

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Livia Helena de Moraes Pereira

*Avaliação de Biomarcadores em Pacientes com
Podocitopatias Pediátricas*

Uberaba

2018

Lívia Helena de Moraes Pereira

Avaliação de Biomarcadores em Pacientes com Podocitopatias Pediátricas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

Orientadoras: Prof^ª Dr^ª Juliana Reis Machado

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Marlene Antônia dos Reis

Uberaba

2018

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

P492a Pereira, Livia Helena de Morais
Avaliação de biomarcadores em pacientes com podocitopatias pediátri-
cas / Livia Helena de Morais Pereira. -- 2018.
87 f. : il., fig., graf., tab.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2018
Orientadora: Profa. Dra. Juliana Reis Machado
Coorientadora: Profa. Dra. Marlene Antônia dos Reis

1. Nefropatias. 2. Rim - Biopsia. 3. Podócitos. 4. Biomarcadores. 5. Re-
sistência a medicamentos. 6. Pediatria. I. Machado, Juliana Reis. II. Univer-
sidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.61

LÍVIA HELENA DE MORAIS PEREIRA

Avaliação de Biomarcadores em Pacientes com Podocitopatias Pediátricas

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Humana”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado
Coorientadora: Prof^a Dr^a Marlene Antônia dos Reis

29 de Junho de 2018

Banca examinadora:

Prof^o Dr. Sérgio Veloso Brant Pinheiro
Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG

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

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

Prof^a Dr^a Adilha Rua Misson
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

Prof^o Dr^a Eliângela de Castro Côbo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

À minha orientadora Juliana,
Por acreditar que tudo daria certo e se empenhar para que isso acontecesse. Pelo apoio ao longo do doutorado, por acreditar em mim, pelas palavras de amizade, incentivo e ânimo. Pelo exemplo de perseverança, dedicação, competência e qualidade em tudo que faz.

À minha coorientadora Marlene,
Por ser um exemplo de dedicação,
superação e competência. Pelos
ensinamentos presentes em cada
conversa, pelas oportunidades e
incentivos ao longo do doutorado.

A Deus, pela oportunidade da vida e pelo amor incondicional.

Aos meus pais, Maria Helena e Geraldo, pelo amor, por serem meus exemplos e meu abrigo de paz e conselhos.

Ao meu esposo, Leonardo, pela paciência, incentivo, companheirismo, alegrias, amizade e amor!

Aos meus irmãos, Rangel e Leandro, pelo carinho, afeto e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inúmeras oportunidades.

Ao meu amado esposo, Leonardo, por acreditar em mim, me incentivar, escutar, aconselhar e me estimular sempre a crescer. Obrigada pelo amor e alegria de cada dia!

Aos meus queridos pais, pelos ensinamentos, por me guiarem para o melhor caminho, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e incentivo.

A minha família pelos momentos de alegria, paz, conselhos e amor.

Ao meu saudoso avô, Jerônimo, pelo afeto e pelas palavras sábias em momentos difíceis.

Aos meus irmãos e cunhadas, Rangel e Aida, Leandro e Andrêsa, pelo carinho e amizade.

Aos meus afilhados, Gabriel, Luísa e Lucas pela alegria, carinho, amor e leveza.

A Geni e Romeu, meus sogros, pelo apoio, auxílio constante, carinho e cuidados a mim dedicados.

A Prof^a Dr^a Juliana Reis Machado pelo aprendizado ao longo de todo doutorado, pelas oportunidades, pelos incentivos, confiança em meu potencial, pelos ensinamentos transmitidos com respeito, serenidade e humildade. Obrigada por tudo!

A Prof^a Dr^a Marlene Antônia dos Reis pela oportunidade e incentivo, pelo exemplo de competência e determinação, pela visão de um corpo e mente sãos. Obrigada por partilhar seus conhecimentos!

Ao Prof^o Dr^o Marcos Vinicius da Silva pelo incentivo e ajuda nessa reta final.

A Liliane Silvano Araújo, Crislaine Aparecida da Silva e Maria Luíza Gonçalves dos Reis Monteiro que foram mais que parceiras de doutorado, foram amigas que ganhei! Obrigada por todos ensinamentos partilhados, pelas inúmeras ajudas e socorros que me prestaram. Obrigada pelos momentos de alegria e prazer, principalmente na hora do café, vocês tornaram o doutorado mais feliz! Vocês me ajudaram a concluir esse trabalho, serei sempre grata!!

Aos professores e amigos da disciplina de Patologia Geral: Ana Paula, Alberto, Aline, Aloísio, Bianca, Camila Cavellani, Carlos, Cláudia, Edson, Ednéia, Eliângela, Érika, Fernanda, Gabriela, Guilherme, Grace, Isabela Rios, João, José Henrique, Juliana Palmieri, Karla, Laura Aguiar, Laura Penna, Laura Venâncio, Lenaldo, Lívia Alves, Lourimar, Luanna Mara, Márcia, Maria Helena, Mariana Mauad, Mariana Oliveira, Roberta, Rosana, Sônia, Pedro, Vandair e Vicente pelo convívio, troca de experiência e colaboração.

Ao professor Fernando Silva Ramalho do departamento de Patologia e Medicina Legal da USP de Ribeirão Preto por ter fornecido amostras de casos para o grupo controle e por ter sido extremamente atencioso.

A Tuânia e ao André, funcionários da pós-graduação, pela ajuda, prontidão e esclarecimentos sempre prestados.

A todos os funcionários, em especial meus amigos enfermeiros, da Unidade de Terapia Renal (UTR-HC/UFTM) pela paciência e compreensão ao longo do doutorado.

