 5.609.537. CAAE: 61450322.8.0000.5154.

Foi avaliado o banco de dados de biópsias renais de crianças realizadas pelo Centro de Pesquisa em Rim (CePRim) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Inicialmente foram selecionadas 70 biópsias de pacientes pediátricos, dentre os quais 37 apresentavam podocitopatias. Os pacientes apresentavam entre 3 e 18 anos, sendo 16 pacientes com diagnóstico de GESF e 21 pacientes com diagnóstico de DLM. O grupo GESF foi definido pela presença de esclerose segmentar e focal (aumento da matriz mesangial) na microscopia de luz (ML) e apagamento de pedicelos na microscopia eletrônica de transmissão (MET). O grupo DLM foi definido pela presença de apagamento dos pedicelos na MET como única alteração. Todos os casos que apresentaram alterações morfológicas compatíveis com outras entidades foram excluídos deste estudo.

O grupo controle para as análises de imuno-histoquímica foi composto por 12 fragmentos de necropsia de rim de pacientes da mesma faixa etária, cuja causa de morte não foi relacionada a doença renal ou doença infecciosa, obtidos do Serviço de Patologia Pediátrica da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto (USP/RP). Para análise de microscopia eletrônica de transmissão (autofagia e apagamento de pedicelos), o grupo controle foi composto por biópsias de casos de proteinúria não glomerular e hematúria isolada ($n = 12$). A não utilização de material de necrópsia para o estudo de MET se justifica pelas alterações pós morte que podem interferir nos estudos por MET.

Foi confeccionada uma planilha eletrônica com informações contidas nas solicitações de biópsias relativas aos dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos pertinentes e a partir de informações contidas nos laudos relativas à análise histológica da biópsia renal (Microscopia de Luz, Imunofluorescência e Microscopia Eletrônica de transmissão). Os casos foram separados de acordo com o diagnóstico dado pela nefropatologista, de acordo com achados da biópsia renal associados com a clínica do paciente.

5.1 IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas foram confeccionadas com cortes de material a 2 µm de espessura, e foram pré tratadas com solução Trilogy (Cell Marque) na panela “Paschal” (Dako, Carpinteria, CA, EUA) a 121°C para desparafinização, reidratação e recuperação antigênica. Para os anticorpos anti-NLRP3 (1/500, Invitrogen, EUA, PAS-79740) e anti-IL10 (1/500, Invitrogen, EUA, PAS-79457), foi utilizado o kit EasyLink Duo (EasyPath) e para os anticorpos anti-TNF (1/1, Invitrogen, EUA, P300A) e anti CD36 (1/500, Invitrogen, EUA, PAS-95242) foi utilizado o kit Novolink Polymer Detection System, (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), conforme as especificações de seus fabricantes. Todos os anticorpos utilizados foram incubados overnight a 4°C. Por fim, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o cromógeno (Liquid DAB, Dako) e posteriormente, foram lavadas com água corrente e contra-coradas em Hematoxilina de Harris por 2 minutos.

5.1.2 QUANTIFICAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES

A análise da expressão *in situ* das moléculas imunomarcadas foi realizada por microscopia de luz comum, onde foram obtidas imagens digitais dos glomérulos por meio de uma câmera acoplada ao microscópio, na objetiva de 40x. As análises se limitaram aos glomérulos e células analisadas no citoplasma glomerular foram consideradas positivas quando apresentaram coloração acastanhada típica.

Nas marcações de CD36 e NLRP3, células positivas glomerulares foram contadas e área do glomérulo foi medida pelo observador por meio do Software ImageJ e os resultados foram expressos em densidade de células marcadas por área (células/mm²).

Nas marcações por TNF e IL-10, a coloração acastanhada foi marcada pelo observador utilizando o Sistema analisador de imagens semiautomático Axio (Zeiss, Aalen, Alemanha) e os resultados foram expressos em porcentagem de área marcada em relação ao total de campos avaliados.

5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Os fragmentos foram fixados em solução de Karnovsk+Vermelho de Rutênio 0,1%, pós-fixados em solução pós-fixadora de tetróxido de ósmio+Vermelho de Rutênio 0,1% e processados para inclusão em resina. Os fragmentos foram submetidos a cortes semi-finos de 400 a 250 nm de espessura e corados pelo azul de toluidina. Após análise desses cortes em microscópio de luz, foram feitos cortes ultrafinos

com espessura de 60 a 80 nm que foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-900. Foram capturadas imagens das alças glomerulares e dos podócitos em uma amplificação de 7.000 vezes, sendo as imagens analisadas pelo software *ImageJ*. Para a análise do apagamento dos pedicelos, foi obtida a estimativa da largura do pedicelo por meio da fórmula $FPW = (\pi/4) \times (\Sigma \text{ comprimento da alça glomerular} / \Sigma \text{ do número de pedicelos})$, sendo $(\pi/4)$ um fator de correção para corrigir a variação randomizada presumida no ângulo da seção relativa do eixo axial do pedicelo (Van Roeyen, Eitner, Boor, Moeller, 2011; Gundersen, Seefeldt, Osterby, 1980)

Para análise de evidências de autofagia, o número de autofagossomos presentes em podócitos e/ou pedicelos foram contados em cada imagem sem repetir campos e os resultados foram expressos em número médio de autofagossomos por caso. O número de autofagossomos foi estabelecido pela contagem de vesículas contendo material citoplasmático não digerido (Liang et al., 2016).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism versão 5.0. As variáveis categóricas foram apresentadas como porcentagem e as variáveis numéricas como média e desvio-padrão, quando a distribuição foi normal e a variância homogênea; ou mediana com mínimo e máximo [Min-Max], quando os critérios anteriores não foram atendidos. A normalidade foi testada pelo teste de Shapiro Wilk.

As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fisher ou pelo teste do Qui quadrado. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste t de Student, quando a distribuição das variáveis foi normal e variâncias semelhantes, ou pelo teste de Mann-Whitney, nos demais casos. Para análise de três grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, utilizou-se o teste paramétrico ANOVA (F) seguido do pós-teste de Tukey. Caso contrário, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (H) seguido do pós-teste de Dunn. A correlação entre duas variáveis com distribuição não normal foi analisada pelo teste de Spearman (rS), quando normal o Pearson (r).

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

6.0 RESULTADOS

6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Neste estudo foram selecionados 37 pacientes com podocitopatias e 12 indivíduos controles, cujas biópsias renais foram encaminhadas ao Centro de Pesquisa em Rim (CePRim) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), no período de 1996 a 2022. Dos pacientes com podocitopatias, 16 receberam o diagnóstico de GESF e 21 de DLM, sendo 9 e 15 pacientes do sexo masculino e 7 e 6 pacientes do sexo feminino, respectivamente. A idade (média e desvio padrão) na qual foi realizada as biópsias foi de $9,5 \pm 5,75$ para os pacientes com GESF e de $8,24 \pm 4,35$ para os pacientes com DLM. Os dados estão na tabela 1. Não houve diferença significativa entre a média da idade nos dois grupos estudados (Teste t; $p > 0,05$).

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos de pacientes com Podocitopatias, GESF e DLM.

	Podocitopatias	GESF	DLM	Valor de p
Idade				
<i>Média ± DP</i>	8,78±4,97	9,5±5,75	8,24±4,35	0,5681
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	8 (3-18)	9 (3-18)	7 (3-15)	
Gênero [n (%)]				
<i>Masculino</i>	24 (62,16)	9 (56,25)	15 (71,43)	0,4891
<i>Feminino</i>	13 (37,84)	7 (43,75)	6 (28,57)	
Ureia (mg\dl)				

<i>Média ±DP</i>	35,15±24,45	38,06±28,49	32,43±20,65	0,9478
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	29 (11-104)	25,5 (11-104)	29 (16,30-103)	
<i>NI (n)</i>	8	2	6	

Creatinina (mg\dl)

<i>Média ±DP</i>	0,66±0,65	0,78±0,80	0,56±,052	0,371
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	0,46 (0,1-3,2)	0,59 (0,16-3,20)	0,44 (0,10-2,30)	
<i>NI (n)</i>	6	2	4	

Proteinúria (g/24h)

<i>Média ±DP</i>	2.946,72±3.061,858	3.711,59±2.974,65	2.309,34±3.068,14	0,085
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	1.699 (36-10.800)	3.400 (156,40-9.330)	1214,03 (36-10.800)	
<i>NI (n)</i>	3	1	2	

Albumina(mg/dl)

<i>Média ±DP</i>	2,66±1,04	2,70±1,03	2,64±1,09	0,877
------------------	-----------	-----------	-----------	-------

<i>Mediana (Min-Máx)</i>	2,42 (1,25-4,8)	2,41 (1,37-4,30)	2,42 (1,25-4,80)	
<i>NI (n)</i>	9	4	5	
Colesterol (mg/dl)				
<i>Média ±DP</i>	355,30±159,57	380,39±150,8 0	33,35±168,57	0,308
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	334,5 (154-693)	375,50 (171-678)	263,50 (154-693)	
<i>NI (n)</i>	7	2	5	
HAS [n (%)]				
<i>Sim</i>	16 (43,24)	9 (56,25)	7 (33,34)	0,2852
<i>Não</i>	16 (43,24)	5 (31,25)	11 (52,38)	
<i>NI</i>	5(13,51)	2 (12,50)	2 (9,52)	

GESF: glomeruloesclerose segmentar e focal; DLM: doença de lesões mínimas; NI: não informado;
HAS: hipertensão arterial sistêmica.

Os dados clínicos/laboratoriais foram obtidos do formulário de solicitação dos exames anátomo patológicos e foram analisados a proteinúria de 24 horas, os níveis séricos de albumina, creatinina e colesterol. A figura 1, ilustra dados clínicos e os situa dentro dos limites da normalidade para a infância. Os dois grupos de pacientes apresentaram proteinúria, sendo o grupo GESF variando de 156,40 a 9.330

mg nas 24 horas, com mediana de 3.400mg e o grupo DLM variou de 36 a 10.800 mg nas 24 horas, com mediana de 1.214,03 mg. Não houve diferença significativa entre os grupos analisados (Mann-Whitney, $p=0,085$). Os níveis séricos de albumina da maioria dos pacientes estavam abaixo da normalidade. O grupo GESF variou de 1,37 a 4,30 g/dL, com mediana de 2,41g e o grupo DLM variou de 1,25 a 4,8 g/dL, com mediana de 2,42g. Não houve diferença significativa entre os grupos (Teste t, $p=0,877$). Os níveis séricos de creatinina estavam dentro dos limites da normalidade na maioria dos pacientes. O grupo GESF variou de 0,16 a 3,20 mg/dL, com mediana de 0,59 mg/dL. O grupo DLM variou de 0,10 a 2,30 mg/dL, com mediana de 0,44 mg/dL. Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0,371$). Em relação aos níveis séricos de colesterol, estes estavam superiores aos limites da normalidade em todos os pacientes estudados. No grupo GESF variou de 171 a 678 mg/dL, com mediana de 375,50 mg/dL. No grupo DLM variou de 154 a 693 mg/dL, com mediana de 263,5 mg/dL, entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0,308$).

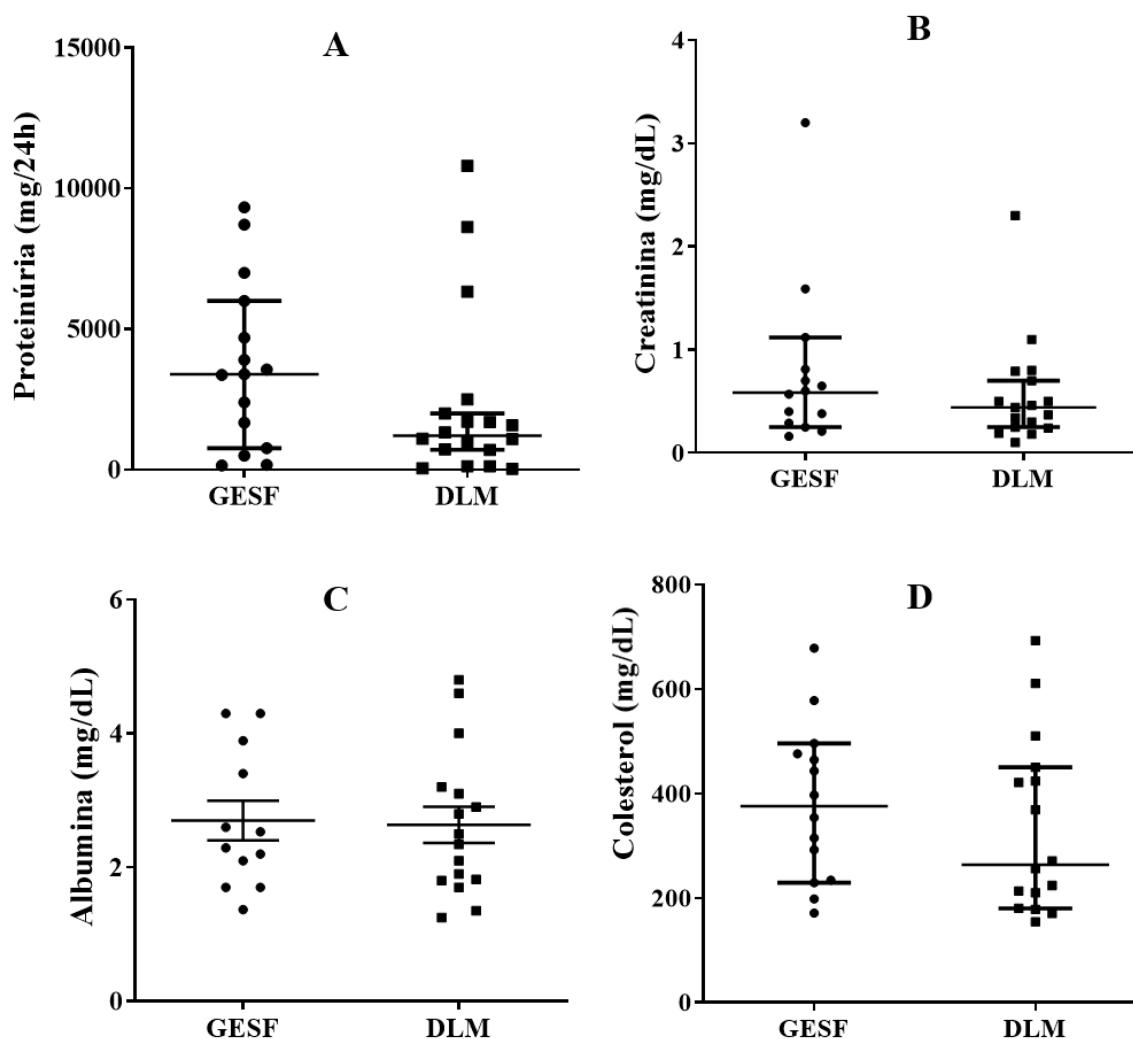


Figura 5: Avaliação dos dados clínicos/laboratoriais dos pacientes diagnosticados com GESF(n=12) e DLM(n=16). Figura A: níveis de proteinúria (mg/24 horas); Figura B: Níveis de creatinina (mg/dL); Figura C: Níveis séricos de albumina (mg/dL); Figura D: níveis séricos de colesterol (mg/dL). Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. Não houve diferença significativa entre os grupos. Fonte: Extraídos do formulário de solicitação dos exames anatomopatológicos. Do autor, 2024.

