

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ana Luisa Monteiro dos Santos Martins

***AVALIAÇÃO PODOCITÁRIA EM CASOS DE NEFROPATIA
DIABÉTICA***

Uberaba - MG

2021

Ana Luisa Monteiro dos Santos Martins

Avaliação podocitária em casos de Nefropatia Diabética

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Juliana Reis Machado e Silva
Coorientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Marlene Antônia dos Reis e Prof^ª. Dr^ª. Liliane Silvano Araújo

Uberaba - MG

2021

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

M341a Martins, Ana Luisa Monteiro dos Santos
Avaliação podocitária em casos de nefropatia diabética / Ana Luisa
Monteiro dos Santos Martins. – 2021.
106 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Reis Machado e Silva

Coorientadora: Marlene Antônia dos Reis

Coorientadora: Liliane Silvano Araújo

1. Nefropatias diabéticas. 2. Diabetes mellitus. 3. Rins - Biópsia. 4. Ge-
nes do tumor de Wilms. 5. Podócitos. I. Silva, Juliana Reis Machado e.
II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.61

ANA LUISA MONTEIRO DOS SANTOS MARTINS

Avaliação podocitária em casos de Nefropatia Diabética

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

Uberaba, 24 de junho de 2021.

Banca examinadora:

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

Prof^ª. Dr^ª. Liliana Borges Menezes
Universidade Federal de Goiás- UFG

Prof^ª. Dr^ª. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

*Dedico este trabalho a minha família,
sendo ela de sangue ou de coração, e a
todos os meus professores que me
guiaram até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Juliana Reis Machado e Silva, a quem serei eternamente grata pela forma como me recebeu, como me preparou e me ensinou, contribuindo para o meu crescimento ao longo desta jornada. Agradeço também por acreditar no meu potencial e por confiar na minha capacidade. Sinto-me muito agraciada por tê-la como orientadora, e expresso aqui minha imensa admiração e carinho pela senhora.

À Prof^ª Dr^ª. Marlene Antônia dos Reis, por quem também tenho imensa admiração e carinho. Obrigada pelo tempo dedicado pacientemente ao meu aprendizado. Gratidão pela confiança em mim e por ser fonte de inspiração e exemplo em minha vida.

À Dr^ª. Liliâne Araújo e a Dr^ª. Crislaine Silva, por todos os ensinamentos, conselhos e incentivos constantes. Obrigada por não medirem esforços ao me ensinarem tudo que sabiam e por me prepararem para cada etapa que eu enfrentaria, tranquilizando-me e me apoiando sempre. Agradeço ainda, por dividirem comigo as experiências, boas e ruins, reforçando assim nossos laços de amizade e carinho. Gratidão especial por isso!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e ter cuidado de mim até esse momento. Agradeço a Ele por tudo que vivi e pela forma como vivi, se algo fosse diferente “eu não seria eu”.

Agradeço a Deus por me dar a graça de ter pais maravilhosos, Ele escolheu duas pessoas muito especiais! Minha mãe, a mulher mais forte que conheço, que sempre lutou para que nada me faltasse. Meu pai, sou cópia original de toda a sua personalidade, comunicativo e “cabeça dura”, ao mesmo tempo, determinado e sensível. Agradeço a eles por terem me ensinado com suas atitudes sobre o verbo LUTAR. Eu amo vocês “daqui até a lua, ida e volta”.

Continuo meus agradecimentos agradecendo a Deus por colocar em minha vida pessoas especiais em momentos especiais.

Agradeço ao João, meu noivo, por todo companheirismo, carinho e dedicação. Obrigada por sonhar os meus sonhos comigo e por lutar ao meu lado por todos eles.

À minha tia Cida, minha segunda mãe. Obrigada por acreditar em mim quando eu não acreditei e obrigada por me colocar no colo todas as vezes que precisei.

Aos meus irmãos, Roberto, Nathália, Rubens Vinícius, Isabela, João Vitor, Luiz Felipe, Ana Carolina e José Neto. Obrigada por serem minha motivação e ao mesmo tempo minha inspiração.

À minha família, vocês são a minha base. Obrigada pela paciência e carinho. Obrigada também por compreenderem a minha ausência em muitos momentos especiais.

A todos os meus professores, em especial minha primeira professora do primário, tia Rosa. Quando eu te conheci sabia que queria ser como você: PROFESSORA! Silvana, minha primeira professora de biologia, todo o meu amor pela ciência foi herança sua. Luciana, minha primeira professora de patologia, obrigada por ter acreditado em mim e por todo o incentivo durante todos esses anos.

Aos meus amigos da patologia, obrigada por terem me acolhido durante todo esse tempo. Nada que eu escrever será suficiente para agradecer tudo que vocês fizeram por mim. A patologia se tornou minha casa e vocês têm sido minha família. Gratidão!

A todos os meus amigos da pós-graduação. Muitas vezes pensei em desistir e vocês me fizeram persistir. Obrigada!

Aos meus professores da pós-graduação: Carlo José Freire, Fábio Orsatti, Helenice Gobbi, Juliana Machado, Márcia, Marcos Vinicius, Marlene Reis e Virmondes Rodrigues. Obrigada pela oportunidade de aprender com vocês durante as aulas cursadas. Minha eterna gratidão!

Aos secretários da pós-graduação, Tuânia e André, que sempre estiveram dispostos a esclarecer todas as minhas dúvidas e anseios.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite do convite, por se disponibilizarem a dedicar seu tempo à leitura deste trabalho e pela contribuição com importantes sugestões.

Aos pacientes que consentiram a utilização das biópsias para estudo, sem eles esse estudo não seria possível.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e à disciplina de Patologia Geral da UFTM, por permitirem a realização dessa pesquisa acreditando nas ideias propostas e cedendo toda estrutura necessária para cada processo.

Ao Serviço de Nefropatologia da UFTM e o Serviço de Patologia da USP/Ribeirão Preto – SP, pelas amostras de tecido analisadas no estudo.

Por fim, agradeço aos seguintes órgãos de fomento pelo compromisso com a ciência e pelo apoio dado aos pesquisadores: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU) e Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares - EBSEH-HC/UFTM.

“Dizem que, na vida, quem perde o telhado ganha as estrelas. É assim mesmo. Às vezes você perde o que não queria, mas conquista o que nunca imaginou.”

(Sóstenes Cruz)

RESUMO

Introdução: A Nefropatia Diabética (ND) é a primeira causa de doença renal crônica e insuficiência renal em estágio terminal no mundo. Vários mecanismos se encontram envolvidos na patogênese desta doença, que culminam nas alterações morfológicas, como a lesão podocitária. Embora o diagnóstico para ND, assim como sua patogênese, seja complexo, tentativas de estabelecer novos biomarcadores e participantes nesse tipo de lesão ainda são escassos. A proteína Mindin, tem sido relatada, em maiores quantidades, na urina de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biomarcador da proteína Mindin em biópsias renais de pacientes com ND, como também correlacionar com as características clínico-epidemiológicas e as alterações ultraestruturais glomerulares. **Métodos:** Foram utilizadas 51 biópsias com diagnóstico de ND e avaliadas quanto à expressão *in situ* de WT1, que é um marcador de podócitos, e Mindin por imunohistoquímica. O apagamento dos pedicelos e a espessura da membrana basal glomerular foram analisados sob microscopia eletrônica de transmissão. O grupo controle foi composto por 23 casos de rins de autópsias de pacientes adultos cuja causa de morte não foi relacionada com doença infecciosa e alterações renais prévias. **Resultados:** Foi observado a diminuição da densidade de podócitos e aumento da expressão de Mindin em casos de ND independente das classes. Não houve correlação significativa entre a expressão de Mindin e WT1. Os podócitos de pacientes do grupo ND apresentaram maior largura dos pedicelos em relação ao grupo controle e a partir desses dados obtivemos uma correlação positiva entre Mindin e apagamento dos pedicelos, na classe III ($p=0,0349$). A espessura da membrana basal glomerular no grupo ND foi significativamente maior que o grupo controle. Não houve correlação significativa entre a espessura da membrana basal glomerular e o apagamento dos pedicelos. Obtivemos curva ROC, com um ponto de corte ideal em 5.178% de área marcada pelo anticorpo da proteína Mindin, com sensibilidade de 68%, especificidade de 86.96% e a ASC de 0.8687. **Conclusão:** Os resultados sugerem que Mindin pode ser considerado um potencial biomarcador de lesão podocitária na ND.

Palavras-chave: Nefropatias diabéticas. Diabetes mellitus. Rins - Biópsia. Genes do tumor de Wilms. Podócitos.

ABSTRACT

Introduction: Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of chronic kidney disease and end-stage renal failure in the world. Several mechanisms are involved in the pathogenesis of this disease, which culminate in morphological changes, such as podocyte injury. Although the diagnosis of DN, as well as its pathogenesis, is complex, attempts to establish new biomarkers and participants in this type of lesion are still scarce. The Mindin protein has been reported, in greater quantities, in the urine of individuals with type 2 diabetes mellitus. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential biomarker of Mindin protein in renal biopsies of patients with DN, as well as to correlate with the clinical-epidemiological characteristics and glomerular ultrastructural changes. **Methods:** 51 biopsies with diagnosis of DN were used and evaluated for *in situ* expression of WT1, which is a podocyte marker, and Mindin by immunohistochemistry. The erasure of the pedicels and the thickness of the glomerular basement membrane were analyzed under transmission electron microscopy. The control group consisted of 23 cases of kidneys from autopsies of adult patients whose cause of death was not related to infectious disease and previous renal disorders. **Results:** A decrease in the density of podocytes and an increase in the expression of Mindin was observed in cases of DN independent of the classes. However, there was no significant correlation between Mindin's expression and WT1. Podocytes from patients in the ND group had greater pedicle width compared to the control group and from these data we obtained a positive correlation between Mindin and pedicle erasure, in class III ($p = 0.0349$). The thickness of the glomerular basement membrane in the ND group was significantly greater than the control group. However, there was no significant correlation between the thickness of the glomerular basement membrane and the erasure of the pedicels. We obtained a ROC curve, with an ideal cutoff point in 5,178% of the area marked by the Mindin protein antibody, with a sensitivity of 68%, specificity of 86.96% and an AUC of 0.8687. **Conclusion:** The results suggest that Mindin can be considered a potential biomarker of podocyte lesion in DN.

Keywords: Diabetic nephropathies. Diabetes mellitus. Kidneys - Biopsy. Wilms tumor genes. Podocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Alterações morfológicas glomerulares das Classes da ND.....	20
Figura 2 – Diafragma slit.....	22
Figura 3 – Biologia do podócito e lesões podocitárias.....	26
Figura 4 – FI/AT, proteinúria e TFGe nas classes da ND.....	46
Figura 5 – Correlação FI/AT e TFGe.....	47
Figura 6 – Correlação de FI/AT e proteinúria.....	48
Figura 7 – Expressão de WT1 nos grupos controle e ND.....	49
Figura 8 – Expressão de Mindin nos grupos controle e ND.....	50
Figura 9 – Correlação entre a expressão de Mindin e WT1.....	51
Figura 10 – Apagamento de pedicelos nos grupos controle e ND.....	53
Figura 11 – Espessura da membrana basal glomerular nos grupos controle e ND.....	54
Figura 12– Correlação entre as lesões ultraestruturais da ND.....	55
Figura 13 – Correlação de Mindin e apagamento dos pedicelos.....	56
Figura 14 – Curva ROC de Mindin nas diferentes classes da ND.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos WT1 e SPON2	38
Tabela 2 – Caracterização epidemiológica do grupo controle e do grupo ND.....	42
Tabela 3 – Caracterização clínico-laboratorial dos casos com ND submetidos à biópsia renal	43
Tabela 4 – Classificação morfológica do grupo ND	44
Tabela 5 –Análise morfológica ultraestrutural	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II: Angiotensina II

ASC: Área sob a curva

BFG: Barreira de filtração glomerular

BR: Biopsia renal

IC: Intervalo de confiança

DM: Diabetes Mellitus

DMT1: Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2

DP: Desvio padrão

DRC: Doença renal crônica

DS: Diafragma slit

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HE: Hematoxilina e eosina

IDF: International Diabetes Federation

IL-6: Interleucina-6

IMC: Índice de massa corporal

JAK2: Proteína Janus Kinase 2

MBG: Membrana basal glomerular

ML: Microscopia de luz

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

mTORC1: Alvo mecanístico do complexo de rapamicina 1

ND: Nefropatia Diabética

NI: Não informado

PAMS: Prata metenamina

TMA: Tricrômico de masson azul

PKC: Proteína quinase C

PS: Picro-sirius

PTHrP: Proteína relacionada ao hormônio da paratireoide

P27kip1: Inibidor de quinase dependente de ciclina1B

P38MAP: Proteínas quinases ativadas por mitogênio p38

RAGES: Receptor de produtos finais de glicação avançada

ROC: Receiver Operating Characteristic

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SRAA: Sistema-renina-angiotensina-aldosterona

STAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

vs: Versus

WT1: Proteína gene supressor do Tumor de Wilms

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 DIABETES MELLITUS	17
1.2 NEFROPATIA DIABÉTICA	17
1.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA NEFROPATIA DIABÉTICA.....	19
1.4 ESPESSAMENTO DA MBG.....	21
1.5 PODÓCITOS E LESÕES PODOCITÁRIAS.....	21
1.5.1 Hipertrofia	23
1.5.2 Destacamento	24
1.5.3 Apoptose	25
1.5.4 Apagamento	25
1.6 MINDIN (SPON 2, SPONDIN 2)	27
2 HIPÓTESE	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	34
4.1 OBJETIVO GERAL	34
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
5.1 CASUÍSTICA.....	36
5.2 MÉTODOS	37
5.2.1 Diagnóstico da ND	37
5.2.2 Classificação da Nefropatia Diabética e avaliação extraglomerular	37
5.2.3 Análise ultraestrutural dos podócitos/pedícelos	37
5.2.4 Morfometria ultraestrutural da Membrana Basal Glomerular (MBG)	38
5.2.5 Imuno-histoquímica para Mindin (Spondin 2 ou SPON2) e WT1	38
5.2.6 Quantificação das imunomarcações Mindin (Spondin 2 ou SPON2) e WT1	39
5.2.7 Cálculo para estimar taxa de filtração glomerular	40
6 RESULTADOS	42
6.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO	42
6.2 PERFIL MORFOLÓGICO	44
6.3 ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA EXTRAGLOMERULAR E DOS DADOS CLÍNICOS NAS DIFERENTES CLASSES DA ND	45
6.4 AVALIAÇÃO DA LESÃO DOS PODÓCITOS NA NEFROPATIA DIABÉTICA	48
6.5 A BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR ENCONTRA-SE ALTERADA NA ND.....	52

6.6 A EXPRESSÃO DE MINDIN ASSOCIADA A ALTERAÇÃO PODOCITÁRIA NA NEFROPATIA DIABÉTICA	55
6.7 MINDIN COMO BIOMARCADOR <i>IN SITU</i> DA NEFROPATIA DIABÉTICA.....	56
7 DISCUSSÃO	59
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
9 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	78
ANEXO B – ARTIGO.....	79
ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	105

Introdução

1 1 INTRODUÇÃO

2 1.1 DIABETES MELLITUS

3 Segundo a última edição da International Diabetes Federation (IDF), os 5 países com
4 mais casos adultos de DM são a China, Índia, Estados Unidos, Paquistão e Brasil,
5 respectivamente. Além disso, foi calculado um gasto anual de 760 bilhões de dólares com
6 pacientes diabéticos e mais 50% foram revestidos no tratamento de complicações dessa doença.
7 A pesquisa mostra ainda que 463 milhões de adultos entre 20 a 79 anos vivem com diabetes e
8 aproximadamente 4,2 milhões de pessoas morreram devido a essa condição em 2019 (SAEEDI
9 *et al.*, 2019). A quantidade de pessoas com essa doença triplicou nos últimos 20 anos e estima-
10 se que a população mundial com diabetes no ano de 2030 será da ordem de 578 milhões de
11 pessoas e que deverá atingir 700 milhões em 2045 (WILLIAMS *et al.*, 2020).

12 Os dois principais tipos de DM são o tipo 1 (DMT1) e tipo 2 (DMT2), sendo o tipo 2
13 responsável por mais de 85% da prevalência total dessa doença (FOROUHI; WAREHAM,
14 2018). O DMT1 é uma doença autoimune resultante da destruição específica de células β
15 produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, o que leva a produção
16 insuficiente ou nenhuma de insulina, hormônio que regula o nível de glicose no sangue,
17 resultando em hiperglicemia (MATHIS; VENCE; BENOIST, 2001). Já o DMT2 é
18 caracterizado pela hiperglicemia devido à insensibilidade à insulina. Tanto a resistência
19 periférica, quanto a hipersecreção compensatória de insulina das ilhotas pancreáticas podem
20 preceder o declínio da função secretora dessas estruturas, podendo levar também a uma
21 produção insuficiente de insulina (KAHN *et al.*, 1993).

22 Apesar da evolução considerável na terapêutica do DM, a elevação crônica da glicemia
23 no sangue, fato que acontece com frequência nos pacientes com DM, leva a várias complicações
24 micro e macrovasculares. As principais alterações são nos olhos, levando à retinopatia; nos rins,
25 à nefropatia; nos nervos, provocando a neuropatia; assim como doenças cardiovasculares e
26 cerebrovasculares (CARDOSO; SALLES, 2008).

27 1.2 NEFROPATIA DIABÉTICA

28 A nefropatia diabética (ND) é uma das complicações microvasculares mais importantes
29 do DM (GROUP, 2008; ORASANU; PLUTZKY, 2009) no que se refere ao diagnóstico de
30 alterações estruturais e funcionais patológicas específicas nos rins de pacientes diabéticos
31 (BERMEJO; GARCÍA-CARRO; SOLER, 2019; UMANATH; LEWIS, 2018a). A ND é a
32 primeira causa de DRC e insuficiência renal em estágio terminal no mundo (NARRES *et al.*,

33 2016; REUTENS; ATKINS, 2011). A mesma pode ocorrer como consequência tanto do DMT1
34 quanto do DMT2 (FAROOQ; RAY, 2015a), desenvolvendo em até 30% a 40% desses pacientes
35 (GNUDI; COWARD; LONG, 2016a; UMANATH; LEWIS, 2018a). Sua patogênese é
36 complexa e não está completamente compreendida, no entanto, acredita-se que vários
37 mecanismos contribuem para o seu desenvolvimento, como resistência à insulina,
38 hiperglicemia, alterações hemodinâmicas, fatores genéticos e processos autoimunes (DE
39 FARIA, 2001; VARGHESE; JIALAL, 2020).

40 Fatores como descontrole glicêmico, hipertensão não controlada, histórico familiar de
41 hipertensão, doença cardiovascular e até mesmo determinados grupos étnicos (afro-americanos,
42 hispano-americanos, e nativo-americanos) são considerados fatores de risco para o
43 desenvolvimento da ND (VARGHESE; JIALAL, 2020). Além disso, existe uma relação direta
44 entre o tempo de acometimento do DM com a probabilidade de desenvolver ND (CORTEZ *et*
45 *al.*, 2015). No DMT1 os pacientes desenvolvem ND entre 15 e 20 anos após o início da doença,
46 já no DMT2 a albuminúria pode já estar presente na descoberta da doença. Uma possível
47 explicação para essa diferença pode estar na dificuldade de apontar exatamente o início do
48 DMT2 (VARGHESE; JIALAL, 2020).

49 Um dos mecanismos relatados no desenvolvimento da ND é que a hiperglicemia causa
50 a produção de espécies reativas de oxigênio e ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC é
51 ativada de várias maneiras, mas devido ao aumento da glicose intracelular, aumenta a produção
52 de novo de diacilglicerol e, portanto, desempenha um papel central na doença. Esta via medeia
53 o aumento da expressão de proteínas da matriz extracelular no mesângio glomerular. Este grupo
54 de moléculas tem a capacidade de ativar receptores específicos, RAGEs (receptores para
55 produtos finais de glicação avançada), e sua ativação medeia efeitos pleiotrópicos, que vão
56 desde aumento do estresse oxidativo intracelular até hipertrofia glomerular ou disfunção
57 endotelial. Além disso, a hiperglicemia corrobora com a produção de mediadores inflamatórios,
58 como citocinas e quimiocinas, produzindo fibrose inflamatória e aumentando a permeabilidade
59 vascular. O aumento da permeabilidade vascular leva à proteinúria, a pressão no glomérulo
60 aumenta, o que por sua vez aumenta a permeabilidade das proteínas que causam lesões
61 tubulares crônicas (CAO; COOPER, 2011).

62 Inicialmente, os pacientes são assintomáticos quando a doença se instala, os sintomas
63 clássicos são fadiga, urina esbranquiçada, edema periférico causado por hipoalbuminemia e
64 síndrome nefrótica caracterizada pelo desenvolvimento de proteinúria com um declínio na taxa
65 de filtração glomerular, que progride por um longo período de tempo, entre 10 e 20 anos

66 (VARGHESE; JIALAL, 2020). Em estágios mais avançados e sem tratamento, há o surgimento
67 de uremia, considerado como insuficiência renal em estágio terminal e pode ser fatal
68 (MOGENSEN; CHRISTENSEN; VITTINGHUS, 1983).

69 O diagnóstico da ND é realizado por meio de exame de urina, com albuminúria
70 (“KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes
71 and Chronic Kidney Disease”, 2007) persistente em duas ou mais ocasiões com intervalo de,
72 no mínimo, três meses. Valores maiores que 300mg em 24 horas ou 200 µg/min são
73 considerados albuminúria persistente, taxas entre 30 e 300mg em 24 horas é um marcador de
74 ND inicial, sendo considerada albuminúria moderadamente aumentada (DE BOER *et al.*,
75 2014). Quando necessário, é feita uma biópsia renal (BR) na qual a histologia é caracterizada
76 pelo espessamento de membrana basal glomerular e hiperplasia nodular mesangial
77 (DRUMMOND; MAUER, 2002; PAGTALUNAN *et al.*, 1997).

78 Para o tratamento e controle da doença, deve-se focar em três pontos chave: controle
79 glicêmico, controle da pressão arterial e inibição do sistema renina-angiotensina. A mudança
80 de hábitos considerados fatores de risco, como tabagismo e ingestão lipídica, são cruciais na
81 redução de risco cardiovascular (VARGHESE; JIALAL, 2020). Em se tratando do DMT1, o
82 controle glicêmico intensivo tem se mostrado como fator protetivo na ND, assim como o
83 controle da pressão arterial (DE BOER *et al.*, 2014), sendo que seu controle levou a menor taxa
84 de mortalidade por problemas cardiovasculares. Já no DMT2, a manutenção da hemoglobina
85 glicada em níveis próximos a 7%, leva a um menor risco de lesões microvasculares, nefropatia
86 incluída (GENUTH *et al.*, 2003), bem como o controle da pressão arterial, por meio do eixo
87 renina-angiotensina, tem sido efetivo na prevenção do desenvolvimento de microalbuminúria
88 (MENNE *et al.*, 2014; PARVING *et al.*, 2001).

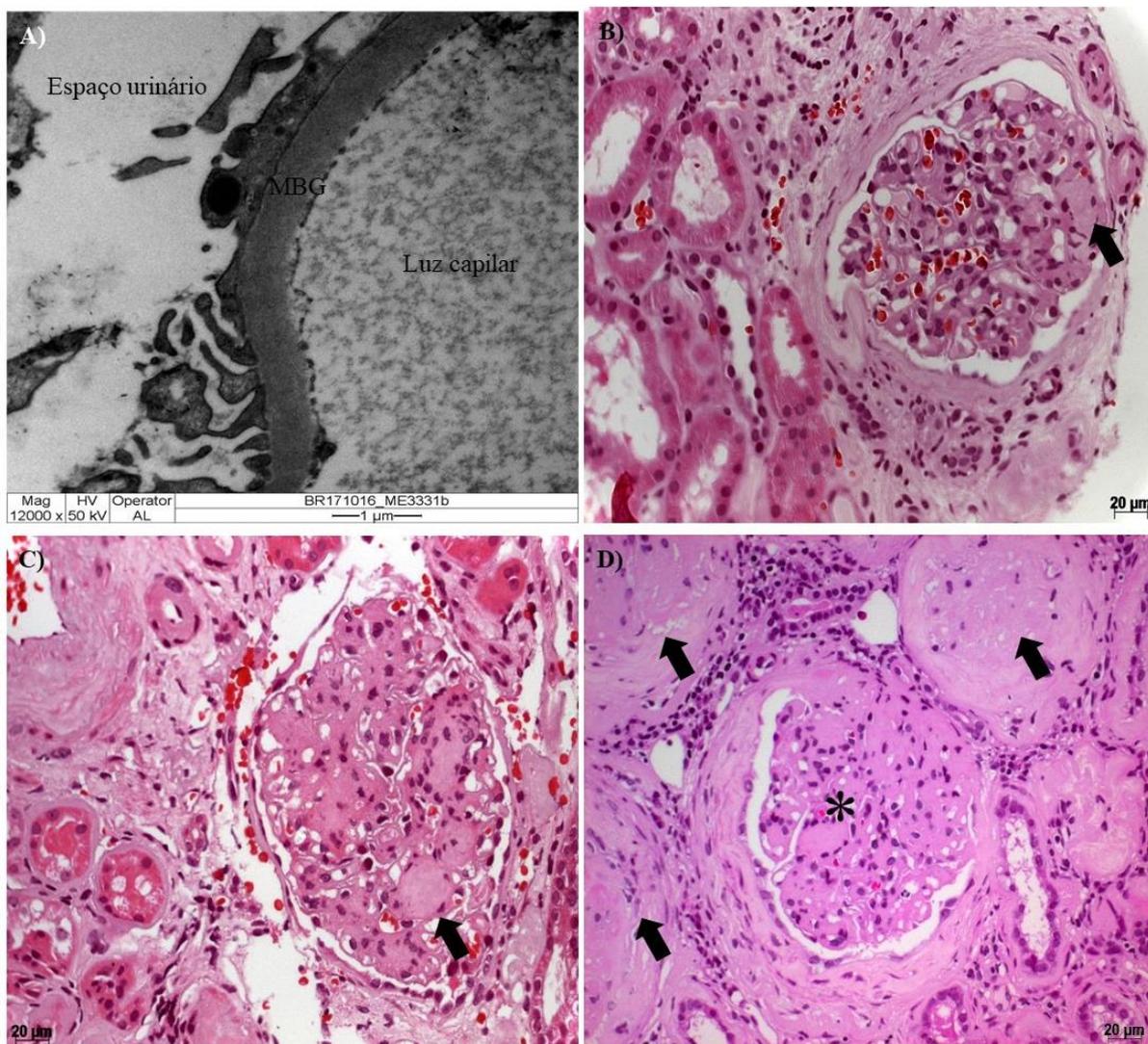
89

90 1.3 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA NEFROPATIA DIABÉTICA

91 As alterações morfológicas glomerulares da ND, são classificadas por Tervaert *et al* em
92 quatro tipos de classes de acordo com a gravidade das lesões: classe I a lesão só pode ser
93 visualizada pela microscopia eletrônica transmissão (MET), na qual é observado o
94 espessamento ultraestrutural da membrana basal glomerular (MBG); classe II refere-se à
95 presença de expansão mesangial, que pode ser leve, classificada como IIa, ou moderada a
96 acentuada, classificada como IIb; classe III está relacionada à presença de esclerose nodular
97 (lesão de Kimmelstiel-Wilson) observada em pelo menos um dos glomérulos da amostra; classe

98 IV ou glomeruloesclerose diabética avançada é definida quando há mais de 50% dos glomérulos
99 analisados com esclerose global (TERVAERT *et al.*, 2010) (Figuras 1A-D).

100 Figura 1 – Alterações morfológicas glomerulares das Classes da ND



101

102 Fonte: Cedida pela disciplina de patologia geral da UFTM, 2021.

103 A) Espessamento da MBG visualizado pela MET, única alteração da ND Classe I (12000X). B) Glomérulo com
104 expansão mesangial (seta) caracterizando a Classe II da ND (HE – 400X). C) Glomérulo com esclerose nodular,
105 nódulo de Kimmelstiel-Wilson (seta) que caracteriza a Classe III da ND (HE – 400X). D) Glomérulos com
106 glomeruloesclerose global (setas) caracterizando a Classe IV da ND e no centro um glomérulo com esclerose
107 nodular (asterisco) (HE – 200X).

108

109 Já a classificação para as lesões intersticiais e vasculares são expressa em scores,
110 destacando a presença e a intensidade do comprometimento histológico (TERVAERT *et al.*,
111 2010).