À todas as crianças deste estudo, por cederem um pouco de si e sem as quais este trabalho não seria possível.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro por ser meu berço de formação desde a graduação, por permitir que eu usufruísse de toda sua estrutura física e humana na minha formação, e por me acolher como Enfermeira desta instituição.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES, FUNEPU, EBSERH-HC, Serviço de Nefropatologia, pelo auxílio financeiro para realização desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Introdução: Doença de Lesões Mínimas (DLM) e Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) são podocitopatias, um dos principais grupos de glomerulopatias da infância. Há controvérsias se são lesões glomerulares distintas ou manifestações diversas dentro do mesmo espectro de doenças, pois podem apresentar curso clínico semelhante e podem ter evoluções variadas, indo da remissão à falha terapêutica. O CD80, o uPAR e algumas proteínas do diafragma *slit* nos podócitos podem estar alterados no glomérulo de pacientes com GESF e DLM e podem funcionar como biomarcadores e/ou marcador de prognóstico dessas podocitopatias em biópsias renais. **Objetivo:** Avaliar o potencial diagnóstico de CD80, uPAR, nefrina e podocina para DLM e GESF na biópsia renal pediátrica, detectar o possível potencial prognóstico dos marcadores e avaliar a evolução clínica desses pacientes. **Metodologia:** Foram selecionadas biópsias renais de 50 crianças, de 2 a 18 anos, com diagnóstico de DLM (29) e GESF (21). O grupo controle foi composto por 15 casos de autópsias pediátricas, sem alteração da função renal. Foram avaliadas as expressões *in situ* de WT1, Nefrina, Podocina, CD80 e uPAR por meio da técnica de imunoperoxidase. Foi utilizada curva ROC para análise de desempenho diagnóstico dos biomarcadores. Foi avaliado também a evolução clínica e a terapia medicamentosa de 22 crianças, seis anos após o diagnóstico. Os biomarcadores foram avaliados em relação a evolução clínica. **Resultado:** Pacientes com DLM e GESF expressaram menos WT1 e nefrina na biópsia renal que pacientes do grupo controle ($p \leq 0,0001$; $F=19,35$ e $p < 0,0001$; $H=21,54$). Pacientes com GESF expressaram menos nefrina e podocina que os casos controle ($p < 0,0359$; $H=6,655$) e houve correlação positiva e significativa entre nefrina e podocina ($p=0,0026$; $rS=0,6502$). Não houve diferença entre os grupos, quanto a expressão de CD80 ($p=0,1895$; $H=3,327$). Casos de GESF expressaram mais uPAR que casos controle e DLM ($p=0,0019$; $H=12,57$). A podocina apresentou sensibilidade de 73,3% e especificidade de 86,7% ($p=0,006$) e uPAR teve sensibilidade de 78,9% e especificidade de 73,3% ($p=0,004$) nas biópsias de pacientes com GESF. A maioria dos pacientes apresentou algum grau de remissão do quadro inicial após o tratamento (64%). A expressão de uPAR no momento do diagnóstico foi significativamente maior entre os pacientes que evoluíram com resistência terapêutica em relação aos que evoluíram com remissão ($p=0,04$; $t=0,2524$). **Conclusão:** Podocina e uPAR são bons marcadores para GESF. Maior expressão de uPAR em casos de podocitopatias é fator preditor de resistência terapêutica. Esses achados sugerem que podocina e uPAR podem ser usados como biomarcadores na rotina da biópsia renal nos casos de podocitopatias em que a

lesão (esclerose) não for amostrada, e que o uPAR pode auxiliar na determinação do prognóstico desses pacientes.

Palavras Chaves: Biomarcadores, Biópsia renal pediátrica, Podocina, uPAR, Resistência Terapêutica, Podocitopatias.

ABSTRACT

Introduction: Minimal Change Disease (MCD) and Focal and Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) are podocytopathies, one of the main groups of glomerulopathies in childhood. It is controversial whether they are distinct glomerular lesions or diverse manifestations within the same spectrum of diseases, since they may present a similar clinical course and may have varying outcomes ranging from remission to therapeutic failure. CD80, uPAR and some podocyte slit diaphragm proteins may be altered in glomerulus of patients with FSGS and MCD and may function as podocytopathy biomarkers and / or prognostic markers in renal biopsies.

Objective: To evaluate the diagnostic potential of CD80, uPAR, nephrin and podocin for MCD and FSGS in renal pediatric biopsies and to detect the potential of uPAR as prognostic marker.

Methods: Renal biopsies of 50 children with age ranging from two to 18 years old, with diagnosis of MCD (29) and FSGS (21) were selected. Control group consisted of 15 renal fragments from pediatric autopsies, with no change in renal function. In situ expressions of WT1, Nephrin, Podocin, CD80 and uPAR were evaluated by immunoperoxidase technique. ROC curve was used to analyze biomarkers diagnostic performance. Clinical outcome and drug therapy of 22 children, six years after diagnosis, were also evaluated. Biomarkers were evaluated regarding clinical outcome.

Results: Patients with MCD and FSGS had decreased expression of WT1 and nephrin on renal biopsies comparing to control group ($p \leq 0,0001$, $F = 19.35$ and $p < 0.0001$; $H = 21.54$). Patients with FSGS showed less nephrin and podocin than control cases ($p < 0.0359$; $H = 6.655$) and there was a positive and significant correlation between nephrin and podocin ($p = 0.0026$, $rS = 0.6502$). There was no difference between groups regarding CD80 expression ($p = 0.1895$; $H = 3.327$). FSGS cases expressed more uPAR than control and MCD cases ($p = 0.0019$; $H = 12.57$). Podocin presented sensitivity of 73.3% and specificity of 86.7% ($p = 0.006$) and uPAR had sensitivity of 78.9% and specificity of 73.3% ($p = 0.004$) in FSGS biopsies. Most patients presented some degree of remission of initial condition after treatment (64%). uPAR expression at the time of diagnosis was significantly higher among patients who evolved with therapeutic resistance than those who evolved with remission ($p = 0.04$; $t = 0.2524$).

Conclusion: Podocin and uPAR are good markers for FSGS. Higher uPAR expression in cases of podocytopathies is a predictor of therapeutic resistance. These findings suggest that podocin and uPAR can be routinely used as biomarkers in renal biopsies from cases of podocytopathies in which the lesion (sclerosis) is not sampled and that uPAR may assist in determining prognosis

Key Words: Biomarkers, renal biopsy, podocin, uPAR, therapeutic resistance, podocytopathies

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma de seleção dos casos para estudo	39
Figura 2 - Quantificação da expressão das imunomarcações de Nefrina e Podocina	43
Figura 3 - Quantificação da expressão das imunomarcações por contagem de células	43
Figura 4 - Expressão de WT1 nos glomérulos. Expressão de WT1 no compartimento glomerular.....	49
Figura 5 - Expressão de nefrina nos glomérulos. Expressão nefrina no compartimento glomerular.....	50
Figura 6 - Expressão de podocina nos glomérulos. Expressão podocina no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase	50
Figura 7 - Expressão de CD80 nos glomérulos. Expressão de CD80 no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase	51
Figura 8 - Expressão uPAR no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase.....	52
Figura 9 - Correlação entre Nefrina e Podocina	52
Figura 10 - Imunomarcação em pacientes dos grupos Controle, DLM e GESF.....	53
Figura 11 - Curva ROC dos indicadores de diagnóstico	54
Figura 12 - Creatinina sérica e TFGe no momento do diagnóstico e após seguimento	58
Figura 13 - uPAR como marcador prognóstico em podocitopatias.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos casos de DLM, GESF e grupo controle	46
Tabela 2 - . Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com GESF e LM.....	48
Tabela 3 - Valores de creatinina e TFGe no momento do diagnóstico	55
Tabela 4 - Tabela 4. Estratégia terapêutica e evolução dos pacientes após a média de 6 anos	57
Tabela 5 - Valores de creatinina e TFGe após a média de 6 anos.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT: Associação Brasileira de Normas técnicas