6.2 ANÁLISE DA AUTOFAGIA EM PODÓCITOS E DO APAGAMENTO DOS PEDICELOS.

A análise da autofagia foi realizada em imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. Foram incluídos nesta avaliação biópsias renais de 12 pacientes controles. Dos 37 pacientes, foi possível avaliar material de 30 deles, 13 com o diagnóstico de GESF e 17 com o diagnóstico de DLM, os demais pacientes não foi possível a recuperação de fragmento para análise. A autofagia foi avaliada pela densidade de autofagossomos. No grupo controle variou de 89 a 473 com mediana de

377,5 autofagossomos/mm², no grupo GESF variou de 101 a 414, com mediana de 173 autofagossomos/mm², enquanto no grupo DLM variou de 121 a 501, com mediana de 214 autofagossomos/mm². O grupo GESF apresentou uma diminuição significativa dos autofagossomos em relação ao grupo controle (Mann-Whitney, $p=0,047$) (Prancha 1A e 1B) (Figura 2). A autofagia também se mostrou significativamente menor no grupo DLM em comparação ao grupo controle (Mann-Whitney, $p=0,032$). Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos, GESF e DLM.

O apagamento dos pedicelos foi expresso em FPW (Foot Process Width), e o grupo controle apresentou valores que variaram de 409,7 a 513,3 com mediana de 445,6. O grupo GESF apresentou valores de 623,9 a 1.806 com mediana de 1.095, enquanto o grupo DLM apresentou valores de 492,5 a 1.698 com mediana de 755,3. Os resultados mostram um apagamento de pedicelos significativamente maior nos grupos GESF e DLM em relação ao grupo controle e um apagamento de pedicelos maior no grupo GESF que no grupo DLM (Mann-Whitney, $p<0,0001$) (Prancha 2A, 2B e 2C) (Figura 2).

A existência de correlação entre a densidade de autofagossomos e o apagamento de pedicelos foi realizada em cada um dos grupos de pacientes com glomerulopatias. Os resultados apresentados na figura 3 mostram que os dois grupos apresentaram uma correlação (Spearman) negativa e significativa entre as duas variáveis. O grupo GESF com valor de $p=0,034$ e r de $-0,587$, enquanto o grupo DLM apresentou um valor de $p=0,026$ e $r=-0,537$.

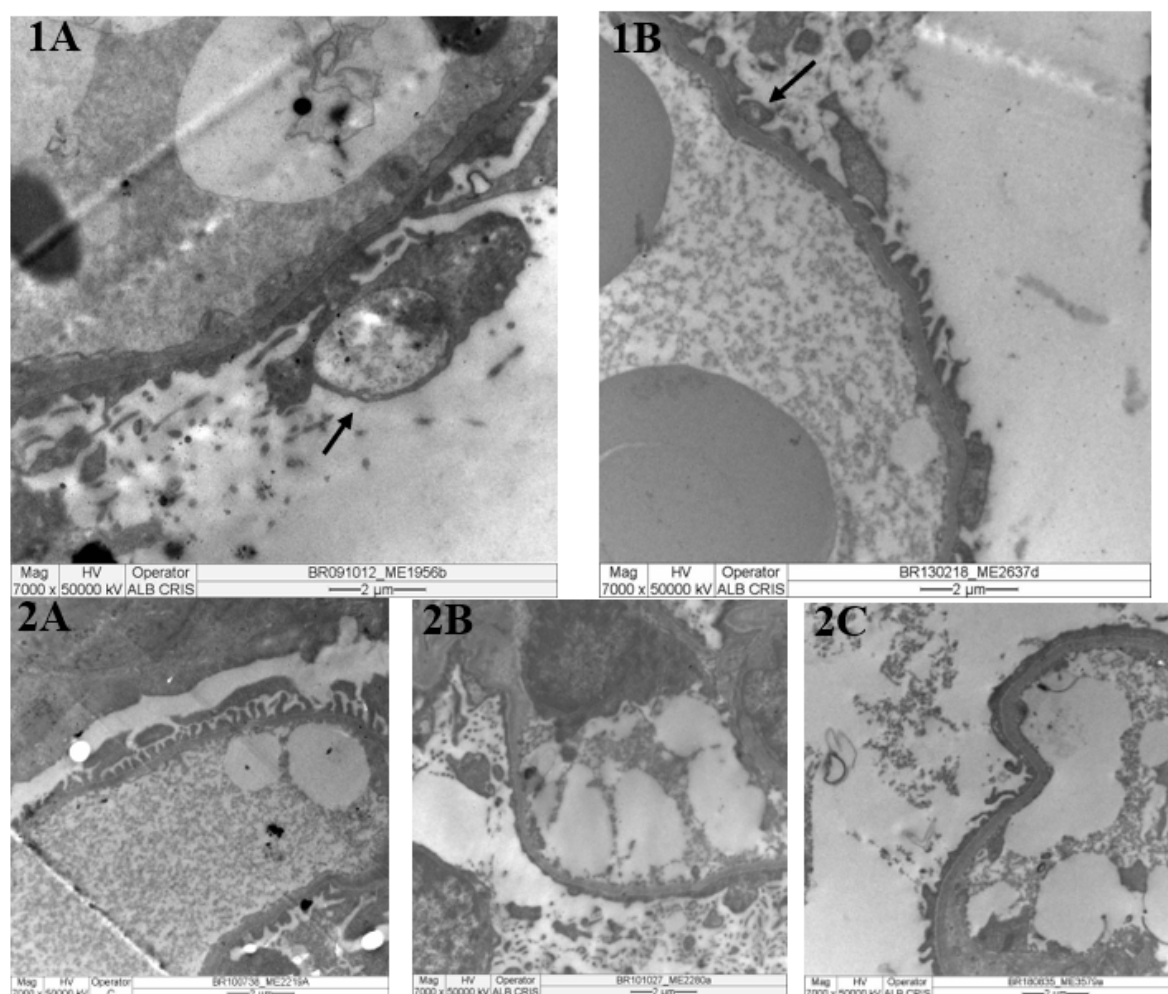


Figura 6: Microscopia eletrônica de transmissão avaliada em biópsias renais do grupo controle, com diagnóstico de GESF e DLM. Na figura 1A (seta) ilustra presença de autofagossomo em podócitos de pacientes do grupo controle, e em 1B (seta) autofagossomo em podócitos dos pacientes do grupo com GESF. Na figura 2A ilustra o apagamento de pedicelos FPW (Foot Process Width) no grupo controle, comparadas com o grupo GESF (figura 2B) e do grupo com DLM (figura 2C). Do autor, 2024.

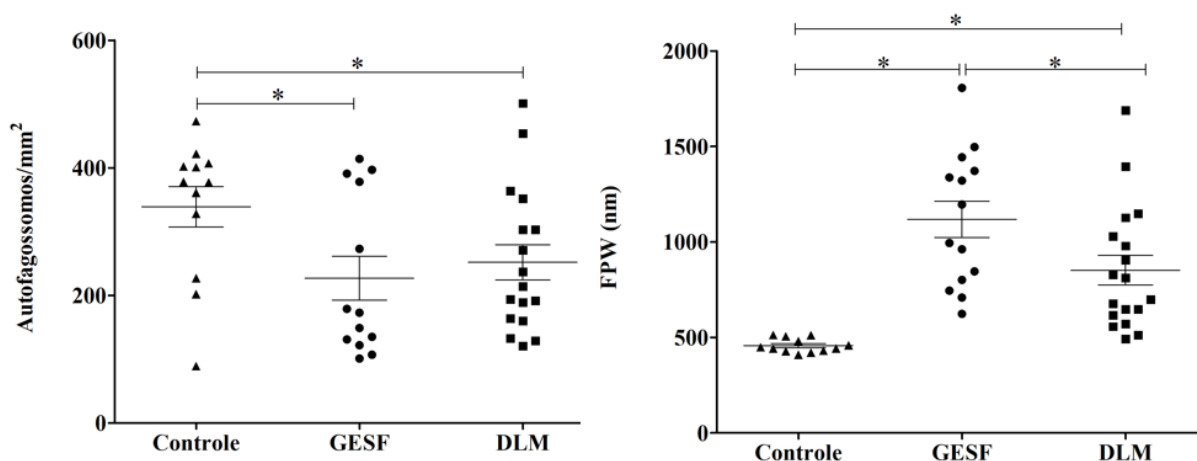


Figura 7:

Autofagossomos/mm² e apagamento de pedicelos (FPW) em pacientes com GESF (n= 13), DLM (n= 17) de grupo controle (n=12). Os dados de autofagia são expressos em número de autofagossomos por mm² e os de apagamento de pedicelos pela avaliação do FPW. Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. Níveis de autofagia significativamente inferiores dos pacientes com GESF em relação ao grupo controle (Mann-Whitney, $p=0,047$) e DLM em relação ao grupo controle (Mann-Whitney, $p=0,038$). O apagamento de pedicelos foi maior nos grupos GESF e DLM em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, $p< 0,0001$). Do autor, 2024.

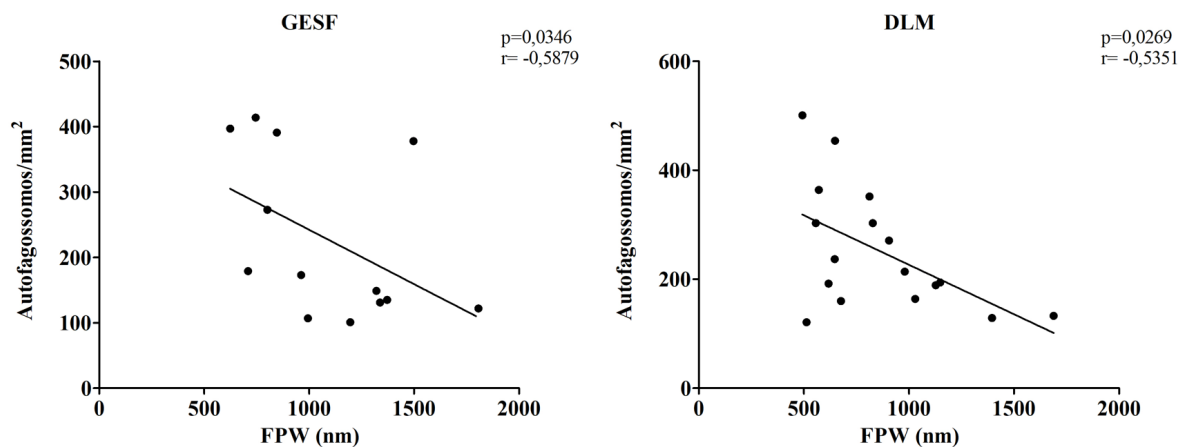


Figura 8:

Correlação entre o número de autofagossomos e o apagamento dos pedicelos em biópsias renais de pacientes com GESF e DLM. Houve uma correlação negativa e significativa entre o número de autofagossomos e o apagamento de podócitos no grupo GESF ($p= 0,034$; $r=-0,58$) e no grupo DLM ($p= 0,026$; $r=-0,53$) (Correlação de Spearman). Do autor, 2024.

6.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO CD36, DO NLRP3, DO TNF E DA IL-10 NOS GLOMÉRULOS RENAIIS.