112 Morfologicamente, a ND cursa com alterações na barreira de filtração glomerular (BFG)
113 que é composta pelo endotélio fenestrado, MBG e podócitos/pedícelos. Alterações nessas
114 estruturas incluem espessamento da MBG e alterações podocitárias (SUN *et al.*, 2013).

115

116 1.4 ESPESSAMENTO DA MBG

117 A MBG está na interface das células endoteliais e uma camada de células epiteliais (os
118 podócitos) na BFG (BYRON *et al.*, 2014). A MBG é formada por três camadas, pela lâmina
119 rara externa, em contato com os podócitos, lâmina densa e a lâmina rara interna, em contato
120 com as células endoteliais (REEVES; KANWAR; FARQUHAR, 1980). Composta
121 principalmente por colágeno tipo IV, sintetizado pelos podócitos (ABRAHAMSON *et al.*,
122 2009), lamininas, imprescindível para a manutenção estrutural da BFG (MINER; LI, 2000),
123 proteoglicanos de sulfato de heparano, que parece dar característica aniônica para a MBG, e
124 fibronectina produzida pelas células endoteliais (PAZ; LE MEUR; RENAUDINEAU, 2013).

125 A desorganização dos componentes da MBG está associada a uma maior
126 permeabilidade da BFG. Sabe-se que a laminina é essencial para a aderência do podócito na
127 MBG, portanto a sua deficiência leva à proteinúria e essa proteinúria poderia ser consequência
128 de um desarranjo entre podócito e MBG. No entanto, um estudo demonstrou que a deficiência
129 de laminina levou à proteinúria antes das alterações podocitárias (JARAD *et al.*, 2006).

130 Na ND é observado o espessamento da MBG que ocorre de forma difusa
131 comprometendo todas as camadas, porém sendo mais proeminente na lâmina densa. O
132 aparecimento do espessamento é atribuído principalmente ao aumento da deposição do
133 colágeno tipo IV e fibronectina e pela degradação insuficiente do excesso de matriz extracelular
134 (MEC) (MASON; WAHAB, 2003). Foi observado que pacientes com proteinúria evidente
135 apresentaram maior espessamento da MBG que os pacientes microalbuminúricos. Além disso,
136 o grau de proteinúria observado teve uma correlação positiva com a espessura da MBG, ou seja,
137 quanto maior o espessamento da MBG maior o grau de proteinúria (ZHU *et al.*, 2009).

138

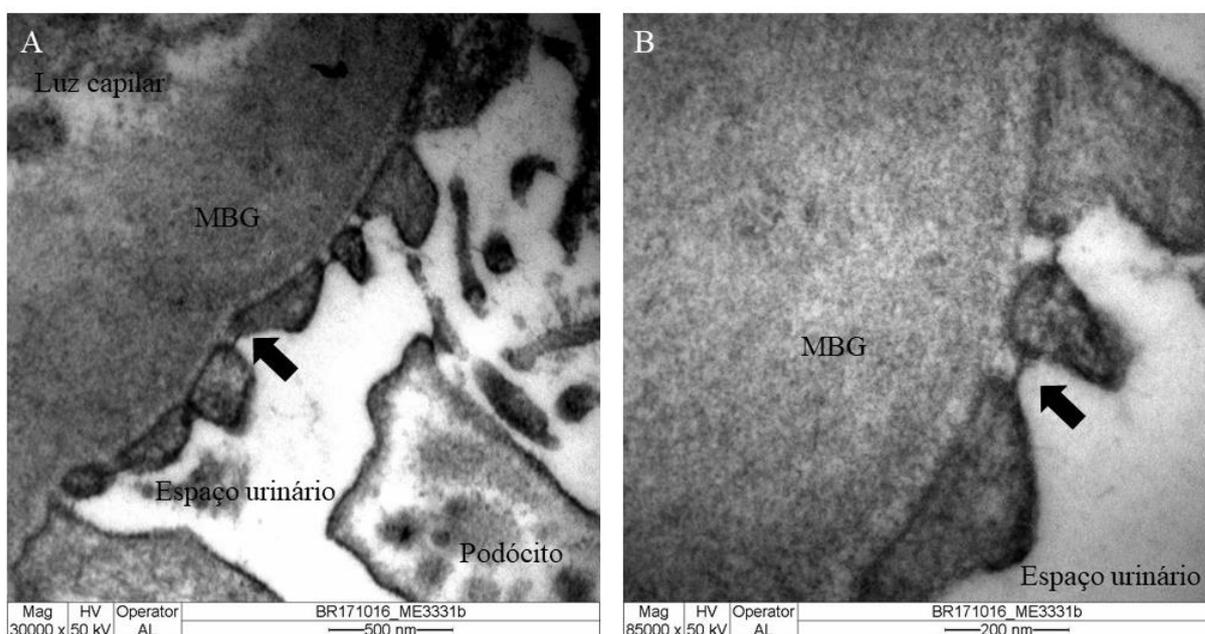
139 1.5 PODÓCITOS E LESÕES PODOCITÁRIAS

140 As células epiteliais voltadas para o espaço urinário no glomérulo, chamadas de
141 podócitos, são importantes para a função desse complexo. Essas células são diferenciadas
142 terminalmente, ou seja, não podem se regenerar ou replicar, sendo sua perda irreparável
143 (BRYER; SUSZTAK, 2018). Possuem uma estrutura complexa pela riqueza de proteínas em

144 sua composição. Compostas por um corpo volumoso, no qual se encontra o núcleo e as
145 organelas, emitem prolongamentos primários que se ramificam em prolongamentos
146 secundários, chamados de processos podocitários ou pedicelos (PAVENSTÄDT; KRIZ;
147 KRETZLER, 2003).

148 Esses pedicelos têm um citoesqueleto formado de actina, conectam-se às proteínas da
149 MBG, por meio dos receptores de integrinas e distroglicanos e se interdigitam com os pedicelos
150 de podócitos vizinhos formando uma rede que recobre toda a MBG. Essa interdigitação entre
151 pedicelos é feita a partir de um conjunto de proteínas, como nefrina e podocina (GREKA;
152 MUNDEL, 2012), que configuram o diafragma slít (DS) (BENZING, 2005) (Figuras 2A-B).

153 Figura 2 – Diafragma slít



155 Fonte: Do Autor, 2021.

156 A) Diafragma slít (seta) (30000X) B) Maior aumento do diafragma slít (seta) (85000X).

157

158 O podócito é responsável por manter a estrutura capilar glomerular e resistir à pressão
159 sanguínea intraglomerular. Além de contribuir para a formação e modulação da MBG, também
160 determina a homeostase das células endoteliais secretando fator de crescimento endotelial
161 vascular (PAVENSTÄDT; KRIZ; KRETZLER, 2003). Além disso, é um aliado importante na
162 contenção de proteínas, pois os pedicelos possuem uma grande quantidade de podocalixina
163 formando uma barreira com carga negativa que repele moléculas com a mesma carga, como a
164 albumina (KERJASCHKI; SHARKEY; FARQUHAR, 1984).

165 Para estudos de podócitos, tem-se usado a proteína gene supressor do Tumor de Wilms
166 (WT1) marcador de podócitos diferenciados em cultura celular e *in situ*, na imuno-histoquímica

167 (GUO, 2002; KIM *et al.*, 2001). WT1, embora inicialmente descoberto como um gene supressor
168 de tumores, é essencial para a nefrogênese normal (AMBU *et al.*, 2015). Foi observado que há
169 uma maior expressão desse gene no rim em desenvolvimento (PRITCHARD-JONES *et al.*,
170 1990), e embriões de camundongos deficientes de WT1 sofrem de agenesia renal completa
171 (KREIDBERG *et al.*, 1993). Mutações nesse gene leva a cicatrizes glomerulares em rins
172 humanos e de camundongos (CHAU *et al.*, 2011). Em animais adultos normais, WT1 é
173 restritamente expresso em podócitos, sugerindo um papel para este gene na manutenção da
174 diferenciação (FANNI *et al.*, 2011) e manutenção da homeostase dessas células (KANN *et al.*,
175 2015).

176 Vários estudos demonstram que os podócitos são alvos da ND devido à hiperglicemia,
177 o aumento da angiotensina II (ANG II), o aumento do fator de transformação do crescimento
178 beta (TGF- β) e estresse mecânico (LI *et al.*, 2007a). Como os podócitos possuem uma
179 capacidade limitada de reparo e são terminalmente diferenciados, quando há danos ou perda de
180 podócitos, de modo consequente há a perda da homeostase na barreira de filtração glomerular
181 levando à proteinúria (LIN; SUSZTAK, 2016a). Dentre os tipos de lesões são evidenciados a
182 hipertrofia, o destacamento, a apoptose e o apagamento dos pedicelos.

183

184 **1.5.1 Hipertrofia**

185 O estágio inicial da ND é denominado hiperfiltração, no qual é observado um aumento
186 na taxa de filtração glomerular. Nesse estágio, os rins se expandem bilateralmente, então
187 também há expansão glomerular. Como mencionado anteriormente, os podócitos não têm a
188 capacidade de proliferar, então eles se expandem em tamanho de forma compensatória na
189 tentativa de continuar a cobrir a MBG (BDUJWBUJPO *et al.*, 2011). Estudos em animais e
190 humanos mostram que a hipertrofia dos podócitos estão relacionados a evolução da ND (DAI;
191 LIU; LIU, 2017) e que os mesmos sofrem hipertrofia antes da hipertrofia glomerular
192 (HERBACH *et al.*, 2009).

193 O que tem sido demonstrado na hipertrofia do podócito, no quadro de ND, está
194 relacionada à hiperglicemia, que induz a produção de ANG II por meio do sistema renina
195 angiotensina aldosterona (SRAA) e aumenta os níveis de interleucina-6 (IL-6), tanto *in situ*, no
196 plasma e na urina (DALLA VESTRA *et al.*, 2005). Em um estudo, houve um aumento nos
197 níveis de IL-6 em cultura de podócitos em ambiente hiperglicêmico, comparando com um
198 ambiente normoglicêmico. Além disso, concluíram que a IL-6 inicia uma cascata que

199 desempenha o papel de ativar proteína Janus Kinase (2 JAK2), portanto, ativa transdutor de
200 sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) levando a hipertrofia de podócitos (JO *et al.*, 2016).

201 Um estudo observou a hipertrofia de podócitos em ambientes hiperglicêmicos e que essa
202 hipertrofia possivelmente é devido à ativação do SRAA que leva ao aumento da ANG II (KIM
203 *et al.*, 2006). A ANG II está associada à hipertrofia podocitária por meio de diferentes
204 caminhos. Através da regulação positiva de PTHrP (proteína relacionada ao hormônio da
205 paratireoide), que parece induzir a expressão de TGF- β 1 e p27 Kip1 (Inibidor de quinase
206 dependente de ciclina 1B) desencadeando hipertrofia de podócitos em condições de aumento
207 glicose (ROMERO *et al.*, 2010). Estimulando a expressão de proteína PKC ativada pelo alvo
208 mecanístico do complexo de rapamicina 1 (mTORC1) em condições de alta glicose (LU;
209 GONG; GUAN, 2011), além de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem a
210 expressão proteica positiva de ERK1/2 e AKt/PKB que também tem sido descrito como
211 contribuinte no processo de hipertrofia podocitárias (KIM *et al.*, 2006).

212

213 1.5.2 Destacamento

214 A barreira de filtração glomerular é formada por uma camada de células endoteliais,
215 pela MBG e pelos podócitos que estão ancorados na MBG. Várias pesquisas relacionadas às
216 doenças renais, tanto em animais quanto em humanos, têm encontrado podócitos normais e
217 lesados na urina. Em relação a ND, observou-se a diminuição de integrina α 3 β 1, uma
218 importante proteína na ligação dos podócitos na MBG, relacionando essa diminuição com a
219 perda de podócitos (CHEN *et al.*, 2008; MATHEW *et al.*, 2012).

220 Além disso, há uma comunicação das proteínas do citoesqueleto do podócito e do DS
221 com as proteínas intimamente conectadas à MBG (CHEN *et al.*, 2000). Wang *et al* analisaram
222 as proteínas dos podócitos em ambiente hiperglicêmico e observaram a expressão reduzida de
223 proteínas do DS (nefrina e podocina) (WANG; LI; SONG, 2018), anteriormente, Jim *et al* já
224 haviam relatado essa diminuição além da redução de proteínas associada a actina no
225 citoesqueleto (sinaptopodina) (JIM *et al.*, 2012). Visto que elas estão diminuídas nos podócitos
226 do rim diabético, essa interação poderia ser prejudicada levando a um desarranjo do
227 citoesqueleto e uma adesão insuficiente entre podócitos e MBG (CHEN *et al.*, 2000).
228 Posteriormente, Wang *et al* demonstraram que o número de podócitos glomerulares está
229 relacionado positivamente com a expressão de nefrina, podocina e sinaptopodina (WANG *et*
230 *al.*, 2010), o que reforça a importância dessas proteínas no destacamento de podócitos na ND.

231

232 1.5.3 Apoptose

233 Normalmente as células do corpo estão em um constante equilíbrio entre mecanismo
234 apoptótico e anti-poptótico. Entretanto, existem evidências de que na ND esse equilíbrio esteja
235 em desarmonia, havendo ativação dos processos apoptóticos e a inibição dos mecanismos anti-
236 apoptóticos levando a diminuição da densidade de podócitos na ND (WANG *et al.*, 2018).
237 Como uma das principais características do DM é a hiperglicemia, modelos *in vitro*
238 demonstraram que nessa condição houve superexpressão de proteínas quinases ativadas por
239 mitógeno p38 (p38 MAPK) e ativação de caspase 3 (SUSZTAK *et al.*, 2006). Uma das vias
240 relatadas por induzir apoptose, na mesma condição, é dependente de TGF- β (DAS *et al.*, 2015).
241 Nessa via, essa citocina, foi capaz de inibir NF-kB/65, ativar proteína quinase p38 e
242 desencadear a cascata que ativa a apoptose via caspase 3 (LI *et al.*, 2004). A ANG II também
243 parece exercer um papel importante na apoptose dos podócitos, pois altas concentrações de
244 ANG II induziu a produção de ROS (KASHIHARA *et al.*, 2010;KAMIYAMA *et al.*, 2013),
245 assim como o TGF- β estimula a ativação da p38 MAPK (GAO *et al.*, 2014). Como resultado
246 da apoptose e do destacamento é relatado a MBG desnuda na ND (SU *et al.*, 2010).

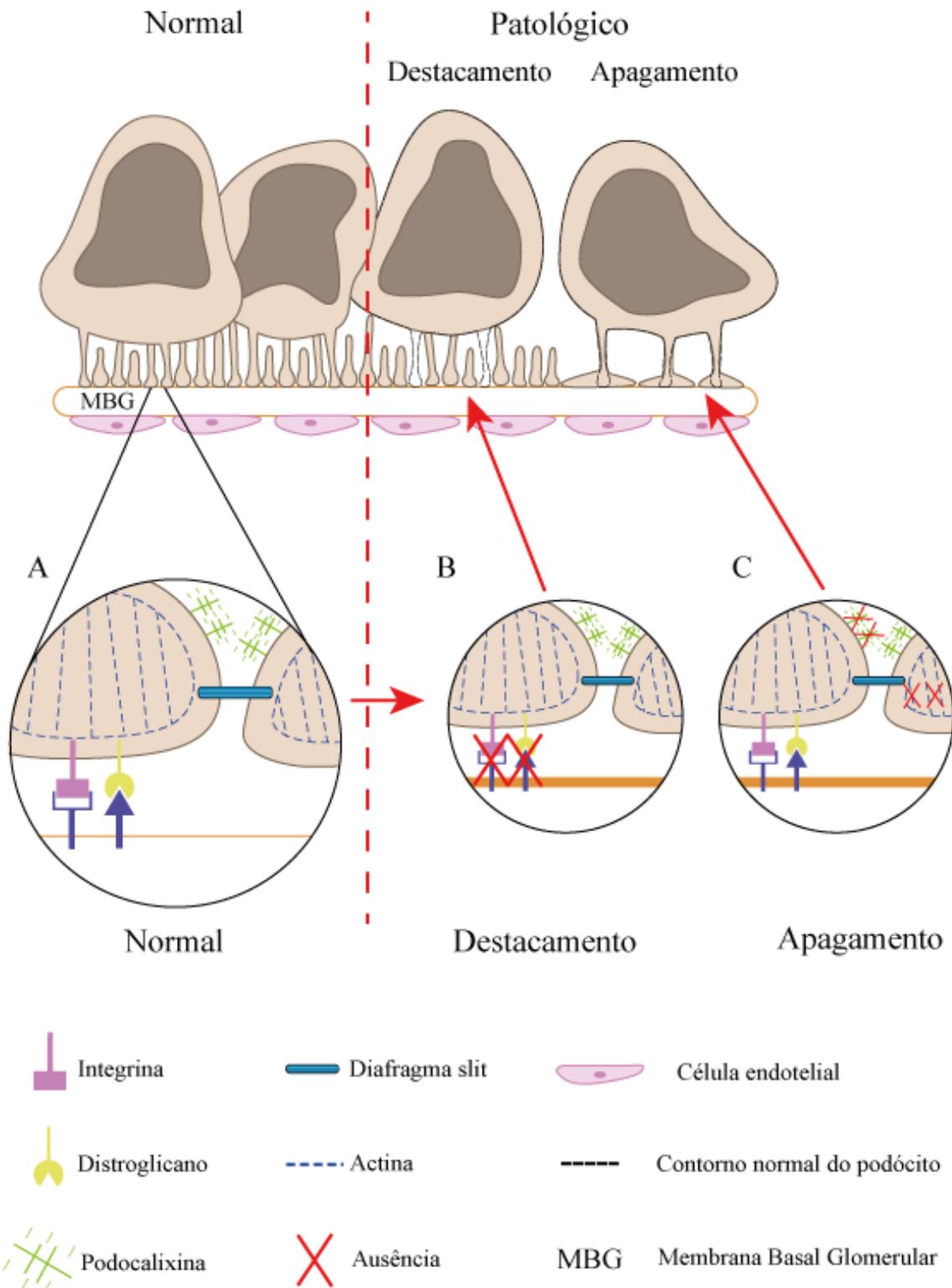
247

248 1.5.4 Apagamento

249 Quando há perda de podócitos no glomérulo, tanto devido à apoptose quanto ao
250 destacamento, foi observado em análise de BR de Índios Pima com DMT2 que os podócitos
251 sofrem uma ampliação nos seus pedicelos, chamado de apagamento (PAGTALUNAN *et al.*,
252 1997).

253 Além disso, assim como o destacamento de podócitos, o apagamento de pedicelos
254 parece estar associado à hiperglicemia regular negativamente à expressão de proteínas dos
255 podócitos (LI *et al.*, 2007a, 2015) (Figura 3). Especialmente aquelas ligadas à proteína de
256 membrana como a podocalixina (ECONOMOU *et al.*, 2004) ou ao citoesqueleto, como a actina
257 (KOSHIKAWA *et al.*, 2005) e a sinaptopodina (BLANCO *et al.*, 2005), além da nefrina que
258 medeia a reorganização da actina. Dessa forma, quando há diminuição de proteínas do
259 citoesqueleto, a estrutura dos pedicelos sofre um desarranjo e leva ao apagamento dos pedicelos
260 (MUNDEL; SHANKLAND, 2002).

261 Figura 3 – Biologia do podócito e lesões podocitárias



262
263
264
265
266
267
268

Fonte: Do Autor, 2021.

A) Biologia normal dos podócitos. B) Destaçamento de podócito: envolvido, principalmente, com alteração das proteínas integrina e distroglicano que ancoram o pedicelo na MBG. C) Apagamento de pedicelos: envolvido, principalmente, com alteração das proteínas actina e podocalixina responsáveis pela manutenção estrutural dos pedicelos.

269 Em um estudo foi demonstrado que a ativação de proteína quinase p38 em ambientes
270 hiperglicêmicos resulta na reorganização do citoesqueleto de actina e que mutações nessa
271 proteína leva ao apagamento dos pedicelos (KOSHIKAWA *et al.*, 2005). Além disso, a
272 sinaptopodina, que tem a funcionalidade associada à actina de manter a forma dos pedicelos,
273 também está diminuída em experimentos com modelos diabéticos (BLANCO *et al.*, 2005). Já
274 as podocalixinas são proteínas que ficam nas extremidades dos pedicelos ligada ao
275 citoesqueleto de actina e têm a função de repelir proteínas aniônicas, como a albumina
276 (PAVENSTÄDT; KRIZ; KRETZLER, 2003). Devido a todos os pedicelos possuírem essas
277 cargas, um pedicelo repele o outro auxiliando a manutenção da sua forma. E quando há redução
278 de podocalixina, os pedicelos perdem o formato de dedos em luvas e passam a apresentar uma
279 característica achatada (RAATS *et al.*, 2000). Hara *et al* demonstraram o aumento da expressão
280 de podocalixina na urina de pacientes diabéticos e relataram essa proteína como um possível
281 biomarcador para diagnóstico precoce de lesões podocitárias (HARA *et al.*, 2012).

282

283 1.6 MINDIN (SPON 2, SPONDIN 2)

284 Atualmente, o marcador usado clinicamente para detectar ND é a microalbuminúria, no
285 entanto, tem limitações óbvias: nem todos os pacientes diabéticos com microalbuminúria terão
286 ND, e até 30% dos pacientes com ND apresentam níveis urinários normais de albumina (AN *et*
287 *al.*, 2009). Nos últimos 20 anos, graças aos múltiplos desenvolvimentos na biologia molecular
288 e na genômica, ocorreu a identificação de inúmeras moléculas implicadas em funções diversas
289 que refletem os vários eventos patofisiológicos da ND. Sendo assim, além das alterações
290 ultraestruturais nos podócitos e na MBG, o papel de possíveis biomarcadores envolvidos na
291 progressão da ND também vem sendo estudado. Dentre eles, destacam-se o Mindin que parece
292 estar envolvido no processo de lesão podocitária (MURAKOSHI *et al.*, 2011b). O Mindin,
293 conhecido como SPON-2 ou Spondin 2, é um membro da família de proteínas Mindin-/F-
294 spondin secretadas da MEC, foi primeiramente identificado em zebrafish sendo seletivamente
295 expressado na lâmina basal (HIGASHIJIMA *et al.*, 1997) e é uma ligante de integrina (JIA; LI;
296 HE, 2005). O mesmo foi relatado ser um biomarcador para o diagnóstico de câncer de próstata
297 (LUCARELLI *et al.*, 2013; QIAN *et al.*, 2012), posteriormente observaram que Mindin
298 aumenta a progressão do câncer prostático (ARDURA *et al.*, 2019) e que parece promover o
299 recrutamento de macrófagos na aterosclerose (LI *et al.*, 2020).

300 Murakoshi *et al* identificaram Mindin como um marcador candidato para lesão
301 podocitárias na ND. Avaliando o glomérulo e a urina de camundongos tratados com dieta

302 hipercalórica observaram que esta proteína era mais expressa quando comparado ao controle.
303 Ainda neste trabalho, evidenciaram que a urina de pacientes com DM continha mais Mindin
304 que as do controle e que essa expressão aumentava com a progressão da ND. Por meio de uma
305 cultura de podócitos isolados em meio hiperglicêmico, comparados com um meio
306 normoglicêmico, comprovaram que eram os podócitos que produziam Mindin (MURAKOSHI
307 *et al.*, 2011a). Recentemente, Kahvecioglu *et al* avaliaram a concentração em níveis séricos
308 dessa proteína. Em pacientes com DMT2, apresentaram aumentados quando comparados com
309 os níveis de pacientes saudáveis e que esse aumento era proporcional à progressão da ND
310 (KAHVECIOGLU *et al.*, 2015). Apesar disso, não há informações na literatura se esses achados
311 podem ser evidenciados no tecido renal humano.

312 Visto que o Mindin representa um possível biomarcador de lesão podocitária na ND,
313 essa proteína pode ser uma possível ferramenta para auxiliar o diagnóstico da ND,
314 possibilitando um tratamento mais assertivo e conseqüentemente melhor acompanhamento do
315 paciente quando não é possível a avaliação pela MET.

Hipótese

1 **2 HIPÓTESE**

- 2 Biópsias renais com diagnóstico de ND apresentam maior expressão da proteína
3 Mindin, e esse aumento está relacionado com o apagamento dos pedicelos. Dessa forma, a
4 Mindin pode ser um biomarcador de lesão podocitária na Nefropatia Diabética.

Justificativa

1 3 JUSTIFICATIVA

2 Dados obtidos pela IDF (2019) sugerem que a prevalência do DM aumentará nas
3 próximas décadas, sendo que a previsão até 2045 seja de 693 milhões de novos casos (CHO *et*
4 *al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2020). Cerca de 20 a 30% dos casos de DM desenvolvem ND, um
5 aumento concomitante dessa forma da doença pode acompanhar a previsão feita anteriormente,
6 resultando no aumento de sua prevalência. Dessa forma, com a grande incidência relatada de
7 DM na população mundial, é de suma importância estudos relacionados a essa doença.

8 O aumento da ND tem repercussões sociais e econômicas significativas, já que essa
9 doença é considerada a principal causa de insuficiência renal crônica e falência renal no mundo
10 (NARRES *et al.*, 2016; REUTENS; ATKINS, 2011). Mesmo dentro deste cenário, a patogênese
11 da ND ainda é obscura. Entretanto, devido à gravidade da doença, cresce o interesse em estudar
12 possíveis proteínas envolvidas nos mecanismos de lesão, assim como alterações morfológicas
13 que auxiliem no diagnóstico e estudo da progressão da ND. A literatura traz que a proteína
14 Mindin é um possível biomarcador para ND (MURAKOSHI *et al.*, 2011a). No entanto, a
15 investigação da especificidade e sensibilidade dessa proteína ainda não foi avaliada no rim de
16 paciente com ND.

17 Dessa maneira, analisar as alterações ultraestruturais dos podócitos e correlacioná-las
18 com a expressão *in-situ* do biomarcador Mindin, como também avaliar a especificidade e a
19 sensibilidade nas diferentes classes na ND, possibilitaria estimar as alterações podocitárias.

20 Além disso, são poucos os estudos que avaliam a ND em material humano,
21 especialmente visando o entendimento da patogênese e a busca por um biomarcador que retrate
22 a lesão podocitária. Sendo essa busca relevante, uma vez que além de agregar conhecimento ao
23 entendimento da patogênese da ND, provavelmente poderíamos sugerir uma possível
24 ferramenta a ser incorporada na rotina da BR a fim de auxiliar no diagnóstico assertivo quando
25 não é possível a avaliação pela MET, direcionando o tratamento mais adequado levando a um
26 melhor acompanhamento do paciente.

Objetivos

1 4 OBJETIVOS

2 4.1 OBJETIVO GERAL

3 Avaliar as alterações podocitárias e o potencial da proteína Mindin como marcador de
4 lesão podocitária em BR de rim nativo de pacientes diabéticos, diagnosticados com ND no
5 Serviço de Nefropatologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

7 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 8 I. Verificar a prevalência e realizar a caracterização clínico-epidemiológicas dos pacientes
9 diabéticos diagnosticados com ND no Serviço de Nefropatologia da UFTM no período de
10 2006 a 2019;
- 11 II. Quantificar a densidade de podócitos em BR de pacientes com diagnóstico de ND e em
12 casos controle, por meio da imunomarcagem de WT1;
- 13 III. Avaliar o potencial do biomarcador Mindin nos casos de ND em BR de pacientes com
14 diagnóstico de ND;
- 15 IV. Realizar a morfometria da espessura da MBG em BR de pacientes com diagnóstico de ND;
- 16 V. Realizar a morfometria do apagamento dos pedicelos e correlacionar com o número de
17 podócitos e com a expressão de Mindin em BR de pacientes com diagnóstico de ND.

Casuística e Métodos

1 5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

2 5.1 CASUÍSTICA

3 Foram utilizados laudos de 3337 BR, na qual foram selecionadas todas as biópsias de
4 rim nativo de pacientes diabéticos previamente diagnosticado com ND e sem doença sobreposta
5 pelo Serviço de Nefropatologia da Disciplina de Patologia Geral, da UFTM, Uberaba, Minas
6 Gerais, no período de 2006 a 2019.