ACTN-4: alfa actnina 4

APC: Célula apresentadora de antígenos

APOL-1: Apolipoproteína L1

AUC: Área abaixo da curva

BFG: Barreira de filtração glomerular

BRA: Bloqueador de receptor de angiotensina

C3: Proteína 3 do complemento

C1q: Proteína 1q do complemento

CD2AP: Proteína associada a CD2

CD80: Cluster of differentiation 80

CKD-EPI: Colaboração Epidemiológica da Doença Renal Crônica

CLCF1: fator-1 de citocina semelhante à cardiotrofina

CTLA-4: Linfócito T citotóxico associado a proteína 4

CSA: Ciclosporina

CFA: Ciclofosfamida

Cr: creatinina

Cdc42: proteína Homóloga 42 de controle de divisão celular

DS: Diafragma slit

DRC: Doença renal crônica

DLM: Doença de Lesões Mínimas

Dx: Diagnóstico

F: ANOVA

GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

GPI: Glicosilfosfatidilinositol

GTPase: guanosina trifosfatases

H: Kruskal-Wallis

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HE: Coloração hematoxilina e eosina

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

IECA: Inibidor da enzima conversora de angiotensina

IF: Imunofluorescência

Ig: Cadeia pesada de imunoglobulinas

IL: Interleucina

IC: Intervalo de confiança

LPS: Lipopolissacarídeo

MBG: Membrana basal glomerular

MEC: Matriz extracelular

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

ML: Microscopia de luz

MF: Microscopia de fluorescência

ND: Nefropatia diabética

NOS: Sem outras especificações

NIgA: Nefropatia por IgA

NPHS1: gene codificador da nefrina

NPHS2: gene codificador da podocina

PAMS: ácido periódico de metanamina de prata

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

PAUR: gene codificados do uPA

PS: Picro-sírius

rS: Spearman

r: Pearson

Rac1: proteína de transdução de sinal

ROC: Receiver Operating Characteristic

SMAD: Proteína intracelular transdutora de sinal do TGF- β

suPAR: Receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase solúvel

SN: Síndrome nefrótica

SNDE: Síndrome nefrótica dependente de esteroides

SNFR: Síndrome nefrótica frequentemente recidivantes

SNRE: Síndrome nefrótica resistente a esteroides

SNSE: Síndrome nefrótica sensível a esteroides

TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada

Th2: Linfócitos T helper tipo 2

TMA: Tricômico de Masson Azul

TNF: Fator de necrose tumoral

Treg: Células T regulatórias

TRPC6: Canais Potencial Receptor Transiente 6

uPAR: Receptor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

uPA: Uroquinase

ZO-1: Zona de oclusão 1

g/24h: Gramas por dia

mg/dl: Miligramas por decilitros

pg/ml: Picogramas por mililitros

μ m: Micrômetros

mm: Milímetros

nm: Nanômetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	GLOMÉRULOS	20
1.2.1	Podócitos	21
1.2.1.1	WT1	21
1.2.2	Proteínas do Diafragma Slit	22
1.3	SÍNDROME NEFRÓTICA EM CRIANÇAS	24
1.4	PODOCITOPATIAS	25
1.4.1	Doença de lesões mínimas	25
1.4.2	Glomeruloesclerose segmentar e focal.....	27
1.5.1	O uPAR e suPAR	29
1.6	TERAPIA MEDICAMENTOSA	30
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	HIPÓTESE	34
4	OBJETIVO GERAL	36
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
5	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	38
5.1	CASUÍSTICA	38
5.2	COMPILAÇÃO DOS DADOS E CLASSIFICAÇÃO.....	40
5.3	MÉTODOS	40
5.3.1	Exame anatomopatológico	40
5.3.1.1	Análise Macroscópica	41
5.3.1.2	Microscopia de luz comum.....	41
5.3.1.3	Microscopia de imunofluorescência.....	41
5.3.1.4	Microscopia eletrônica	41
5.3.2	Imunoperoxidase	41
5.3.3	Quantificação das imunomarcações	42
5.3.4	Análise estatística.....	43
5.3.5	Normas para a confecção do manuscrito.....	44
5.3.6	Aspectos éticos	44
6	RESULTADOS	46
6.1	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO	46
6.2	PERFIL CLÍNICO	47
6.3	QUANTIFICAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES.....	49
6.3.1	Expressão de WT1	49
6.3.2	Expressão de Nefrina	49

6.3.3	Expressão de Podocina.....	50
6.3.4	Expressão de CD80	51
6.3.5	Expressão de uPAR.....	51
6.4	ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES	52
6.5	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	54
6.6	EVOLUÇÃO CLÍNICA.....	55
6.6.1	Dados laboratoriais.....	55
6.6.2	Resposta ao tratamento e evolução clínica.....	55
6.6.3	Avaliação de marcadores laboratoriais de prognóstico conforme evolução clínica	58
7	DISCUSSÃO.....	61
7.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS.....	61
7.2	ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO E CORRELAÇÕES.....	62
7.3	TERAPIA MEDICAMENTOSA E EVOLUÇÃO CLÍNICA	67
7.4	ANÁLISE DE MARCADOR PROGNÓSTICO	69
8	CONCLUSÕES.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
8.1	CONCLUSÃO FINAL.....	73
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	754

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLOMÉRULOS

Os glomérulos funcionam como filtro para o plasma restringindo a passagem de algumas proteínas e macromoléculas com maior peso molecular (Tryggvason e Wartiovaara, 2005). Em condições fisiológicas, a barreira de filtração glomerular (BFG) é permeável à água e a pequenos solutos, e de maneira muito reduzida à albumina ou a outras proteínas de peso molecular equivalente ou maiores. A eliminação urinária de proteína é de até 4mg/m²/hora, sendo que a albumina representa uma parcela importante dessas proteínas no filtrado glomerular. Defeitos na BFG podem culminar com o aumento da permeabilidade à albumina, a proteínas de tamanho semelhante e causar proteinúria (Montañés Bermúdez *et al.*, 2011).

Os glomérulos situados no córtex renal são originados das arteríolas aferentes, que se dividem em finos capilares e, estes em conjunto, formam o tufo glomerular envolto pela cápsula de Bowman. Em vista disso, a parede desses vasos compõe a BFG, e lesões nessa região parecem ser a causa inicial das podocitopatias. A BFG é formada por três constituintes: o endotélio fenestrado, a membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos. Desses partem os processos podocitários entre eles uma fina membrana é formada, o diafragma slit (DS), que também compõe a barreira. A filtração ocorre pelo mecanismo de seletividade baseado no tamanho e carga dos elementos filtrados (Tryggvason *et al.*, 2006).