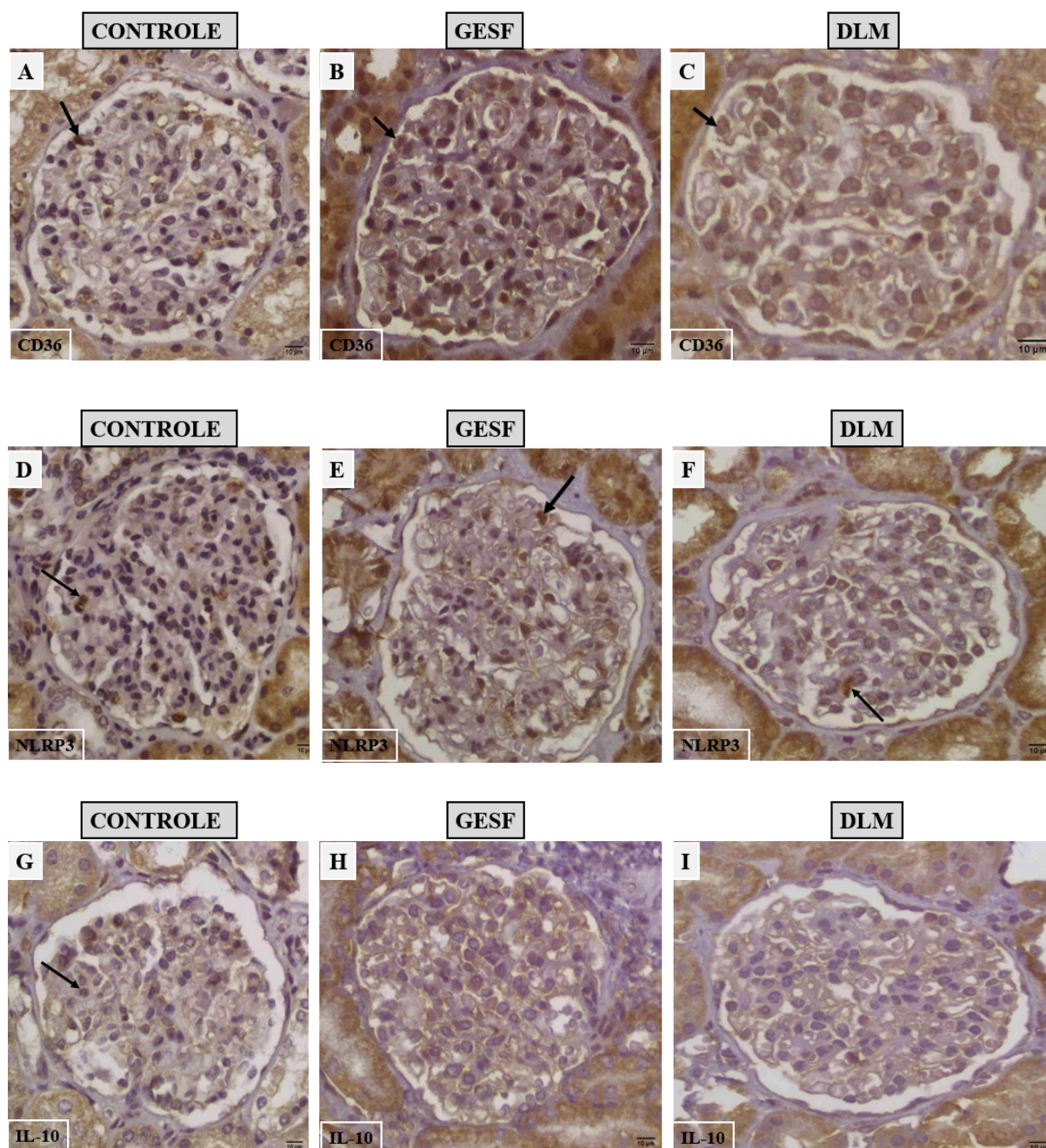
A expressão do CD36 e do NLRP3, foi avaliada por imuno-histoquímica nos glomérulos renais do grupo controle, com GESF e com DLM, e a marcação foi expressa pela densidade de células marcadas por mm^2 . A marcação do TNF e da IL-10 se mostrou mais difusa, marcando citoplasma e o tecido ao redor, dessa forma, a positividade foi considerada apenas as marcações intracelulares e avaliada em porcentagem de área.

A densidade de células marcadas para a molécula CD36 (Prancha 2: figura A, B e C) no grupo controle variou de 1,05 cel./ mm^2 a 37,03 cel./ mm^2 com mediana de 9,62 cel./ mm^2 . No grupo GESF variou de 0,60 cel./ mm^2 a 24,3 cel./ mm^2 com mediana de 13,59 cel./ mm^2 . E no grupo DLM variou de 0,15 cel./ mm^2 a 55,63 cel./ mm^2 com mediana de 4,51 cel./ mm^2 . Os dados mostram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e GESF (Mann Whitney, $p=0,340$). Houve uma diminuição significativa entre o grupo DLM e o grupo controle (Mann Whitney, $p=0,012$) e entre o grupo DLM e o GESF (Mann-Whitney, $p=0,010$).

A imunomarcação para NLRP3 também foi expressa em densidade de células marcadas. No grupo controle variou de 0,32 cel./ mm^2 a 11,13 cel./ mm^2 com mediana de 7,58 cel./ mm^2 . No grupo GESF variou de 1,67 cel./ mm^2 a 53,4 cel./ mm^2 com mediana de 15,33 cel./ mm^2 . No grupo DLM variou de 0,26 cel./ mm^2 a 31,44 cel./ mm^2 com mediana de 9,0 cel./ mm^2 . Os dados mostram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o DLM (Mann Whitney, $p=0,591$) e entre DLM e o grupo GESF (Mann Whitney, $p=0,182$). Houve um aumento significativo na expressão do NLRP3 entre o grupo GESF em relação ao grupo controle (Mann Whitney, $p=0,0205$). Os dados são apresentados na figura 4 e ilustrados na prancha 2 (G, H e I).

A imunomarcação para a IL-10 α foi avaliada em porcentagem de área (Prancha 2: G, H e I). No grupo controle variou de 2,24% a 44,2% com mediana de 14,68%. No grupo GESF variou de 3,64% a 46,06%, com mediana de 20,73%. No grupo DLM variou de 1,16% a 43,57% com mediana de 14,14%. Não houve diferença significativa entre a área imunomarcada para a IL-10 entre os grupos estudados (Kruskal-Whallis, $p=0,946$).

Semelhante a IL-10, a expressão do TNF foi avaliada pela porcentagem da área positiva (Prancha 2: J, K e L). No grupo controle variou de 0,17% a 25% com mediana de 6,97%. No grupo GESF variou de 3,37% a 38,62% com mediana de 15,05%. No grupo DLM variou de 0,91% a 38,68%, com mediana de 9,36%. Não houve diferença significativa entre a área imunomarcada para o TNF entre os grupos (Kruskal-Wallis, $p=0,152$).



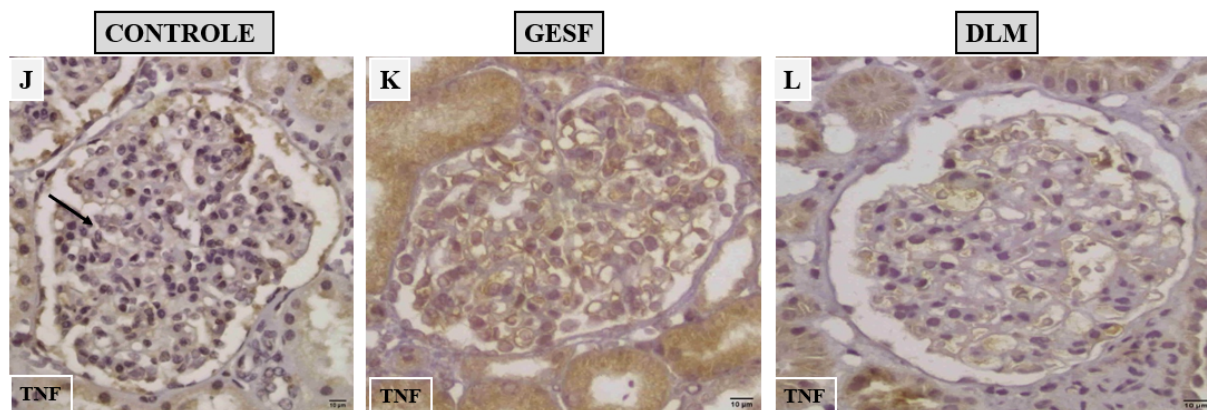


Figura 9: Avaliação da imunomarcagem por imuno-histoquímica nos glomérulos renais, no grupo controle, com GESF e com DLM, respectivamente. A marcação positiva (seta) do CD36 (Figura A, B e C) e do NLRP3 (Figura D, E e F) foi expressa pela densidade de células marcadas por mm^2 . A avaliação da positividade da IL-10 (Figura G, H e I) e do TNF (Figura J, K e L) foi expressa em porcentagem de área. Do autor, 2024.

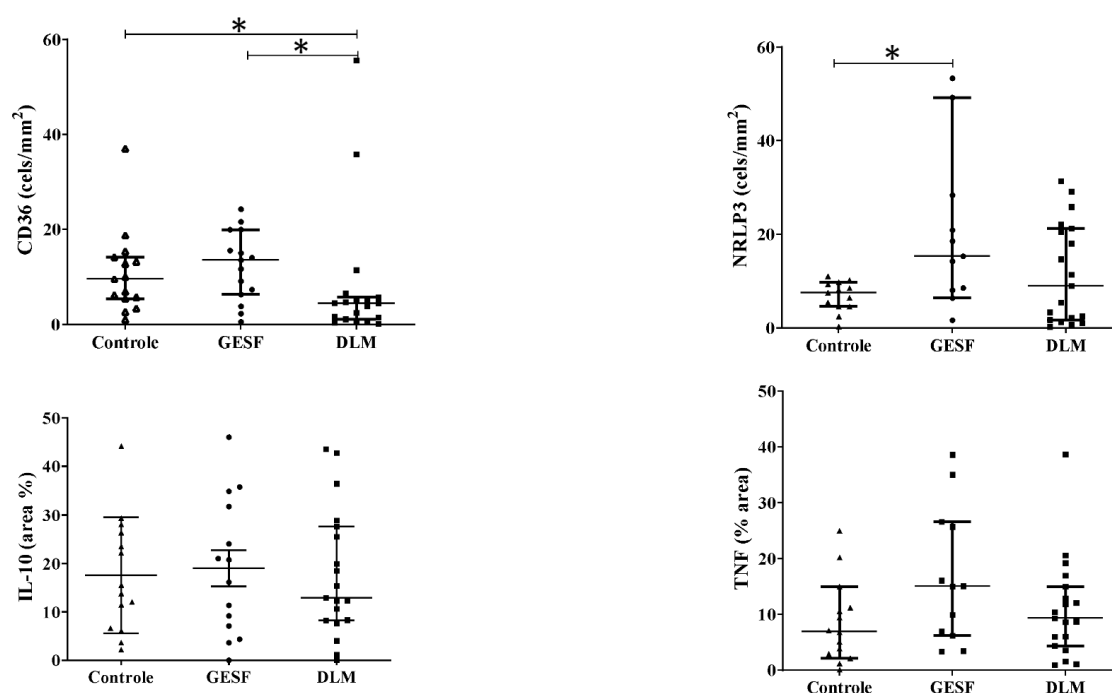


Figura 10: Avaliação da expressão de CD36, NLRP3, IL-10 e TNF em biópsias renais de crianças do grupo controle, GESF e DLM. Cada ponto representa um paciente, a linha horizontal representa a mediana e a linha vertical o intervalo de confiança de 95%. A expressão do CD36 foi expressa pela densidade de células marcadas por mm^2 . A expressão do CD36 no grupo DLM foi significativamente menor que a do grupo controle e GESF ($p=0,0087$) (Kruskal-Wallis). A expressão do NLRP3 foi

expressa pela densidade de células marcadas por mm². A expressão do NLRP3 no grupo GESF foi significativamente maior que no grupo controle ($p= 0,020$) Mann-Whitney. A expressão de IL-10 e do TNF foi expressa em porcentagem de área. Do autor, 2024.

7.0 DISCUSSÃO:

A GESF e a DLM são as podocitopatias mais prevalentes da infância, caracterizadas por lesões podocitárias que resultam em proteinúria e graus variados de comprometimento renal. O manejo inicial com corticosteroides geralmente apresenta boa resposta clínica, sendo a biópsia renal indicada principalmente em casos refratários ou com evolução clínica atípica (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, 2021; Crawford; Gipson, 2017). Neste estudo, analisamos dados de pacientes que, em sua maioria, haviam recebido tratamento prévio com corticosteroides ou outros agentes imunossupressores. Apesar dessas intervenções, os achados laboratoriais e histopatológicos foram consistentes com o diagnóstico de GESF ou DLM. Esses resultados reforçam a importância do monitoramento clínico, embora os exames laboratoriais careçam de especificidade para diferenciação entre GESF e DLM.

Com o objetivo de aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes às podocitopatias pediátricas, avaliamos a capacidade de autofagia dos podócitos em pacientes com GESF e DLM. A autofagia é um mecanismo essencial para renovação de estruturas citoplasmáticas e manutenção da homeostase celular (Fougeray; Pallet, 2015). No presente estudo, os resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis de autofagia nos podócitos de crianças com GESF e DLM, em comparação ao grupo controle. Esses achados estão alinhados com dados da literatura que indicam que a autofagia exerce um papel protetor, retardando a progressão da doença renal (Silva et al., 2020; Lenoir, 2016; Yoshibayashi et al., 2020; Gowd et al., 2020). Sua redução pode, portanto, contribuir diretamente para a patogênese e progressão das podocitopatias.