7 Por meio da análise e revisão de laudos e solicitações das biópsias renais foi
8 confeccionada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) com dados epidemiológicos (idade,
9 sexo, cor e procedência), clínicos (presença de HAS, tempo de DM), laboratoriais (creatinina e
10 proteinúria), diagnóstico morfológico e classificação da ND de 52 pacientes diagnosticados
11 com ND. Entretanto, devido à falta de glomérulo, para a análise sob ML foi necessário a
12 exclusão de 1 biópsia renal, totalizando 51 biópsias utilizadas neste estudo. Na análise sob MET
13 foram excluídas 11 biópsias renais devido à ausência de amostra para análise e 4 biópsias em
14 que o material para MET estava inadequado para análise, totalizando 37 biópsias.

15 O grupo controle foi composto por 23 casos de rins de autópsias de pacientes adultos
16 com idade acima de 18 anos cuja causa de morte não foi relacionada com doença infecciosa
17 e/ou alterações renais prévias. Todos os casos controles foram analisados por um
18 nefropatologista (o mesmo que avaliou as biópsias de ND) e foram excluídos os casos que
19 apresentaram autólise, necrose tubular aguda e congestão em graus moderados a intensos. As
20 amostras do grupo controle foram obtidas do Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina
21 de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo – FMRP-USP.

22 Devido à inviabilidade dos casos de autópsias para o processamento da microscopia
23 eletrônica, o grupo controle para análise morfológica ultraestrutural foi composto por 4 casos
24 de pacientes com idade acima de 18 anos em que a biópsia renal não apresentava alterações
25 histológicas após a avaliação do nefropatologista.

26 O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFTM sob número
27 3.001.006 (Anexo C).

28

29

30

31

32

33 5.2 MÉTODOS

34 5.2.1 Diagnóstico da ND

35 O diagnóstico da ND foi realizado após avaliação das amostras por microscopia de luz
36 (ML), imunofluorescência direta (IF) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), essas
37 avaliações fazem parte da rotina do Serviço de Nefropatologia da Disciplina de Patologia Geral.
38 Na ML foram avaliadas lâminas com cortes seriados de 2 µm corados por hematoxilina e eosina
39 (HE), picro-sírius (PS), prata metenamina (PAMS) e tricrômico de masson azul (TMA). A IF
40 foi utilizada para afastar doenças sobrepostas a ND que cursam com depósitos de
41 imunoglobulinas e/ou complementos: IgG, IgM, IgA, kappa e lambda, complemento C3 e C1q,
42 e fibrinogênio. A avaliação ultraestrutural foi utilizada para descartar outras doenças, avaliar
43 os pedicelos podocitários e medir a espessura da MBG. A amostra foi fixada em Karnovsky
44 2,5% + vermelho de rutênio 0,2% e, pós fixado em tetróxido de ósmio a 2%. Em seguida, foi
45 desidratada gradualmente com uma série de soluções de etanol e acetona e emblocada em resina
46 Epon 812. Foram feitos cortes inicialmente semifinos de 0,5µm, e após a seleção dos
47 glomérulos para o estudo, os cortes ultrafinos de 60 nm para a análise ultraestrutural.

48

49 5.2.2 Classificação da Nefropatia Diabética e avaliação extraglomerular

50 Após a avaliação sob ML e MET para avaliação das lesões glomerulares, as amostras
51 foram classificadas de acordo com a Classificação da ND publicada em 2010 pelo Comitê de
52 Pesquisa da Sociedade Internacional de Patologia Renal classificando as lesões glomerulares
53 em classe I, IIa, IIb, III e IV. As BR também foram avaliadas quanto ao grau de fibrose
54 intersticial e a atrofia tubular (FI/AT) pela porcentagem da área cortical acometida: score 0:
55 sem FI/AT, score 1: <25% FI/AT, score 2: entre 25% a 50% e score 3: > 50% (TERVAERT *et*
56 *al.*, 2010).

57

58 5.2.3 Análise ultraestrutural dos podócitos/pedicelos

59 O apagamento dos pedicelos foi avaliado quantitativamente por MET (Zeiss EM-900).
60 A quantificação foi realizada por meio do software ImageJ, utilizando todas as imagens digitais
61 obtidas no aumento de 7000x de cada caso. O sistema foi calibrado usando a barra de escala
62 das imagens digitais. Em cada imagem digital foi medido o comprimento (µm) da alça
63 glomerular e dividido pelo número de pedicelos da respectiva alça. Ao final da análise de cada
64 biópsia foi realizado a média dos valores obtidos de cada caso e essa média passou pelo fator

65 de correção $\pi/4$ para corrigir a variação aleatória presumida no ângulo da secção em relação ao
 66 eixo longo do podócito (VAN DEN BERG *et al.*, 2004). Para cada paciente, a média da largura
 67 do pedicelo foi expressa em nanômetros (nm).

68

69 **5.2.4 Morfometria ultraestrutural da Membrana Basal Glomerular (MBG)**

70 Para a análise da morfometria ultraestrutural da MBG, foram selecionadas as imagens
 71 capturadas durante a avaliação na MET. Estas imagens digitais foram feitas no aumento de
 72 12000x de pelo menos duas alças capilares completas de dois glomérulos diferentes, com
 73 aproximadamente 100 medidas ou mais para cada biópsia (número de medidas foi dependente
 74 do tamanho da alça capilar), com auxílio do programa Image J. A espessura da MBG foi medida
 75 pelo menos 5 vezes em cada imagem. A espessura da MBG foi feita medindo-se a distância
 76 entre a membrana citoplasmática do endotélio até a membrana citoplasmática do
 77 podócito/pedicelo. Após a morfometria, foi calculada a média, mediana, desvio padrão (DP),
 78 mínimo e máximo da espessura da MBG referente a cada biópsia (HAAS, 2009). De acordo
 79 com a Classificação da ND (TERVAERT *et al.*, 2010), é considerada espessada a MBG maior
 80 que 395 nm para mulheres e maior que 430 nm para homens.

81

82 **5.2.5 Imuno-histoquímica para Mindin (Spondin 2 ou SPON2) e WT1**

83 A imuno-histoquímica foi realizada manualmente em uma lâmina proveniente do
 84 material parafinado, utilizando o sistema de polímero não biotinizado Novolink (Kit Novolink
 85 Polymer Detection System, BL, UK, lote 6067432).

86 Para a realização da imuno-histoquímica indireta (imunoperoxidase) foram utilizados
 87 os seguintes anticorpos primários (Tabela 1):

88 Tabela 1 – Anticorpos WT1 e SPON2

Anticorpo primário	Marca	Clone/Código	Tampão de recuperação antigênica	Concentração
Monoclonal mouse anti-human Wilms' tumor 1 (WT1)	Dako	M3561	Citrato pH 6.0	1:500
Anti-SPON2 antibody	Abcam	Ab187920	EDTA	1:1000

89 Fonte: Elaborada pelo Autor, 2021.

90

91 Os cortes de 2µm foram fixados nas lâminas com organossilano, posteriormente
92 desparafinizados em xilol, hidratados em álcoois decrescentes até água destilada. Foi realizado
93 o processo de recuperação antigênica utilizando o tampão citrato pH 6,0 para o anticorpo WT1
94 e o tampão EDTA pH 9,0 para o anticorpo SPON2, na panela Pascal (DAKO) à 121°C e 18 psi.
95 Após essa etapa, os cortes foram novamente lavados com tampão PBS e incubados em câmara
96 úmida e escura com uma gota de bloqueador de peroxidase (Peroxidase block, Kit Novolink
97 Polymer Detection System, BL, UK) por 25 minutos. Após, as lâminas foram incubadas com o
98 bloqueador de proteínas (Protein block Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK) por
99 25 minutos. Em seguida, incubados com anticorpos primários anti-WT1 (Dako) (conforme
100 especificação do fabricante) por 2 horas em câmara úmida à temperatura ambiente e com o
101 anticorpo anti-SPON2 overnight na geladeira. Os cortes foram lavados com PBS e incubados
102 com o reagente pós-primário (Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK) por 25
103 minutos à temperatura ambiente, depois foram lavadas com PBS e incubadas com o reagente
104 polímero (Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK) por 25 minutos. Após, foram
105 lavados com PBS e incubados com o cromógeno (Liquid DAB, DAKO) por 2 minutos. Em
106 seguida, lavados com água corrente e contra-corados em Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
107 A posteriori, os cortes foram desidratados em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%),
108 diafanizados em xilol (I, II e III) e montados com meio de montagem permanente e lamínula.
109 Os cortes foram avaliados sob microscopia de luz e avaliadas quanto ao local e à intensidade
110 da expressão dos marcadores.

111

112 **5.2.6 Quantificação das imunomarcações Mindin (Spondin 2 ou SPON2) e WT1**

113 Todos os glomérulos das biópsias renais e 10 glomérulos dos fragmentos de rim de
114 autópsia foram avaliados. Para as imunomarcações do anticorpo SPON2, as células
115 imunomarcadas que apresentaram coloração acastanhada intensa foram marcadas pelo
116 observador utilizando o sistema analisador de imagens interativo AxionCam ICc 5 (Zeiss®) em
117 objetiva de 40x (aumento final de 1.600x). Os resultados foram expressos em porcentagem de
118 área marcada em relação ao total de campos avaliados.

119 Para quantificar as imunomarcações do anticorpo WT1, foi utilizado o sistema
120 analisador de imagens interativo AxionCam ICc 5 (Zeiss®) para a captura das imagens digitais
121 e foram quantificados os podócitos marcados de todos os glomérulos da amostra na objetiva de
122 40x (aumento final de 1.600x) pelo programa ImageJ 1.53. Os resultados foram expressos em
123 densidade de células ($\text{pods}/\times 10^6 \mu\text{m}^3$) (VENKATAREDDY *et al.*, 2014).

124

125 **5.2.7 Cálculo para estimar taxa de filtração glomerular**

126 Mediante à falta dos dados de TFG e de albuminúria, calculamos a taxa de filtração
127 glomerular estimada (TFGe) como parâmetro para avaliar a função renal dos casos de ND. Para
128 calcular utilizamos a fórmula CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)
129 que necessita de algumas informações para ser calculada: sexo, raça, idade e creatinina (mg/dL)
130 (LEVEY *et al.*, 2009). $TFG (mL / min / 1,73 m^2) = 141 \times \min (creatinina\ sérica / k, 1)^\alpha \times$
131 $\max (creatinina\ sérica / k, 1) - 1,209 \times 0,993 Idade \times 1,018$ (se feminino) $\times 1,159$ (se preto),
132 onde k é 0,9 para homens e 0,7 para mulheres, α é -0,411 para homens e -0,329 para mulheres,
133 min indica creatinina sérica mínima / k ou 1 e max indica creatinina sérica máxima / k ou 1. A
134 DRC é classificada em cinco estágios de acordo com a TFGe: Estágio 1 (TFG normal ou
135 elevada: ≥ 90 mL/min/1.73m²); Estágio 2 (TFG levemente reduzida: 60-89 mL/min/1.73m²);
136 Estágio 3a (moderada redução da TFG: 45-59 mL/min/1.73m²); Estágio 3b (redução marcada
137 da TFG: 30-44 mL/min/1.73m²); Estágio 4 (redução grave da TFG: 15-29 mL/min/1.73m²);
138 Estágio 5 (insuficiência renal: TFG<15 mL/min/1.73m²) (LEVEY *et al.*, 2011).

139

140 **5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

141 Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica (Microsoft Excel) e a
142 análise dos dados foi realizada no programa Graphpad prism versão 7.0. As variáveis foram
143 testadas para verificar a normalidade por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, e também foi
144 feito a análise da variância. Quando a distribuição foi normal e os grupos homogêneos, utilizou-
145 se testes paramétricos. Na comparação entre dois grupos, o teste “t” de Student e três ou mais
146 grupos ANOVA. Quando a distribuição não foi normal, aplicamos testes não paramétricos, na
147 comparação entre os dois grupos, o teste de Mann-Withney (U) e três ou mais grupos Kruskal-
148 Wallis (H). As proporções foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Para correlações entre
149 duas variáveis de distribuição não normal foi utilizado o teste de Spearman (rS). O desempenho
150 de diagnóstico dos biomarcadores testados na biopsia renal foi avaliado pela sensibilidade e
151 especificidade por meio da utilização da curva ROC (Receiver Operating Characteristic). A
152 área sob a curva ROC (Area Under curve – AUC), intervalos de confiança de 95% e os pontos
153 de corte foram calculados usando métodos paramétrico/não-paramétrico. As diferenças foram
154 consideradas estatisticamente significantes quando “p” foi menor que 5% (p<0.05).

Resultados

1 6 RESULTADOS

2 6.1 PERFIL CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICO

3 Das 51 biópsias renais com diagnóstico de ND, selecionadas do Serviço de
4 Nefropatologia a maioria era do sexo masculino 29 (56,87%) com idade média de 51,34 ± 15,18
5 anos. Quanto a cor, 29 (56,86%) eram brancos, 8 (15,69%) pardos, 3 (5,88%) eram pretos e 11
6 (21,57%) não foram informados (NI).

7 O grupo controle foi composto por 23 casos de BR com diagnóstico de ND, destes, 12
8 (52,17%) eram do sexo masculino e 11 (47,83%) do sexo feminino. O grupo apresentava idade
9 média de 47±16,57 anos. As características epidemiológicas dos casos foram demonstradas na
10 tabela 2.

11 Tabela 2 – Caracterização epidemiológica do grupo controle e do grupo ND

	Grupo Controle (n=23)	Grupo ND (n=51)
Sexo n (%)		
<i>Masculino</i>	12 (52,17%)	29 (56,87%)
<i>Feminino</i>	11 (47,83%)	22 (43,13%)
Idade (anos)		
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	44 (19-80)	53,5 (23-75)
<i>Média ± DP</i>	47±16,57	51,34 ± 15,18
Cor n (%)		
<i>Branco</i>		29 (56,86%)
<i>Pardo</i>		8 (15,69%)
<i>Preto</i>		3 (5,88%)
<i>NI</i>		11 (21,57%)

12 Fonte: Elaborada pelo Autor, 2021.

13 n: Número de casos

14 ND: Nefropatia diabética

15 Min: Mínimo

16 Máx: Máximo

17 DP: Desvio padrão

18 NI: Não informado

19

20 Em relação aos dados clínicos e laboratoriais, os pacientes selecionados no grupo ND
21 apresentaram o índice de massa corporal (IMC) com média 26,48 ± 13,04 Kg/m², a maioria era
22 hipertenso 32 (62,74%) e o tempo médio de evolução do diabetes foi de 12,47 ± 8,49 anos. O

23 nível de creatinina sérica foi de $2,22 \pm 1,55$ mg/dL e a média da TFGe foi de $46,71 \pm 35,32$
 24 mL/min/1,73m². A maioria dos pacientes apresentaram proteinúria nefrótica, com média de
 25 $5,29 \pm 4,50$ g/dia e a média do nível de ureia foi de $79,98 \pm 49,24$ mg/dL (Tabela 3).

26 Tabela 3 – Caracterização clínico-laboratorial dos casos com ND submetidos à biópsia renal

Grupo ND	
(n=51)	
IMC (Kg/m²)	
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	25,39 (13,04-39,35)
<i>Média ± DP</i>	26,48 ± 13,04
HAS n (%)	
<i>Sim</i>	32 (62,74%)
<i>Não</i>	8 (15,69%)
<i>NI</i>	11 (21,57%)
Tempo DM (anos)	
<i>Mediana (Mín-Máx)</i>	11,5 (1-30)
<i>Média ± DP</i>	12,47 ± 8,49
Creatinina (mg/dL)	
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	1,9 (0,7-8,3)
<i>Média ± DP</i>	2,22 ± 1,55
TFGe (mL/min/1,73m²)	
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	33,20 (4,8-136,7)
<i>Média ± DP</i>	46,71 ± 35,32
Proteinúria (g/dia)	
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	3,85 (0,08-16)
<i>Média ± DP</i>	5,29 ± 4,50
Ureia (mg/dL)	
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	70 (24-189)
<i>Média ± DP</i>	79,98 ± 49,24

27 Fonte: Elaborada pelo Autor, 2021.

28 n: Número de casos

29 ND: Nefropatia diabética

30 IMC: Índice de massa corporal

31 Mín: Mínimo

32 Máx: Máximo

33 DP: Desvio padrão

- 34 HAS: Hipertensão arterial sistêmica
 35 NI: Não informado
 36 DM: Diabetes Mellitus
 37 TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada
 38 mg: Miligrama
 39 dL: Decilitro

40

41 6.2 PERFIL MORFOLÓGICO

42 Na avaliação morfológica, dentre as 51 biópsias renais analisadas, a maioria foi
 43 classificada em Classe III (n=32; 62,75%) seguida pela Classe IV (n=14; 27,45%) (Tabela 4).

44 Tabela 4 – Classificação morfológica do grupo ND

	Grupo ND (n=51)
Classes ND (n)	
<i>Classe I</i>	1 (1,96%)
<i>Classe IIa</i>	2 (3,92%)
<i>Classe IIb</i>	2 (3,92%)
<i>Classe III</i>	32 (62,75%)
<i>Classe IV</i>	14 (27,45%)

45 Fonte: Elaborada pelo Autor, 2021.

46 n: Número de casos

47 ND: Nefropatia diabética

48

49 A média da espessura ultraestrutural da MBG no grupo ND foi de $727,083 \pm 367,859$
 50 nm e a largura dos pedicelos apresentou um média de $731,346 \pm 365,769$ nm, conforme tabela
 51 5.

52 Tabela 5 –Análise morfológica ultraestrutural

	Grupo Controle (n=4)	Grupo ND (n=36)
Espessura MBG (nm)		
<i>Mediana (Mín-Máx)</i>	375,868 (337,882 – 452,99)	726,101 (430,217 – 1158,142)
<i>Média ± DP</i>	$385,652 \pm 431,214$	$727,083 \pm 367,859$
Apagamento dos pedicelos (nm)		
<i>Mediana (Mín-Máx)</i>	470,586 (461,281– 567,802)	743,246 (273,222 – 1286,431)

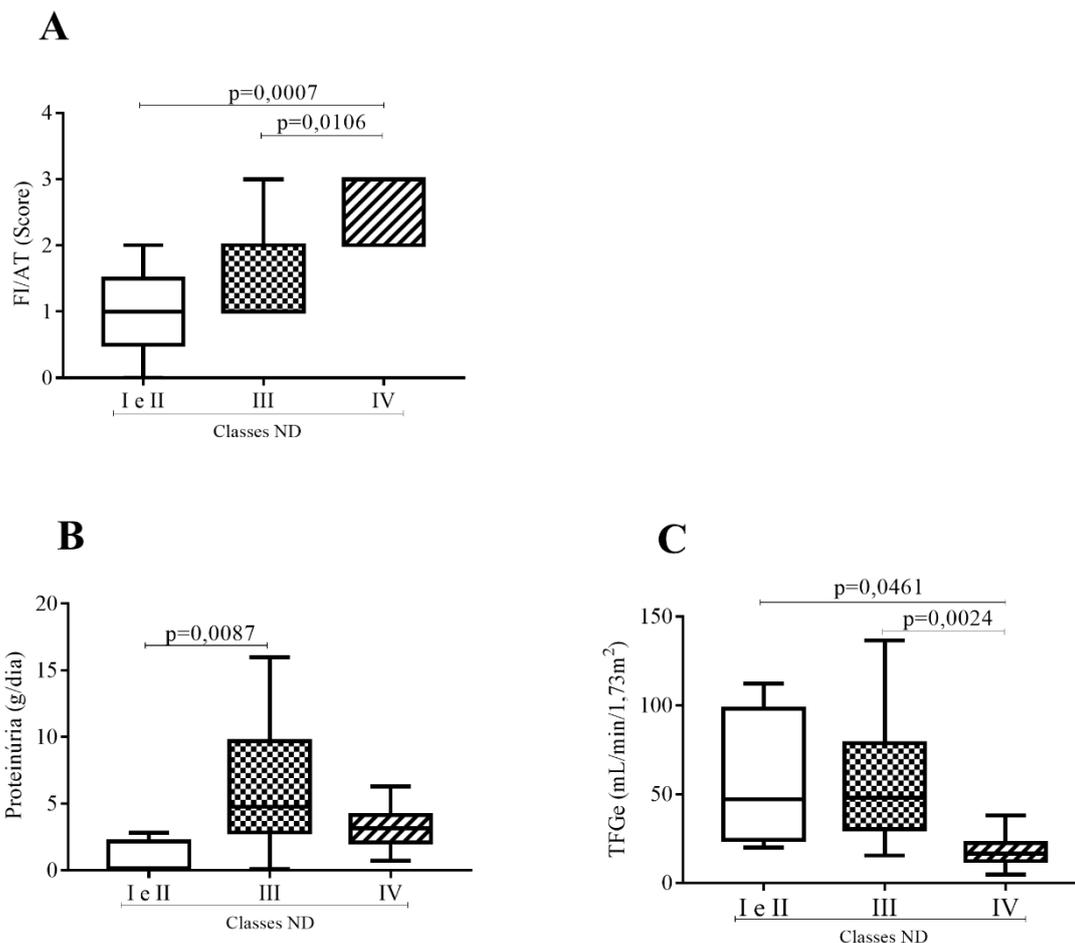
<i>Média ± DP</i>	492,564 ± 439,36	731,346 ± 365,769
-------------------	------------------	-------------------

53 Fonte: Elaborada pelo Autor, 2021.
54 n: Número de casos
55 ND: Nefropatia diabética
56 MBG: Membrana basal glomerular
57 Mín: Mínimo
58 Máx: Máximo
59 DP: Desvio padrão
60 nm: Nanômetro

61 6.3 ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA EXTRAGLOMERULAR E DOS DADOS CLÍNICOS 62 NAS DIFERENTES CLASSES DA ND

63 Ao avaliar os scores da FI/AT nas classes da ND, observou-se que o score foi maior na
64 classe IV quando comparado com a classe III e as classes iniciais (I e II). Entretanto, não houve
65 diferença significativa entre as classes iniciais (I e II) e a classe III ($p < 0,0004$; $H = 15,9$; pós teste
66 Dunn: I e II vs IV $p = 0,0007$; III vs IV $p = 0,0106$, Figura 4A). Ao analisar o nível de proteinúria
67 entre as classes, foi observado que os pacientes da Classe III apresentaram níveis de proteinúria
68 significativamente maiores que os da Classes I e II ($p < 0,0062$; $H = 10,16$; pós teste Dunn: I e II
69 vs IV $p = 0,0087$, Figura 4B). O mesmo não foi observado entre a Classes III e IV, como também
70 não foi evidenciado entre as classes I e II quando comparados com a classe IV. Ainda avaliando
71 os parâmetros clínicos do grupo ND entre as classes, foi evidenciado que há uma diminuição
72 da TFGe de acordo com a evolução das classes na ND ($p < 0,0025$; $H = 11,95$; pós teste Dunn: I
73 e II vs IV $p = 0,0461$; III vs IV $p = 0,024$, Figura 4C). A TFGe foi significativamente menor na
74 classe IV quando comparado com as classes iniciais (I e II) e a classe III. Porém, não houve
75 diferença entre as classes I e II com a classe III.

76 Figura 4 – FI/AT, proteinúria e TFGe nas classes da ND



77

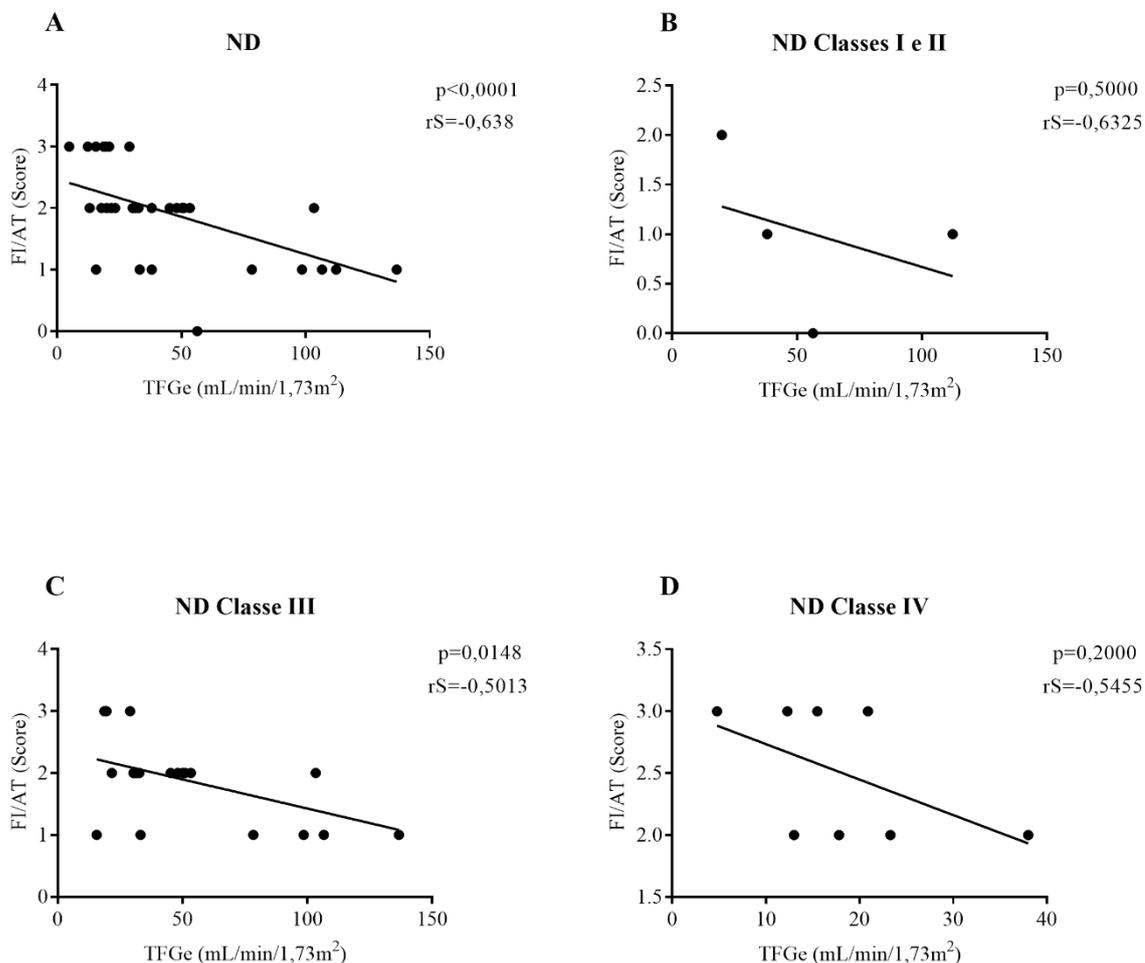
78 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

79 A) Fibrose intersticial e atrofia tubular, avaliada em score, nas diferentes classes da ND. B) Níveis de proteinúria
 80 (g/dia) nas diferentes classes da ND. C) Taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nas diferentes classes da
 81 ND. Teste de Kruskal Wallis (H) seguido do pós-teste de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas,
 82 as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,05$.

83

84 Correlacionando os scores de FI/AT e a TFGe, foi observado uma correlação negativa
 85 e significativa ($p < 0,0001$; $rS = -0,638$). Entre as classes da ND, a FI/AT correlacionou-se de
 86 forma negativa e significativa apenas com a classe III ($p < 0,0148$; $rS = -0,5013$), conforme
 87 Figuras 5A-D.