O endotélio fenestrado é revestido por uma camada de glicosaminoglicanos polianiônicos e glicoproteínas, possui orifícios de 70 a 100nm de diâmetro, mas eles não parecem ser os responsáveis principais pelo processo de filtração glomerular. Alguns estudos mostram que é possível que o glicocálix do endotélio, com cargas negativas devido as sialoproteínas e glicosaminoglicanos, tenha um papel mais relevante nesse processo (Tryggvason *et al.*, 2006; Jefferson *et al.*, 2011).

O segundo componente é a MBG, que é uma matriz acelular que atua como suporte para a parede capilar e contribui na BFG por meio de sítios aniônicos localizados nas cadeias de sulfato de heparan e condroitina situadas nas cadeias de *perlecan* e *agrin*. O mecanismo de ação parece ser o de eliminação enzimática ou alteração da carga da membrana. A laminina e o colágeno tipo IV fazem parte da MBG, e têm se mostrado indispensáveis para a filtração glomerular, uma vez que a deficiência de um desses componentes desencadeia um quadro de proteinúria importante (Doublie *et al.*, 2001; Tryggvason *et al.*, 2006; Jefferson *et al.*, 2011).

1 A terceira camada é composta pelos podócitos, que são terminações altamente
2 especializadas da diferenciação das células de *lying*, localizados na região externa dos capilares
3 glomerulares (Tryggvason *et al.*, 2006).

4 5 **1.2.1 Podócitos**

6 Os podócitos são estruturas primárias que possuem prolongamentos em formato de pés-
7 interdigitais (processos podocitários ou pedicelos) e interagem com a MBG, formando o DS.
8 Os principais ligantes que garantem a interação pedicelos-MBG são as $\alpha 3\beta 1$ -integrinas e os $\alpha\beta$
9 distroglicanos. Os processos podocitários parecem ser a principal barreira de filtração de
10 proteínas, devido sua seletividade quanto a carga e tamanho das moléculas, sendo considerado
11 um tipo de junção gap, com uma fina membrana que faz a interligação dos poros à MBG
12 (Pavenstädt *et al.*, 2003; Tryggvason e Wartiovaara, 2005; Tryggvason *et al.*, 2006; Jefferson
13 *et al.*, 2011).

14 A estrutura dos podócitos é muito importante para manutenção da BFG, e para a
15 arquitetura e contratilidade dos pedicelos, dessa maneira a arquitetura dos podócitos é composta
16 por microfilamentos que contêm miosinas tipo I e tipo II, alfa-actinina, talina, paxilina,
17 vinculina e paladina, que permitem a contratilidade dessas células. Alterações ou mutações em
18 reguladores do citoesqueleto de actina têm sido associados ao desenvolvimento de doenças
19 proteinúricas (Asanuma e Mundel, 2003).

20 O comprometimento em um desses três componentes pode desencadear a proteinúria.
21 Além disso, as interações entre os podócitos, as células endoteliais e as mesangiais são
22 fundamentais para a manutenção da função da parede capilar glomerular (Tryggvason e
23 Wartiovaara, 2005; Jefferson *et al.*, 2011).

24 25 *1.2.1.1 WT1*

26 O gene WT1, gene supressor do Tumor de Wilms, codifica um fator de transcrição
27 implicado na tumorigênese e na especificação do desenvolvimento urogenital normal. Dentro
28 desses tecidos, a proteína codificada por esse gene, chamada de WT1, desempenha um papel
29 no crescimento celular (diferenciação celular) e a autodestruição das células (apoptose). Para
30 realizar essas funções, a proteína WT1 regula a atividade de outros genes ao se ligar a regiões
31 específicas do DNA. Com base nessa ação, a proteína WT1 é chamada de fator de transcrição
32 (Kreidberg *et al.*, 1993; Mrowka e Schedl, 2000).

1 A proteína WT1 foi estudada quanto a sua localização por meio de microscopia confocal
2 e foi identificada a distribuição intracelular exclusivamente nuclear. A distribuição nuclear e o
3 padrão seletivo de expressão sustentam o papel proposto de WT1 como um fator de transcrição
4 ativo durante o desenvolvimento urogenital. A persistência da expressão de WT1 no rim adulto
5 sugere um papel na homeostase do podócito (Mundlos *et al.*, 1993; Mrowka e Schedl, 2000).

6 Várias mutações podem ocorrer em WT1 e como consequência são identificados o
7 desenvolvimento de tumores, como o nefroblastoma (tumor de Wilms), mesotelioma, câncer
8 de mama, tumor desmoplásico de células redondas pequenas e leucemia. Ainda são vistos
9 anomalias genital, retardo mental, Doença de Denys Drash (DDD) e Síndrome de Fraiser (SF).
10 Essas duas últimas manifestam-se com quadro de síndrome nefrótica hereditária, sendo a DDD
11 manifestada com esclerose mesangial difusa e a SF um padrão típico de GESF (Kreidberg *et*
12 *al.*, 1993; Mrowka e Schedl, 2000).

13 No rim totalmente desenvolvido, a expressão de WT1 persiste nos podócitos e, em
14 quantidades menores, nas células epiteliais da cápsula de Bowman. O que sugere um papel mais
15 amplo, do que apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento renal (Kreidberg *et al.*, 1993;
16 Mrowka e Schedl, 2000).

17 Nas doenças glomerulares, quando os podócitos são lesados, seja por apoptose, necrose,
18 autofagia alterada, catastrofes mitóticas e descolamento podem causar uma redução aguda ou
19 crônica na densidade do podócito. Como a proliferação de células existentes é insuficiente para
20 substituir aqueles destacados, o número de podócitos diminui com a evolução de algumas
21 doenças (Shankland *et al.*, 2014). Estudos têm utilizado o WT1 para quantificar a densidade de
22 podócitos com intuito de descrever a manutenção ou perda de podócitos nas amostras de biópsia
23 renal (Kawakami *et al.*, 2012; Shankland *et al.*, 2014). Dessa maneira, a estimativa do número
24 de podócitos tem sido considerado um componente crítico de estudos de doenças renais
25 progressivas (Shankland *et al.*, 2014).

27 **1.2.2 Proteínas do Diafragma Slit**

28 O DS é constituído por proteínas específicas, tais como nefrina, Neph1, Neph2, proteína
29 associada a CD2 (CD2AP), FAT (1 e 2), *Zona ocludens* 1 (ZO-1), P-caderina, podocina, dentre
30 outras. Além da participação na BFG, ele atua na sinalização de informação para os podócitos.
31 A interação com o citoesqueleto de actina dos processos podocitários ocorre através de
32 proteínas ligantes, como CD2AP, Nck, ZO-1 e as cateninas (Pavenstädt *et al.*, 2003;
33 Tryggvason e Wartiovaara, 2005; Tryggvason *et al.*, 2006).