O apagamento de pedicelos é considerado um marcador chave de estresse nos podócitos, refletindo o comprometimento da capacidade de mecanismo da homeostase celular. Observamos um apagamento significativo dos processos podocitários em ambos os grupos de podocitopatias pediátricas, com maior evidência no grupo GESF, em relação ao grupo DLM. Esses resultados corroboram com a literatura, que associa a GESF a alterações estruturais mais graves e a um risco aumentado de progressão da doença (Gowd et al., 2020). Além disso, identificamos uma correlação inversa entre os níveis de autofagia e o apagamento de pedicelos nos dois grupos, sugerindo que a redução da atividade autofágica está diretamente associada ao aumento da lesão e ao apagamento dos podócitos. Tal achado ressalta o

papel protetor da autofagia e apoia estudos que investigam estratégias terapêuticas voltadas para aumentar a atividade autofágica como forma de proteger os podócitos e mitigar a progressão das podocitopatias (Ponticelli et al., 2023).

O CD36 é um receptor multifuncional expresso nos podócitos, onde desempenham papel crucial como receptor de lipoproteínas, facilitando o transporte intracelular de ácidos graxos de cadeia longa. Alterações no metabolismo de lipídios e lipoproteínas são descritos na SN (Takabatake et al., 2014). Os níveis elevados de colesterol em pacientes com GESF e DLM, como observado em nosso estudo, sugerem uma possível interação com receptores de captura, como o CD36. Essa interação pode ativar vias de sinalização intracelular, levando à liberação de citocinas inflamatórias e contribuindo para lesão de podócitos. Estudos prévios corroboram essa hipótese, associando a hipercolesterolemia ao aumento dos ligantes de CD36, o que favorece o estresse oxidativo e o agravamento da lesão renal crônica (Kennedy et al., 2013; Hua et al., 2015). Outros estudos destacaram que cristais de colesterol podem ativar o sistema complemento, promovendo a ativação do inflamassoma NLRP3 e a subsequente liberação de citocinas inflamatórias (Niyonzima et al., 2013; Samstad et al., 2014). Assim sendo, nossos resultados sugerem que o aumento do colesterol pode ter papel lesivo nos podócitos e compreender essas vias de sinalização pode abrir caminhos para novas abordagens terapêuticas nas podocitopatias pediátricas.

Ainda no contexto das doenças renais, o CD36 desempenha um papel fundamental nas vias de inflamação, sobretudo ao ativar mecanismos como NF- κ B e inflamassoma NLRP3. Estas vias, em conjunto com a caspase-1, promovem a maturação de IL-1 β e IL-18, citocinas pró-inflamatórias essenciais, com efeitos significativos locais e sistêmicos (Yang et al., 2018). Nossos resultados demonstraram uma expressão significativamente reduzida do CD36 em pacientes do grupo DLM em comparação com o grupo controle e o grupo GESF. Corroborando esses achados, observou-se um aumento significativo na expressão de inflamassoma NLRP3 no grupo GESF em relação ao grupo controle. A expressão diferencial do CD36 e inflamassoma NLRP3 entre os grupos avaliados sugere a presença de mecanismos inflamatórios distintos. Nos casos de GESF, a maior expressão de inflamassoma NLRP3 pode desencadear respostas inflamatórias mais intensas, alinhando-se com estudos anteriores que indicam que o aumento na expressão do inflamassoma NLRP3 em pacientes com GESF está associada a inflamação intensa e ao desenvolvimento de fibrose (Yang et al., 2017; Niu et al., 2023; Henedak et al., 2024). Já no grupo DLM, observou-se uma modulação negativa na expressão de CD36 sugerindo que

essa condição está associada a respostas inflamatórias mais moderada, uma vez que sinais inflamatórios mediados pelo CD36 estariam diminuídos.

A distinção entre os mecanismos inflamatórios de GESF e DLM é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas. A modulação da via CD36 e inflamassoma NLRP3 pode ser particularmente relevante para pacientes com GESF, enquanto abordagens alternativas podem ser mais adequadas para tratar especificidades inflamatórias observadas na DLM. Adicionalmente, a expressão reduzida de CD36 nos pacientes do grupo DLM sugere o potencial dessa molécula como um biomarcador diagnóstico, especialmente em casos de GESF não amostrada, onde o fragmento de biópsia renal pode não conter glomérulos afetados. Pesquisas futuras são necessárias para aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes às respostas inflamatórias distintas entre essas podocitopatias e para explorar a maior aplicabilidade dessas moléculas como marcadores diagnósticos.

Neste estudo, analisamos ainda a presença do TNF e da IL-10. O TNF é uma citocina amplamente envolvida nos processos inflamatórios, enquanto a IL-10 atua como uma citocina anti-inflamatória, cujo principal mecanismo de ação consiste na inibição da produção do TNF. Recentemente, um estudo de caráter multicêntrico reuniu amostras de adultos e adolescentes diagnosticados com GESF e DLM, evidenciando ativação das vias de sinalização do TNF, especialmente em casos de maior gravidade (Mariani et al., 2023). Entretanto, nossos resultados não evidenciaram diferenças significativas entre a expressão tanto de TNF como de IL-10.

Este estudo apresenta limitações relacionadas ao tamanho amostral e ao fato de ter sido conduzido em um único centro médico, embora o CePRim receba amostras provenientes de diferentes regiões geográficas do país. Além disso, os fragmentos de biópsias avaliados correspondiam a pacientes pediátricos que, em sua maioria, foram submetidos previamente a terapia com corticosteroides ou imunossupressores. Essas intervenções podem ter influenciado os achados obtidos na avaliação à MET e na expressão de moléculas, como CD36, TNF, NLRP3 e IL-10. Apesar da influência relacionada ao prévio, ainda foram observadas evidências substanciais de mediadores inflamatórios locais, que podem corroborar para uma melhor compreensão da patogênese das podocitopatias pediátricas. Estudos futuros, com amostra maiores e em contextos de tratamento diversificados serão essenciais para validar esses achados e refinar as estratégias terapêuticas. Além disso, são necessárias investigações adicionais para

confirmar o potencial do CD36 como um biomarcador diferencial entre as podocitopatias, contribuindo então, para diagnósticos mais precisos e intervenções direcionadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A presença de proteinúria, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia em ambos os grupos reforça importância desses exames para o diagnóstico e seguimento das podocitopatias.
- Ambos grupos (GESF e DLM) apresentaram maior apagamento de pedicelos, correlacionados com a diminuição do processo de autofagia. Destacando a autofagia como mecanismo protetor dos podócitos.
- Expressão significativamente reduzida de CD36 na DLM, em contraste com elevada expressão de inflamassoma NLRP3 nos casos de GESF sugere perfis inflamatórios distintos.
- O CD36 pode se mostrar como potencial biomarcador para o diagnóstico diferencial entre GESF e DLM.
- Não observamos diferença na expressão de TNF e IL-10 entre os grupos.

8.0 CONCLUSÃO

Estes achados apontam para a participação do CD36 e do inflamassoma NLRP3 no desenvolvimento das podocitopatias pediátricas. A identificação destas vias pode abrir caminho para novas estratégias diagnósticas e terapêuticas.

8.0 REFERÊNCIAS:

- ALSHAMI, A. et al. Indications for kidney biopsy in idiopathic childhood nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology*, v. 32, n. 10, p. 1897-1905, 2017. DOI: 10.1007/s00467-017-3687-3. Epub 2017 May 24. PMID: 28540445.
- BEZAIRE, V. et al. Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, v. 290, p. E509-515, 2006. DOI: 10.1152/ajpendo.00312.2005.
- BÜSCHER, A. K.; WEBER, S. Educational paper: the podocytopathies. *European Journal of Pediatrics*, v. 171, n. 8, p. 1151-1160, jan. 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237399>
- CAMPBELL, R. E.; THURMAN, J. M. The Immune System and Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Clinical Journal American Society Nephrology*, v. 17, n. 12, p. 1823-1834, dez. 2022. DOI: 10.2215/CJN.07180622. Epub 2022 Oct 5. PMID: 36198505; PMCID: PMC9718018.
- CRAWFORD, B. D.; GIPSON, D. S. Improving the evidence for the management of childhood nephrotic syndrome. *Kidney International*, v. 92, n. 1, p. 21-23, 2017. DOI: 10.1016/j.kint.2017.02.029.
- DURAND, A. et al. Identification of Novel Genetic Risk Factors for Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children: Results From the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) Cohort. *American Journal Kidney Disease*, v. 81, n. 6, p. 635-646.e1, 2023. DOI: 10.1053/j.ajkd.2022.11.003. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36623684.
- EDDY, A. A.; SYMONS, J. M. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*, v. 362, n. 9384, p. 629-639, ago. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944064>.
- ENDEMANN, G. et al. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal Biological Chemistry*, v. 268, n. 16, p. 11811-11816, jun. 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685021>.
- FENG, D.; DuMONTIER, C.; POLLAK, M. R. Mechanical challenges and cytoskeletal impairments in focal segmental glomerulosclerosis. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 314, n. 5, p. F921-F925, 2018. DOI: 10.1152/ajprenal.00641.2017.
- FLOEGE, J.; AMANN, K. Primary glomerulonephritides. *Lancet*, v. 387, n. 10032, p. 2036-2048, maio 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26921911>.
- FOGO, A. B. Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Review Nephrology*, v. 11, n. 2, p. 76-87, fev. 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447132>.
- FOGO, A. B. et al. AJKD Atlas of Renal Pathology: Focal Segmental Glomerulosclerosis. *American Journal Kidney Disease*, v. 66, n. 2, p. e1-e2, 2015. DOI: 10.1053/j.ajkd.2015.04.007. PMID: 26210729.

FOUGERAY, S.; PALLET, N. Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys. *Nature Reviews Nephrology*, v. 11, p. 34–45, 2015. DOI: 10.1038/nrneph.2014.201.

GIPSON, D. S. et al. Complete remission in the Nephrotic Syndrome Study Network. *Clinical Journal American Society Nephrology*, v. 11, n. 1, p. 81-89, 2016. DOI: 10.2215/CJN.02560315. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26656320; PMCID: PMC4702222.

GOWD, V. et al. Resveratrol: evidence for its nephroprotective effect in diabetic nephropathy. *Advances in Nutrition*, v. 11, n. 6, p. 1555-1568, 16 nov. 2020. DOI: 10.1093/advances/nmaa075. PMID: 32577714; PMCID: PMC7666903.

GUNDERSEN, H. J. et al. Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. *Cell and Tissue Research*, v. 205, n. 1, p. 147-155, 1980.

HAAS, M. et al. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *American Journal Kidney Disease*, v. 30, n. 5, p. 621-631, nov. 1997.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. *Textbook of Medical Physiology*. 14. ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2021.

HAN, K. H.; KIM, S. H. Recent Advances in Treatments of Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children. *Biomedical Research International*, v. 2016, p. 3053706, 2016. DOI: 10.1155/2016/3053706. Epub 2016 abr. 18. PMID: 27195285; PMCID: PMC4852325.

HANDBERG, A. et al. Soluble CD36 (sCD36) clusters with markers of insulin resistance, and high sCD36 is associated with increased type 2 diabetes risk. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 95, p. 1939-1946, 2010. DOI: 10.1210/jc.2009-2002

HARTLEBEN, B. et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *Journal Clinical Investigation*, v. 120, n. 4, p. 1084-1096, abr. 2010. DOI: 10.1172/JCI39492. PMID: 20200449; PMCID: PMC2846040.

HENEDAK, N. T.; EL-ABHAR, H. S.; SOUBH, A. A.; ABDALLAH, D. M. NLRP3 inflammasome: A central player in renal pathologies and nephropathy. *Life Sciences*, v. 351, p. 122813, 2024. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122813.

HOU, Y. et al. CD36 promotes NLRP3 inflammasome activation via the mtROS pathway in renal tubular epithelial cells of diabetic kidneys. *Cell Death & Disease*, v. 12, n. 6, p. 523, 21 mai. 2021. DOI: 10.1038/s41419-021-03813-6.

HUA, W. et al. CD36 Mediated Fatty Acid-Induced Podocyte Apoptosis via Oxidative Stress. *PLoS One*, v. 10, n. 5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127507>.

HUBER, T. B.; BENZING, T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion Nephrology Hypertension*, v. 14, n. 3, p. 211-216, mai. 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821412>.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Advanced Chronic Kidney Disease*, v. 21, n. 5, p. 408-416, set. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25168829>.

JIANG, H. et al. Understanding the podocyte immune responses in proteinuric kidney diseases: from pathogenesis to therapy. *Frontiers Immunology*, v. 14, p. 1335936, 15 jan. 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1335936. PMID: 38288116; PMCID: PMC10822972.

KAWAKAMI, T. et al. Deficient autophagy results in mitochondrial dysfunction and FSGS. *Journal American Society Nephrology*, v. 26, n. 5, p. 1040-1052, mai. 2015. DOI: 10.1681/ASN.2013111202. Epub 2014 nov. 18. PMID: 25406339; PMCID: PMC4413752.

KENNEDY, D. J. et al. CD36 and Na/K-ATPase- α 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney. *Hypertension*, v. 61, p. 216-224, 2013. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198770.

KENNEDY, D. J. et al. CD36 and Na/K-ATPase- α 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney. *Hypertension*, v. 61, n. 1, p. 216-224, jan. 2013. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.198770. Epub 19 nov. 2012.