88 Figura 5 – Correlação FI/AT e TFGe



89

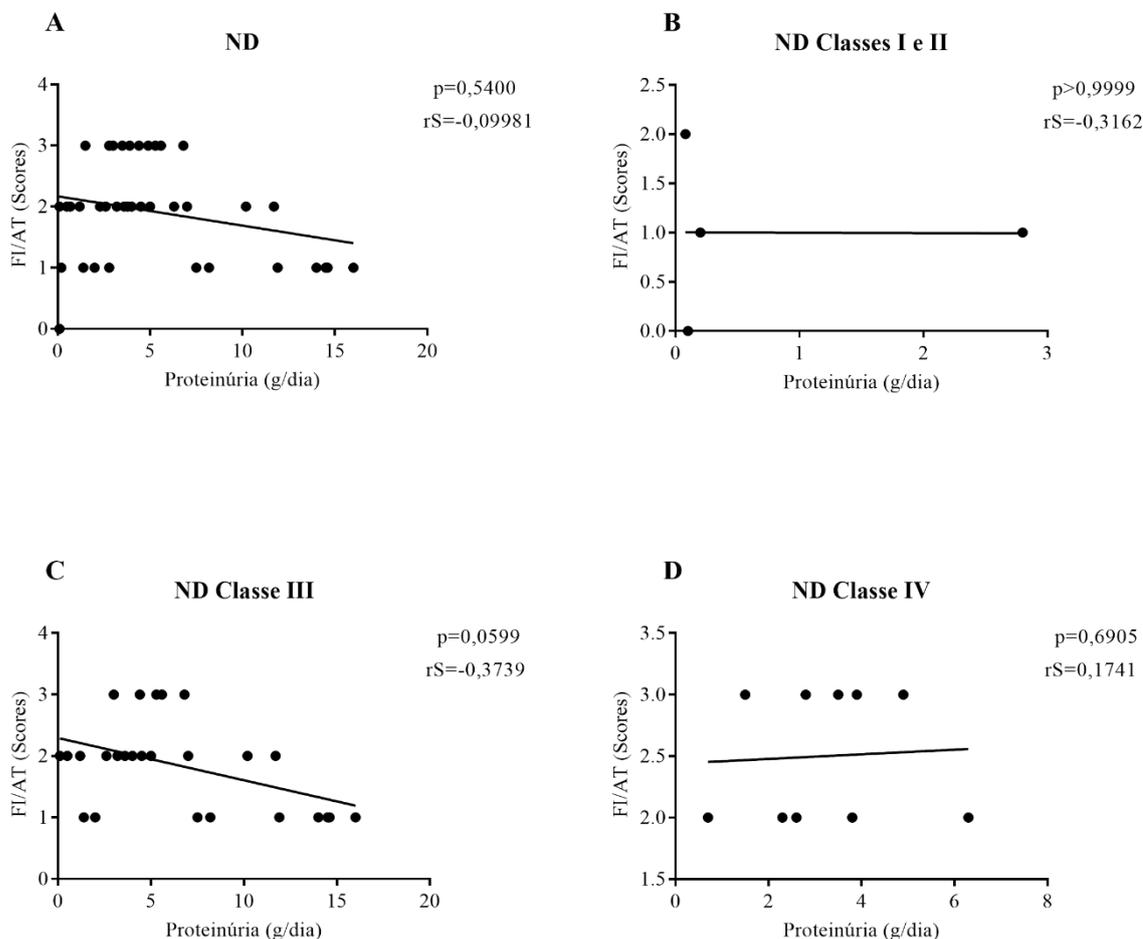
90 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

91 Correlação entre a fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT), avaliada em score, e a taxa de filtração glomerular
92 estimada (TFGe) nas classes da ND. Correlação de Spearman (rS). p<0,05.

93

94 A correlação entre FI/AT e proteinúria não foi significativa, no entanto avaliando as
95 classes obtivemos uma tendência de correlação negativa na classe III (p<0,0599; rS= -0,3739,
96 Figura 6).

97 Figura 6 – Correlação de FI/AT e proteinúria



98

99 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

100 Correlação entre a fibrose intersticial e atrofia tubular (FI/AT), avaliada em scores, e a proteinúria (g/dia) nos
101 grupos ND e nas classes da ND. Correlação de Spearman (rS). $p<0,05$.

102

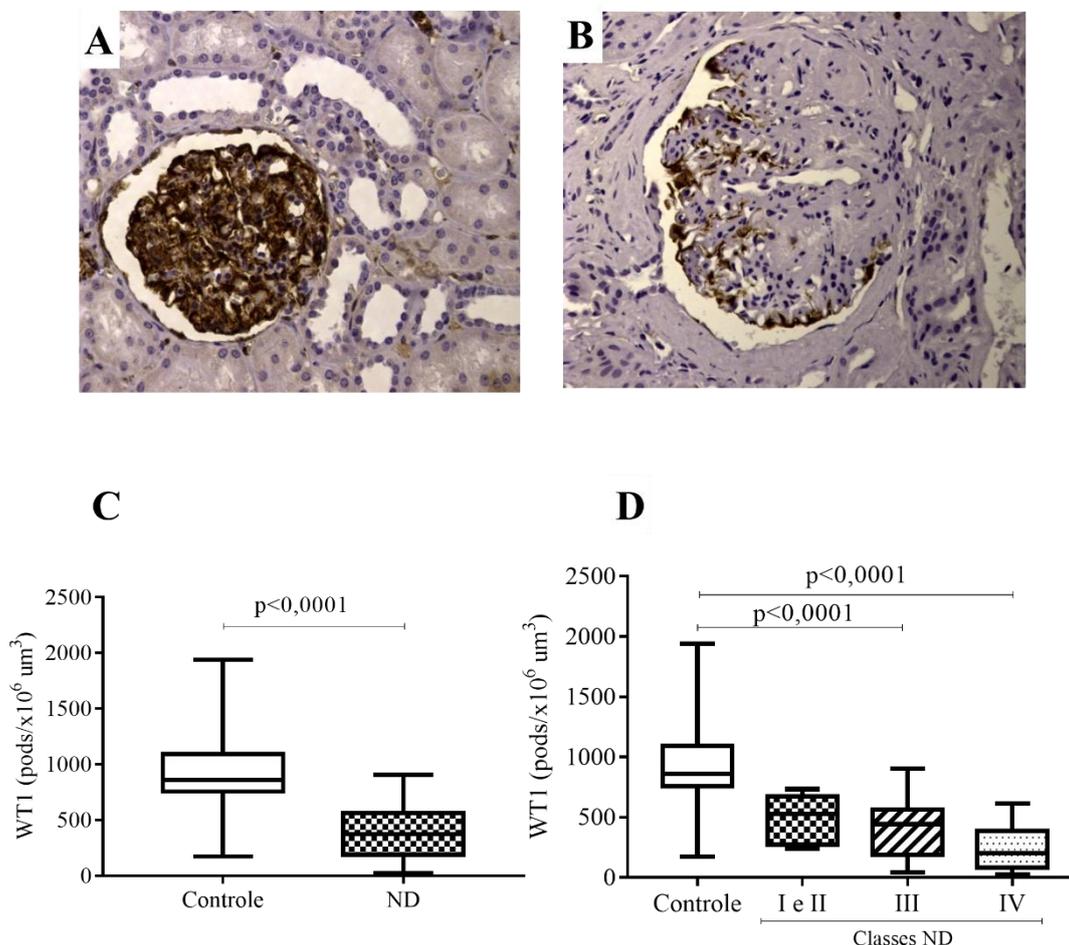
103 6.4 AVALIAÇÃO DA LESÃO DOS PODÓCITOS NA NEFROPATIA DIABÉTICA

104 Para avaliar os podócitos na ND foi realizado a imunomarcagem do anticorpo WT1, que
105 é um marcador de podócitos, a fim de quantificar o número de podócitos nas amostras (Figuras
106 7A e B). Foi observado que o grupo ND apresenta menor expressão de WT1 em relação ao
107 grupo controle ($p<0,0001$; $U=120$, Figura 7C), o que mostra que há uma menor quantidade de
108 podócito na ND.

109 Em relação às classes da ND e à expressão de WT1, foi observado que não houve
110 diferença entre as classes. No entanto, as classes III e IV apresentaram diferença significativa
111 com o controle, mas essa diferença não foi encontrada entre as classes iniciais (I e II) com o

112 controle ($p < 0,0001$; $H = 31,91$; pós teste Dunn: controle vs III $p < 0,0001$; controle vs IV
 113 $p < 0,0001$, Figura 7D).

114 Figura 7 – Expressão de WT1 nos grupos controle e ND



115

116 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

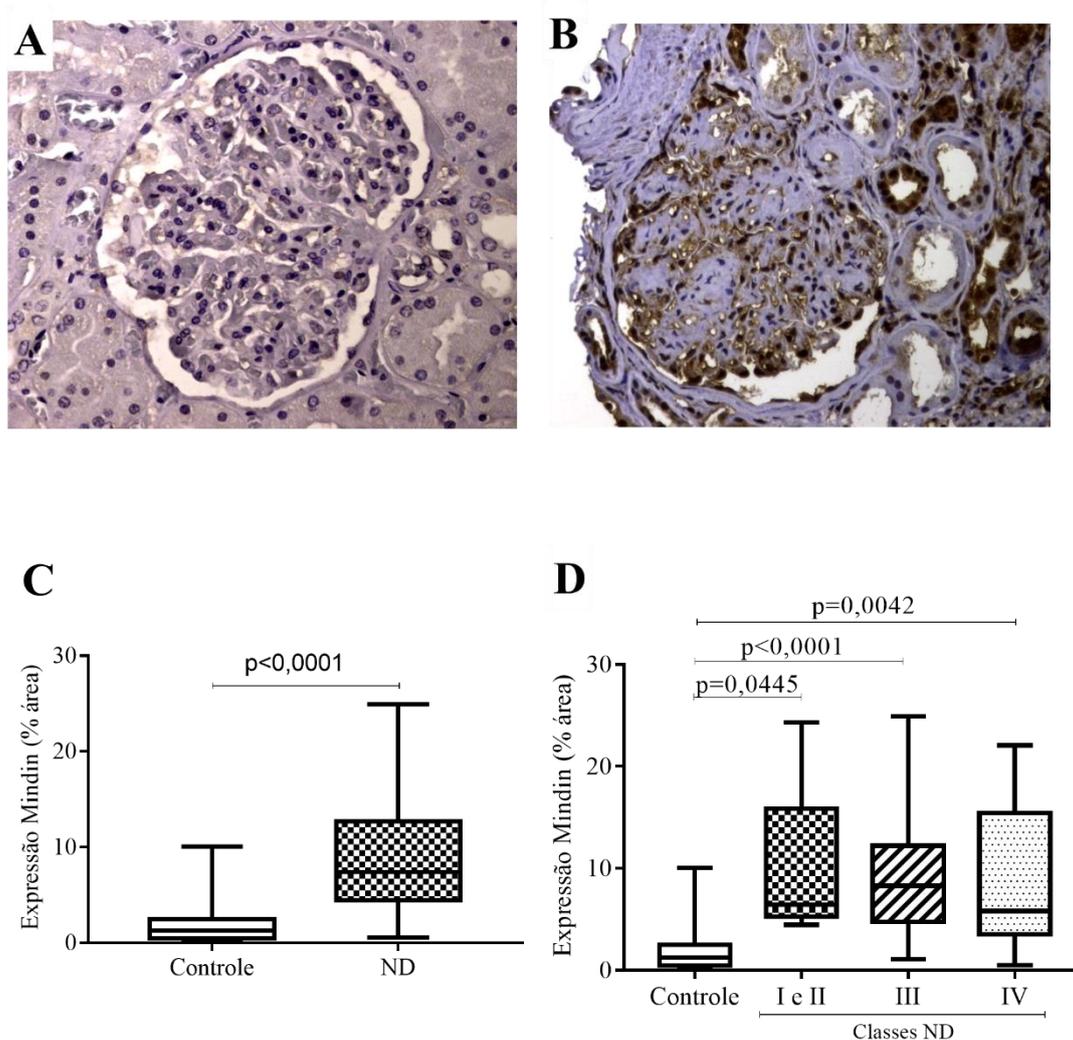
117 A) Expressão de WT1 no compartimento glomerular no grupo controle (400X). B) Expressão de WT1 no
 118 compartimento glomerular em um caso de ND (400X). C) Expressão de podócitos marcados pelo anticorpo
 119 WT1 nos grupos controle e ND. Teste de Mann Whitney (U). D) Expressão de podócito marcados pelo anticorpo
 120 WT1 nos grupos controle e nas classes ND. Teste de Kruskal Wallis (H) seguido do pós-teste de Dunn. As linhas
 121 horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam
 122 os percentis 10-90%. $p < 0,05$.

123

124 Uma vez que observamos que houve redução de podócitos na ND, buscamos avaliar a
 125 extensão da lesão podocitária nessas biópsias de ND. Para isso, utilizamos a proteína Mindin
 126 (Figuras 8A e 8B), que tem sido cogitado como um marcador de lesão podocitária e observamos
 127 que os pacientes com ND apresentaram uma maior expressão de Mindin quando comparado
 128 com o controle ($p < 0,0001$; $U = 151$, Figura 8C). Mostrando que, provavelmente, existe uma
 129 lesão podocitária na ND.

130 Já a expressão de Mindin não apresentou diferença significativa entre as classes, o que
 131 observamos foi o aumento da Mindin nas classes quando comparado com o grupo controle
 132 ($p < 0,0001$; $H = 25,63$; pós teste Dunn: controle vs I e II $p = 0,0445$; controle vs III $p < 0,0001$;
 133 controle vs IV $p = 0,0042$, Figura 8D).

134 Figura 8 – Expressão de Mindin nos grupos controle e ND



135

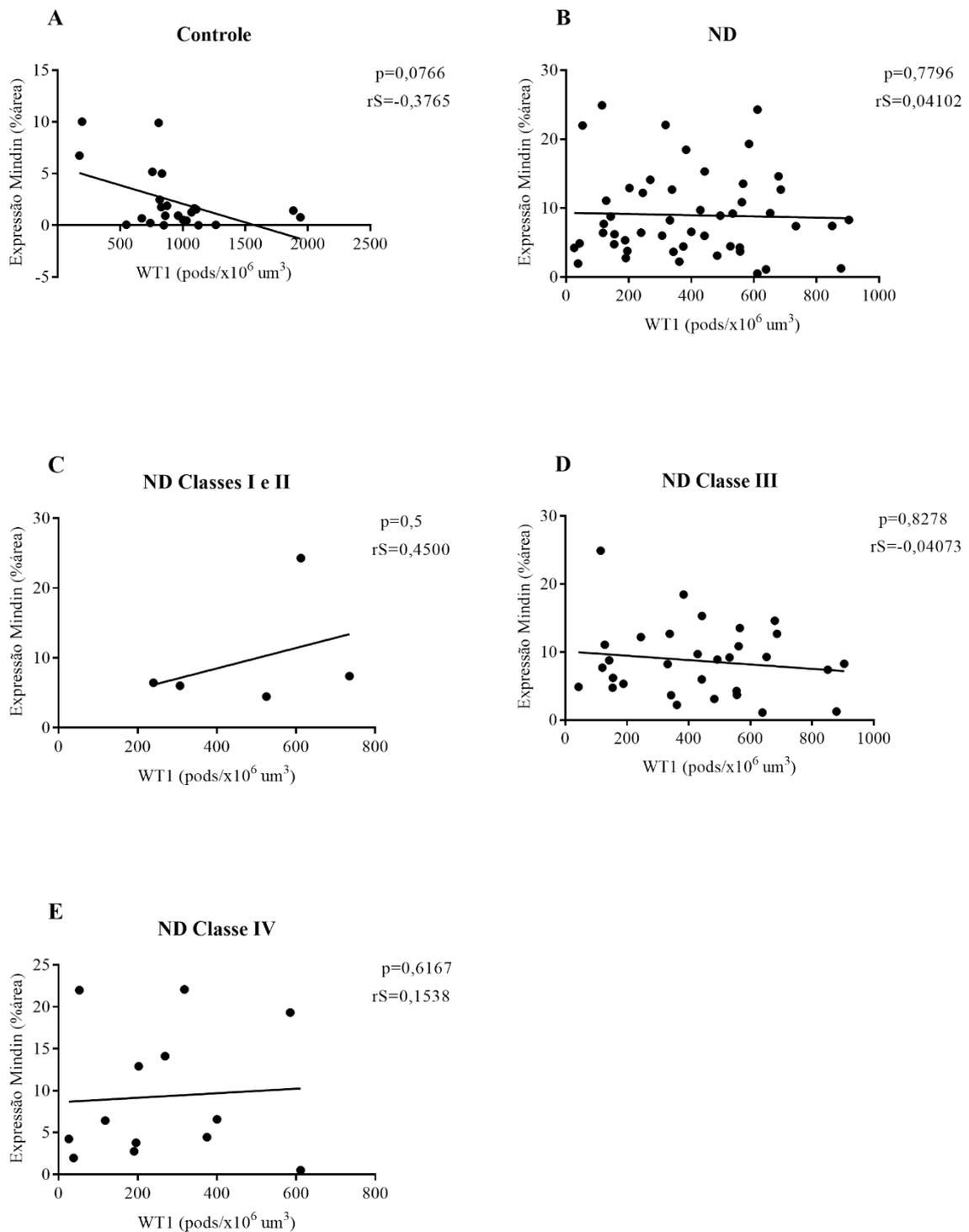
136 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

137 A) Imunomarcção do anticorpo Mindin no compartimento glomerular no grupo controle (400X). B)
 138 Imunomarcção do anticorpo Mindin no compartimento glomerular em um caso com ND (400X). C) Porcentagem
 139 de área marcada pelo anticorpo Mindin nos podócitos dos grupos controle e ND. Teste de Mann Whitney (U). D)
 140 Porcentagem de área marcada pelo anticorpo Mindin nos podócitos dos grupos controle e nas classes ND. Teste
 141 de Kruskal Wallis (H) seguido do pós-teste de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras
 142 representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,05$.

143

144 Como foi encontrado diferença significativa na expressão de WT1 e Mindin entre o
145 grupo controle e ND, buscamos analisar a correlação entre a expressão dessas proteínas, mas
146 não houve diferença significativa mesmo avaliando as classes separadamente (Figuras 9A-E).

147 Figura 9 – Correlação entre a expressão de Mindin e WT1



148

149 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

150 Correlação entre a expressão de podócito marcados pelo anticorpo WT1 e porcentagem de área marcada pelo
151 anticorpo Mindin nos podócitos dos grupos controle e nas classes da ND. Correlação de Spearman (rS). $p < 0,05$.

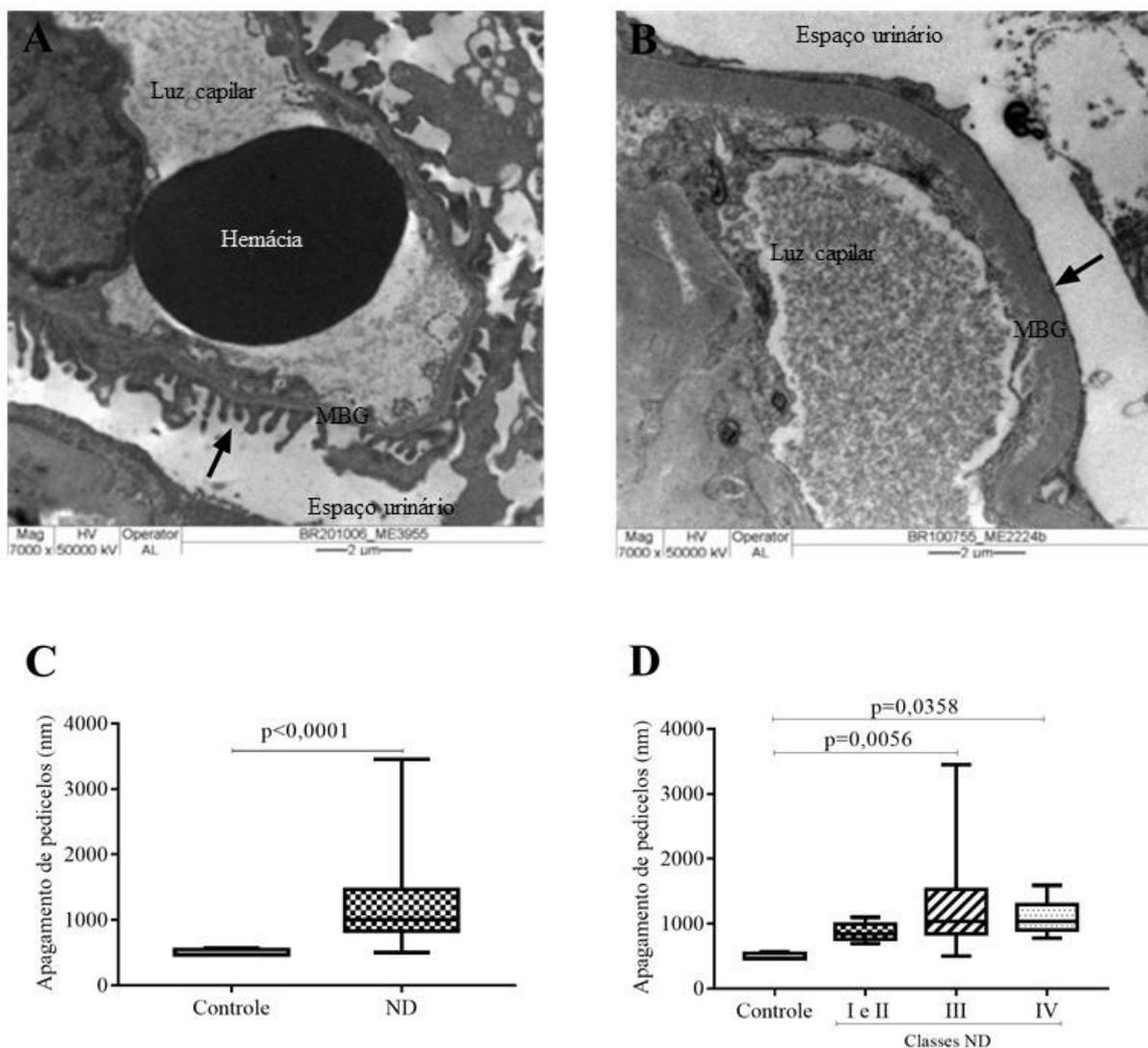
152

153 6.5 A BARREIRA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR ENCONTRA-SE ALTERADA NA

154 ND

155 Devido os achados que remetem a lesão podocitária e à literatura trazer que uma das
156 lesões podocitárias presente na ND é o apagamento dos pedicelos, o nosso próximo objetivo
157 foi avaliar essa alteração ultraestrutural (Figuras 10A e 10B). Na avaliação foi observado um
158 aumento na largura dos pedicelos que evidencia um maior apagamento dos pedicelos no grupo
159 ND em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$; $U=1$, Figura 10C). Quando avaliado o apagamento
160 dos pedicelos nas classes, observamos que o grupo controle apresentou apagamento dos
161 pedicelos significativamente menor em relação as classes III e IV da ND ($p < 0,0066$; $H=14,49$;
162 pós teste Dunn: controle vs III $p=0,0056$; controle vs IV $p=0,0358$). Foi evidenciado que as
163 classes iniciais (I e II) têm mais apagamento que o grupo controle, porém não há diferença
164 significativa. Também não foi observada diferença significativa entre as classes, conforme
165 Figura 10D.

166 Figura 10 – Apagamento de pedicelos nos grupos controle e ND



167

168 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

169 A) Pedicelos normais (seta) visualizado pela MET no grupo controle (7000X). B) Apagamento dos pedicelos (seta)
 170 visualizado pela MET em caso de ND (7000X). C) Apagamento dos pedicelos dos grupos controle e ND. Teste de
 171 Mann Whitney (U). D) Apagamento dos pedicelos dos grupos controle e nas diferentes classes da ND. Teste de
 172 Kruskal Wallis seguido do pós-teste de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras
 173 representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,05$.

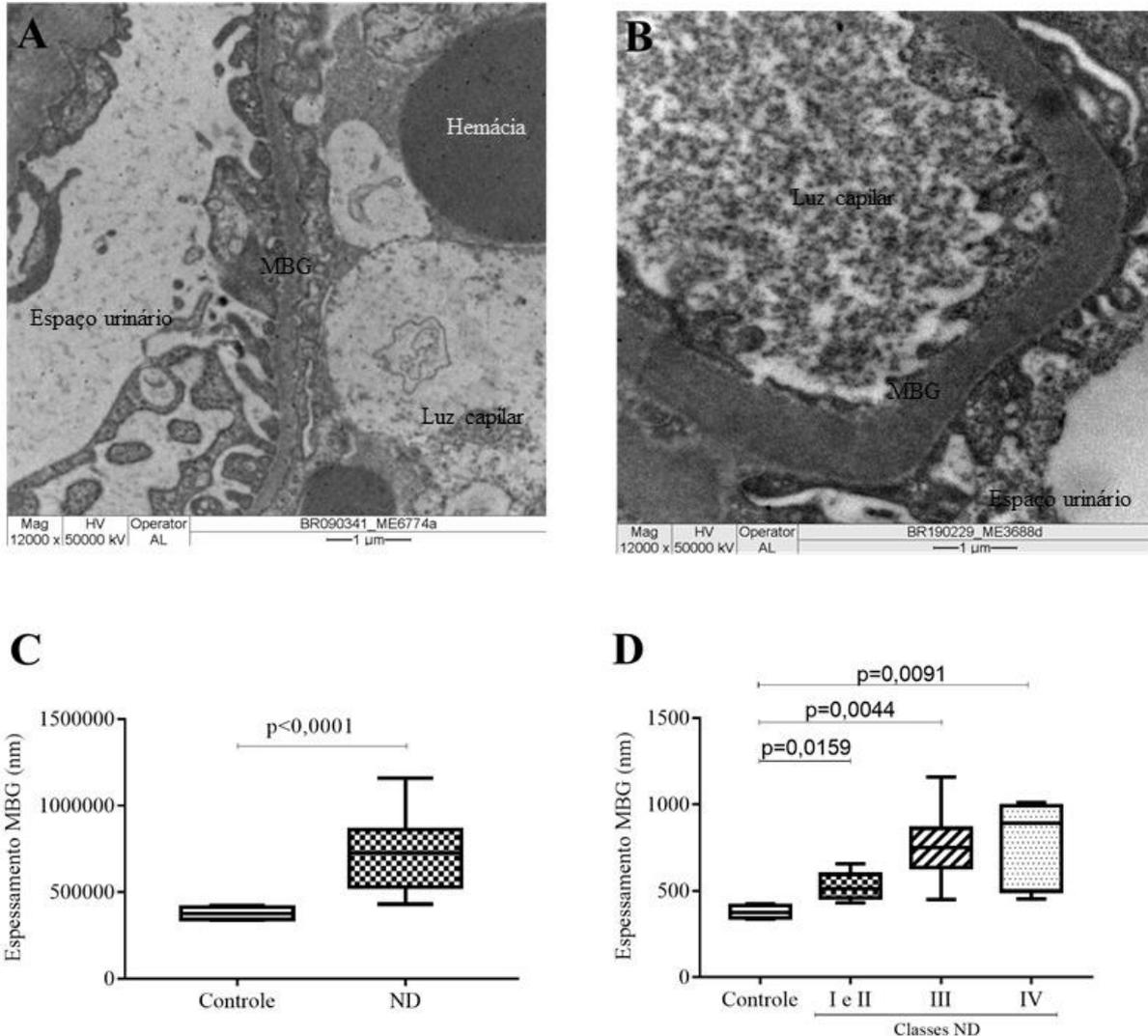
174

175

176 Na avaliação ultraestrutural da espessura da MBG (Figuras 11A e 11B), que é de suma
 177 importância na patogênese da ND, especialmente na classe I, na qual o diagnóstico é feito
 178 exclusivamente por essa alteração morfológica, foi observado que houve um aumento
 179 significativo da espessura da MBG no grupo ND em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$; $U = 0$,
 180 Figura 11C). Quando avaliado a morfometria ultraestrutural da espessura da MBG nas
 181 diferentes classes da ND, houve diferença significativa entre o controle e todas classes
 ($p = 0,0011$; $H = 15,97$; pós teste Dunn: controle vs I e II $p = 0,0159$; controle vs III $p = 0,0044$;

182 controle vs IV $p=0,0091$, Figura 11D). Entretanto, não houve diferença significativa entre as
 183 classes.