1 As principais proteínas envolvidas no processo de filtração glomerular, e que tem sido
2 alvo de muitos estudos é a nefrina e a podocina. A nefrina, codificada pelo gene NPHS1, foi a
3 primeira proteína a ser localizada no DS e parece ser o seu principal componente estrutural.
4 Trata-se de uma proteína com domínios intracelular, transmembrana e extracelular, sendo que
5 este último forma poros com diâmetros menores que o da albumina através de interações entre
6 si. Ela forma interações homifílicas na fenda originada pelos processos podocitários na região
7 extracelular, e a elas agregam outras moléculas que auxiliam na estabilização do DS, formando
8 um *zipper*. A podocina, codificada pelo gene NPHS2, é uma proteína de membrana localizada
9 exclusivamente na região de inserção do DS, possui dois domínios voltados para a região
10 intracelular que interagem com a nefrina, Neph1 e CD2AP (Asanuma e Mundel, 2003;
11 Tryggvason *et al.*, 2006). Ela tem papel na estabilização do DS, por organizar a estrutura e
12 regular a sua função de filtração (Pavenstädt *et al.*, 2003; Tryggvason e Wartiovaara, 2005;
13 Tryggvason *et al.*, 2006).

14 Mutações nessas proteínas do DS, são pouco comuns, e podem desencadear doenças
15 renais, com proteinúria importante, perda da função renal e por vezes, podem ser incompatíveis
16 com a vida. Esse grupo de doenças proteinúricas hereditárias com manifestações clínicas
17 semelhantes, são denominadas Síndromes das Proteinúrias Hereditárias (Rocha *et al.*, 2016). O
18 início da doença pode ser precoce ou tardio, dependendo do tipo de mutação provocado no gene
19 responsável. A gravidade do quadro está relacionada ao tipo de proteína mutada, bem como ao
20 grau de depleção do gene, podendo haver quadros de proteinúria leve a perda da função renal
21 abrupta (Tryggvason *et al.*, 2006).

22 Mutações na nefrina estão relacionadas, principalmente, com a Síndrome Nefrótica
23 Congênita do tipo Finlândesa. Sua ausência ou redução promove intensa proteinúria, redução
24 do DS e pode levar a morte neonatal (Pavenstädt *et al.*, 2003; Tryggvason *et al.*, 2006). A
25 mutação no gene da podocina desencadeia a Síndrome Nefrótica Resistente a Corticosteroide.
26 Esse gene defeituoso ainda pode ser encontrado em algumas entidades como a Síndrome
27 Nefrótica Congênita do tipo Finlândesa e na Glomeruloesclerose Segmentar Focal Familiar de
28 início precoce. Ela é caracterizada por proteinúria na primeira infância, resistência às terapias
29 imunossupressoras e progressão rápida para esclerose glomerular. O início da doença pode ser
30 precoce ou tardio, dependendo do tipo de mutação provocado no gene responsável (Tryggvason
31 *et al.*, 2006).

32 Além de seu papel na síndrome nefrótica congênita, a nefrina e a podocina,
33 principalmente, têm sido estudadas em várias síndromes nefróticas adquiridas, incluindo DLM

1 e GESF (Furness *et al.*, 1999; Patrakka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002; Wernerson *et al.*, 2003).
2 Porém, os resultados ainda são controversos, visto que alguns estudos relataram uma regulação
3 negativa da expressão de nefrina e podocina em DLM em comparação com grupo controle
4 (Furness *et al.*, 1999; Wernerson *et al.*, 2003; Hulkko *et al.*, 2014; Van De Lest *et al.*, 2018)
5 enquanto outros estudos não relataram nenhuma mudança aparente na expressão dessas
6 proteínas (Doublier *et al.*, 2001; Patrakka *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002).

7 Há estudo em material de biópsia renal que revelou redução da podocina em cerca de
8 90% dos pacientes com GESF. Além disso, foi encontrado uma correlação significativa com
9 níveis de proteinúria, em que maiores níveis de proteinúria estavam relacionados com casos
10 com menor marcação de podocina (Agrawal *et al.*, 2013). Ainda foi detectado que níveis
11 reduzidos de nefrina em pacientes com DLM podem estar relacionados com a piora da função
12 renal e com a resistência terapêutica a longo prazo. Esses achados levantam a questão se essas
13 alterações ocorrem devido a diferenças no curso evolutivo das doenças com síndrome nefrótica
14 (Van De Lest *et al.*, 2018).

15

16 1.3 SÍNDROME NEFRÓTICA EM CRIANÇAS

17 A síndrome nefrótica (SN) ocorre devido ao aumento da permeabilidade da BFG. Em
18 crianças é caracterizada principalmente pela proteinúria nefrótica (superior a 50 mg/kg/dia ou
19 40 mg/m²/hora) e pela hipoalbuminemia (menor que 2,5 g/dL). E pode estar associado a edema
20 e hiperlipidemia. Valores de proteinúria acima de 40mg/m²/dia são considerados como
21 proteinúria maciça. As causas que levam a SN em crianças são múltiplos, como fatores
22 circulantes na Doença de Lesões Mínimas (DLM) e na Glomeruloesclerose Segmentar e Focal
23 (GESF); fatores imunológicos circulantes vistos na Glomerulonefrite Membranoproliferativa,
24 Glomerulonefrite pós-estreptocócica e Nefrite Lúpica; e mutações de proteínas do DS, que
25 desencadeiam SN Congênita e Infantil. Além desses fatores envolvidos na patogênese da SN
26 os mecanismos que levam à proteinúria também são relevantes, pois envolvem as três camadas
27 da BFG e está relacionado com a seletividade de carga e seletividade de tamanho das partículas
28 filtradas (Eddy e Symons, 2003; Machado *et al.*, 2012; Lombel *et al.*, 2013).

29 A realização da biópsia renal é indicada quando o paciente apresenta evolução atípica,
30 sugerindo não ser DLM. E também quando a criança for menor que 1 anos de idade ou acima
31 de 8 até 12 anos, apresentar hematúria persistente, hipertensão grave persistente,
32 corticorresistência, ter complemento sérico reduzido ou perda da função renal (Alshami *et al.*,
33 2017). Os achados de biópsia renal revelam em comum o apagamento difuso dos processos

1 podocitários vistos na microscopia eletrônica (ME). Na microscopia de luz (ML), as alterações
2 mínimas, esclerose segmentar focal ou proliferação mesangial são os achados possíveis. Não
3 está claro se esses três padrões representam distúrbios separados ou são um espectro de um
4 único processo de doença (Kriz e Lehir, 2005; Jefferson *et al.*, 2011; Cara-Fuentes *et al.*, 2014).