KERJASCHKI, D.; SHARKEY, D. J.; FARQUHAR, M. G. Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *Journal Cell Biology*, v. 98, n. 4, p. 1591-1596, abr. 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371025>.

KIDNEY DISEASE: Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guideline for Management of Glomerular Diseases. *Kidney International*, v. 100, n.4, p. s57s60, 2021.

KITIYAKARA, C.; EGGERS, P.; KOPP, J. B. Twenty-one-year trend in ESRD due to focal segmental glomerulosclerosis in the United States. *American Journal Kidney Disease*, v. 44, n. 5, p. 815-825, nov. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15492947>.

KOCYLOWSKI, M. K.; AYPEK, H.; BILDL, W.; et al. A slit-diaphragm-associated protein network for dynamic control of renal filtration. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 6446, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-33748-1. Publicado em 28 out. 2022.

KODNER, C. Diagnosis and management of nephrotic syndrome in adults. *American Family Physician*, v. 93, n. 6, p. 479-485, mar. 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977832>.

KOPP, J. B. et al. Podocytopathies. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 6, n. 1, p. 68, 2020. DOI: 10.1038/s41572-020-0196-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0196-7>.

KRONBICHLER, A. et al. Immunologic changes implicated in the pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Biomedical Research International*, v. 2016, p. 2150451, 2016. DOI: 10.1155/2016/2150451. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26989679; PMCID: PMC4773535.

LENOIR, O.; THARAUX, P.-L.; HUBER, T. B. Autophagy in kidney disease and aging: lessons from rodent models. *Kidney International*, v. 90, p. 950, 2016. DOI: 10.1016/j.kint.2016.04.014.

LIANG, S. et al. How many podocyte autophagosomes are there in immunoglobulin A nephropathy and idiopathic membranous nephropathy? *International Urology and Nephrology*, v. 48, n. 12, p. 2109-2114, 2016. DOI: 10.1007/s11255-016-1398-5.

LV, F. et al. CD36 aggravates podocyte injury by activating NLRP3 inflammasome and inhibiting autophagy in lupus nephritis. *Cell Death & Disease*, v. 13, n. 8, p. 729, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05179-9>.

MAO, X. et al. TGF- β 1 inhibits the autophagy of podocytes by activating mTORC1 in IgA nephropathy. *Experimental Cell Research*, v. 385, n. 1, p. 111670, 2019. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.111670. Epub 2019 Oct 7. PMID: 31600491.

MARIANI, L. H.; EDDY, S.; ALAKWAA, F. M.; et al. Precision nephrology identified tumor necrosis factor activation variability in minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, v. 103, n. 3, p. 565-579, 2023. DOI: 10.1016/j.kint.2022.10.023.

MCGROGAN, A.; FRANSSEN, C. F.; DE VRIES, C. S. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplant*, v. 26, n. 2, p. 414-430, fev. 2011. Epub nov. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068142>.

MESCHER, A. L. *Junqueira's Basic Histology*. 13. ed. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2013.

MIQUILENA-COLINA, M. E. et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, v. 60, p. 1394-1402, 2011. DOI: 10.1136/gut.2010.222844.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. *Genes Development*, v. 21, n. 22, p. 2861-2873, 15 nov. 2007. DOI: 10.1101/gad.1599207. PMID: 18006683.

MOURA, L. R.; FRANCO, M. F.; KIRSZTAJN, G. M. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adults: response to steroids and risk of renal failure. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 37, n. 4, p. 475-480, out.-dez. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26648497>.

NACHMAN, P. H.; JENNETTE, J. C.; FALK, R. J. Primary glomerular diseases. In: SKORECKI, K. et al. *Brenner & Rector's the Kidney*. 1. ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. v. 1, p. 1012-1090.

NICHOLSON, A. C.; FEBBRAIO, M.; HAN, J.; SILVERSTEIN, R. L.; HAJJAR, D. P. CD36 in atherosclerosis: The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 902, p. 128-131; discussion 131-123, 2000.

NISHAD, R. et al. Podocyte derived TNF- α mediates monocyte differentiation and contributes to glomerular injury. *FASEB Journal*, v. 36, n. 12, p. e22622, dez. 2022. DOI: 10.1096/fj.202200923R.

NIU, H. et al. CD36 deletion ameliorates diabetic kidney disease by restoring fatty acid oxidation and improving mitochondrial function. *Renal Failure*, v. 45, n. 2, p. 2292753, 2023. DOI: 10.1080/0886022X.2023.2292753. Epub 14 dez. 2023.

NIYONZIMA, N. et al. Complement activation by cholesterol crystals triggers a subsequent cytokine response. *Molecular Immunology*, v. 84, p. 43-50, 2017. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.019.

OGAWA-AKIYAMA, A. et al. Podocyte autophagy is associated with foot process effacement and proteinuria in patients with minimal change nephrotic syndrome. *PLoS One*, v. 15, n. 1, e0228337, jan. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0228337. PMID: 31978139; PMCID: PMC6980606.

PAVENSTÄDT, H.; KRIZ, W.; KRETZLER, M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiology Reviews*, v. 83, n. 1, p. 253-307, jan. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506131>.

PEDIGO, C. E. et al. Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury. *Journal Clinical Investigation*, v. 126, n. 9, p. 3336-3350, 2016. DOI: 10.1172/JCI85939. Epub 2016 Aug 2. PMID: 27482889; PMCID: PMC5004940.

POLLAK, M. R.; QUAGGIN, S. E.; HOENIG, M. P.; DWORKIN, L. D. The glomerulus: the sphere of influence. *Clinical Journal American Society Nephrology*, v. 9, n. 8, p. 1461-1469, ago. 2014.

PONTICELLI, C.; MORONI, G.; REGGIANI, F. Autophagy and podocytopathy. *Nephrology Dialysis Transplant*, v. 38, n. 9, p. 1931-1939, 31 ago. 2023. DOI: 10.1093/ndt/gfad024. PMID: 36708169.

PUROHIT, S. et al. Molecular mechanisms of proteinuria in minimal change disease. *Frontiers Medecine*, v. 8, p. 761600, 2021. DOI: 10.3389/fmed.2021.761600. Epub 2021 Dec 23. PMID: 35004732; PMCID: PMC8733331.

ROSA, A. C. et al. Angiotensin II induces tumor necrosis factor- α expression and release from cultured human podocytes. *Inflammation Research*, v. 61, n. 4, p. 311-317, abr. 2012. DOI: 10.1007/s00011-011-0412-8.

SAMSTAD, E. O. et al. Cholesterol crystals induce complement-dependent inflammasome activation and cytokine release. *Journal of Immunology*, v. 192, n. 6, p. 2837-2845, 15 mar. 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1302484. Epub 19 fev. 2014.

SCOTT, R. P.; QUAGGIN, S. E. Review series: The cell biology of renal filtration. *Journal of Cell Biology*, v. 209, n. 2, p. 199-210, abr. 2015.

SHAHZAD, K. et al. Podocyte-specific Nlrp3 inflammasome activation promotes diabetic kidney disease. *Kidney International*, v. 102, n. 4, p. 766-779, 2022. DOI: 10.1016/j.kint.2022.06.010. Epub 2022 Jun 30. PMID: 35779608.

SILVA, C. A. et al. In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmentar glomerulosclerosis and minimal change disease. *PLoS One*, v. 15, n. 11, p. 1-14, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33147279>.

SILVA, JRM; SILVA, ACS; REIS, MA. *Atualizações em nefropatologia*. 1. ed. João Pessoa: Creative, 2022.

SILVERSTEIN, R. L.; FEBBRAIO, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Science. Signal.*, v. 2, n. 72, re 3, mai. 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19471024>.

SONG, D. et al. Lipopolysaccharide promotes NLRP3 inflammasome activation by inhibiting TFEB-mediated autophagy in NRK-52E cells. *Molecular Immunology*, v. 163, p. 127-135, nov. 2023. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.09.008.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Review Immunology*, v. 19, n. 8, p. 477-489, ago. 2019. DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0. PMID: 31036962; PMCID: PMC7807242.

TAGAWA, A. et al. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. *Diabetes*, v. 65, n. 3, p. 755-767, mar. 2016. DOI: 10.2337/db15-0473. Epub 2015 set. 17. PMID: 26384385.

TAKABATAKE, Y. et al. Autophagy and the kidney: health and disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 29, p. 1639-1647, 2014. DOI: 10.1093/ndt/gft535.

TRYGGVASON, K.; WARTIOVAARA, J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Current Opinion Nephrology Hypertension*, v. 10, n. 4, p. 543-549, jul. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458036>.

VAN ROEYEN, C. R. et al. Induction of progressive glomerulonephritis by podocyte-specific overexpression of platelet-derived growth factor-D. *Kidney International*, v. 80, n. 12, p. 1292-1305, dez. 2011.

VIVARELLI, M. et al. Focal segmental glomerulosclerosis in children: results of a multicenter study. *Kidney International*, v. 82, n. 3, p. 341-348, set. 2012. DOI: 10.1038/ki.2012.170. Epub 2012 jun. 20. PMID: 22797269.

VIVARELLI, M.; MASSELLA, L.; RUGGIERO, B.; EMMA, F. Minimal change disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 12, n. 2, p. 332-345, 2017. DOI: 10.2215/CJN.05000516.

VIVARELLI, M.; GIBSON, K.; SINHA, A.; BOYER, O. Childhood nephrotic syndrome. *Lancet*, v. 402, n. 10404, p. 809-824, 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)01051-6. PMID: 37659779.

VIZIRI, N. D. Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: mechanisms and consequences. *Kidney International*, v. 90, p. 41–52, 2016.

WANG, W. et al. Inflammasome-independent NLRP3 augments TGF- β signaling in kidney epithelium. *Journal of Immunology*, v. 190, n. 3, p. 1239-1249, 2013. DOI: 10.4049/jimmunol.1201959. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23264657.

WEI, W. et al. The role of IL-10 in kidney disease. *International Immunopharmacology*, v. 108, p. 108917, 2022. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108917. Epub 2022 Jun 3. PMID: 35729842.

WRIGHT, R. D.; BERESFORD, M. W. Podocytes contribute, and respond, to the inflammatory environment in lupus nephritis. *American Journal of Renal Physiology*, v. 315, n. 6, p. F1683-F1694, 2018. DOI: 10.1152/ajprenal.00512.2017. Epub 2018 Sep 12. PMID: 30207171; PMCID: PMC6336988.

XU, J.; NÚÑEZ, G. The NLRP3 inflammasome: activation and regulation. *Trends Biochemical Sciences*, v. 48, n. 4, p. 331-344, abr. 2023. DOI: 10.1016/j.tibs.2022.10.002. Epub 2022 nov. 4. PMID: 36336552; PMCID: PMC10023278.

YANG, D. et al. Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential. *Cellular and molecular life sciences*, v. 75, n. 4, p. 669-688, fev. 2018. DOI: 10.1007/s00018-017-2639-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2639-1>

YANG, X. et al. CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nature Review Nephrology*, v. 13, n. 12, p. 769-781, dez. 2017. DOI: 10.1038/nrneph.2017.126. Epub 2017 set. 18. PMID: 28919632.

YANG, X.; WU, Y.; LI, Q.; et al. CD36 promotes podocyte apoptosis by activating the Pyrin Domain-Containing-3 (NLRP3) inflammasome in primary nephrotic syndrome. *Medical Science Monitor*, v. 24, p. 6832-6839, 27 set. 2018. DOI: 10.12659/MSM.909810.

YANG, Z.; MING, X. CD36: the common soil for inflammation in obesity and atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, v. 89, n. 3, p. 485–486, fev. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21177336>.

YOKOI, H.; YANAGITA, M. Targeting the fatty acid transport protein CD36, a class B scavenger receptor, in the treatment of renal disease. *Kidney International*, v. 89, n. 4, p. 740-742, abr. 2016. DOI: 10.1016/j.kint.2016.01.009. PMID: 26994570.

YOSHIBAYASHI, M. et al. Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 525, n. 2, p. 319-325, 30 abr. 2020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.02.088. Epub 20 fev. 2020.

ZENG, C. et al. Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies. *Journal of Pathology*, v. 234, n. 2, p. 203-213, out. 2014. DOI: 10.1002/path.4382. Epub 4 ago. 2014.

ZHAO, J. et al. CD36-Mediated Lipid Accumulation and Activation of NLRP3 Inflammasome Lead to Podocyte Injury in Obesity-Related Glomerulopathy. *Mediators of Inflammation*, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/3172647>.

ORIGINAL RESEARCH

Bárbara Rocha Rodrigues¹, Ludmila Fonseca Ruy², Maria Eduarda Gomes da Costa², Liliane Silvano Araújo³, Crislaine Aparecida da Silva³, Marlene Antônia dos Reis³, Virmondes Rodrigues Júnior⁴, Juliana Reis Machado e Silva^{3*}

¹ Post-graduation in Health Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

² Medical Student, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

³ Kidney Research Center-Department of Pathology, Genetics and Evolution, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Discipline of Immunology - Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author:

Juliana Reis Machado e Silva, PhD

Kidney Research Center - Department of Pathology, Genetics and Evolution
Federal University of Triângulo Mineiro Uberaba – Minas Gerais, Brazil.