184 Figura 11 – Espessura da membrana basal glomerular nos grupos controle e ND



185

186 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

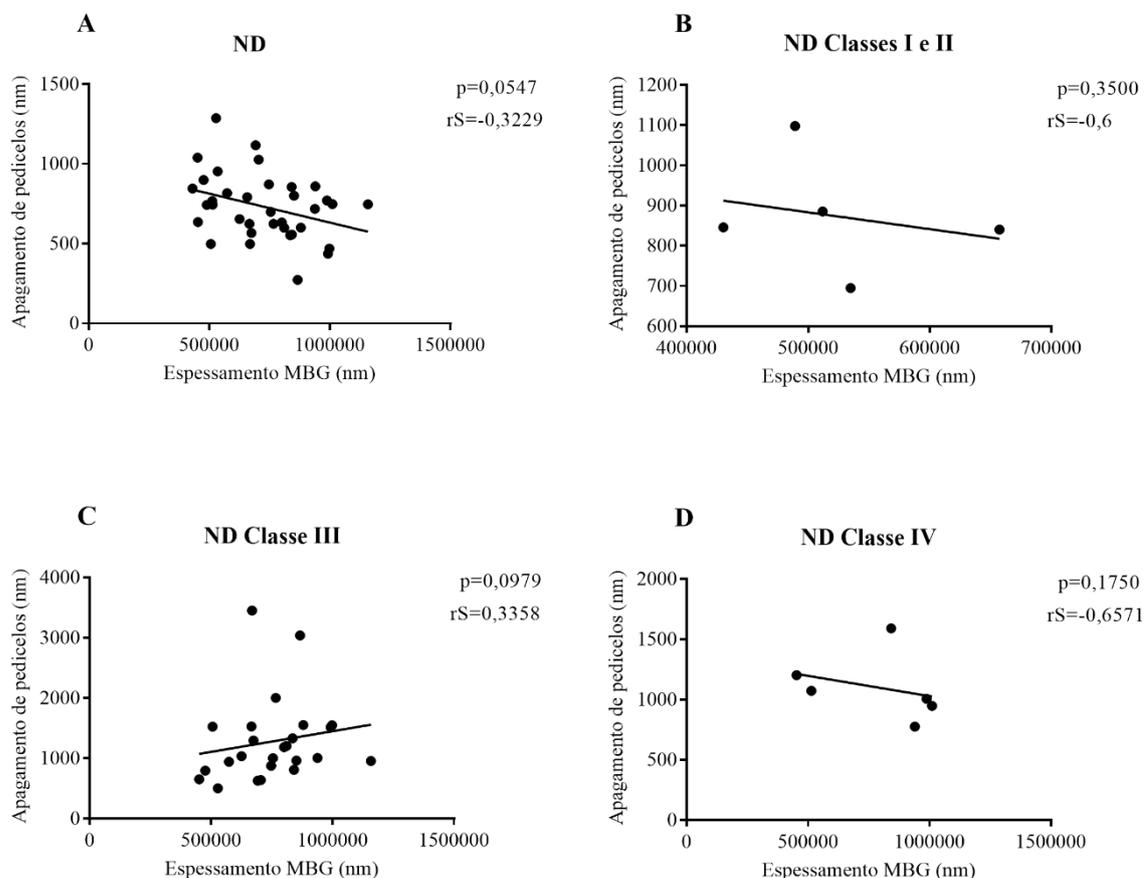
187 A) Espessura ultraestrutural da MBG normal no grupo controle (12000X). B) Espessura ultraestrutural da MBG
 188 aumentada em um caso de ND (12000X). C) Espessamento ultraestrutural da MBG dos grupos controle e ND.
 189 Teste de Mann Whitney (U). D) Espessura da MBG dos grupos controle e nas diferentes classes da ND. Teste de
 190 Kruskal Wallis (H) seguido do pós-teste de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras
 191 representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p < 0,05$.

192

193

194 Posto que encontramos alterações nestes componentes da BFG, avaliamos a correlação
 195 das duas lesões, o apagamento dos pedicelos e o espessamento da MBG, e observamos uma
 196 tendência de correlação negativa na ND ($p < 0,0547$; $rS = 0,3229$). O mesmo não foi evidenciado
 quando observado as classes da ND (Figura 12-D).

197 Figura 12– Correlação entre as lesões ultraestruturais da ND



198

199 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

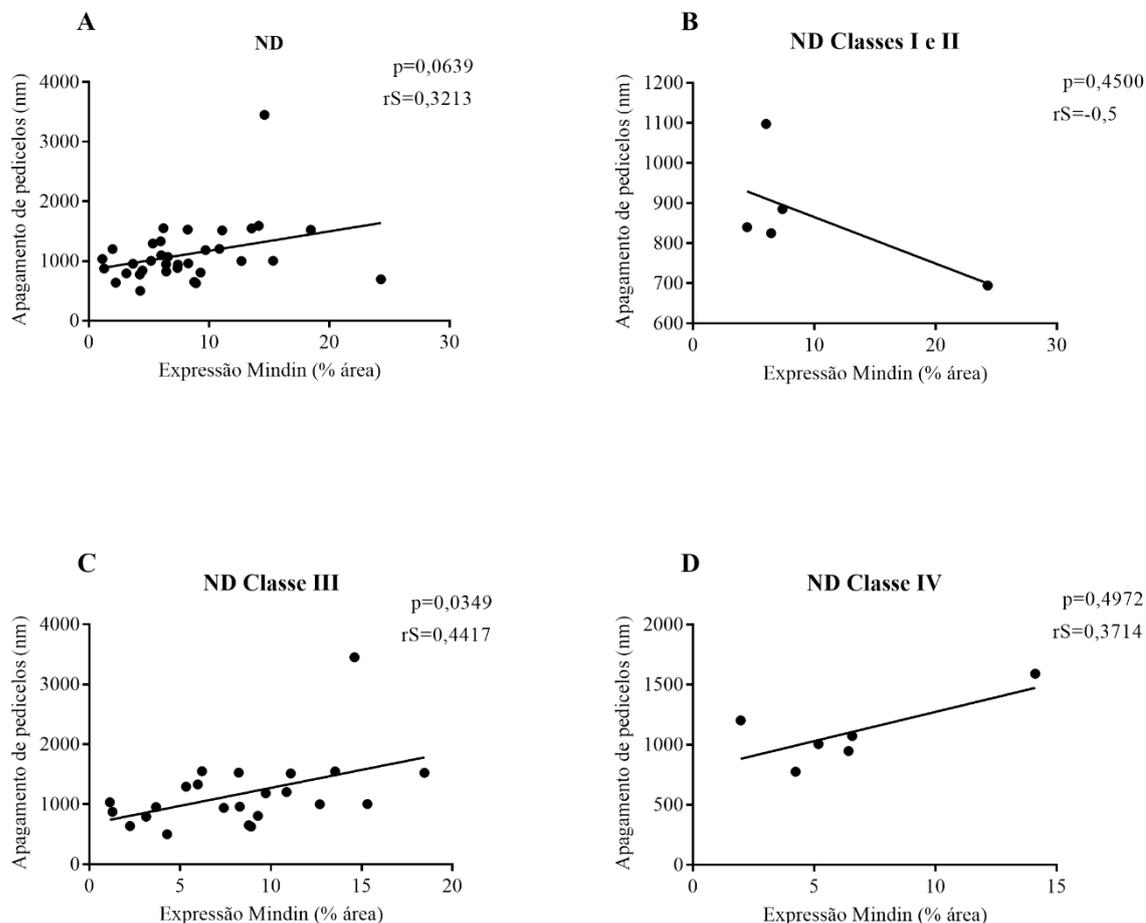
200 Correlação entre a espessura ultraestrutural da MBG e apagamento dos pedicelos nos grupos controle e nas classes
201 da ND. Correlação de Spearman (rS). $p<0,05$.

202

203 6.6 A EXPRESSÃO DE MINDIN ASSOCIADA A ALTERAÇÃO PODOCITÁRIA NA 204 NEFROPATIA DIABÉTICA

205 Devido ao aumento da expressão de Mindin na ND e sua possível relação com a lesão
206 podocitária, resolvemos correlacionar essa expressão com o apagamento dos pedicelos. Embora
207 não observado correlação significativa, houve uma tendência de correlação positiva entre o
208 apagamento dos pedicelos e a expressão de Mindin na ND ($p<0,0639$; $rS=0,3213$, Figura 13A).
209 Já na classe III, essa correlação foi positiva e significativa ($p<0,0349$; $rS=0,4417$, Figura 13C),
210 sugerindo que a lesão podocitária evidenciada pelo Mindin tenha relação com o apagamento
211 dos pedicelos na ND.

212 Figura 13 – Correlação de Mindin e apagamento dos pedicelos



213

214 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

215 Correlação entre a porcentagem de área marcada pelo anticorpo Mindin nos podócito com o apagamento dos
216 pedicelos no grupo controle e nas classes da ND. Correlação de Spearman (rS). $p<0,05$.

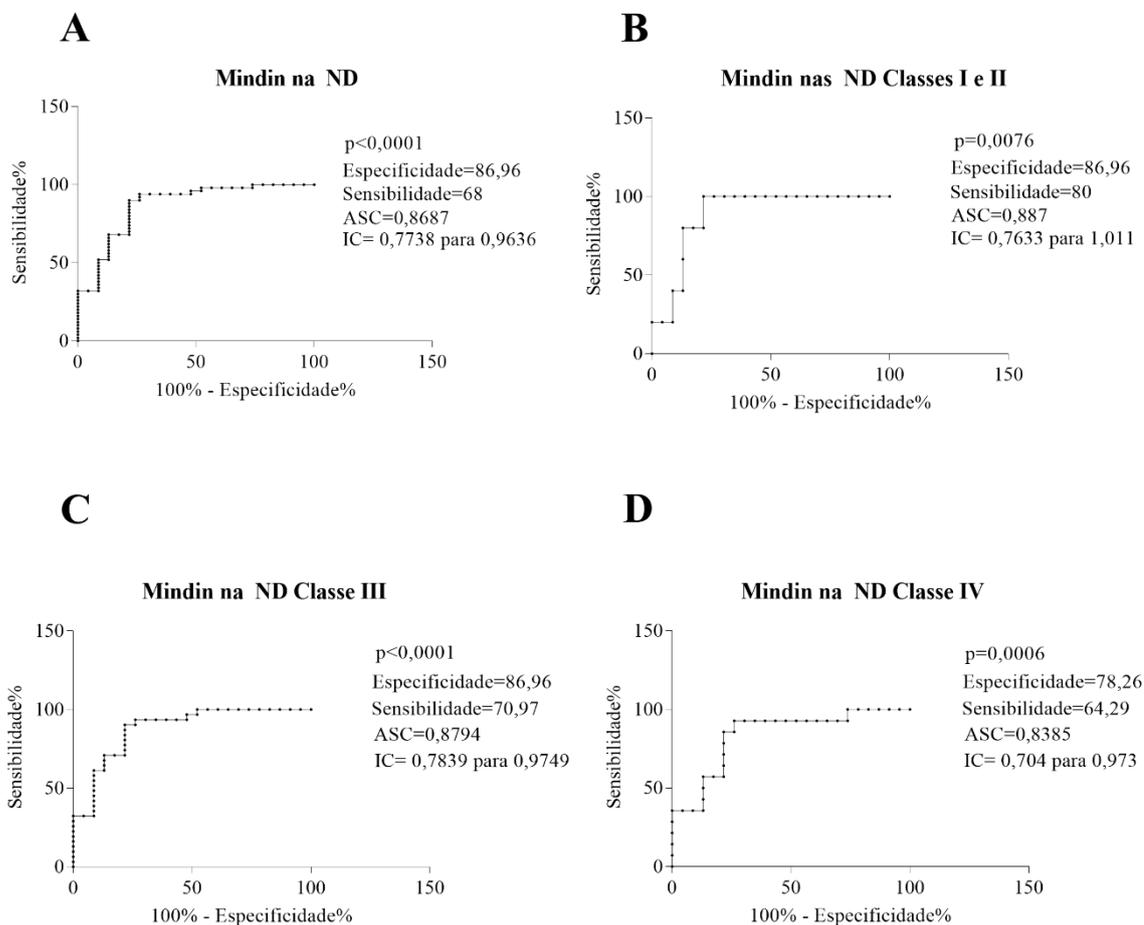
217

218 6.7 MINDIN COMO BIOMARCADOR *IN SITU* DA NEFROPATIA DIABÉTICA

219 Em virtude do aumento da expressão de Mindin na ND quando comparada com o grupo
220 controle procuramos avaliar a utilidade da proteína Mindin como biomarcador *in situ* da ND.
221 Obtivemos curva ROC, com um ponto de corte ideal em 5,178% de área marcada pelo anticorpo
222 da proteína Mindin, com sensibilidade de 68%, especificidade de 86,96% e a ASC foi 0,8687
223 (CI de 95% de 0,7738-0,9636, $p<0,0001$, Figura 14A). Foi avaliado a sensibilidade e
224 especificidade da proteína Mindin nas diferentes classes. Nas classes iniciais I e II, obtivemos
225 uma sensibilidade de 80% e especificidade de 86,96%, ASC de 0,887 (CI de 95% de 0,7633-
226 1,001, $p=0,0076$). Na classe III, obtivemos uma sensibilidade de 70,97% e especificidade de
227 86,96%, ASC de 0,8794 (CI de 95% de 0,7839-0,9749, $p<0,0001$) e na classe IV obtivemos

228 uma sensibilidade de 64,29% e especificidade de 78,26%, ASC de 0,8385 (CI de 95% de 0,704-
229 0,973, $p=0,0006$), conforme figuras 14 B-D.

230 Figura 14 – Curva ROC de Mindin nas diferentes classes da ND



231

232 Fonte: Elaborada pelo autor, 2021.

233 Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) para avaliação do potencial diagnóstico de Mindin para lesão
234 podocitária nas diferentes classes da ND.

Discussão

1 7 DISCUSSÃO

2 Este estudo analisou a expressão *in situ* da proteína Mindin em biópsias renais de
3 pacientes com ND, bem como as alterações clínicas e morfológica objetivando contribuir com
4 o conhecimento acerca do papel da Mindin como possível marcador de lesão podocitária nesta
5 entidade.

6 Em relação ao gênero, um pouco mais da metade dos pacientes com ND eram do sexo
7 masculino. Essa predominância também foi observada por Rossing *et al.*, onde 78,48% dos
8 pacientes diabéticos que desenvolveram ND eram homens. Portanto, nossos dados são
9 consistentes com os da literatura (ROSSING *et al.*, 2005). Além disso, pacientes diabéticos do
10 sexo masculino têm mais risco de complicações microvasculares, inclusive renais, quando
11 comparado às mulheres (MARIC-BILKAN, 2017). Em relação à faixa etária, a idade média foi
12 de 51,34 anos. De forma semelhante, Afroz *et al* obtiveram uma média de 54,09 anos sendo que
13 as idades incluídas nesse estudo variavam de 27 a 82 anos, portanto, os dados se aproximam
14 dos nossos resultados uma vez que a variação de idade foi de 23 a 75 anos (AFROZ *et al.*,
15 2017).

16 É sabido que a hipertensão é um fator de risco para o desenvolvimento da ND
17 (VARGHESE; JIALAL, 2020), 62,74% dos casos analisados eram hipertensos. Além da
18 hipertensão, o tempo de diabetes está diretamente relacionado com o aparecimento das
19 alterações morfológicas renais entre 5 a 15 anos após desenvolvimento da doença (ANDERSEN
20 *et al.*, 1983; CORTEZ *et al.*, 2015). O resultado encontrado em neste evidenciou o padrão
21 observado pelo trabalho exposto anteriormente, com uma média de 12,47 anos de DM no
22 momento do diagnóstico da ND.

23 Em relação aos parâmetros laboratoriais, os valores de creatinina, ureia e proteinúria
24 estavam todos aumentados. Esses achados coincidem com os resultados encontrados em
25 diversos estudos na literatura (AFROZ *et al.*, 2017; DE BRUYNE *et al.*, 2019). Dentre as
26 principais alterações clínicas na ND, está a proteinúria em níveis nefróticos (acima de 3,5g/dia)
27 (STEFAN *et al.*, 2019). Esse achado acontece devido a alterações na BFG nesses pacientes
28 (SUN *et al.*, 2013). Com o avanço das alterações morfológicas na ND, devido ao tempo, e
29 condições de hiperglicemia do DM (CORTEZ *et al.*, 2015), esses pacientes apresentam
30 diminuição da função renal que cursa com o aumento de ureia e creatinina em níveis séricos
31 (KITAI *et al.*, 2015).

32 Em relação às Classes da ND, a maioria das biópsias renais foram agrupadas na Classe
33 III (62,75%). Isso é justificado pelo fato que a BR só é indicada quando as manifestações

34 clínicas cursam com alterações diferentes do esperado, como aumento abrupto da proteinúria
35 ou hematúria com pouco tempo de diagnóstico do DM (PERSSON; ROSSING, 2018; RITZ;
36 ZENG; RYCHLÍK, 2011). Contudo, o que foi observado que nos primeiros anos de diagnóstico
37 do DM já exista um certo grau de acometimento renal. Dessa forma, quando é realizado a BR,
38 a maioria dos pacientes já não se encontram nas classes iniciais da ND.

39 Na análise da proteinúria nas diferentes classes da ND, foi observado um aumento
40 significativo entre as classes iniciais e a classe III. E uma tendência de diminuição dos níveis
41 de proteinúria entre a classe III e IV. O que pode explicar essa diferença é que nas classes
42 iniciais, a destruição nos compartimentos renais favorece a perda de proteína na urina. Já na
43 classe IV, o rim tem mais de 50% dos glomérulos globalmente esclerosados (TERVAERT *et*
44 *al.*, 2010), com diminuição da filtração renal (KITAI *et al.*, 2015), inclusive a passagem de
45 proteínas contribuindo com a redução da perda de proteínas nos estágios mais avançados da
46 doença.

47 Em relação a TFGe, houve uma diminuição da função renal nos casos estudados, no
48 entanto não houve uma diferença significativa da TFGe entre as classes iniciais e a classe III,
49 mas houve uma diminuição abrupta entre a classe III e IV. Uma alteração morfológica que está
50 diretamente relacionada com a diminuição da função renal é a FI/AT (STEFAN *et al.*, 2019),
51 sendo que quanto maior o score, menor é a capacidade de filtração do rim, contribuindo para
52 uma menor TFGe. Nas classes da ND, o score de FI/AT teve um aumento gradativo com a
53 evolução da ND.

54 Para avaliar a densidade de podócitos na ND, foi realizada a imunomarcagem de WT1,
55 proteína que está relacionada com a manutenção e diferenciação dessa célula (FANNI *et al.*,
56 2011). Essa avaliação vem sendo utilizada em alguns trabalhos com a mesma finalidade, tanto
57 em biópsias humanas (DA SILVA *et al.*, 2020) quanto em modelos experimentais
58 (FAULHABER-WALTER *et al.*, 2020). Ao avaliar a expressão de WT1, foi observado que os
59 glomérulos de biópsias com ND apresentavam uma menor quantidade de células marcadas em
60 relação aos glomérulos do grupo controle. Recentemente, um modelo experimental observou o
61 mesmo achado, no qual camundongos com fenótipo de ND apresentaram uma menor densidade
62 podocitária quando comparado aos sem ND (FAULHABER-WALTER *et al.*, 2020). Essa
63 diferença se dá pelo fato de que WT1 é um marcador de podócitos (GUO, 2002) e na ND há
64 perda dessas células por vias de apoptose (GUO *et al.*, 2017) e destacamento (DESSAPT *et al.*,
65 2009).

66 Quando avaliado a imunomarcagem de WT1 nas classes da ND, houve uma diminuição
67 de células marcadas em todas as classes, mas a diferença significativa estava entre o controle e
68 as classes III e IV. Uma possível explicação é que há uma perda leve de podócitos nas classes
69 iniciais e um aumento gradativo de acordo com evolução da ND. Sawada *et al* observaram o
70 aumento da expressão de integrinas em podócitos com estágio iniciais da ND, o que sugere ser
71 um mecanismo compensatório para aumentar a adesão dos podócitos, já que a integrina está
72 diretamente relacionada à ancoragem dessas células a MBG (SAWADA *et al.*, 2016). Isso pode
73 explicar o resultado encontrado em nosso estudo, já que nas fases iniciais não foi observada a
74 diminuição significativa da densidade de podócitos.

75 Este estudo é o primeiro a investigar a proteína Mindin em biópsias renais de pacientes
76 com ND, e nele foi observado um aumento da expressão dessa proteína nos glomérulos de
77 pacientes com ND. Na literatura, há trabalhos que demonstram aumento de Mindin *in situ* e na
78 urina de modelos experimentais de ND, bem como na urina e no sangue de pacientes com ND
79 (KAHVECIOGLU *et al.*, 2015; MURAKOSHI *et al.*, 2011b). Acredita-se que exista uma
80 relação direta entre ambiente hiperglicêmico e aumento da produção de Mindin (MURAKOSHI
81 *et al.*, 2011b), além disso há uma relação direta de Mindin com recrutamento de células
82 inflamatórias em outros processos patológicos (SUN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018). Já está
83 bem documentado que existe uma participação das células e citocinas inflamatórias da ND
84 (ARAÚJO *et al.*, 2020a, 2020b), diante do exposto e dos resultados apresentados nesse estudo,
85 sugerimos que os podócitos em situações de estresse, proporcionada pela condição de
86 hiperglicemia do DM, produzem a proteína Mindin que se ligam às integrinas induzindo o
87 recrutamento de células inflamatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias que estão
88 presentes na ND. Entretanto há necessidade de estudos que investiguem o mecanismo
89 envolvido no aumento de Mindin na ND. Na análise entre o grupo controle e todas as classes
90 da ND houve uma diferença estatisticamente significativa, porém na análise entre Mindin e as
91 classes da ND não houve diferença significativa

92 Foi observado a diminuição de WTI e o aumento de Mindin na ND, após a análise da
93 análise a correlação dessas proteínas não foi evidenciado correlação significativa entre a
94 expressão delas. Isso pode ser explicado pelo fato de que existem vários tipos de lesões
95 podocitárias na ND (ZHANG *et al.*, 2020). A diminuição de WT1 se dá pela diminuição da
96 densidade de podócitos (FAULHABER-WALTER *et al.*, 2020), provavelmente ligado à perda
97 dessas células por apoptose e/ou destacamento. Para Mindin, sugere-se que seja um marcador
98 de lesão podocitária (MURAKOSHI *et al.*, 2011b), sugerimos que os podócitos estejam

99 lesados, mas que os mesmos ainda estejam conectados a MBG. Sendo assim, essa expressão
100 provavelmente está ligada ao apagamento de pedicelos e hipertrofia de podócitos, pois essas
101 lesões podocitárias não diminuem a densidade de podócito.

102 Um achado ultraestrutural dos podócitos na ND é o apagamento dos pedicelos, e através
103 da análise ultraestrutural da largura dos pedicelos sob a MBG foi observado um aumento
104 significativo do apagamento dos pedicelos do grupo ND quando comparados ao grupo controle.
105 Esse achado é consistente com o resultado de Pagtalunan *et al* (PAGTALUNAN *et al.*, 1997),
106 que exibiu o apagamento dos pedicelos na ND. Existem várias causas associadas ao apagamento
107 de pedicelos dependente de proteínas que fazem parte da biologia dos podócitos. Foi
108 demonstrado *in vitro* e *in vivo* que em condições hiperglicêmicas há um aumento compensatório
109 da estabilização de actina (DAI *et al.*, 2006). De fato, quando encontrado a mutação no gene
110 que codifica um tipo de actina, α -Actinina-4, leva ao apagamento de pedicelos (LI *et al.*,
111 2007a). Outra proteína envolvida é a nefrina, a qual sofre diminuição intensa em biópsias renais
112 de paciente diabéticos (DOUBLIER *et al.*, 2003) e em podócitos de camundongos induzidos
113 com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (mimetizando a nefropatia diabética
114 precoce), culminando com apagamento dos pedicelos (VERON *et al.*, 2010). Uma terceira
115 proteína relacionada a essa alteração é a podocalixina. Essa é suprimida em ambiente
116 hiperglicêmico tanto *in vitro* (DROSSOPOULOU; TSOTAKOS; TSILIBARY, 2009) quanto
117 *in situ*, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (ECONOMOU *et al.*, 2004) e em
118 biópsias de pacientes diabéticos (KOOP *et al.*, 2003). Além disso, o apagamento dos pedicelos
119 está relacionado com o desacoplamento da podocalixina ao citoesqueleto de actina (TAKEDA
120 *et al.*, 2001). Quando comparado o apagamento dos pedicelos entre o controle e as classes, só
121 foi observado aumento significativo na III e na IV. O que sugere ser um mecanismo gradativo,
122 mas não isento nas classes iniciais.

123 Outra alteração ultraestrutural observada na ND é o espessamento da MBG. Essa é a
124 primeira alteração morfológica observada na doença, inclusive o único achado para classificar
125 a ND classe I (TERVAERT *et al.*, 2010). Em vista disso, foi observado que a espessura da
126 MBG no grupo ND era significativamente maior que o controle desde as classes iniciais. Os
127 podócitos têm papel fundamental na manutenção da MBG (MORA-FERNÁNDEZ *et al.*,
128 2014). Contudo, em ambiente hiperglicêmico, essas células são induzidas à produção exagerada
129 dos constituintes da MBG, principalmente colágeno tipo IV (IGLESIAS-DE LA CRUZ *et al.*,
130 2002).

131 Na análise entre apagamento dos pedicelos e a espessura da MBG não foi observado
132 uma correlação positiva e significativa, apenas uma tendência. Isso porque outras células
133 glomerulares também ajudam na manutenção da MBG, como as células endoteliais (MORA-
134 FERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

135 No presente estudo, observou-se o aumento de Mindin concomitante ao apagamento de
136 pedicelos na ND. Esse achado está de acordo com o trabalho que sugere que Mindin seja um
137 marcador de lesão podocitária (MURAKOSHI *et al.*, 2011b). O aumento de Mindin pode estar
138 relacionado a indução de apagamento através da sinalização pela ligação de Mindin e integrinas.
139 Essa via de sinalização ativa Rho GTPases, a qual regula aspectos da dinâmica da actina, o que
140 é demonstrada em células dendríticas (LI *et al.*, 2006). Essa regulação pode estar relacionada
141 às alterações citoesqueléticas dos podócitos que estão criticamente envolvidos na patogênese
142 das doenças glomerulares, já que a actina é a principal proteína relacionada a manutenção do
143 citoesqueleto de podócitos. A relação entre Mindin, ND e inflamação consiste em duas
144 hipóteses: 1) Mindin pode promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias e consequente
145 recrutamento de células inflamatórias levando à lesão de células renais, inclusive de podócitos;
146 2) os podócitos que, quando lesados por mecanismos variados, produzem Mindin que
147 participam do processo inflamatório instalado na ND.

148 No presente estudo houve uma correlação positiva entre Mindin e apagamento dos
149 pedicelos na classe III. Contudo, acredita-se que este fenômeno seja válido para todas as classes.
150 O fato dessa análise não ter dado valor estatisticamente significativo pode ser justificado pela
151 pequena quantidade de amostras nas demais classes. A curva ROC mostrou que a proteína
152 Mindin tem alta especificidade em biópsias de pacientes com ND. Portanto acredita-se que a
153 expressão de Mindin em biópsias renais seja um marcador promissor de lesão podocitária na
154 ND, possibilitando estimar a alteração ultraestrutural sob microscopia de luz.

Considerações finais

1 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 2 I. No período de 2006 a 2019 foram diagnosticadas 3337 BR no serviço de
3 Nefropatologia da UFTM, destas biópsias 52 eram de rim nativo de pacientes com
4 ND e sem outras doenças sobrepostas. Este número corresponde a 1,55% das
5 biópsias do serviço. Os pacientes deste estudo apresentavam idade entre 23 a 75
6 anos, com prevalência do sexo masculino, brancos e a maioria proveniente do estado
7 de Minas Gerais. Os pacientes apresentavam tempo de evolução do diabetes entre
8 1-30 anos. A maioria possuía índice de massa corporal elevado e hipertensão,
9 apresentando elevados níveis séricos de creatinina e ureia, além de proteinúria em
10 níveis nefróticos. De acordo com a Classificação da ND, as biópsias deste estudo
11 foram classificadas em: 01 (1.96%) Classe I, 02 (3.92%) Classe IIa, 02 (3.92%)
12 Classe IIb, 32 (62.75%) Classe III e 14 (27,45%) Classe IV.
- 13
- 14 II. O grupo ND apresentou menor densidade de podócitos, por meio da imunomarcção
15 de WT1, em comparação com o grupo controle.
- 16
- 17 III. O grupo ND apresentou maior expressão de Mindin em comparação com o grupo
18 controle. Além disso, a proteína Mindin demonstrou ser um potencial biomarcador
19 quando avaliado por meio da curva ROC.
- 20
- 21 IV. O grupo ND apresentou mais espessamento da MBG em comparação com o grupo
22 controle.
- 23
- 24 V. O grupo ND apresentou uma maior largura dos pedicelos em comparação com o
25 grupo controle. Houve uma correlação positiva e significativa entre o apagamento
26 de pedicelos e a expressão de Mindin na Classe III da ND.

Conclusão

1 9 CONCLUSÃO

2

3 No presente estudo, pudemos observar que pacientes com ND, apresentam, na biópsia
4 renal, um aumento da espessura da MBG, diminuição de podócitos e aumento da expressão da
5 proteína Mindin, tendo este último uma relação direta com o apagamento dos pedicelos,
6 sobretudo na classe III, além de ter alta especificidade em biópsias de pacientes com ND por
7 meio da curva ROC sendo um marcador promissor de lesão podocitária. Também foi
8 demonstrado que, clinicamente, os pacientes envolvidos neste estudo, apresentam aumento dos
9 níveis de proteinúria, creatinina e diminuição da TFGe.