5 Dentre as glomerulopatias primárias que causam SN em crianças, as mais comuns são
6 as podocitopatias – DLM e GESF. DLM variam entre 80 a 90% dos casos de SN na infância,
7 já a GESF representa em torno de 10% a 20% dos diagnósticos. As podocitopatias recebem
8 esse nome por possuírem lesões nos podócitos, que podem acometer tanto níveis estruturais,
9 como moleculares, e algumas proteínas têm sido mostradas como um pivô da lesão renal e do
10 desenvolvimento de proteinúria (Machado *et al.*, 2012).

11 Algumas complicações são evidenciadas em pacientes com SN, como quadros de
12 infecção, devido a diminuição da imunidade humoral; anasarca, que pode desencadear um
13 desconforto respiratório e ainda lesões de pele com risco aumentado para celulites; trombose,
14 devido a hipercoagulabilidade e alterações hemostáticas; quadros de injúria renal transitória;
15 hipovolemia e alterações no crescimento, pelo uso de esteroides por períodos prolongados
16 (Hogg *et al.*, 2000).

17

18 1.4 PODOCITOPATIAS

19 **1.4.1 Doença de lesões mínimas**

20 A DLM é a causa principal de SN em crianças sendo mais incidente em crianças de 1 a 7
21 anos de vida, com índices em torno de 90% naquelas menores de 10 anos. Acima dessa idade cai
22 para 50%, pois crescem os casos de GESF. Em adultos é responsável por 10 a 15% dos casos
23 (Eddy e Symons, 2003; Vivarelli *et al.*, 2017). Com relação a incidência na população parece
24 acometer mais asiáticos e caucasianos (Srivastava *et al.*, 1999).

25 Ela é caracterizada por edema, proteinúria intensa e possui boa resposta terapêutica com
26 o uso de corticosteroides. Não possui alteração da função renal na maioria dos casos, exceto em
27 injúria renal aguda (Fogo *et al.*, 2015).

28 A etiologia da DLM ainda não está clara, mas parece estar relacionada com ativação de
29 células T mediada por citocinas e/ou regulação anormal de células T. Há forte evidência que na
30 DLM a proteinúria ocorre pela participação da interleucina 13 (IL-13), derivada de linfócitos T
31 helper tipo 2 (Th2), que parece estar aumentada em células T CD4+ de pacientes com síndrome
32 nefrótica sensível a esteroides (SNSE) com recidivas. Ela tem sido encontrada em níveis
33 elevados nesses pacientes provavelmente por expressar receptor na superfície de podócitos

1 (Jefferson *et al.*, 2011). A detecção de RNAm de IL-4R α , IL-13 α 1 e IL-13 α 2 na cultura de
2 podócitos e em glomérulos isolados de humanos e ratos demonstrou a existência do receptor de
3 IL-13 e IL-4 em podócitos (Van Den Berg e Weening, 2004).

4 É possível que as citocinas do perfil Th2, principalmente IL-13, podem causar aumento
5 de CD80 (*Cluster of Differentiation 80*) ou B7-1 em podócitos. Dessa maneira os podócitos
6 funcionariam como células apresentadoras de antígenos (Lai *et al.*, 2007; Fogo *et al.*, 2015).
7 Estudo que abordou diretamente o papel da IL-13 presente em ratos relatou que uma nefropatia
8 semelhante à DLM foi induzida na presença desta citocina, com alterações na estrutura e na
9 expressão gênica dos podócitos semelhantes às observadas na doença humana (Alakulppi *et al.*,
10 2007).

11 CD80 está presente nas células apresentadoras de antígeno (APC), e é capaz de estimular
12 as células T, através da ligação com o CD28. A ativação de CD80 nas APCs é regulada
13 negativamente pelas células Treg que expressam e secretam a CTLA-4 (*Cytotoxic T-*
14 *lymphocyte-associated protein 4*), molécula que inibe a resposta imune (Wing *et al.*, 2008).
15 Alguns estudiosos acreditam na hipótese de 2 eventos desencadeantes da DLM, que
16 relacionam-se com a disfunção de Treg e/ou a função autorreguladora prejudicada, que leva a
17 ativação irregular da expressão de CD80 nos podócitos. A desregulação de Treg pode
18 desencadear proteinúria elevada, lesão dos podócitos e possivelmente DLM (Shimada *et al.*,
19 2011). É possível que fatores circulantes também atuem no CD80 e o ativem. Parece haver o
20 envolvimento do CD20, devido a boa resposta ao rituximab, pelos pacientes com DLM, visto
21 que esse imunossupressor é um anticorpo monoclonal dirigido contra células contendo CD20
22 (Churg *et al.*, 1970; Eddy e Symons, 2003; Park e Shin, 2011; Shimada *et al.*, 2011).

23 Estudos têm sido realizados com material sérico, urinário e também experimental na
24 tentativa de desvendar o fator desencadeante da doença e assim padronizar um fator que auxilie
25 no diagnóstico não invasivo (Lai *et al.*, 2007; Garin *et al.*, 2009; Navarro-González *et al.*, 2011).

26 Com relação às características histológicas, a DLM não apresenta alterações na ML nem
27 deposição de imunocomplexos na microscopia de fluorescência (MF), exceto em alguns casos
28 em que há deposição de IgM inespecífica. A única alterações morfológicas visualizada é o
29 apagamento dos pedicelos visualizados na ME (Fogo *et al.*, 2015). Dessa forma, o diagnóstico
30 de DLM trata-se de um diagnóstico por exclusão. Entretanto, alguns casos de GESF a esclerose
31 não é amostrada nos glomérulos coletados para a biópsia. Nestes casos a única alteração é o
32 apagamento de pedicelos visualizados na ME, tornando-se um desafio para o patologista fazer
33 diagnóstico diferencial entre GESF e DLM. Na prática, o que tem-se utilizado é a avaliação de

1 no mínimo 20 glomérulos sem esclerose para excluir GESF (Corwin *et al.*, 1988; Wang *et al.*,
2 1998).

3

4 **1.4.2 Glomeruloesclerose segmentar e focal**

5 A GESF acomete cerca de 20% das crianças e 40% dos adultos nos casos de síndrome
6 nefrótica. Além da proteinúria elevada, identifica-se edema, hipoalbuminemia e
7 hipercolesterolemia. A hematúria é um achado comum, sendo identificado em alguns trabalhos
8 em 50% dos pacientes, e a hipertensão pode variar de 20-50%. A alteração da creatinina (Cr)
9 sérica pode ocorrer em torno de 20-50% dos casos, mas pode ser decorrente da proteinúria
10 elevada, que pode desencadear necrose tubular aguda (Chun *et al.*, 2004; Jefferson *et al.*, 2011).
11 Se no início da doença houver uma manifestação acentuada de proteinúria existe a chance de
12 50% dos casos evoluírem para a fase final da doença renal no prazo de 3 a 8 anos (De Mik *et*
13 *al.*, 2013).