E-mail address: juliana.patologiageral@gmail.com

Telephone: 55 (34) 3700-6450

Introduction

Podocytes are specialized epithelial cells that surround glomerular capillaries, playing an essential role in forming the glomerular ultrafiltrate. Their functions are highly dependent on their intricate architecture and negative electric charge [1, 2]. Structurally, podocytes consist of three main components: a large cell body, major processes, and the foot processes. The foot processes interdigitate with those of adjacent podocytes, forming diaphragmatic slit, which are responsible for filtration and inter-podocyte signaling [3, 4, 5]. Podocyte injury leads to ultrastructural alterations, including cytoskeletal rearrangement, effacement of foot processes and detachment from the glomerular basal membrane. Such damage compromises the filtration barrier, resulting in proteinuria [6].

Podocytopathies represent a group of glomerular diseases characterized by primary lesions in podocytes, leading to proteinuria or nephrotic syndrome [7, 8]. The main types of podocytopathies in children are focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) lesions and minimal changes (also referred to as minimal change disease - MCD) [9]. Despite the similarity in clinical presentation and common histological lesions, these diseases may have different courses and responses to treatments, particularly steroids [7,10].

Nephrotic syndrome in children is defined by proteinuria ($\geq 1.000 \text{ mg/m}^2/\text{dia}$ or more than 3+ on a urine dipstick or urine protein–creatinine ratio $\geq 2,0 \text{ mg/mg}$ or $\geq 200 \text{ mg/mmol}$), hypoalbuminemia, edema, and hyperlipidemia [11]. NS is the most common glomerular disease in children, with an estimated incidence of 1.15–16.9 per 100,000 children [12]. Given the favorable prognosis based on corticosteroids treatment, kidney biopsies are often reserved for cases of treatment resistance or atypical presentations [11].

Focal segmental glomerulosclerosis is characterized by segmental sclerotic of glomeruli, associated with electron microscopy findings of effacement of foot processes. The pathophysiology and progression of FSGS have been extensively studied, and it is believed that genetic variants and circulating components contribute to podocyte damage, which may progress to local sclerosis [13].

Minimal change disease predominantly affects children, and its abnormalities can only be visualized through ultrastructural analysis using EM, which shows extensive effacement of foot process [7]. Based on prevalence, it is assumed that children with steroid-sensitive forms of NS, if biopsied, would most frequently be found to have MCD [11,13]. Like FSGS, the pathophysiology of

MCD is not yet fully understood. It is believed to involve dysregulation of the immune system, with cytokines production that may damage the glomerular filtration barrier [7,14]. The effectiveness of glucocorticoids and other immunosuppressive drugs in podocytopathies suggests a central role of the immune system in the pathogenesis of these disorders [15].

Podocytes exhibit high levels of autophagic activity, and it is evident that a loss of this autophagic capacity increases susceptibility to glomerular diseases [16, 17]. CD36 is a member of the scavenger receptor class B (SR-B), a family of highly glycosylated transmembrane receptors with various ligand recognition sites. In renal tissue, CD36 is expressed in podocytes, tubular epithelial cells, and mesangial cells. It is associated with podocyte injury in many kidney diseases, including NS. CD36 has been reported to activate the NLRP3 inflammasome, which contributes to podocyte injury in NS [18, 19]. In animal models of NS, an increase in CD36 expression has been observed, which may be associated with podocyte apoptosis and activation of the NLRP3 inflammasome, leading to the secretion of interleukin-1 beta (IL-1 β). Additionally, elevated urinary excretion of TNF- α has been noted in conditions associated with NS [36]. TNF- α may be linked to inflammasome activation and negatively regulates the autophagy [20]. Similarly, TGF- β has been associated with inflammasome activation in models of chronic kidney disease [21]. IL-10, on the other hand, may inhibit inflammasome activation and is associated with an increase in autophagy capacity [22].

This study analyzes renal biopsies from children with podocytopathy to evaluate podocyte injury, including foot process effacement and autophagy activity. It also assesses the expression of inflammatory markers and cytokines implicated in podocyte damage. The findings aim to clarify the underlying mechanisms of podocytopathies and their potential therapeutic targets.

Methods

This is an observational, retrospective, and descriptive study focusing on human subjects. It utilizes both qualitative and quantitative variables for data analysis. Ethical approval was granted by the Ethics Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro under protocol number 5.609.537, ensuring compliance with ethical standards.

A total of 37 renal biopsies from pediatric patients aged between 3 and 18 years were analyzed. These biopsies were performed at the Kidney Research Center of the Federal University of Triângulo Mineiro and diagnosed with podocytopathies, specifically FSGS and

MCD. The FSGS group (n = 16) was characterized by segmental sclerotic lesions and foot process effacement observed via EM. The MCD group (n = 21) was defined by foot process effacement as the sole alteration seen in EM. Cases showing other morphological changes suggestive of different kidney diseases were excluded to ensure specificity in the analysis.

The control group for immunohistochemical analysis comprised 12 kidney necropsy fragments from pediatric patients whose cause of death was unrelated to kidney or infectious diseases. These samples were obtained from the University of São Paulo Pediatric Pathology Service/Ribeirão Preto (USP/RP). For the analysis of autophagy and foot process effacement via electron microscopy (EM), the control group consisted of renal biopsies from patients with non-glomerular proteinuria and isolated hematuria (n = 12).

Immunohistochemistry

Tissue slides were prepared from 2 μm thick sections and underwent pre-treatment with Trilogy (Cell Marque) solution in a “Paschal” pan (DAKO) at 121°C for deparaffinization, rehydration, and antigen retrieval. The antibodies anti-NLRP3 (1/500, Invitrogen) and anti-IL10 (1/800, Invitrogen) were detected using the Easylink Duo (Easypath) kit. For anti-TNF- α (1/700, Invitrogen) and anti-CD36 (1/200, Invitrogen) antibodies, the Novolink Polymer Detection System kit (Leica Biosystems) was employed, following the manufacturers' instructions. All antibodies were incubated overnight at 4°C. The slides were then washed with PBS, incubated with the chromogen (Liquid DAB, Dako), washed with running water, and counterstained with Harris hematoxylin for 2 minutes.

In situ analysis of the expression of immunostained molecules was performed using standard light microscopy. Digital images of the glomeruli were captured with a camera attached to the microscope at 40x magnification. Cells within the glomerulus were considered positive if they exhibited a brownish coloration. For TNF- α and IL-10, the brownish-stained areas were quantified using the Axio semi-automatic image analysis system (ZEISS). Results were expressed as a percentage of the marked area relative to the total fields evaluated. For NLRP3 and CD36, the number of positive glomerular cells was counted, and the area of the glomerulus was measured using ImageJ software. Results were expressed as cell density in the marked area (cells/mm²).

Electronic Microscopy

The tissue fragments were fixed in 0.1% Ruthenium Red Karnovsky solution and subsequently post-fixed in a solution containing 1% osmium tetroxide and 0.1% ruthenium red. These fragments were then processed for resin embedding. Semi-thin sections, ranging from 400 to 250 nm in thickness, were cut and stained with toluidine blue for preliminary analysis under a light microscope.

Following this, ultra-thin sections of 60 to 80 nm thickness were prepared and examined using a ZEISS EM-900 transmission electron microscope. Images of the glomerular capillaries and podocytes were captured at a magnification of 7,000x and analyzed using ImageJ software. For the analysis of foot process effacement, the Foot Process Width (FPW) was calculated using the formula: $FPW = (4/\pi) \times (\sum \text{GBM length in each image} / \sum \text{number of foot process})$ [23].

This formula quantifies the extent of foot process effacement by determining the average width of the foot processes. The factor $(\pi/4)$ is applied as a correction to account for the random variation in the angle at which the pedicels are sectioned relative to their axial axis. This correction factor helps adjust the measurements to more accurately reflect the true width of the foot processes, considering that the sectioning orientation may not always align perfectly with the pedicels' axis [24]. For autophagy analysis, the number of autophagosomes present in podocytes and/or pedicels was counted in each image, ensuring no fields were repeated. Results were expressed as the average number of autophagosomes per case. Autophagosomes were identified and counted based on the presence of vesicles containing undigested cytoplasmic material, indicative of ongoing autophagic processes.

Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism version 5.0. Categorical variables are expressed as percentages. Group comparisons were performed using Fisher's exact test or the Chi-square test, as appropriate for the data. For numerical variables, means with standard deviations were reported for normally distributed data, while medians with ranges [min-max] were used for non-normally distributed data. Normality was evaluated with the Shapiro-Wilk test.

For comparisons among three groups with normally distributed data and equal variances, one-way ANOVA (F-test) was employed, followed by Tukey's post hoc test. For data not meeting

normality assumptions, the Kruskal-Wallis test (H-test) was used, with Dunn's post hoc test for pairwise comparisons. Spearman's rank correlation coefficient (ρ) was utilized to assess correlations between non-normally distributed variables.

Results

Demographic, clinical and laboratory data

This study evaluated renal biopsies from 37 children with podocytopathies and 12 control individuals, all of whom were examined at the Kidney Research Center (Ceprim) of the Federal University of Triângulo Mineiro between 1996 and 2022. Among the children with podocytopathies, 16 were diagnosed with FSGS and 21 with MCD. The FSGS cohort consisted of 9 males and 7 females, while the MCD cohort included 15 males and 6 females. The mean age at biopsy was 9.5 ± 5.75 years for the FSGS group and 8.24 ± 4.35 years for the MCD group.

There was no statistical difference between the groups regarding clinical and laboratory parameters. However, in the FSGS group, a statistical trend was observed, indicating higher proteinuria levels than the MCD group. Comprehensive demographic, clinical and laboratory details are presented in Table 1.

Table 1: Demographic and Clinical Data:

	Podocytopathies	FSGS	MCD	p value
Age				
<i>Mean $\pm$ SD</i>	8,78 $\pm$ 4,97	9,5 $\pm$ 5,75	8,24 $\pm$ 4,35	0.5681
<i>Median (Min-Max)</i>	8 (3-18)	35 (25-54)	7 (3-16)	
Gender (%)				
<i>Male</i>	23 (62,16)	9 (56,25)	15 (71,43)	0.4891
<i>Female</i>	14 (37,84)	7 (43,75)	6 (28,57)	

Urea (mg\dl)

<i>Mean ± SD</i>	35,15±24,45	38,06±28,49	32,43±20,65	0.9478
<i>Median (Min-Max)</i>	29 (11-104)	25,50 (11-104)	29 (16,30-103)	
<i>NI (n)</i>	8	2	6	

Creatinine (mg\dl)

<i>Mean ± SD</i>	0,66±0,65	0,78±0,80	0,56±,052	0.371
<i>Median (Min-Max)</i>	0,46 (0,1-3,2)	0,59 (0,16-3,20)	0,44 (0,10-2,30)	
<i>NI (n)</i>	6	2	4	

Proteinuria
(g/24h)

<i>Mean ± SD</i>	2.946,72±3.061,858	3.711,59±2.974,65	2.309,34±3.068,14	0.085
<i>Median (Min-Max)</i>	1.699 (36-10.800)	3.400 (156,40-9.330)	1214,03 (36-10.800)	
<i>NI (n)</i>	3	1	2	

Albumin(mg/dl)

<i>Mean ± SD</i>	2,66±1,04	2,70±1,03	2,64±1,09	0.877
<i>Median (Min-Max)</i>	2,42 (1,25-4,8)	2,41 (1,37-4,30)	2,42 (1,25-4,80)	
<i>NI (n)</i>	9	4	5	

Cholesterol
(mg/dl)

<i>Mean ± SD</i>	355,30±159,57	380,39±150,80	33,35±168,57	0.308
------------------	---------------	---------------	--------------	-------

<i>Median (Min-Max)</i>	334,5 (154-693)	375,50 (171-678)	263,50 (154-693)	
<i>NI (n)</i>	7	2	5	
SAH [n (%)]				
<i>Yes</i>	16 (43,24)	9 (56,25)	7 (33,34)	0.2852
<i>No</i>	16 (43,24)	5 (31,25)	11 (52,38)	
<i>NI</i>	5 (13,51)	2 (12,50)	2 (9,52)	

Autophagy and Foot Process Effacement in Podocytes

Autophagy was assessed using electron microscopy images from renal biopsies, which included samples from 12 adult controls, 13 children with FSGS, and 17 patients with MCD. The density of autophagosomes per square millimeter (autophagosomes/mm²) was used to quantify autophagy. In the control group, the density ranged from 89 to 473 autophagosomes/mm², with a median of 377.5 autophagosomes/mm². In the FSGS group, the density ranged from 101 to 414 autophagosomes/mm², with a median of 173 autophagosomes/mm². The MCD group showed a range from 121 to 501 autophagosomes/mm², with a median of 214 autophagosomes/mm². Statistical analysis indicated a significant reduction in autophagosomes in the FSGS and MCD groups compared to the control (Figure 1A, $p=0,0502$ and $p=0.0354$, respectively). No significant difference was observed between the FSGS and MCD groups group ($p=0.4026$).

Foot process effacement was quantified as Foot Process Width (FPW), with results presented in Figure 1B. The control group exhibited PFW values ranging from 409.7 to 513.3 nm, with a median of 445.6 nm. The FSGS group showed values from 623.9 to 1,806 nm, with a median of 1,095 nm, while the MCD group had values ranging from 492.5 to 1,698 nm, with a median of 755.3 nm. The analysis revealed significantly increased foot process effacement in both the FSGS and MCD groups compared to the control group ($p<0.0001$ and $p<0.0001$, respectively) with the FSGS group exhibiting greater effacement than the MCD group (Figure 1D, $p=0.0289$).