Referências

1 REFERÊNCIAS

- 2 ABRAHAMSON, D. R. et al. Cellular origins of type IV collagen networks in developing
3 glomeruli. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 7, p. 1471–1479, jul.
4 2009.
- 5 AFROZ, T. et al. Clinical and histological correlation of diabetic nephropathy. **Saudi journal**
6 **of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for**
7 **Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 28, n. 4, p. 836–841, 1 jul. 2017.
- 8 AMBU, R. et al. WT1 expression in the human fetus during development. **European Journal**
9 **of Histochemistry**, v. 59, n. 2, p. 156–163, 2015.
- 10 AN, J. H. et al. The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean
11 type 2 diabetic patients: A possible early stage renal complication. **Journal of Korean**
12 **Medical Science**, v. 24, n. SUPPL.1, p. S75, 2009.
- 13 ANDERSEN, A. R. et al. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: An
14 epidemiological study. **Diabetologia**, v. 25, n. 6, p. 496–501, dez. 1983.
- 15 ARAÚJO, L. S. et al. Analysis of serum inflammatory mediators in type 2 diabetic patients
16 and their influence on renal function. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229765, 2020a.
- 17 ARAÚJO, L. S. et al. Renal expression of cytokines and chemokines in diabetic nephropathy.
18 **BMC Nephrology**, v. 21, n. 1, 28 jul. 2020b.
- 19 ARDURA, J. A. et al. The secreted matrix protein mindin increases prostate tumor
20 progression and tumor-bone crosstalk via ERK 1/2 regulation. **Carcinogenesis**, v. 40, n. 7, p.
21 828–839, 1 jul. 2019.
- 22 BDUJWBUJPO, N. et al. Pg Ejbcbfujd Ofqispqbuiz Jo Njdf. **Journal of Clinical**
23 **Investigation**, v. 121, n. 6, 2011.
- 24 BENZING, T. The slit diaphragm : A signaling platform to regulate podocyte function.
25 **Japanese Journal of Nephrology**, v. 47, n. 3, p. 230–231, 2005.
- 26 BERMEJO, S.; GARCÍA-CARRO, C.; SOLER, M. J. Diabetes and renal disease—should we
27 biopsy? **Nephrology Dialysis Transplantation**, 28 dez. 2019.
- 28 BLANCO, S. et al. ACE inhibitors improve nephrin expression in Zucker rats with
29 glomerulosclerosis. **Kidney International, Supplement**, v. 67, n. 93, p. 10–14, 2005.
- 30 BRYER, J. S.; SUSZTAK, K. **Screening Drugs for Kidney Disease: Targeting the**
31 **PodocyteCell Chemical Biology** Elsevier Ltd, , 15 fev. 2018.
- 32 BYRON, A. et al. Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of
33 extracellular matrix. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 953–
34 966, 2014.
- 35 CAO, Z.; COOPER, M. E. Pathogenesis of diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes**
36 **Investigation**, v. 2, n. 4, p. 243–247, 2011.
- 37 CARDOSO, C. R. L.; SALLES, G. F. Predictors of development and progression of
38 microvascular complications in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. **Journal of**
39 **Diabetes and its Complications**, v. 22, n. 3, p. 164–170, 1 maio 2008.
- 40 CHAU, Y. Y. et al. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental

- 41 regulator Wt1. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, 2011.
- 42 CHEN, H. C. et al. Altering expression of $\alpha 3\beta 1$ integrin on podocytes of human and rats with
43 diabetes. **Life Sciences**, v. 67, n. 19, p. 2345–2353, 29 set. 2000.
- 44 CHEN, J. et al. Astragaloside IV improves high glucose-induced podocyte adhesion
45 dysfunction via $\alpha 3\beta 1$ integrin upregulation and integrin-linked kinase inhibition. **Biochemical**
46 **Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 796–804, 15 set. 2008.
- 47 CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and
48 projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.
- 49 CORTEZ, D. N. et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção
50 primária. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 28, n. 3, p. 250–255, 1 maio 2015.
- 51 DA SILVA, C. A. et al. Evaluation of the diagnostic potential of UPAR as a biomarker in
52 renal biopsies of patients with FSGS. **Disease Markers**, v. 2019, 2019.
- 53 DA SILVA, C. A. et al. In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental
54 glomerulosclerosis and minimal change disease. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0241745, 4
55 nov. 2020.
- 56 DAI, H.; LIU, Q.; LIU, B. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in
57 Diabetic Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, 2017.
- 58 DAI, T. et al. Glucose and diabetes: Effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat
59 shock protein 25, and actin cytoskeleton. **Kidney International**, v. 69, n. 5, p. 806–814, 1
60 mar. 2006.
- 61 DALLA VESTRA, M. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure
62 in patients with type 2 diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 3
63 SUPPL. 1, p. 78–82, 2005.
- 64 DAS, R. et al. Transforming growth factor $\beta 1$ -induced apoptosis in podocytes via the
65 extracellular signal-regulated kinase- mammalian target of rapamycin complex 1-nadph
66 oxidase 4 axis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 52, p. 30830–30842, 25 dez.
67 2015.
- 68 DE BOER, I. et al. Effect of intensive diabetes treatment on albuminuria in type 1 diabetes:
69 Long-term follow-up of the diabetes control and complications trial and epidemiology of
70 diabetes interventions and complications study. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v.
71 2, n. 10, p. 793–800, 2014.
- 72 DE BRUYNE, S. et al. Detection and Characterization of a Biochemical Signature Associated
73 with Diabetic Nephropathy Using Near-infrared Spectroscopy on Tissue Sections. **Journal of**
74 **Clinical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 1022, 12 jul. 2019.
- 75 DE FARIA, J. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética.
76 **J Bras Nefrol**, v. 23, n. 2, p. 121–9, 2001.
- 77 DESSAPT, C. et al. Mechanical forces and TGF $\beta 1$ reduce podocyte adhesion through $\alpha 3\beta 1$
78 integrin downregulation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 2645–2655,
79 set. 2009.
- 80 DOUBLIER, S. et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy:
81 Evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p.
82 1023–1030, 1 abr. 2003.

- 83 DROSSOPOULOU, G. I.; TSOTAKOS, N. E.; TSILIBARY, E. C. Impaired transcription
84 factor interplay in addition to advanced glycation end products suppress podocalyxin
85 expression in high glucose-treated human podocytes. **American Journal of Physiology-
86 Renal Physiology**, v. 297, n. 3, p. F594–F603, set. 2009.
- 87 DRUMMOND, K.; MAUER, M. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1
88 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1580–1587, 2002.
- 89 ECONOMOU, C. G. et al. **Enhanced podocalyxin expression alters the structure of
90 podocyte basal surface** *Journal of Cell Science* *J Cell Sci*, , 1 jul. 2004. Disponível em:
91 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15226400/>>. Acesso em: 16 nov. 2020
- 92 FANNI, D. et al. Expression of WT1 during normal human kidney development. **Journal of
93 Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. SUPPL. 2, p. 45–48, 2011.
- 94 FAROOQ, U.; RAY, S. G. **2014 Guideline for the Management of High Blood Pressure
95 (Eighth Joint National Committee). Take-Home Messages.** *Medical Clinics of North
96 America* W.B. Saunders, , jul. 2015a.
- 97 FAROOQ, U.; RAY, S. G. **2014 Guideline for the Management of High Blood Pressure
98 (Eighth Joint National Committee). Take-Home Messages.** *Medical Clinics of North
99 America* W.B. Saunders, , 1 jul. 2015b. Disponível em:
100 <[https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/2014-guideline-for-the-management-of-
101 high-blood-pressure-eighth-j](https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/2014-guideline-for-the-management-of-high-blood-pressure-eighth-j)>. Acesso em: 22 out. 2020
- 102 FAULHABER-WALTER, R. et al. Podocyte density and albuminuria in aging diabetic ins2±
103 mice with or without adenosine a1 receptor signaling. **International Journal of Nephrology
104 and Renovascular Disease**, v. 13, p. 19–26, 2020.
- 105 FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. (a Uk E). **Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1–11, 2018.
- 106 GAO, K. et al. 59-AMP-Activated Protein Kinase Attenuates Adriamycin-Induced Oxidative
107 Podocyte Injury through Thioredoxin-Mediated Suppression of the Apoptosis Signal-
108 Regulating Kinase 1-P38 Signaling Pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 460–
109 471, mar. 2014.
- 110 GENUTH, S. et al. **Implications of the United Kingdom prospective diabetes
111 study** *Diabetes Care* American Diabetes Association Inc., , jan. 2003.
- 112 GNUDI, L.; COWARD, R. J. M.; LONG, D. A. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel
113 Molecular Mechanisms. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 11, p. 820–
114 830, 2016a.
- 115 GNUDI, L.; COWARD, R. J. M.; LONG, D. A. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel
116 Molecular Mechanisms. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 11, p. 820–
117 830, 2016b.
- 118 GREKA, A.; MUNDEL, P. Cell biology and pathology of podocytes. **Annual Review of
119 Physiology**, v. 74, p. 299–323, 15 fev. 2012.
- 120 GROUP, T. A. C. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with
121 Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 24, p. 2560–2572, 12 jun.
122 2008.
- 123 GUO, J.-K. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause
124 crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n.

- 125 6, p. 651–659, 2002.
- 126 GUO, Y. et al. Infiltrating macrophages in diabetic nephropathy promote podocytes apoptosis
127 via TNF- α -ROS-p38MAPK pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 53276–53287, 8 ago. 2017.
- 128 HAAS, M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy a practical
129 approach to diagnosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 133, n. 2, p.
130 224–232, 2009.
- 131 HARA, M. et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with
132 diabetes: Establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin.
133 **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 2913–2919, 2012.
- 134 HERBACH, N. et al. Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: Podocyte
135 hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and
136 glomerulosclerosis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 296, n. 4, p.
137 819–829, 2009.
- 138 HIGASHIJIMA, S. ICHI et al. Mindin/F-spondin family: Novel ECM proteins expressed in
139 the zebrafish embryonic axis. **Developmental Biology**, v. 192, n. 2, p. 211–227, 1997.
- 140 IGLESIAS-DE LA CRUZ, M. C. et al. Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression
141 of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. **Kidney
142 International**, v. 62, n. 3, p. 901–913, 1 set. 2002.
- 143 JARAD, G. et al. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in Lamb2^{-/-} mice, implicating
144 the glomerular basement membrane as an albumin barrier. **Journal of Clinical Investigation**,
145 v. 116, n. 8, p. 2272–2279, 1 ago. 2006.
- 146 JIA, W.; LI, H.; HE, Y. W. The extracellular matrix protein mindin serves as an integrin
147 ligand and is critical for inflammatory cell recruitment. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3854–3859, 1
148 dez. 2005.
- 149 JIM, B. et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: A cross
150 sectional study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 17 maio 2012.
- 151 JO, H. A. et al. The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced
152 podocyte hypertrophy. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 35, n. 4, p. 212–218,
153 2016.
- 154 KAHN, S. E. et al. Quantification of the Relationship Between Insulin Sensitivity and β -Cell
155 Function in Human Subjects: Evidence for a Hyperbolic Function. **Diabetes**, v. 42, n. 11, p.
156 1663–1672, 1 nov. 1993.
- 157 KAHVECIOGLU, S. et al. Evaluation of serum Spondin 2 levels in the different stages of
158 Type 2 diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 20, n. 10, p. 721–726, 2015.
- 159 KAMIYAMA, M. et al. Oxidative stress/angiotensinogen/renin-angiotensin system axis in
160 patients with diabetic nephropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n.
161 11, p. 23045–23062, 2013.
- 162 KANN, M. et al. Genome-wide analysis of Wilms' tumor 1-controlled gene expression in
163 podocytes reveals key regulatory mechanisms. **Journal of the American Society of
164 Nephrology**, v. 26, n. 9, p. 2097–2104, 2015.
- 165 KASHIHARA, N. et al. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Current Medicinal
166 Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4256–4269, 2010.

- 167 KERJASCHKI, D.; SHARKEY, D. J.; FARQUHAR, M. G. Identification and
168 characterization of podocalyxin - The major sialoprotein of the renal glomerular epithelial
169 cell. **Journal of Cell Biology**, v. 98, n. 4, p. 1591–1596, 1984.
- 170 KIM, N. H. et al. Redox dependence of glomerular epithelial cell hypertrophy in response to
171 glucose. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 290, n. 3, p. 741–751,
172 2006.
- 173 KIM, Y. H. et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the
174 PAN-treated rat. **Kidney International**, v. 60, n. 3, p. 957–968, 2001.
- 175 KITAI, Y. et al. Nephrotic range proteinuria as a strong risk factor for rapid renal function
176 decline during pre-dialysis phase in type 2 diabetic patients with severely impaired renal
177 function. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 19, n. 6, p. 1037–1043, 1 dez. 2015.
- 178 KOOP, K. et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney
179 diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 8, p. 2063–2071, 1 ago.
180 2003.
- 181 KOSHIKAWA, M. et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte
182 injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. **Journal of the American Society
183 of Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 2690–2701, 1 set. 2005.
- 184 KREIDBERG, J. A. et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell**, v. 74, n. 4, p.
185 679–691, 1993.
- 186 LEVEY, A. S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal
187 Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–612, 5 maio 2009.
- 188 LEVEY, A. S. et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: A
189 KDIGO Controversies Conference report. **Kidney International**, v. 80, n. 1, p. 17–28, 1 jul.
190 2011.
- 191 LI, H. et al. Efficient dendritic cell priming of T lymphocytes depends on the extracellular
192 matrix protein mindin. **EMBO Journal**, v. 25, n. 17, p. 4097–4107, 6 set. 2006.
- 193 LI, J. H. et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-
194 dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease.
195 **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for
196 Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 176–178, 2004.
- 197 LI, J. J. et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 72, p. S36–
198 S42, 2007a.
- 199 LI, J. J. et al. **Podocyte biology in diabetic nephropathy**. *Kidney International*.
200 **Anais...Elsevier**, 1 ago. 2007bDisponível em: <<http://www.kidney-international.org>>. Acesso
201 em: 16 dez. 2020
- 202 LI, N. et al. Transcriptional Activation of Matricellular Protein Spondin2 (SPON2) by BRG1
203 in Vascular Endothelial Cells Promotes Macrophage Chemotaxis. **Frontiers in Cell and
204 Developmental Biology**, v. 8, p. 794, 14 ago. 2020.
- 205 LI, X. et al. Nephrin preserves podocyte viability and glomerular structure and function in
206 adult kidneys. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 10, p. 2361–2377,
207 1 out. 2015.
- 208 LIN, J. S.; SUSZTAK, K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? **Current**

- 209 **Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 1–17, 2016a.
- 210 LIN, J. S.; SUSZTAK, K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? **Current**
211 **Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 1–9, 2016b.
- 212 LU, M. K.; GONG, X. G.; GUAN, K. L. mTOR in podocyte function: Is rapamycin good for
213 diabetic nephropathy? **Cell Cycle**, v. 10, n. 20, p. 3415–3416, 2011.
- 214 LUCARELLI, G. et al. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel
215 diagnostic biomarker for prostate cancer. **Journal of Urology**, v. 190, n. 6, p. 2271–2277, 1
216 dez. 2013.
- 217 MARIC-BILKAN, C. **Sex differences in micro- and macro-vascular complications of**
218 **diabetes mellitus** *Clinical Science* Portland Press Ltd, , 1 maio 2017. Disponível em:
219 </clinsci/article/131/9/833/71779/Sex-differences-in-micro-and-macro-vascular>. Acesso em:
220 17 mar. 2021
- 221 MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy.
222 **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 1358–1373, 2003.
- 223 MATHEW, S. et al. **Integrins in renal development** *Pediatric Nephrology* Springer Verlag, ,
224 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21603909/>. Acesso em: 10 nov.
225 2020
- 226 MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. To Diabetes. **Nature**, v. 414, n. December, 2001.
- 227 MENNE, J. et al. The Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention
228 (ROADMAP) observational follow-up study: benefits of RAS blockade with olmesartan
229 treatment are sustained after study discontinuation. **Journal of the American Heart**
230 **Association**, v. 3, n. 2, 2014.
- 231 MINER, J. H.; LI, C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a
232 developmental role for the kidney glomerular basement membrane. **Developmental Biology**,
233 v. 217, n. 2, p. 278–289, 15 jan. 2000.
- 234 MOGENSEN, C. E.; CHRISTENSEN, C. K.; VITTINGHUS, E. **The stages in diabetic**
235 **renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic**
236 **nephropathy** *Diabetes* American Diabetes Association, , 1 jun. 1983. Disponível em:
237 <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/32/Supplement_2/64>. Acesso em: 22 out. 2020
- 238 MORA-FERNÁNDEZ, C. et al. **Diabetic kidney disease: From physiology to**
239 **therapeutics** *Journal of Physiology* Blackwell Publishing Ltd, , 2014. Disponível em:
240 </pmc/articles/PMC4198010/>. Acesso em: 15 mar. 2021
- 241 MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **Journal of the**
242 **American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 3005–3015, 2002.
- 243 MURAKOSHI, M. et al. Role of mindin in diabetic nephropathy. **Experimental Diabetes**
244 **Research**, v. 2011, 2011a.
- 245 MURAKOSHI, M. et al. Mindin: A novel marker for podocyte injury in diabetic
246 nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 7, p. 2153–2160, 1 jul. 2011b.
- 247 NARRES, M. et al. The Incidence of End-Stage Renal Disease in the Diabetic (Compared to
248 the Non-Diabetic) Population: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147329,
249 26 jan. 2016.

- 250 ORASANU, G.; PLUTZKY, J. **The Pathologic Continuum of Diabetic Vascular**
251 **Disease***Journal of the American College of Cardiology*, 3 fev. 2009.
- 252 PAGTALUNAN, M. E. et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II
253 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 342–348, 1997.
- 254 PARVING, H. H. et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy
255 in patients with type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 12, p. 870–
256 878, set. 2001.
- 257 PAVENSTÄDT, H.; KRIZ, W.; KRETZLER, M. Cell biology of the glomerular podocyte.
258 **Physiological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 253–307, 2003.
- 259 PAZ, D. L.; LE MEUR, Y.; RENAUDINEAU, Y. Glomerular Basement Membrane
260 Autoantibodies. In: **Autoantibodies: Third Edition**. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. p. 553–560.
- 261 PEREIRA, L. H. DE M. et al. Podocin and uPAR are good biomarkers in cases of Focal and
262 segmental glomerulosclerosis in pediatric renal biopsies. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p.
263 e0217569, 12 jun. 2019.
- 264 PERSSON, F.; ROSSING, P. **Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and**
265 **future perspective***Kidney International Supplements*Elsevier B.V., , 1 jan. 2018.
- 266 PRITCHARD-JONES, K. et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in
267 genitourinary development. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 194–197, 1990.
- 268 QIAN, X. et al. Spondin-2 (SPON2), a More Prostate-Cancer-Specific Diagnostic Biomarker.
269 **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37225, 15 maio 2012.
- 270 RAATS, C. J. I. et al. Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue
271 and in experimental glomerulopathies. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p.
272 1749–1765, 2000.
- 273 REEVES, W. H.; KANWAR, Y. S.; FARQUHAR, M. G. Assembly of the glomerular
274 filtration surface: Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat
275 kidney. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 735–753, 1 jun. 1980.
- 276 REUTENS, A. T.; ATKINS, R. C. Epidemiology of diabetic nephropathy. **Contributions to**
277 **Nephrology**, v. 170, p. 1–7, jun. 2011.
- 278 RITZ, E.; ZENG, X.-X.; RYCHLÍK, I. Clinical Manifestation and Natural History of Diabetic
279 Nephropathy. In: **Contributions to Nephrology**. [s.l.] Karger Publishers, 2011. v. 170p. 19–
280 27.
- 281 ROMERO, M. et al. Parathyroid hormone-related protein induces hypertrophy in podocytes
282 via TGF- β 1 and p27Kip1: Implications for diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis**
283 **Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 2447–2457, 2010.
- 284 ROSSING, K. et al. Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal
285 disease and improves survival in type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2241–
286 2247, 17 nov. 2005.
- 287 SAEEDI, P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections
288 for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th
289 edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, 2019.
- 290 SAWADA, K. et al. Upregulation of $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin in Podocytes in Early-Stage Diabetic

- 291 Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.
- 292 STEFAN, G. et al. Histologic predictors of renal outcome in diabetic nephropathy: Beyond
293 renal pathology society classification. **Medicine**, v. 98, n. 27, p. e16333, 1 jul. 2019.
- 294 SU, J. et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms'
295 tumor-1 protein used as a podocyte marker. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87,
296 n. 2, p. 167–175, 2010.
- 297 SUN, P. et al. Mindin deficiency protects the liver against ischemia/reperfusion injury.
298 **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 5, p. 1198–1211, 1 nov. 2015.
- 299 SUN, Y. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Recent advances in
300 understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy.
301 **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, n. 4, p. 359–361, 2013.
- 302 SUSZTAK, K. et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes
303 and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 225–
304 233, 2006.
- 305 TAKEDA, T. et al. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of
306 podocalyxin from the actin cytoskeleton. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 2, p.
307 289–301, 2001.
- 308 TERVAERT, T. W. C. et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. **Journal of the**
309 **American Society of Nephrology**, v. 21, n. 4, p. 556–563, 2010.
- 310 UMANATH, K.; LEWIS, J. B. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018.
311 **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 6, p. 884–895, 1 jun. 2018a.
- 312 UMANATH, K.; LEWIS, J. B. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018.
313 **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 6, p. 884–895, 1 jun. 2018b.
- 314 VAN DEN BERG, J. G. et al. Podocyte foot process effacement is not correlated with the
315 level of proteinuria in human glomerulopathies. **Kidney International**, v. 66, n. 5, p. 1901–
316 1906, 1 nov. 2004.
- 317 VARGHESE, R. T.; JIALAL, I. **Diabetic Nephropathy**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2020.
- 318 VENKATAREDDY, M. et al. Estimating podocyte number and density using a single
319 histologic section. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 1118–
320 1129, 2014.
- 321 VERON, D. et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular
322 disease. **Kidney International**, v. 77, n. 11, p. 989–999, 2010.
- 323 WANG, G. et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules
324 for the estimation of glomerular podocyte loss. **Renal Failure**, v. 32, n. 3, p. 372–379, 2010.
- 325 WANG, X. B. et al. Gremlin regulates podocyte apoptosis via transforming growth factor- β
326 (TGF- β) pathway in diabetic nephropathy. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 183–189, 9
327 jan. 2018.
- 328 WANG, Y.; LI, H.; SONG, S. P. β -arrestin 1/2 aggravates podocyte apoptosis of diabetic
329 nephropathy via wnt/ β -catenin pathway. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 1724–1732, 24
330 mar. 2018.

- 331 WILLIAMS, R. et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health
332 expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition.
333 **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 162, p. 108072, 1 abr. 2020.
- 334 ZHANG, C. et al. Mindin deficiency in macrophages protects against foam cell formation and
335 atherosclerosis by targeting LXR- β . **Clinical Science**, v. 132, n. 11, p. 1199–1213, 1 jun.
336 2018.
- 337 ZHANG, L. et al. **Research Progress on the Pathological Mechanisms of Podocytes in**
338 **Diabetic Nephropathy** *Journal of Diabetes Research* Hindawi Limited, , 2020. Disponível
339 em: </pmc/articles/PMC7368941/?report=abstract>. Acesso em: 30 nov. 2020
- 340 ZHU, W. WEI et al. Ultrastructural changes in the glomerular filtration barrier and occurrence
341 of proteinuria in Chinese patients with type 2 diabetic nephropathy. **Diabetes Research and**
342 **Clinical Practice**, v. 86, n. 3, p. 199–207, 2009.
- 343

1

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

2

3

4

5

6

ANEXO B – Artigo***In situ* assessment of mindin as a biomarker of podocyte lesion in diabetic nephropathy**

Ana Luisa Monteiro dos Santos Martins¹, Alexia Borges Bernardes¹, Verônica Aparecida Ferreira¹, David Campos Wanderley², Stanley de Almeida Araújo², José Rodrigues do Carmo Neto³, Crislaine Aparecida da Silva¹, Liliane Silvano Araújo¹, Marlene Antônia dos Reis¹,
*Juliana Reis Machado¹.

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

² Institute of Nephropathology, Center for Electron Microscopy, Federal University of Minas Gerais, Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Zip Code: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Department of Bioscience and Technology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, R. 235, S/n - Setor Leste Universitário, Zip Code: 74605-050, Goiania, GO, Brazil

E-mail address:

Ana Luisa Monteiro dos Santos Martins: ana.uisamartins@gmail.com

-
- 28 Alexia Borges Bernardes: alexiaborghesh@gmail.com
- 29 Verônica Aparecida Ferreira: veronicaferreira0609@gmail.com
- 30 David Campos Wanderley: davidcamposwanderley@gmail.com
- 31 Stanley de Almeida Araújo: stanleyaa@gmail.com
- 32 José Rodrigues do Carmo Neto: rodriguesnneto@gmail.com
- 33 Crislaine Aparecida da Silva: crislaine.0604@gmail.com
- 34 Liliane Silvano Araújo: lili_silvano@yahoo.com.br
- 35 Marlene Antônia dos Reis: mareispatologia@gmail.com
- 36 Juliana Reis Machado: juliana.patologiageral@gmail.com

37

38 ***Corresponding author:**

39 **Juliana Reis Machado, PhD**

40 General Pathology Professor

41 Federal University of Triângulo Mineiro

42 Praça Manoel Terra, 330 Zip Code: 38025-015

43 Uberaba – MG, Brazil.

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

45 Telephone: 55 (34) 3700-6452

46

47

48 ABSTRACT

49 Background: Diabetic Nephropathy (DN) is the leading cause of chronic kidney disease and
50 end-stage renal failure in the world. Several mechanisms are involved in the pathogenesis of
51 this disease, which culminate in morphological changes such as podocyte injury in patients.
52 Although the diagnosis of DN and its pathogenesis is complex, limited attempts have been made
53 to establish new biomarkers in this type of disorder. The concentration of mindin protein has
54 been reported to be higher in the urine of patients with type 2 diabetes mellitus, hence, it appears
55 considered a potent biomarker. Therefore, this study aimed to evaluate whether the expression
56 of mindin protein in renal biopsies of patients with DN can be considered a potential biomarker.
57 Methods: This study included 50 cases of renal biopsies diagnosed with DN that were evaluated
58 for *in situ* expression of Wilms' tumor 1 (WT1) protein and mindin by immunostaining and
59 foot process effacement by transmission electron microscopy. The control group included 23
60 cases of kidney autopsies of adult patients in whom the cause of death was not related to
61 infectious disease and previous renal disorders. Results: Decreased podocyte density and
62 increased mindin expression were observed in cases of DN, regardless of their class. Further,
63 these data showed a positive correlation between mindin and foot process effacement in class
64 III. The receiver operative characteristic curve ($p < 0.0001$) showed that mindin protein had
65 86.965% specificity in the biopsies of patients with DN. Conclusions: Therefore, mindin can
66 be considered a potential biomarker of podocyte lesion in DN.

67 **Keywords:** diabetic nephropathy, renal biopsy, mindin, wt1, podocytes

68 BACKGROUND

69 Diabetic nephropathy (DN) is one of the most important microvascular complications
70 of diabetes mellitus (DM) (GROUP, 2008; ORASANU; PLUTZKY, 2009) causing specific

71 pathological, structural and functional changes in the kidneys of patients with diabetes
72 (BERMEJO; GARCÍA-CARRO; SOLER, 2019; UMANATH; LEWIS, 2018b). DN is the
73 leading cause of chronic kidney disease (CKD) and end-stage renal failure worldwide
74 (NARRES et al., 2016; REUTENS; ATKINS, 2011). DN can be a consequence of both type 1
75 DM and type 2 DM (FAROOQ; RAY, 2015b), developing in up to 30% to 40% of the patients
76 (GNUDI; COWARD; LONG, 2016b; UMANATH; LEWIS, 2018b).