14 Na análise da biópsia renal, a lesão histológica que caracteriza GESF é a esclerose em
15 partes (segmentares) de alguns glomérulos (focais) no exame microscópico de luz. A lesão é
16 definida como uma cicatriz segmentar do tufo glomerular, com fechamento progressivo do
17 lúmen dos capilares glomerulares, por aumento da matriz mesangial e pode haver formação de
18 sinéquias. A imunoflorescência (IF) é negativa, mas pode haver marcação inespecífica de C3,
19 IgM e fibrina e pela ME são observados apagamento dos processos podocitários (Jefferson *et*
20 *al.*, 2011; Fogo *et al.*, 2015).

21 A classificação de Columbia definiu cinco variantes morfológicas da lesão da GESF,
22 com base no exame de ML: (a) peri-hilar (lesões predominantemente identificadas no pólo
23 vascular), (b) *Tip lesion* (lesões localizadas no pólo urinário), (c) celular (lesão com
24 hiper celularidade endocapilar), (d) colapsante (colapso do tufo glomerular associado hipertrofia
25 e hiperplasia das células epiteliais), e (e) GESF não especificada de outra forma (NOS-*not*
26 *otherwise specified*) se as lesões não se encaixam em uma das categorias acima mencionadas
27 (Fogo *et al.*, 2015). Na avaliação histológica, a aparência do glomérulo difere entre essas
28 formas, contudo todas elas compartilham os achados ultraestruturais das alterações dos
29 podócitos, visto pela ME. Os fatores responsáveis por essas diferentes variantes histológicas
30 ainda estão sendo pesquisados (D'agati *et al.*, 2011).

31 Sua fisiopatologia tem como principal agente os podócitos (Fogo *et al.*, 2015), mas o
32 envolvimento de células epiteliais parietais, independente do envolvimento do podócito,
33 também foi descrito (Dijkman *et al.*, 2005). Os podócitos, por serem células terminais, não

1 possuem a capacidade de se dividir e reparar o local lesado. A região desnuda da MBG, que
2 perdeu o podócito, torna-se alvo das células epiteliais parietais, que formam as sinéquias e,
3 posteriormente, o fechamento da luz dos vasos e a formação de esclerose (Jefferson e
4 Shankland, 2014). De acordo com Fogo (2015), os fatores de maior suscetibilidade para o
5 desencadeamento da GESF são: alelos de risco APOL-1, crianças com baixo peso ao
6 nascimento e menor quantidade de néfrons congênitos ou adquiridos. O esclarecimento da lesão
7 no podócito promovida por agente circulante pode auxiliar no melhor entendimento da GESF
8 primária (Fogo *et al.*, 2015).

9 Ela pode ser classificada em formas primárias e secundárias. A GESF primária, ou
10 idiopática, surge como consequência de múltiplas vias que causam lesões no podócito, e
11 manifesta-se com SN clássica. Se existirem outras doenças sistêmicas associadas, com agentes
12 etiológicos capazes de causar GESF é definida com secundária. A GESF secundária representa
13 cerca de 20% dos casos. São descritas causas genéticas, como a mutação de α -actinina 4; casos
14 com malformação renal congênita; casos associados ao HIV; induções por medicamentos,
15 como o interferon- γ ; e ainda devido a redução da massa renal por doença sistêmica, como a
16 hipertensão arterial sistêmica (De Mik *et al.*, 2013). A GESF genética tem origem nas mutações
17 em genes que codificam proteínas expressas em podócitos e no DS (Chun *et al.*, 2004). A GESF
18 autossômica dominante possui proteinúria leve durante a adolescência e início da vida adulta,
19 com progressão lenta até doença renal final. Especificamente o tipo 1, ocorre devido mutação
20 no gene ACTN-4, codificador da α -actina 4. Essa mutação aumenta a afinidade da α -actinina-
21 4 pela F-actina, e interfere com a montagem e desmontagem dos filamentos de actina nos
22 podócitos. Mutações encontradas no gene TRPC6, envolvido na formação de poros nos
23 podócitos, também pode desencadear GESF por alterar o padrão de filtração glomerular (Yao
24 *et al.*, 2004).

25 A GESF primária é responsável por cerca de 80% dos casos de GESF (D'agati *et al.*,
26 2011), e a lesão de células glomerulares pode ocorrer como consequência de um fator ou fatores
27 de permeabilidade circulante, porém ainda não claramente identificado. A hipótese de um fator
28 circulante é pautada nos eventos de recorrência de GESF após o transplante e a melhora
29 terapêutica de pacientes com GESF ao realizarem plasmaferese (Meijers *et al.*, 2014). Além
30 disso, a transmissão de mãe para filho de fatores circulantes que desencadearam proteinúria no
31 neonato (Kemper *et al.*, 2001), e o controle da proteinúria e das alterações histológicas quando
32 o rim transplantado em um paciente com GESF recorrente foi reimplantado em paciente com

1 nefropatia diabética, são fatores que reforçam a hipótese de ser um fator circulante o agente que
2 desencadeia a GESF primária (Rea *et al.*, 2001; Gallon *et al.*, 2012).

3 Recentemente, o aumento da concentração de receptor de ativador de plasminogênio do
4 tipo uroquinase solúvel (suPAR) foi proposto como um importante fator de risco circulante
5 específico para GESF (Wei *et al.*, 2011). Outros fatores estão sendo estudados, como o fator-1
6 de citocina semelhante à cardiotrofina (CLCF1), que é um membro da família das interleucinas
7 (IL)-6, detectado no plasma de pacientes com GESF recorrente (Gebeshuber *et al.*, 2013; Silva
8 *et al.*, 2014). E os MicroRNAs endógenos, principalmente, o miR-193a que parece inibir a
9 transcrição da proteína WT1 em podócitos e, portanto, inibir a expressão de uma variedade de
10 genes controlados por ele, importantes para a função do podócito, como a nefrina
11 (Königshausen e Sellin, 2016).

12

13 **1.5.1 O uPAR e suPAR**

14 O sistema ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA), codificado por PAUR, é
15 formado por uma protease, um receptor (uPAR) e seus inibidores. O uPAR é ligado à proteínas
16 de membrana com três domínios (DI, DII e DIII) associados a glicosilfosfatidilinositol (GPI)
17 (Thunø *et al.*, 2009). Está presente em várias células do sistema imunológico ativas, como
18 neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos, células T ativadas, células endoteliais,
19 megacariócitos, células tumorais e podócitos (Blasi e Carmeliet, 2002; Thunø *et al.*, 2009;
20 Smith e Marshall, 2010; Wei *et al.*, 2011). O complexo uPAR-uPA é responsável pelas
21 atividades celulares de adesão, migração, diferenciação e proliferação (Thunø *et al.*, 2009).
22 Outras proteínas podem se ligar ao uPAR além da uPA, como a vitronectina e integrinas (Smith
23 e Marshall, 2010). A interação entre uPAR e a $\alpha v \beta 3$ integrina, nos podócitos, é responsável
24 por desencadear a motilidade celular e ativação de pequenas GTPases, como Cdc42 e Rac1,
25 que podem promover a contração do podócito, mudança no seu fenótipo estacionário para
26 móvel e conseqüentemente, o apagamento dos processos podocitários e a proteinúria (Wei *et*
27 *al.*, 2008; Smith e Marshall, 2010).