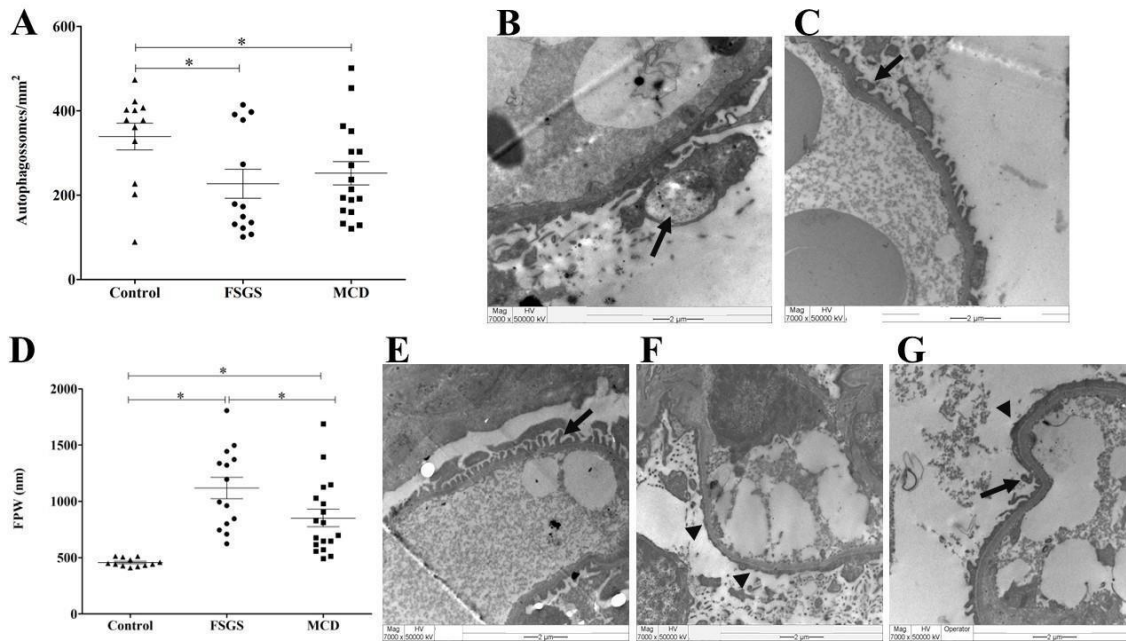


Figure 1: Autophagy and Foot Process Effacement in Patients with Podocytopathies. Autophagy data are expressed as the number of autophagosomes per mm², and podocyte effacement is evaluated by measuring its width. Mann-Whitney test. Each point represents a patient, the horizontal line represents the median, and the vertical line represents the 95% confidence interval. (A) Significantly lower levels of autophagy in patients with podocytopathies compared to the control group. (B) Digital image showing an autophagosome in a podocyte (arrow). (C) Digital image showing an autophagosome in a foot process (arrow). (D) Foot process effacement was greater in the FSGS and MCD groups compared to the control group, and among the diseases, it was greater in the FSGS group. (E) Digital image showing a glomerular loop of a control case with preserved foot processes (arrow). (F) Digital image showing a glomerular loop of an FSGS case with extensive foot process effacement (arrowhead). (G) Digital image showing a glomerular loop of an MCD case with foot process effacement (arrowhead) and some preserved foot processes (arrow).

To investigate the relationship between autophagosome density and foot process effacement in podocytopathies, we assessed these variables within each patient group. As shown in Figure 2, both FSGS and MCD groups exhibited a significant negative correlation between autophagosome density and pedicel effacement. Specifically, in the FSGS group, this correlation was significant with a Spearman's rank correlation coefficient (ρ) of -0.5879 and a p-value of 0.0346. Similarly,

the MCD group demonstrated a significant negative correlation with a Pearson's rank correlation coefficient (ρ) of -0.5351 and a p-value of 0.0269.

These findings underscore that both the FSGS and MCD groups exhibit significantly reduced autophagy compared to controls and display increased foot process effacement. The significant negative correlations between autophagosome density and pedicel effacement in these glomerulopathy groups suggest that impaired autophagy may contribute to podocyte injury and disease progression.

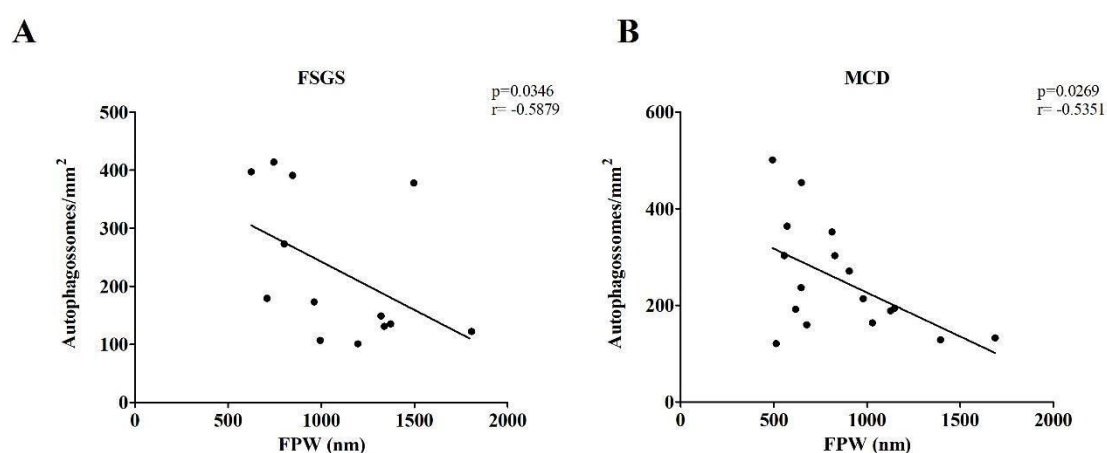


Figure 2: Correlation Between the Number of Autophagosomes and Foot Process Effacement in Renal Biopsies of Patients with FSGS and MCD. (A) There was a significant negative correlation between the number of autophagosomes and podocyte effacement in the FSGS group ($p = 0.0346$; $r = -0.5879$, Spearman correlation), and (B) in the MCD group ($p = 0.0269$; $r = -0.5351$, Pearson correlation).

Glomerular expression of TNF- α , IL-10, CD36, and NLRP3

CD36 glomerular expression was measured as cell density. In the control group, it ranged from 1.05 cells/mm² to 37.03 cells/mm², with a median of 9.62 cells/mm². The FSGS group showed a range of 0.60 cells/mm² to 24.3 cells/mm², with a median of 13.59 cells/mm². In the MCD group, expression ranged from 0.15 cells/mm² to 55.63 cells/mm², with a median of 4.51 cells/mm². A lower glomerular expression of CD36 was observed in MCD cases compared to control cases ($p = 0.0125$) and FSGS cases ($p = 0.0103$) (Figure 3).

NLRP3 expression was also quantified as cell density. In the control group, it ranged from 0.32 cells/mm² to 11.13 cells/mm², with a median of 7.58 cells/mm². The FSGS group showed values from 1.67 cells/mm² to 53.4 cells/mm², with a median of 15.33 cells/mm². In the MCD group, it ranged from 0.26 cells/mm² to 31.44 cells/mm², with a median of 9.0 cells/mm². Higher glomerular expression of NLRP3 was observed in FSGS cases compared to the control group ($p = 0.0205$); however, no difference was observed between the diseases (Figure 3).

No differences were found between the groups regarding the expression of the cytokines IL-10 and TNF- α .

These results highlight differential expression patterns of key inflammatory markers in FSGS and MCD, suggesting potential pathways involved in the pathogenesis of these glomerulopathies. Detailed results are illustrated in Figure 4 and Board 2.

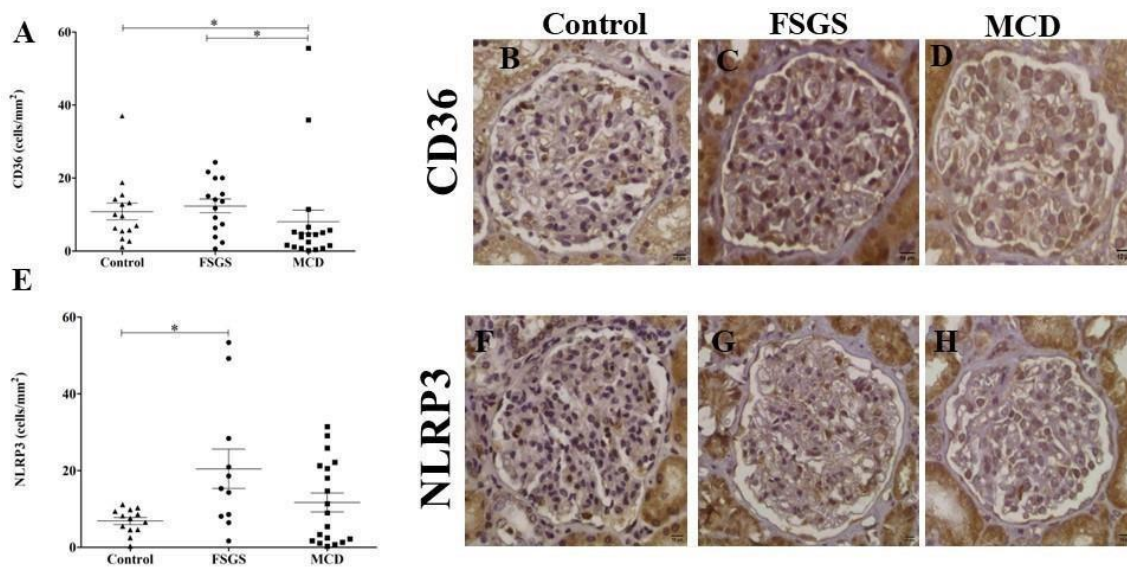


Figure 3: Evaluation of CD36, NLRP3, IL-10, and TNF- α Expression in Renal Biopsies of Children with FSGS, MCD, and the Control Group. Mann-Whitney test. Each point represents a patient, the horizontal line represents the median, and the vertical line represents the 95% confidence interval. (A) CD36 expression in the MCD group was significantly lower than in the control group and the FSGS group. Glomerular immunostaining of CD36 in the control group (B), in the FSGS group (C), and in the MCD group (D). (E) NLRP3 expression was significantly

higher in the FSGS group compared to the control group. Glomerular immunostaining of NLRP3 in the control group (F), in the FSGS group (G), and in the MCD group (H).

Correlation Between Autophagy, Foot Processes Effacement, and Expression of TNF- α , IL-10, CD36, and NLRP3

In the FSGS group, no significant correlations were observed between autophagy or foot process effacement and the expression levels of TNF- α , IL-10, CD36, or NLRP3. Specifically, autophagy did not correlate significantly with any of the four markers (TNF- α , IL-10, CD36, NLRP3).

Conversely, in the MCD group, a significant positive correlation was found between the glomerular expression of NLRP3 and CD36 showed a positive and significant correlation ($p = 0.0385$, $r = 0.4778$, Figure 4A), suggesting a possible role of NLRP3 activation by CD36. Additionally, in this group, a positive and significant correlation was also found between the glomerular expression of NLRP3 and the number of autophagosomes ($p = 0.0193$, $r = 0.5604$, Figure 4B), highlighting the role of autophagy in protecting against NLRP3 inflammasome-mediated injury.

These findings suggest that while autophagy and effacement of the foot process are associated with inflammatory markers in MCD, no such correlations were observed in FSGS, indicating potential differences in the underlying pathophysiological mechanisms between the two glomerulopathies.

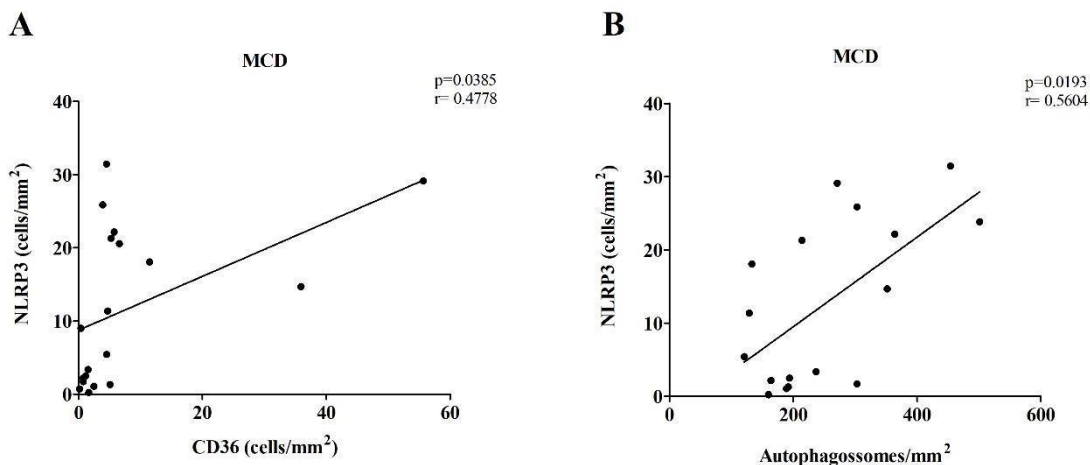


Figure 4: Correlation Between Morphological Parameters Related to Autophagy in the MCD

Group. (A) Positive and significant correlation between glomerular expression of NLRP3 and CD36. (B) Positive and significant correlation between glomerular expression of NLRP3 and the number of autophagosomes. Spearman correlation.