77 Histologically, DN progresses with mesangial expansion, glomerular basement
78 membrane (GBM) thickening, and podocyte changes in patients. Several studies have shown
79 that podocytes are targets in DN due to hyperglycemia, increased angiotensin II and
80 transforming growth factor beta levels, and mechanical stress (LI et al., 2007b). As podocytes
81 have a limited repair capacity and are terminally differentiated, podocyte damage or loss leads
82 to decreased homeostasis in the glomerular filtration barrier (GFB), leading to proteinuria (LIN;
83 SUSZTAK, 2016b).

84 The roles of possible biomarkers related to podocyte lesion and their involvement in
85 DN progression have been studied because of the importance of podocytes in the GFB. Mindin,
86 also known as SPON-2 or Spondin 2, is possibly related to DN. This protein is a member of the
87 mindin-/F-spondin family of proteins, secreted from the extracellular matrix, and was first
88 identified when it was deposited on the basal lamina of zebrafish (HIGASHIJIMA et al., 1997).
89 Murakoshi et al. (MURAKOSHI et al., 2011b) identified mindin as a potential podocyte lesion
90 marker in DN due to the increased SPON2 protein RNAm expression in mice with diabetes and
91 in the urinary excretion of patients with type 2 diabetes mellitus (DMT2). Thus, this study
92 evaluated the expression of mindin protein *in situ* to understand the role of this molecule in DN
93 pathogenesis. We also tested it as a podocyte lesion biomarker.

94 METHODS

95 *Patients*

96 The study included 50 cases of renal biopsies that were previously diagnosed with DN
97 at the Nephropathology Service of General Pathology, Federal University of Triângulo Mineiro
98 (UFTM), Uberaba, MG, Brazil. The control group included 23 cases of kidney autopsies. The
99 exclusion criteria were autolysis, acute tubular necrosis, and moderate-to-severe congestion.
100 The control group for ultrastructure analysis included four cases of renal biopsies without
101 morphological changes. All study samples were taken from patients aged >18 years. This study
102 was approved by the UFTM Research Ethics Committee (number: 3,001,006).

103 *DN diagnosis*

104 DN was diagnosed after sample evaluation under light microscopy (LM), direct
105 immunofluorescence (IF), and transmission electron microscopy (TEM). LM was used to
106 evaluate 2- μ m serial cut slides stained with hematoxylin and eosin, picrosirius, periodic acid
107 methenamine silver, and blue Masson's trichrome, which were evaluated and classified
108 according to the DN Classification (TERVAERT et al., 2010). IF was used to rule out the
109 possibility of diseases associated with immunocomplex formation overlapping DN. Were used
110 antibodies such as immunoglobulin (Ig) G, IgM, IgA, kappa and lambda, complement C3 and
111 C1q and fibrinogen by fluorescein isothiocyanate conjugated antibodies (Dako, Copenhagen,
112 Denmark). Ultrastructure evaluation was used to rule out other diseases and measure GBM
113 thickness. The tissue was fixed in 2.5% Karnovsky's solution + 0.2% ruthenium, which
114 subsequently fixed in 2% osmium tetroxide. Then, it was gradually dehydrated in a series of
115 ethanol and acetone solutions and incorporated into an Epon 812 resin to prepare 60-nm ultra-
116 fine cuts that were then placed on a nickel grid accordingly and examined under an EM-900

117 transmission electron microscope (Zeiss, Germany) (DA SILVA et al., 2019; PEREIRA et al.,
118 2019).

119 *Mindin (Spondin 2 or SPON2) and WT1 immunohistochemistry*

120 Immunohistochemistry was performed on 2- μ m paraffin-embedded fragments. The
121 technique was performed manually using the Novolink non-biotinylated polymer system
122 (Novolink Polymer Detection System Kit, BL, UK, lot 6067432). The antibodies used are
123 described in table 1.

124 Table 1- WT1 and SPON2 antibodies

Primary antibody	Supplier	Clone/Code	Antigen recovery	Concentration
Monoclonal mouse anti-human Wilms' tumor 1 (WT1)	Dako	M3561	Citrate pH 6.0	1:500
Anti-SPON2 polyclonal antibody	abcam	Ab187920	EDTA pH 9.0	1:1000

125

126 *Mindin (Spondin 2 or SPON2) and WT1 immunostaining quantification*

127 All renal biopsy glomeruli and 10 control group glomeruli were evaluated accordingly.
128 The AxionCam ICc 5 (Zeiss®) interactive image analyzer system was used to capture 40x
129 magnification micrographs (final magnification of 1,600x). Cells showing intense brown color
130 were labeled by the observer for SPON2 antibody immunostaining, and the results were
131 expressed as a percentage of the labeled area in relation to the total evaluated fields. WT1 was
132 quantified using ImageJ 1.53 software, and the results were expressed in cell density (cell/mm²)
133 according to Venkatereddy et al. (VENKATAREDDY et al., 2014).

134 *Ultrastructure podocyte/pedichel analysis*

135 Foot process effacement was assessed by TEM (Zeiss EM-900). Quantification was
136 performed using ImageJ 1.53 software using 7000x magnification images. The length in
137 micrometer (μm) of the glomerular loop was measured for each image and divided by the
138 number of pedicels in the respective loop. At the end of the analysis of each biopsy, the mean
139 values of each case were calculated, and this mean underwent factor $\pi/4$ correction to normalize
140 the presumed random variation in the section angle in relation to the long axis of the podocyte
141 (VAN DEN BERG et al., 2004). The mean pedicel width of each patient was expressed in
142 nanometers (nm).

143 *Statistical analysis*

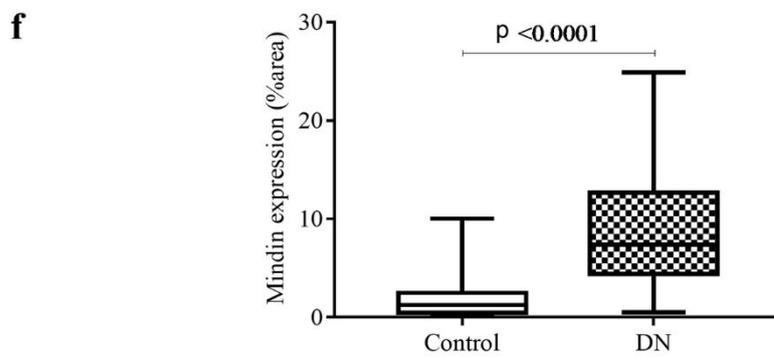
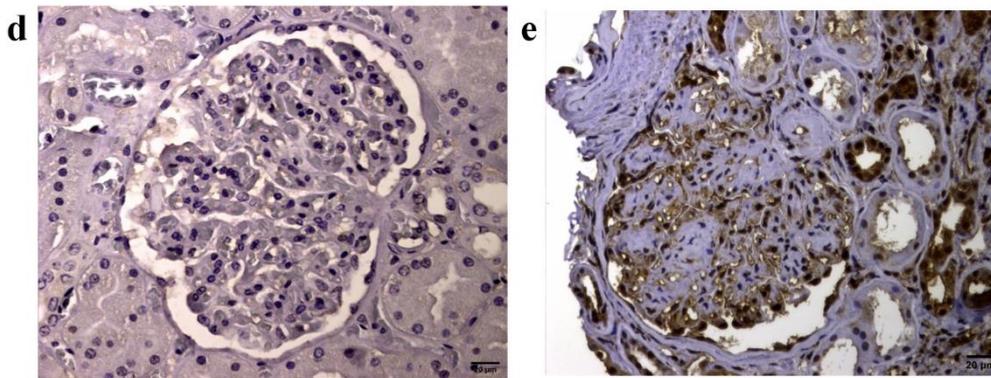
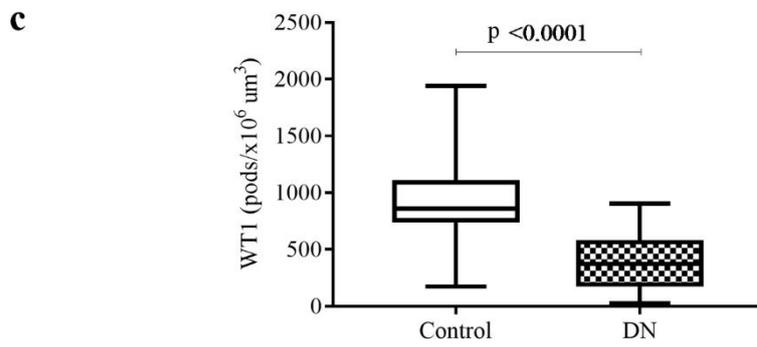
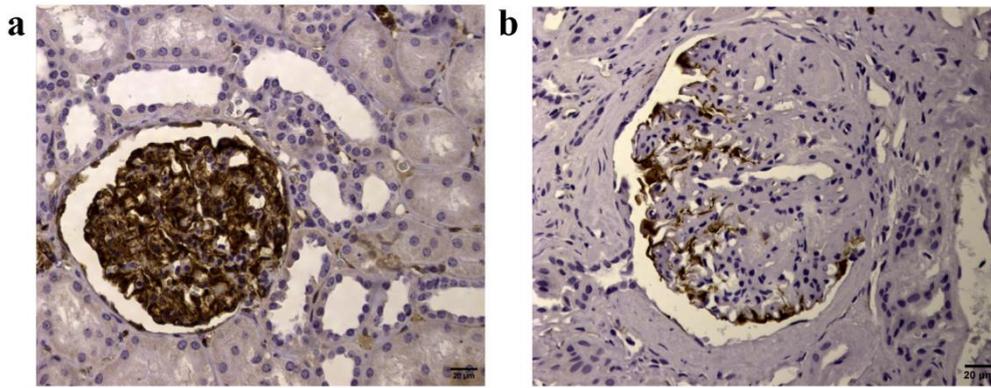
144 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.0 software. The
145 variables were tested to verify normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Student's t-test
146 or analysis of variance was used when distribution was normal, according to the number of
147 groups evaluated. When distribution was not normal, the Mann-Whitney (U) test or the
148 Kruskal-Wallis (H) test for more groups were used accordingly. Correlations were made using
149 Spearman's test (r_s). The diagnostic performance of the biomarker was tested using the receiver
150 operating characteristic (ROC) curve. The differences were considered statistically significant
151 when p was <5% ($p < 0.05$).

152 RESULTS

153 *Podocyte evaluation in DN*

154 The number of podocytes in DN was analyzed by WT1 antibody immunostaining
155 (Figures 1A and 1B). The DN group showed lower WT1 expression than the control group (p

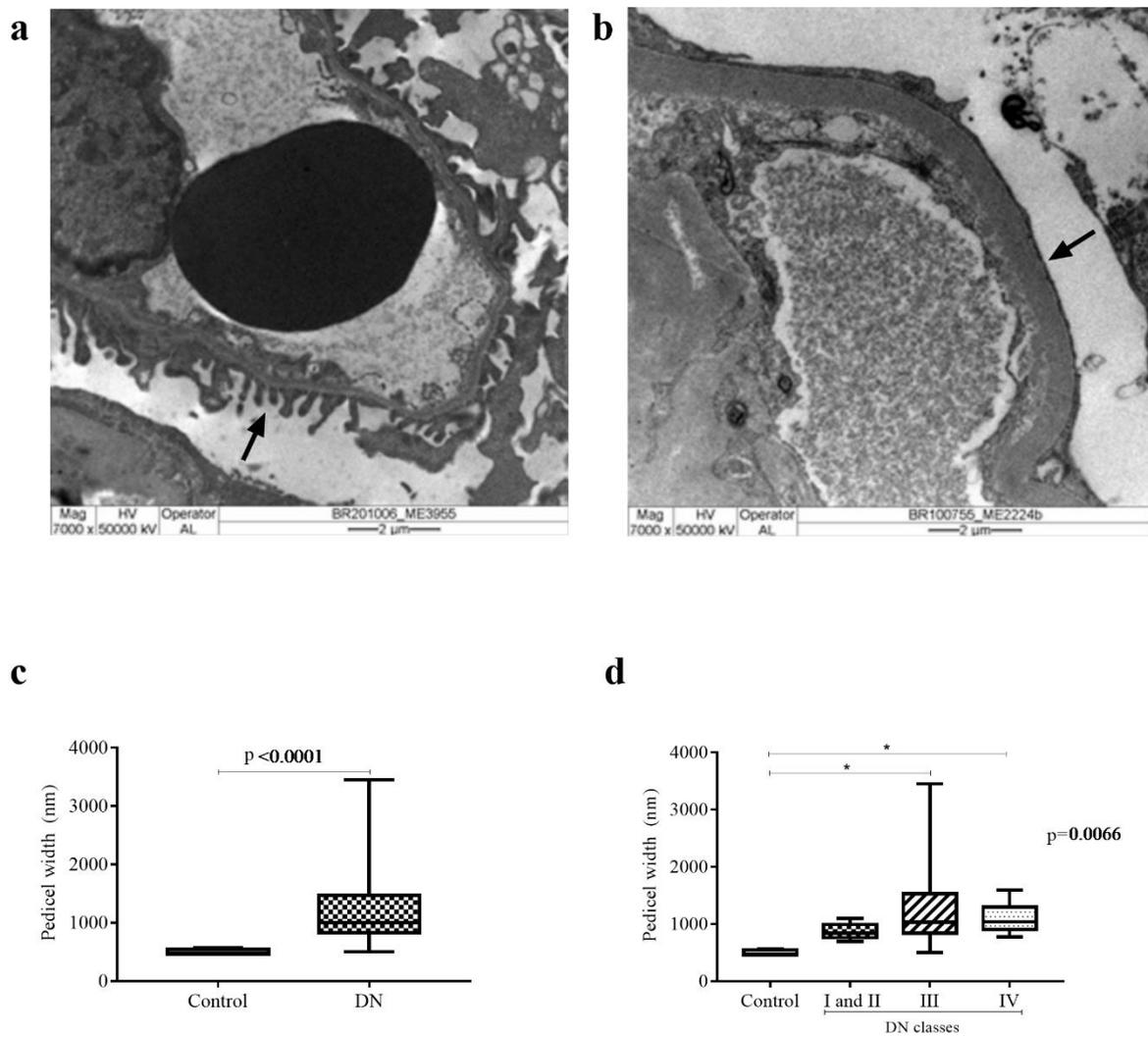
156 < 0.0001, U = 120, Figure 1C, with a smaller amount of podocytes in DN. Since podocytes
157 were reduced in DN, podocyte lesion was evaluated in these DN biopsies using mindin protein
158 (Figures 1D and 1E), a marker of podocyte lesion, showing that patients with DN had a higher
159 expression of this marker than control group ($p < 0.0001$, U = 151, Figure 1F).



161 Figure 1- WT1 and mindin immunolabeling the control and DN groups. (a) *In situ* WT1
162 expression in the glomerular compartment in the control group (400x). (b) WT1 expression in
163 the glomerular compartment in the DN group (400x). (c) Density of podocytes labeled with
164 WT1 in the control and DN groups. Mann-Whitney (U) test. (d) *In situ* mindin expression in
165 the glomerular compartment in the control group (400x). (e) *In situ* mindin expression in the
166 glomerular compartment in the DN group (400x). (f) Percentage of area labeled by mindin
167 antibody in control and DN podocytes. Mann-Whitney (U) test. Horizontal lines represent
168 medians, bars represent 25%-75% percentiles, and vertical lines represent 10%-90%
169 percentiles. $p < 0.05$.

170 *The GFB is changed in DN*

171 Pedicel width increased (Figures 2A and 2B), showing a greater effacement of these
172 structures in the DN group than in the control group ($p < 0.0001$, $U = 1$, Figure 2C). Foot
173 process effacement was present in all DN classes, and it was significantly greater in the DN
174 group than in the control group ($p < 0.0066$, $H = 14.49$), as shown in Figure 2D.



175

176 Figure 2- Foot process effacement in the control and DN groups. (a) Normal pedicels (arrow)

177 under TEM in the control group (7000x). (b) Foot process effacement (arrow) under TEM in

178 the DN group (7000x). (c) Pedicel width in the control and DN groups. Mann-Whitney (U) test.

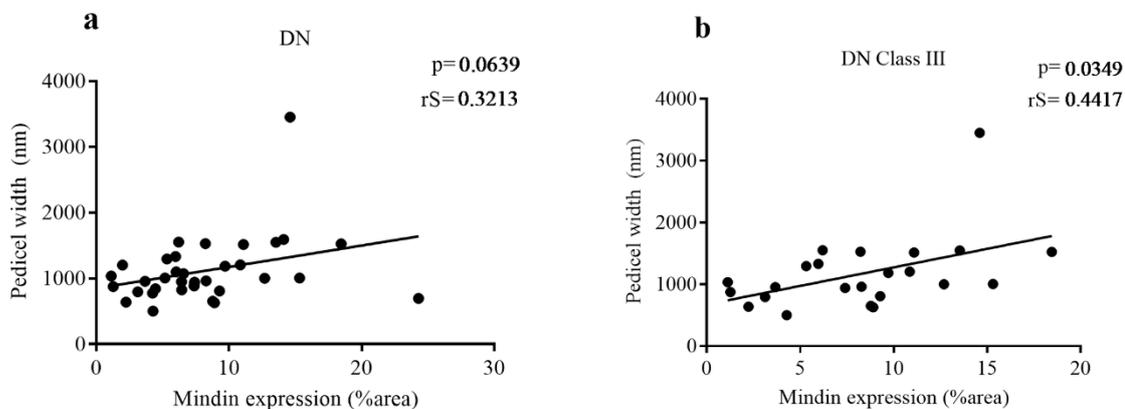
179 (d) Pedicel width in the control group and in different DN classes. Kruskal-Wallis test (H)

180 followed by Dunn's post-test. Horizontal lines represent medians, bars represent 25%-75%

181 percentiles, and vertical lines represent 10%-90% percentiles. $p < 0.05$.

182 *Mindin expression may be associated with podocyte changes in DN, especially in class III*

183 Mindin expression was correlated with foot process effacement due to its increased
 184 expression in DN and its possible relationship with the podocyte lesion. Although no significant
 185 correlation was observed, there was a tendency for a positive correlation between foot process
 186 effacement and mindin expression in DN ($p < 0.0639$, $rS = 0.3213$, Figure 3A). In class III, this
 187 correlation was positive and significant ($p < 0.0349$, $rS = 0.4417$, Figure 3B).

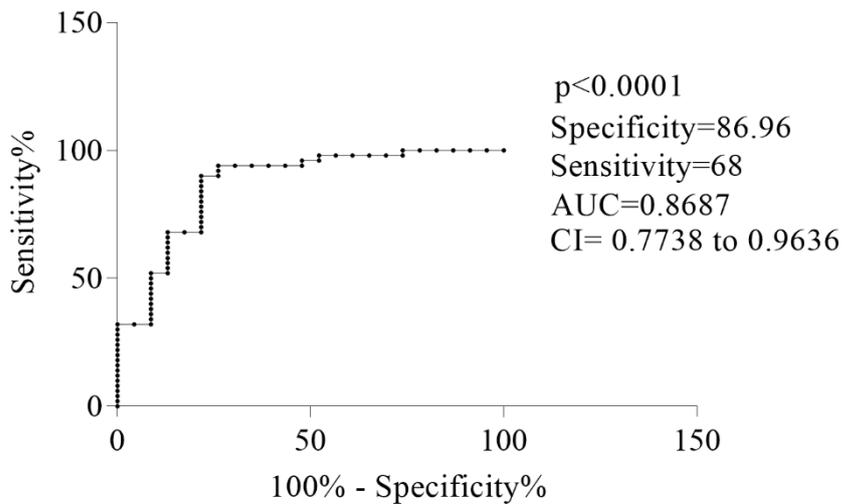


188

189 Figure 3- Correlation between mindin expression and foot process effacement. Correlation
 190 between the percentage of area labeled by mindin antibody in the glomeruli with pedicel width
 191 in the DN group (a) and in class III DN (b). Spearman's correlation (rS). $p < 0.05$.

192 *Mindin can be considered an in situ biomarker for DN*

193 Due to the increased mindin expression in DN cases, we tried to evaluate the usefulness
 194 of mindin protein as an in situ DN biomarker using the ROC curve. An optimum cutoff point
 195 at 5.178 for percentage of area marked labeled with mindin was found to have 68% of
 196 sensitivity, 86.96% of specificity, and AUC of 0.8687 (95% confidence interval: 0.7738-
 197 0.9636, $p < 0.0001$, Figure 4).



198

199 Figure 4- Mindin ROC curve in DN. ROC curve for assessing the diagnostic potential of mindin
200 for podocyte lesion in DN.

201 DISCUSSION

202 This study analyzed the *in situ* expression of mindin protein in cases of renal biopsies
203 in patients with DN and related this expression to morphological podocyte changes to
204 understand the role of this protein in the pathogenesis of the disease.

205 WT1 immunolabeling was used to assess podocyte density in DN. This protein is related
206 to the maintenance and differentiation of this cell (FANNI et al., 2011). This assessment has
207 been used in some studies for the same purpose, both in biopsies (DA SILVA et al., 2020) and
208 in experimental models (FAULHABER-WALTER et al., 2020). The evaluation of WT1
209 expression showed that the DN biopsy glomeruli had less labeled cells than the control
210 glomeruli. A recent experimental model reported the same finding, in which mice with a DN
211 phenotype presented lower podocyte density than those without DN (FAULHABER-WALTER
212 et al., 2020). This difference is due to the fact that WT1 is a podocyte marker (GUO, 2002) and

213 there is loss of these cells through apoptosis (GUO et al., 2017) and detachment in DN
214 (DESSAPT et al., 2009).

215 This study is the first to investigate mindin protein in cases of renal biopsies in patients
216 with DN reporting increased mindin expression in the glomeruli of patients with DN. Some
217 studies in the literature report increased mindin *in situ* and in the urine of experimental DN
218 models as well as in the urine and blood of patients with DN (KAHVECIOGLU et al., 2015;
219 MURAKOSHI et al., 2011b). There is a direct relationship between hyperglycemia, increased
220 mindin production (MURAKOSHI et al., 2011b), and inflammatory cell recruitment. This
221 mechanism is well documented in DN (ARAÚJO et al., 2020a, 2020b) and in other pathological
222 processes (SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2018). Considering the above and the results of
223 our study, we believe that podocytes produce mindin protein that binds to integrins in stress
224 situations caused by DM hyperglycemia, inducing inflammatory cell recruitment and the
225 production of pro-inflammatory cytokines present in DN.

226 Foot process effacement is an ultrastructure podocyte finding in DN. This study showed
227 significantly increased effacement in the DN group than in the control group. This finding
228 corroborates the findings of Pagtalunan et al. (PAGTALUNAN et al., 1997), who reported foot
229 process effacement in DN. The literature reports several causes for foot process effacement
230 depending on proteins that are part of the biology of podocytes. A compensatory actin
231 stabilization increase was demonstrated *in vitro* and *in vivo* under diabetic conditions (DAI et
232 al., 2006). In fact, when the gene that encodes an actin type mutates, α -Actinin-4, leads to foot
233 process effacement (LI et al., 2007b). Another protein involved is nephrine, which is
234 significantly decreased in renal biopsy samples from diabetic patients (DOUBLIER et al., 2003)
235 and in podocytes of mice induced with vascular endothelial growth factor (VEGF) (mimicking
236 early DN), resulting in foot process effacement (VERON et al., 2010). A third protein related

237 to this change is podocalyxin, which is suppressed in hyperglycemic environments both *in vitro*
238 (DROSSOPOULOU; TSOTAKOS; TSILIBARY, 2009) and *in situ*, as observed in
239 streptozotocin-induced diabetic rats (ECONOMOU et al., 2004) and in biopsy samples from
240 patients with diabetes (KOOP et al., 2003). In addition, foot process effacement is related to
241 podocalyxin uncoupling from the actin cytoskeleton (TAKEDA et al., 2001).

242 The present study shows increased mindin expression associated with foot process
243 effacement in DN. This finding corroborates the findings of a previous study that suggested that
244 mindin is a podocyte lesion marker (MURAKOSHI et al., 2011b). Increased mindin expression
245 may be related to foot process effacement induction through signaling via mindin and integrin
246 binding. This signaling pathway activates Rho GTPases, which regulate actin dynamics in
247 dendritic cells (LI et al., 2006). This regulation may be related to podocyte cytoskeletal changes,
248 critically involved in the pathogenesis of glomerular diseases since actin is the main protein
249 related to podocyte cytoskeleton maintenance. There are two hypotheses for the relationship
250 between mindin, DN, and inflammation: 1) mindin can promote pro-inflammatory cytokine
251 release and the consequent inflammatory cell recruitment, leading to kidney cell damage,
252 including podocytes and 2) when damaged by different mechanisms, podocytes produce
253 mindin, which participates in the inflammatory process installed in DN.

254 The present study shows a positive correlation between mindin and foot process
255 effacement in class III patients. This phenomenon may be valid for all classes, but due to the
256 small number of samples from other class patients, these data were not significant. This is
257 justified by the fact that nephrologists usually request renal biopsy when clinical changes are
258 associated with changes other than expected, such as in cases when abrupt proteinuria or
259 hematuria increase shortly after DM diagnosis (RITZ; ZENG; RYCHLÍK, 2011). However, a

260 certain degree of renal impairment is already observed in the initial years after DM diagnosis.
261 Thus, most patients have progressed to higher DN classes at the time of diagnosed.

262 The ROC curve showed that the mindin protein had high specificity in biopsies of
263 patients with DN. Therefore, mindin expression in renal biopsies is a promising podocyte lesion
264 marker in DN, making it possible to estimate ultrastructural changes under LM.

265 CONCLUSIONS

266 For the first time, this study provides evidence that mindin protein is expressed *in situ*
267 in renal biopsies of patients with DN. In addition, it show a relationship between mindin
268 expression and foot process effacement, especially in class III patients, suggesting that mindin
269 can be a possible podocyte lesion biomarker in DN.

270 LIST OF ABBREVIATIONS

271 AUC: Area under curve

272 CKD: Chronic kidney disease

273 DM: diabetes mellitus

274 DMT2: Type 2 diabetes mellitus (DMT2)

275 DN: Diabetic Nephropathy

276 GBM: Glomerular basement membrane

277 GFB: Glomerular filtration barrier (GFB)

278 H: Kruskal-Wallis test

279 IF: immunofluorescence

280 Ig: immunoglobulin

281 LM: light microscopy

282 nm: Nanometers

283 ROC: Receiver operating characteristic

284 rS: Spearman's test

285 TEM: transmission electron microscopy

286 U: Mann-Whitney test

287 UFTM: Federal University of Triângulo Mineiro

288 VEGF: Vascular endothelial growth factor

289 μm : Micrometer

290

291 **DECLARATIONS**

292 **Ethics approval and consent to participate**

293 Patients involved in the study signed a consent form and this study was approved by the

294 Ethics Committee of the Federal University of Triângulo Mineiro, Protocol 3,001,006.

295

296 **Consent for publication**

297 Not applicable

298

299 **Availability of data and materials**

300 The datasets used and / or analyzed during the current study are available from the

301 corresponding author on reasonable request.

302

303 **Competing interests**

304 The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

305

306 **Funding**

307 Not applicable

308

309 **Authors' contributions**

310 Conceptualization: JRM and ALMSM.

311 Formal analysis: JRM and ALMSM.

312 Performed the pathological diagnosis: MAR, SAA and DCW.

313 Methodology: ALMSM, LSA, CAS, ABB, JRCN and VAF.

314 Supervised the manuscript: JRM.

315 Writing - original draft: ALMSM.

316 Writing - review and editing: ALMSM, LSA, CAS, ABB, JRCN, VAF, SAA, DCW, MAR
317 and JRM.

318 All authors read and approved the final manuscript.

319

320 **Acknowledgements**

321 The authors appreciate the financial support of the Conselho Nacional de Desenvolvimento
322 Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
323 Superior (CAPES), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais
324 (FAPEMIG), and the Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU).

325 The authors would like to thank the Discipline of General Pathology at the Federal University
326 of Triângulo Mineiro and the employees of the Nephropathology Service: Alberto Borba and
327 João Nolberto.

328 **REFERENCES**

329 ABRAHAMSON, D. R. et al. Cellular origins of type IV collagen networks in developing
330 glomeruli. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 7, p. 1471–1479, jul.
331 2009.

- 332 AFROZ, T. et al. Clinical and histological correlation of diabetic nephropathy. **Saudi journal**
333 **of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for**
334 **Organ Transplantation, Saudi Arabia**, v. 28, n. 4, p. 836–841, 1 jul. 2017.
- 335 AMBU, R. et al. WT1 expression in the human fetus during development. **European Journal**
336 **of Histochemistry**, v. 59, n. 2, p. 156–163, 2015.
- 337 AN, J. H. et al. The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean
338 type 2 diabetic patients: A possible early stage renal complication. **Journal of Korean**
339 **Medical Science**, v. 24, n. SUPPL.1, p. S75, 2009.
- 340 ANDERSEN, A. R. et al. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: An
341 epidemiological study. **Diabetologia**, v. 25, n. 6, p. 496–501, dez. 1983.
- 342 ARAÚJO, L. S. et al. Analysis of serum inflammatory mediators in type 2 diabetic patients
343 and their influence on renal function. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229765, 2020a.
- 344 ARAÚJO, L. S. et al. Renal expression of cytokines and chemokines in diabetic nephropathy.
345 **BMC Nephrology**, v. 21, n. 1, 28 jul. 2020b.
- 346 ARDURA, J. A. et al. The secreted matrix protein mindin increases prostate tumor
347 progression and tumor-bone crosstalk via ERK 1/2 regulation. **Carcinogenesis**, v. 40, n. 7, p.
348 828–839, 1 jul. 2019.
- 349 BDUJWBUJPO, N. et al. Pg Ejbcbfujd Ofqispqbuiz Jo Njdf. **Journal of Clinical**
350 **Investigation**, v. 121, n. 6, 2011.
- 351 BENZING, T. The slit diaphragm : A signaling platform to regulate podocyte function.
352 **Japanese Journal of Nephrology**, v. 47, n. 3, p. 230–231, 2005.
- 353 BERMEJO, S.; GARCÍA-CARRO, C.; SOLER, M. J. Diabetes and renal disease—should we
354 biopsy? **Nephrology Dialysis Transplantation**, 28 dez. 2019.
- 355 BLANCO, S. et al. ACE inhibitors improve nephrin expression in Zucker rats with
356 glomerulosclerosis. **Kidney International, Supplement**, v. 67, n. 93, p. 10–14, 2005.
- 357 BRYER, J. S.; SUSZTAK, K. **Screening Drugs for Kidney Disease: Targeting the**
358 **PodocyteCell Chemical Biology** Elsevier Ltd, , 15 fev. 2018.
- 359 BYRON, A. et al. Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of
360 extracellular matrix. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 953–
361 966, 2014.
- 362 CAO, Z.; COOPER, M. E. Pathogenesis of diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes**
363 **Investigation**, v. 2, n. 4, p. 243–247, 2011.
- 364 CARDOSO, C. R. L.; SALLES, G. F. Predictors of development and progression of
365 microvascular complications in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. **Journal of**
366 **Diabetes and its Complications**, v. 22, n. 3, p. 164–170, 1 maio 2008.
- 367 CHAU, Y. Y. et al. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental
368 regulator Wt1. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 12, 2011.
- 369 CHEN, H. C. et al. Altering expression of $\alpha\beta 1$ integrin on podocytes of human and rats with
370 diabetes. **Life Sciences**, v. 67, n. 19, p. 2345–2353, 29 set. 2000.
- 371 CHEN, J. et al. Astragaloside IV improves high glucose-induced podocyte adhesion
372 dysfunction via $\alpha\beta 1$ integrin upregulation and integrin-linked kinase inhibition. **Biochemical**
373 **Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 796–804, 15 set. 2008.
- 374 CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and
375 projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 2018.
- 376 CORTEZ, D. N. et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção
377 primária. **ACTA Paulista de Enfermagem**, v. 28, n. 3, p. 250–255, 1 maio 2015.
- 378 DA SILVA, C. A. et al. Evaluation of the diagnostic potential of UPAR as a biomarker in
379 renal biopsies of patients with FSGS. **Disease Markers**, v. 2019, 2019.
- 380 DA SILVA, C. A. et al. In situ evaluation of podocytes in patients with focal segmental

- 381 glomerulosclerosis and minimal change disease. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0241745, 4
382 nov. 2020.
- 383 DAI, H.; LIU, Q.; LIU, B. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in
384 Diabetic Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, 2017.
- 385 DAI, T. et al. Glucose and diabetes: Effects on podocyte and glomerular p38MAPK, heat
386 shock protein 25, and actin cytoskeleton. **Kidney International**, v. 69, n. 5, p. 806–814, 1
387 mar. 2006.
- 388 DALLA VESTRA, M. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure
389 in patients with type 2 diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 3
390 SUPPL. 1, p. 78–82, 2005.
- 391 DAS, R. et al. Transforming growth factor β 1-induced apoptosis in podocytes via the
392 extracellular signal-regulated kinase- mammalian target of rapamycin complex 1-nadph
393 oxidase 4 axis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 52, p. 30830–30842, 25 dez.
394 2015.
- 395 DE BOER, I. et al. Effect of intensive diabetes treatment on albuminuria in type 1 diabetes:
396 Long-term follow-up of the diabetes control and complications trial and epidemiology of
397 diabetes interventions and complications study. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v.
398 2, n. 10, p. 793–800, 2014.
- 399 DE BRUYNE, S. et al. Detection and Characterization of a Biochemical Signature Associated
400 with Diabetic Nephropathy Using Near-infrared Spectroscopy on Tissue Sections. **Journal of**
401 **Clinical Medicine**, v. 8, n. 7, p. 1022, 12 jul. 2019.
- 402 DE FARIA, J. Atualização em fisiologia e fisiopatologia: Patogênese da nefropatia diabética.
403 **J Bras Nefrol**, v. 23, n. 2, p. 121–9, 2001.
- 404 DESSAPT, C. et al. Mechanical forces and TGF β 1 reduce podocyte adhesion through α 3 β 1
405 integrin downregulation. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 9, p. 2645–2655,
406 set. 2009.
- 407 DOUBLIER, S. et al. Nephryn expression is reduced in human diabetic nephropathy:
408 Evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p.
409 1023–1030, 1 abr. 2003.
- 410 DROSSOPOULOU, G. I.; TSOTAKOS, N. E.; TSILIBARY, E. C. Impaired transcription
411 factor interplay in addition to advanced glycation end products suppress podocalyxin
412 expression in high glucose-treated human podocytes. **American Journal of Physiology-**
413 **Renal Physiology**, v. 297, n. 3, p. F594–F603, set. 2009.
- 414 DRUMMOND, K.; MAUER, M. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1
415 Diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1580–1587, 2002.
- 416 ECONOMOU, C. G. et al. **Enhanced podocalyxin expression alters the structure of**
417 **podocyte basal surface** *Journal of Cell Science* *J Cell Sci*, , 1 jul. 2004. Disponível em:
418 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15226400/>>. Acesso em: 16 nov. 2020
- 419 ENE-IORDACHE, B. et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of
420 the world (ISN-KDDC): A cross-sectional study. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 5, p.
421 e307–e319, 2016.
- 422 FANNI, D. et al. Expression of WT1 during normal human kidney development. **Journal of**
423 **Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 24, n. SUPPL. 2, p. 45–48, 2011.
- 424 FAROOQ, U.; RAY, S. G. **2014 Guideline for the Management of High Blood Pressure**
425 **(Eighth Joint National Committee). Take-Home Messages.** *Medical Clinics of North*
426 *America* W.B. Saunders, , jul. 2015a.
- 427 FAROOQ, U.; RAY, S. G. **2014 Guideline for the Management of High Blood Pressure**
428 **(Eighth Joint National Committee). Take-Home Messages.** *Medical Clinics of North*
429 *America* W.B. Saunders, , 1 jul. 2015b. Disponível em:

- 430 <[https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/2014-guideline-for-the-management-of-](https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/2014-guideline-for-the-management-of-high-blood-pressure-eighth-j)
431 [high-blood-pressure-eighth-j](https://pennstate.pure.elsevier.com/en/publications/2014-guideline-for-the-management-of-high-blood-pressure-eighth-j)>. Acesso em: 22 out. 2020
- 432 FAULHABER-WALTER, R. et al. Podocyte density and albuminuria in aging diabetic ins2±
433 mice with or without adenosine a1 receptor signaling. **International Journal of Nephrology**
434 **and Renovascular Disease**, v. 13, p. 19–26, 2020.
- 435 FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. (a Uk E .). **Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1–11, 2018.
- 436 FRANCESCHINI, N. et al. Adiposity patterns and the risk for ESRD in postmenopausal
437 women. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 2, p. 241–250,
438 2015.
- 439 GAO, K. et al. 59-AMP-Activated Protein Kinase Attenuates Adriamycin-Induced Oxidative
440 Podocyte Injury through Thioredoxin-Mediated Suppression of the Apoptosis Signal-
441 Regulating Kinase 1-P38 Signaling Pathway. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 460–
442 471, mar. 2014.
- 443 GENUTH, S. et al. **Implications of the United Kingdom prospective diabetes**
444 **studyDiabetes Care**American Diabetes Association Inc., , jan. 2003.
- 445 GNUDI, L.; COWARD, R. J. M.; LONG, D. A. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel
446 Molecular Mechanisms. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 11, p. 820–
447 830, 2016a.
- 448 GNUDI, L.; COWARD, R. J. M.; LONG, D. A. Diabetic Nephropathy: Perspective on Novel
449 Molecular Mechanisms. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 27, n. 11, p. 820–
450 830, 2016b.
- 451 GREKA, A.; MUNDEL, P. Cell biology and pathology of podocytes. **Annual Review of**
452 **Physiology**, v. 74, p. 299–323, 15 fev. 2012.
- 453 GROUP, T. A. C. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with
454 Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 24, p. 2560–2572, 12 jun.
455 2008.
- 456 GUO, J.-K. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause
457 crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n.
458 6, p. 651–659, 2002.
- 459 GUO, Y. et al. Infiltrating macrophages in diabetic nephropathy promote podocytes apoptosis
460 via TNF-α-ROS-p38MAPK pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 53276–53287, 8 ago. 2017.
- 461 HAAS, M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy a practical
462 approach to diagnosis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 133, n. 2, p.
463 224–232, 2009.
- 464 HARA, M. et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with
465 diabetes: Establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin.
466 **Diabetologia**, v. 55, n. 11, p. 2913–2919, 2012.
- 467 HERBACH, N. et al. Diabetic kidney lesions of GIPRdn transgenic mice: Podocyte
468 hypertrophy and thickening of the GBM precede glomerular hypertrophy and
469 glomerulosclerosis. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 296, n. 4, p.
470 819–829, 2009.
- 471 HIGASHIJIMA, S. ICHI et al. Mindin/F-spondin family: Novel ECM proteins expressed in
472 the zebrafish embryonic axis. **Developmental Biology**, v. 192, n. 2, p. 211–227, 1997.
- 473 IGLESIAS-DE LA CRUZ, M. C. et al. Effects of high glucose and TGF-β1 on the expression
474 of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. **Kidney**
475 **International**, v. 62, n. 3, p. 901–913, 1 set. 2002.
- 476 JARAD, G. et al. Proteinuria precedes podocyte abnormalities in Lamb2-/- mice, implicating
477 the glomerular basement membrane as an albumin barrier. **Journal of Clinical Investigation**,
478 v. 116, n. 8, p. 2272–2279, 1 ago. 2006.

- 479 JIA, W.; LI, H.; HE, Y. W. The extracellular matrix protein mindin serves as an integrin
480 ligand and is critical for inflammatory cell recruitment. **Blood**, v. 106, n. 12, p. 3854–3859, 1
481 dez. 2005.
- 482 JIM, B. et al. Dysregulated nephrin in diabetic nephropathy of type 2 diabetes: A cross
483 sectional study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 17 maio 2012.
- 484 JO, H. A. et al. The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced
485 podocyte hypertrophy. **Kidney Research and Clinical Practice**, v. 35, n. 4, p. 212–218,
486 2016.
- 487 KAHN, S. E. et al. Quantification of the Relationship Between Insulin Sensitivity and β -Cell
488 Function in Human Subjects: Evidence for a Hyperbolic Function. **Diabetes**, v. 42, n. 11, p.
489 1663–1672, 1 nov. 1993.
- 490 KAHVECIOGLU, S. et al. Evaluation of serum Spondin 2 levels in the different stages of
491 Type 2 diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 20, n. 10, p. 721–726, 2015.
- 492 KAMIYAMA, M. et al. Oxidative stress/angiotensinogen/renin-angiotensin system axis in
493 patients with diabetic nephropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n.
494 11, p. 23045–23062, 2013.
- 495 KANN, M. et al. Genome-wide analysis of Wilms' tumor 1-controlled gene expression in
496 podocytes reveals key regulatory mechanisms. **Journal of the American Society of**
497 **Nephrology**, v. 26, n. 9, p. 2097–2104, 2015.
- 498 KASHIHARA, N. et al. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy. **Current Medicinal**
499 **Chemistry**, v. 17, n. 34, p. 4256–4269, 2010.
- 500 KERJASCHKI, D.; SHARKEY, D. J.; FARQUHAR, M. G. Identification and
501 characterization of podocalyxin - The major sialoprotein of the renal glomerular epithelial
502 cell. **Journal of Cell Biology**, v. 98, n. 4, p. 1591–1596, 1984.
- 503 KIM, N. H. et al. Redox dependence of glomerular epithelial cell hypertrophy in response to
504 glucose. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 290, n. 3, p. 741–751,
505 2006.
- 506 KIM, Y. H. et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the
507 PAN-treated rat. **Kidney International**, v. 60, n. 3, p. 957–968, 2001.
- 508 KITAI, Y. et al. Nephrotic range proteinuria as a strong risk factor for rapid renal function
509 decline during pre-dialysis phase in type 2 diabetic patients with severely impaired renal
510 function. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 19, n. 6, p. 1037–1043, 1 dez. 2015.
- 511 KOOP, K. et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney
512 diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 8, p. 2063–2071, 1 ago.
513 2003.
- 514 KOSHIKAWA, M. et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte
515 injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome. **Journal of the American Society**
516 **of Nephrology**, v. 16, n. 9, p. 2690–2701, 1 set. 2005.
- 517 KREIDBERG, J. A. et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell**, v. 74, n. 4, p.
518 679–691, 1993.
- 519 LEVEY, A. S. et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal**
520 **Medicine**, v. 150, n. 9, p. 604–612, 5 maio 2009.
- 521 LEVEY, A. S. et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: A
522 KDIGO Controversies Conference report. **Kidney International**, v. 80, n. 1, p. 17–28, 1 jul.
523 2011.
- 524 LI, H. et al. Efficient dendritic cell priming of T lymphocytes depends on the extracellular
525 matrix protein mindin. **EMBO Journal**, v. 25, n. 17, p. 4097–4107, 6 set. 2006.
- 526 LI, J. H. et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF- β -
527 dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease.

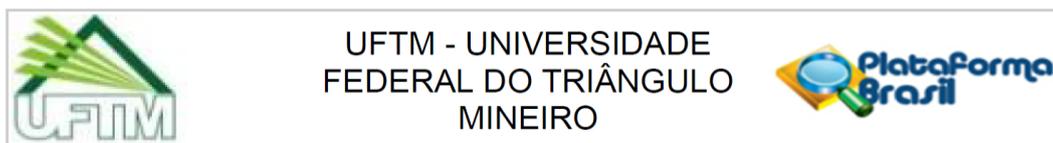
- 528 **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for**
529 **Experimental Biology**, v. 18, n. 1, p. 176–178, 2004.
- 530 LI, J. J. et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 72, p. S36–
531 S42, 2007a.
- 532 LI, J. J. et al. **Podocyte biology in diabetic nephropathy**. *Kidney International*.
533 **Anais...Elsevier**, 1 ago. 2007bDisponível em: <<http://www.kidney-international.org>>. Acesso
534 em: 16 dez. 2020
- 535 LI, N. et al. Transcriptional Activation of Matricellular Protein Spondin2 (SPON2) by BRG1
536 in Vascular Endothelial Cells Promotes Macrophage Chemotaxis. **Frontiers in Cell and**
537 **Developmental Biology**, v. 8, p. 794, 14 ago. 2020.
- 538 LI, X. et al. Nephryn preserves podocyte viability and glomerular structure and function in
539 adult kidneys. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 26, n. 10, p. 2361–2377,
540 1 out. 2015.
- 541 LIN, J. S.; SUSZTAK, K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? **Current**
542 **Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 1–17, 2016a.
- 543 LIN, J. S.; SUSZTAK, K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? **Current**
544 **Diabetes Reports**, v. 16, n. 5, p. 1–9, 2016b.
- 545 LU, M. K.; GONG, X. G.; GUAN, K. L. mTOR in podocyte function: Is rapamycin good for
546 diabetic nephropathy? **Cell Cycle**, v. 10, n. 20, p. 3415–3416, 2011.
- 547 LUCARELLI, G. et al. Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel
548 diagnostic biomarker for prostate cancer. **Journal of Urology**, v. 190, n. 6, p. 2271–2277, 1
549 dez. 2013.
- 550 MARIC-BILKAN, C. **Sex differences in micro- and macro-vascular complications of**
551 **diabetes mellitus***Clinical Science*Portland Press Ltd, , 1 maio 2017. Disponível em:
552 <[/clinsci/article/131/9/833/71779/Sex-differences-in-micro-and-macro-vascular](https://clinsci/article/131/9/833/71779/Sex-differences-in-micro-and-macro-vascular)>. Acesso em:
553 17 mar. 2021
- 554 MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy.
555 **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 1358–1373, 2003.
- 556 MATHEW, S. et al. **Integrins in renal development***Pediatric Nephrology*Springer Verlag, ,
557 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21603909/>>. Acesso em: 10 nov.
558 2020
- 559 MATHIS, D.; VENCE, L.; BENOIST, C. To Diabetes. **Nature**, v. 414, n. December, 2001.
- 560 MENNE, J. et al. The Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention
561 (ROADMAP) observational follow-up study: benefits of RAS blockade with olmesartan
562 treatment are sustained after study discontinuation. **Journal of the American Heart**
563 **Association**, v. 3, n. 2, 2014.
- 564 MINER, J. H.; LI, C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin $\alpha 5$ demonstrates a
565 developmental role for the kidney glomerular basement membrane. **Developmental Biology**,
566 v. 217, n. 2, p. 278–289, 15 jan. 2000.
- 567 MOGENSEN, C. E.; CHRISTENSEN, C. K.; VITTINGHUS, E. **The stages in diabetic**
568 **renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic**
569 **nephropathy***Diabetes*American Diabetes Association, , 1 jun. 1983. Disponível em:
570 <https://diabetes.diabetesjournals.org/content/32/Supplement_2/64>. Acesso em: 22 out. 2020
- 571 MORA-FERNÁNDEZ, C. et al. **Diabetic kidney disease: From physiology to**
572 **therapeutics***Journal of Physiology*Blackwell Publishing Ltd, , 2014. Disponível em:
573 <[/pmc/articles/PMC4198010/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24198010/)>. Acesso em: 15 mar. 2021
- 574 MUNDEL, P.; SHANKLAND, S. J. Podocyte biology and response to injury. **Journal of the**
575 **American Society of Nephrology**, v. 13, n. 12, p. 3005–3015, 2002.
- 576 MURAKOSHI, M. et al. Role of mindin in diabetic nephropathy. **Experimental Diabetes**

- 577 **Research**, v. 2011, 2011a.
- 578 MURAKOSHI, M. et al. Mindin: A novel marker for podocyte injury in diabetic
- 579 nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, n. 7, p. 2153–2160, 1 jul. 2011b.
- 580 NARRES, M. et al. The Incidence of End-Stage Renal Disease in the Diabetic (Compared to
- 581 the Non-Diabetic) Population: A Systematic Review. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0147329,
- 582 26 jan. 2016.
- 583 ORASANU, G.; PLUTZKY, J. **The Pathologic Continuum of Diabetic Vascular**
- 584 **Disease****Journal of the American College of Cardiology**, 3 fev. 2009.
- 585 PAGTALUNAN, M. E. et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II
- 586 diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 2, p. 342–348, 1997.
- 587 PARVING, H. H. et al. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy
- 588 in patients with type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 12, p. 870–
- 589 878, set. 2001.
- 590 PAVENSTÄDT, H.; KRIZ, W.; KRETZLER, M. Cell biology of the glomerular podocyte.
- 591 **Physiological Reviews**, v. 83, n. 1, p. 253–307, 2003.
- 592 PAZ, D. L.; LE MEUR, Y.; RENAUDINEAU, Y. Glomerular Basement Membrane
- 593 Autoantibodies. In: **Autoantibodies: Third Edition**. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. p. 553–560.
- 594 PEREIRA, L. H. DE M. et al. Podocin and uPAR are good biomarkers in cases of Focal and
- 595 segmental glomerulosclerosis in pediatric renal biopsies. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p.
- 596 e0217569, 12 jun. 2019.
- 597 PERSSON, F.; ROSSING, P. **Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and**
- 598 **future perspective****Kidney International Supplements**Elsevier B.V., 1 jan. 2018.
- 599 PRITCHARD-JONES, K. et al. The candidate Wilms' tumour gene is involved in
- 600 genitourinary development. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 194–197, 1990.
- 601 QIAN, X. et al. Spondin-2 (SPON2), a More Prostate-Cancer-Specific Diagnostic Biomarker.
- 602 **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37225, 15 maio 2012.
- 603 RAATS, C. J. I. et al. Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue
- 604 and in experimental glomerulopathies. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p.
- 605 1749–1765, 2000.
- 606 REEVES, W. H.; KANWAR, Y. S.; FARQUHAR, M. G. Assembly of the glomerular
- 607 filtration surface: Differentiation of anionic sites in glomerular capillaries of newborn rat
- 608 kidney. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 735–753, 1 jun. 1980.
- 609 REUTENS, A. T.; ATKINS, R. C. Epidemiology of diabetic nephropathy. **Contributions to**
- 610 **Nephrology**, v. 170, p. 1–7, jun. 2011.
- 611 RITZ, E.; ZENG, X.-X.; RYCHLÍK, I. Clinical Manifestation and Natural History of Diabetic
- 612 Nephropathy. In: **Contributions to Nephrology**. [s.l.] Karger Publishers, 2011. v. 170p. 19–
- 613 27.
- 614 ROMERO, M. et al. Parathyroid hormone-related protein induces hypertrophy in podocytes
- 615 via TGF- β 1 and p27Kip1: Implications for diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis**
- 616 **Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 2447–2457, 2010.
- 617 ROSSING, K. et al. Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal
- 618 disease and improves survival in type 2 diabetic patients. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2241–
- 619 2247, 17 nov. 2005.
- 620 SAEEDI, P. et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections
- 621 for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th
- 622 edition. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 157, p. 107843, 2019.
- 623 SARAN, A.; ROBINSON, R.; ABBOTT, B. UC Irvine UC Irvine Previously Published
- 624 Works Title US Renal Data System 2018 Annual Data Permalink Publication Date. 2019.
- 625 SAWADA, K. et al. Upregulation of α 3 β 1-Integrin in Podocytes in Early-Stage Diabetic

- 626 Nephropathy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.
- 627 STANIFER, J. W. et al. Chronic kidney disease care models in low- and middle-income
628 countries: A systematic review. **BMJ Global Health**, v. 3, n. 2, p. 1–8, 2018.
- 629 STEFAN, G. et al. Histologic predictors of renal outcome in diabetic nephropathy: Beyond
630 renal pathology society classification. **Medicine**, v. 98, n. 27, p. e16333, 1 jul. 2019.
- 631 SU, J. et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms'
632 tumor-1 protein used as a podocyte marker. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 87,
633 n. 2, p. 167–175, 2010.
- 634 SUN, P. et al. Mindin deficiency protects the liver against ischemia/reperfusion injury.
635 **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 5, p. 1198–1211, 1 nov. 2015.
- 636 SUN, Y. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications Recent advances in
637 understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy.
638 **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, n. 4, p. 359–361, 2013.
- 639 SUSZTAK, K. et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes
640 and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 55, n. 1, p. 225–
641 233, 2006.
- 642 TAKEDA, T. et al. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of
643 podocalyxin from the actin cytoskeleton. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 2, p.
644 289–301, 2001.
- 645 TERVAERT, T. W. C. et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. **Journal of the**
646 **American Society of Nephrology**, v. 21, n. 4, p. 556–563, 2010.
- 647 UMANATH, K.; LEWIS, J. B. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018.
648 **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 6, p. 884–895, 1 jun. 2018a.
- 649 UMANATH, K.; LEWIS, J. B. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018.
650 **American Journal of Kidney Diseases**, v. 71, n. 6, p. 884–895, 1 jun. 2018b.
- 651 VAN DEN BERG, J. G. et al. Podocyte foot process effacement is not correlated with the
652 level of proteinuria in human glomerulopathies. **Kidney International**, v. 66, n. 5, p. 1901–
653 1906, 1 nov. 2004.
- 654 VARGHESE, R. T.; JIALAL, I. **Diabetic Nephropathy**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2020.
- 655 VENKATAREDDY, M. et al. Estimating podocyte number and density using a single
656 histologic section. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 5, p. 1118–
657 1129, 2014.
- 658 VERON, D. et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular
659 disease. **Kidney International**, v. 77, n. 11, p. 989–999, 2010.
- 660 WANG, G. et al. Intra-renal and urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules
661 for the estimation of glomerular podocyte loss. **Renal Failure**, v. 32, n. 3, p. 372–379, 2010.
- 662 WANG, X. B. et al. Gremlin regulates podocyte apoptosis via transforming growth factor- β
663 (TGF- β) pathway in diabetic nephropathy. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 183–189, 9
664 jan. 2018.
- 665 WANG, Y.; LI, H.; SONG, S. P. β -arrestin 1/2 aggravates podocyte apoptosis of diabetic
666 nephropathy via wnt/ β -catenin pathway. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 1724–1732, 24
667 mar. 2018.
- 668 WILLIAMS, R. et al. Global and regional estimates and projections of diabetes-related health
669 expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition.
670 **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 162, p. 108072, 1 abr. 2020.
- 671 ZHANG, C. et al. Mindin deficiency in macrophages protects against foam cell formation and
672 atherosclerosis by targeting LXR- β . **Clinical Science**, v. 132, n. 11, p. 1199–1213, 1 jun.
673 2018.
- 674 ZHANG, L. et al. **Research Progress on the Pathological Mechanisms of Podocytes in**

675 **Diabetic Nephropathy** *Journal of Diabetes Research* Hindawi Limited, , 2020. Disponível
676 em: </pmc/articles/PMC7368941/?report=abstract>. Acesso em: 30 nov. 2020
677 ZHU, W. WEI et al. Ultrastructural changes in the glomerular filtration barrier and occurrence
678 of proteinuria in Chinese patients with type 2 diabetic nephropathy. **Diabetes Research and**
679 **Clinical Practice**, v. 86, n. 3, p. 199–207, 2009.
680

1

ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação histopatológica e de citocinas séricas em pacientes diabéticos com ou sem alteração renal

Pesquisador: Juliana Reis Machado e Silva

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 88997018.6.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.001.006

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores:

A Nefropatia Diabética é considerada a principal causa de insuficiência renal terminal com necessidade de terapia renal substitutiva. De acordo com os dados da International Diabetes Federation, o número de diabéticos na população adulta com idade superior a 20 anos poderá ultrapassar 430 milhões em 2030 (Atkins, 2005).

A patogênese da Nefropatia Diabética vem sendo intensamente investigada. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na evolução e progressão desta entidade. Alterações nos podócitos e na espessura da membrana basal glomerular (MBG) são cruciais para o aparecimento gradual de proteinúria nestes pacientes (White, Bilous e Group, 2004).

O podócito é um dos componentes responsável pela integridade da barreira de filtração glomerular, alterações como achatamento ou redução no número de células podem levar ao desenvolvimento de proteinúria (Lemley et al., 2002). Estudos revelam que o apagamento dos processos podocitários é evidente nas fases de proteinúria maciça, porém, foi observado que os pacientes normoalbuminúricos ou microalbuminúricos também podem apresentar certo grau de apagamento e que a gravidade destas lesões é proporcional ao aumento da taxa de excreção de albumina (Perrin et al., 2006; Toyoda et al., 2007).

Foi observado que lesões podocitárias graves podem levar a perda de podócitos pela urina com consequente diminuição do número de podócitos no glomérulo. Pacientes com Diabetes Mellitus

Endereço: Rua Conde Prados, 191

Bairro: Nossa Sra. Abadia

UF: MG

Telefone: (34)3700-6803

Município: UBERABA

CEP: 38.025-260

E-mail: cep@uftm.edu.br

2



Continuação do Parecer: 3.001.006

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 05 de Novembro de 2018

Assinado por:

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

Endereço: Rua Conde Prados, 191

Bairro: Nossa Sra. Abadia

CEP: 38.025-260

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3700-6803

E-mail: cep@uftm.edu.br