Discussion

FSGS and MCD are the most prevalent podocytopathies in childhood, characterized by podocyte injuries that result in proteinuria and varying degrees of renal impairment. Initial management with corticosteroids generally shows a good clinical response, and kidney biopsy is primarily indicated in refractory cases or those with atypical clinical progression [11]. In this study, we analyzed data from patients, most of whom had previously received treatment with corticosteroids or other immunosuppressive agents. Despite these interventions, laboratory and histopathological findings were consistent with a diagnosis of FSGS or MCD. These results highlight the importance of clinical monitoring, even though laboratory tests lack specificity for distinguishing between FSGS and MCD.

To deepen the understanding of the mechanisms underlying pediatric podocytopathies, we evaluated the autophagy capacity of podocytes in patients with FSGS and MCD. Autophagy is an essential mechanism for cytoplasmic structure renewal and cellular homeostasis maintenance [26]. In this study, results demonstrated a significant reduction in autophagy levels in the podocytes of children with FSGS and MCD compared to the control group. These findings align with the literature, which indicates that autophagy plays a protective role in delaying the progression of kidney disease [28, 30, 31]. Its reduction may thus directly contribute to the pathogenesis and progression of podocytopathies.

Foot process effacement is considered a key marker of podocyte stress, reflecting the impairment of cellular homeostasis mechanisms. We observed significant effacement of podocyte processes in both pediatric podocytopathy groups, with greater evidence in the FSGS group compared to the MCD group. These results corroborate the literature, which associates FSGS with more severe structural alterations and an increased risk of disease progression [28]. Additionally, we identified an inverse correlation between autophagy levels and foot process effacement in both groups, suggesting that reduced autophagic activity is directly associated with increased podocyte

injury and effacement. This finding underscores the protective role of autophagy and supports studies investigating therapeutic strategies aimed at enhancing autophagic activity to protect podocytes and mitigate the progression of podocytopathies [32].

CD36 is a multifunctional receptor expressed in podocytes, where it plays a crucial role as a receptor for lipoproteins, facilitating intracellular transport of long-chain fatty acids. Alterations in lipid and lipoprotein metabolism are described in NS [33]. Elevated cholesterol levels in patients with FSGS and MCD, as observed in our study, suggest a possible interaction with scavenger receptors such as CD36. This interaction can activate intracellular signaling pathways, leading to the release of inflammatory cytokines and contributing to podocyte injury. Previous studies corroborate this hypothesis, linking hypercholesterolemia to increased CD36 ligands, which promote oxidative stress and aggravate chronic kidney injury [34]. Other studies have highlighted that cholesterol crystals can activate the complement system, promoting NLRP3 inflammasome activation and subsequent inflammatory cytokine release [35]. Thus, our results suggest that elevated cholesterol levels may have a damaging role in podocytes, and understanding these signaling pathways may open avenues for new therapeutic approaches in pediatric podocytopathies.

In renal diseases, CD36 plays a fundamental role in inflammatory pathways, particularly by activating mechanisms such as NF- κ B and the NLRP3 inflammasome. Together with caspase-1, these pathways promote the maturation of IL-1 β and IL-18, key pro-inflammatory cytokines with significant local and systemic effects [19]. Our results demonstrated significantly reduced CD36 expression in patients in the MCD group compared to the control and FSGS groups. Supporting these findings, we observed a significant increase in NLRP3 inflammasome expression in the FSGS group compared to the control group. The differential expression of CD36 and the NLRP3 inflammasome among the evaluated groups suggests distinct inflammatory mechanisms. In FSGS cases, higher NLRP3 inflammasome expression may trigger more intense inflammatory responses, consistent with previous studies indicating that increased NLRP3 inflammasome expression in FSGS patients is associated with intense inflammation and fibrosis development [18, 37]. In contrast, the downregulated CD36 expression observed in the MCD group suggests that this condition is associated with milder inflammatory responses, as CD36-mediated inflammatory signals would be diminished.

The distinction between the inflammatory mechanisms of FSGS and MCD is crucial for developing specific therapeutic strategies. Modulation of the CD36 pathway and the NLRP3 inflammasome may be particularly relevant for FSGS patients, while alternative approaches may be more suitable for addressing the specific inflammatory features observed in MCD. Additionally, the reduced CD36 expression in MCD patients suggests the potential of this molecule as a diagnostic biomarker, especially in cases of non-sampled FSGS, where the biopsy fragment may not contain affected glomeruli. Further research is needed to better understand the underlying mechanisms of distinct inflammatory responses between these podocytopathies and to explore the broader applicability of these molecules as diagnostic markers.

In this study, we also analyzed the presence of TNF and IL-10. TNF is a cytokine widely involved in inflammatory processes, while IL-10 acts as an anti-inflammatory cytokine, primarily inhibiting TNF production. A recent multicenter study gathered samples from adults and adolescents diagnosed with FSGS and MCD, showing activation of TNF signaling pathways, especially in more severe cases [39]. However, our results did not reveal significant differences in TNF or IL-10 expression.

This study has limitations related to the sample size and the fact that it was conducted at a single medical center, although CePRim receives samples from different geographic regions of the country. Additionally, the evaluated biopsy fragments corresponded to pediatric patients who, for the most part, had undergone prior therapy with corticosteroids or immunosuppressants. These interventions may have influenced the findings in the EM evaluation and the expression of molecules such as CD36, TNF, NLRP3, and IL-10. Despite the influence of prior treatments, substantial evidence of local inflammatory mediators was still observed, which may contribute to a better understanding of the pathogenesis of pediatric podocytopathies. Future studies with larger samples and in diversified treatment contexts will be essential to validate these findings and refine therapeutic strategies. Furthermore, additional investigations are needed to confirm CD36's potential as a differential biomarker among podocytopathies, thereby contributing to more precise diagnoses and targeted interventions.

8 References:

1. Tryggvason, K., & Wartiovaara, J. (2001). Molecular basis of glomerular permselectivity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 10(4), 543–549. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11458036>.
2. Farquhar, M. G. (2006). The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *Journal of Clinical Investigation*, 116(8), 2090-2093. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506131>.
3. Pavenstädt, H., Kriz, W., & Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological Reviews*, 83(1), 253-307. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506131>.
4. Huber, T. B., & Benzing, T. (2005). The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(3), 211-216. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821412>.
5. Kerjaschki, D., Sharkey, D. J., & Farquhar, M. G. (1984). Identification and characterization of podocalyxin-the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *Journal of Cell Biology*, 98(4), 1591-1596. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6371025>.
6. Jefferson, J. A., & Shankland, S. J. (2014). The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 21(5), 408-416. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25168829>.
7. Vivarelli, M., Massella, L., Ruggiero, B., & Emma, F. (2017). Minimal change disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 12(2), 332-345. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940460>.
8. Büscher, A. K., & Weber, S. (2012). Educational paper: The podocytopathies. *European Journal of Pediatrics*, 171(8), 1151-1160. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22237399>.
9. Barisoni, L., Schnaper, H. W., & Kopp, J. B. (2007). A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2(3), 529–542.

10. Moura, L. R., Franco, M. F., & Kirsztajn, G. M. (2015). Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adults: response to steroids and risk of renal failure. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, 37(4), 475-480. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26648497>.
11. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). (2021). Clinical practice guideline for management of glomerular diseases. *Kidney International*, 100(4), S57–S60.
12. Noone, D. G., Iijima, K., & Parekh, R. (2018). Idiopathic nephrotic syndrome in children. *The Lancet*, 392(10141), 61-74.
13. Fogo, A. B. (2015). Causes and pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Reviews Nephrology*, 11(2), 76-87. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447132>.
14. Nachman, P. H., Jennette, J. C., & Falk, R. J. (2015). Primary glomerular diseases. In: Skorecki, K., Chertow, G. M., Marsden, P. A., Taal, M. W., & Yu, A. S. L. (Eds.), *Brenner & Rector's the Kidney* (10th ed.), Vol. 1, 1012-1090.
15. Yoo, T. H., & Fornoni, A. (2015). Nonimmunologic targets of immunosuppressive agents in podocytes. *Kidney Research and Clinical Practice*, 34(2), 69-75.
16. Wang, L., Hong, Q., Ly, Y., Feng, Z., Zhang, X., Wu, L., et al. (2012). Autophagy can repair endoplasmic reticulum stress damage of the passive Heymann nephritis model as revealed by proteomics analysis. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3866-3876. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22595305>.
17. Hartleben, B., Godel, M., Meyer-Schwesinger, C., Liu, S., Ulrich, T., et al. (2010). Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1084-1096. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200449>.
18. Yang, X., Okamura, D. M., Lu, X., Chen, Y., Moorhead, J., Varghese, Z., et al. (2017). CD36 in chronic kidney disease: novel insights and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Nephrology*, 13, 769–781.
19. Yang, X., Wu, Y., Li, Q., Zhang, G., Wang, M., Yang, H., et al. (2018). CD36 promotes podocyte apoptosis by activating the pyrin domain-containing-3 (NLRP3) inflammasome in primary nephrotic syndrome. *Medical Science Monitor*, 24, 6832–6839.

20. Sharma, D., Malik, A., Guy, C., Vogel, P., & Kanneganti, T. D. (2019). TNF/TNFR axis promotes pyrin inflammasome activation and distinctly modulates pyrin inflammasomopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 150-162. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30457980>.
21. Wang, Y. J., Chen, Y. Y., Hsiao, C. M., Pan, M. H., Wang, B. J., Chen, Y. C., et al. (2020). Induction of autophagy by pterostilbene contributes to the prevention of renal fibrosis via attenuating NLRP3 inflammasome activation and epithelial-mesenchymal transition. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 436. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32582712>.
22. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 356(6337), 513-519. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473584>.
23. Deegens, J. K., Dijkman, H. B., Borm, G. F., Steenbergen, E. J., van den Berg, J. G., & Weening, J. J., et al. (2008). Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 74(12), 1568–1576. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18813290/>.
24. Gundersen, H. J., Seefeldt, T., & Osterby, R. (1980). Glomerular epithelial foot processes in normal man and rats. Distribution of true width and its intra- and inter-individual variation. *Cell and Tissue Research*, 205(1), 147-155. DOI: 10.1007/bf00234450.
25. Crawford, B. D., & Gipson, D. S. (2017). Improving the evidence for the management of childhood nephrotic syndrome. *Kidney International*, 92(1), 21-23. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.02.029>.
26. Fougeray, S., & Pallet, N. (2015). Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys. *Nature Reviews Nephrology*, 11, 34–45. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.201>.
27. Yoshibayashi, M., et al. (2020). Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 525(2), 319-325.
28. Gowd, V., et al. (2020). Resveratrol: Evidence for its nephroprotective effect in diabetic nephropathy. *Advances in Nutrition*, 11(6), 1555-1568.
29. Zeng, C., Fan, Y., Wu, J., Shi, S., Chen, Z., Zhong, Y., Zhang, C., Zen, K., Liu, Z. (2014). Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies. *Journal of Pathology*, 234(2), 203-213. DOI: 10.1002/path.4382.

30. Da Silva, C. A., Monteiro, M. L. G. D. R., Araújo, L. S., Urzedo, M. G., Rocha, L. B., Dos Reis, M. A., & Machado, J. R. (2020). In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental glomerulosclerosis and minimal change disease. *PLoS One*, 15(11), e0241745. DOI: 10.1371/journal.pone.0241745.
31. Lenoir, O., Tharaux, P. L., & Huber, T. B. (2016). Autophagy in kidney disease and aging: Lessons from rodent models. *Kidney International*, 90(5), 950-964. DOI: 10.1016/j.kint.2016.04.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27325184/>.
32. Ponticelli, C., Moroni, G., & Reggiani, F. (2023). Autophagy and podocytopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 38(9), 1931-1939. DOI: 10.1093/ndt/gfad024. PMID: 36708169.
33. Takabatake, Y., Kimura, T., Takahashi, A., & Isaka, Y. (2014). Autophagy and the kidney: Health and disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 29(9), 1639-1647. DOI: 10.1093/ndt/gft535.
34. Hua, W., et al. (2015). CD36 mediated fatty acid-induced podocyte apoptosis via oxidative stress. *PLoS One*, 10(5), e0127507. DOI: 10.1371/journal.pone.0127507. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127507>.
35. Niyonzima, N., et al. (2017). Complement activation by cholesterol crystals triggers a subsequent cytokine response. *Molecular Immunology*, 84, 43-50. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.09.019.
36. Vaziri, N. D. (2016). Disorders of lipid metabolism in nephrotic syndrome: Mechanisms and consequences. *Kidney International*, 90(1), 41-52.
37. Niu, H., Ren, X., Tan, E., Wan, X., Wang, Y., Shi, H., Hou, Y., & Wang, L. (2023). CD36 deletion ameliorates diabetic kidney disease by restoring fatty acid oxidation and improving mitochondrial function. *Renal Failure*, 45(2), 2292753. DOI: 10.1080/0886022X.2023.2292753.
38. Hou, Y., Wang, Q., Han, B., et al. (2021). CD36 promotes NLRP3 inflammasome activation via the mtROS pathway in renal tubular epithelial cells of diabetic kidneys. *Cell Death & Disease*, 12(1), 523. DOI: 10.1038/s41419-021-03813-6.
39. Mariani, L. H., Eddy, S., Alakwaa, F. M., et al. (2023). Precision nephrology identified tumor necrosis factor activation variability in minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney International*, 103(3), 565-579. DOI: 10.1016/j.kint.2022.10.023.