28 A forma solúvel do uPAR, o suPAR (suPAR- receptor de ativador de plasminogênio do
29 tipo uroquinase solúvel), é dada após a clivagem de uPAR, que é catalisada por várias enzimas.
30 O suPAR, então, é liberado da membrana celular em suPAR de comprimento total ou clivado,
31 com a geração de algumas isoformas com diferentes funções. Ambos podem se ligar à
32 integrinas, que estão associadas à células e influenciam diferentes processos intracelulares
33 (Sidenius, Sier e Blasi, 2000; Thunø, MacHo e Eugen-Olsen, 2009). Ele está presente em

1 condições fisiológicas em baixas concentrações no sangue humano, na urina e no líquido
2 cefalorraquidiano e foi observado que a ativação do sistema imune pode aumentar os níveis
3 dessa molécula (Thunø *et al.*, 2009).

4 Contudo, vários trabalhos têm associado o suPAR com o desenvolvimento de GESF
5 (Wei *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014; Alfano *et al.*, 2015). Isso ocorre porque após o transplante
6 renal, pacientes com GESF tiveram rápida recidiva da doença e aqueles que fizeram
7 plasmaferese apresentaram boa resolução da proteinúria (Hoyer *et al.*, 1972), o que sugere ser
8 um fator circulante o seu desencadeador. Estudos tem apontado que o suPAR pode funcionar
9 como fator prognóstico da GESF, além de se correlacionar com pior taxa de filtração glomerular
10 (TFG) e proteinúria (Alfano *et al.*, 2015). Alguns trabalhos encontraram níveis aumentados
11 dessa proteína em pacientes com GESF, o que não foi observado em pacientes com outras
12 doenças que cursam com proteinúria como DLM e glomerulopatia membranosa (Wei *et al.*,
13 2011; Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Além de biomarcador da doença, o suPAR também
14 parece estar envolvido ativamente na patogênese da GESF, devido sua capacidade de interagir
15 com os receptores transmembrana das células. Paralelo as alterações renais, ele tem sido
16 associado à progressão de diversas doenças, incluindo câncer, sepse, doença hepática, doenças
17 reumáticas e infecção pelo HIV, compartilhando graus sistêmicos de inflamação e ativação
18 imunológica crônica (Sidenius *et al.*, 2000; Alfano *et al.*, 2002; Lomholt *et al.*, 2010).

19 O suPAR fornece vários indícios de ser o agente desencadeante da GESF e um possível
20 fator prognóstico da doença detectado em fluidos, como sangue e urina. Porém, a sua análise
21 em substituição à biópsia renal ainda está distante da realidade. Acreditamos que o uPAR possa
22 auxiliar no diagnóstico ao ser analisado nos fragmentos da biópsia renal, isso colaboraria com
23 o achado diagnóstico, quando a esclerose não fosse amostrada.

24

25 1.6 TERAPIA MEDICAMENTOSA

26 Cerca de 15% dos casos de SN apresentam remissão espontânea do quadro, e em todas
27 as crianças acima de um ano de idade está indicado o tratamento com corticoterapia (Gipson *et*
28 *al.*, 2009; Vivarelli *et al.*, 2017). Cerca de 80 a 90% das crianças com SN idiopática respondem
29 ao tratamento com esteroides e são consideradas com bom prognóstico.

30 De acordo com KDIGO (2012) a terapia inicial é dada com prednisona de 60 mg/m² ou
31 2 mg/kg/dia por quatro a seis semanas (dose máxima de 60 mg / dia), seguida por prednisona
32 de 40 mg/m² ou 1,5 mg/kg em dias alternados (dose máxima de 40 mg / dia) e continuada por
33 dois a cinco meses com redução da dose. Naqueles com recidivas, o tratamento com a

1 prednisona está associado aos resultados de proteína na urina negativos. Em crianças que
2 apresentam efeitos adversos a prednisona ou são recidivantes existem medicamentos
3 alternativos, poupadores de esteroides, que substituem o seu uso. Eles são medicamentos novos
4 e ainda há poucos estudos que estabeleçam a melhor conduta terapêutica. Assim, a seleção de
5 medicamentos baseia-se na eficácia relatada, efeitos adversos, disponibilidade e custo. Algumas
6 das principais alternativas são os agentes alquilantes, Ciclofosfamida (CFA) ou Clorambucil;
7 os inibidores de calcineurina, Ciclosporina (CSA) ou Tacrolimus; o Micofenolato de Monfetil
8 (MMF) e ainda o Rituxmab (Stevens *et al.*, 2013). Além desses, o uso de inibidores da enzima
9 conversora de angiotensina (IECA) e dos bloqueadores de receptor de angiotensina (BRA)
10 podem ser utilizados como complemento para controle da proteinúria nefrótica (Gipson *et al.*,
11 2009).

12 Frente a resposta ao tratamento, os pacientes com SN podem ser definidos com síndrome
13 nefrótica sensível a esteroides (SNSE), sendo que a grande maioria, mais de 90%, possuem
14 DLM e o restante são de pacientes com GESF. E os pacientes com síndrome nefrótica resistente
15 a esteroides (SNRE) apresentam falha no tratamento e devem ser submetidos à biópsia renal
16 para confirmação diagnóstica. Cerca de 25% dos pacientes com SNRE possuem DLM e os
17 outros na grande maioria possuem GESF (Swierczewska *et al.*, 2013; Maas *et al.*, 2016; Ali *et*
18 *al.*, 2017).

19 Os pacientes com quatro ou mais recaídas em qualquer período de 12 meses, ou duas ou
20 mais recaídas em seis meses após a resposta inicial ao tratamento são considerados
21 frequentemente recidivantes (SNFR). E há ainda, aqueles que apresentam recidivas do quadro
22 de proteinúria, na vigência do uso de corticoides ou dentro de 2 semanas após o fim do
23 tratamento, são classificados com síndrome nefrótica dependente de esteroides (SNDE)
24 (Lombel *et al.*, 2013; Downie *et al.*, 2017).

25 Um estudo sugeriu que as características clínicas no diagnóstico e a resposta inicial ao
26 tratamento com corticosteroides prevê com precisão a GESF e pode ser usada para orientar a
27 prática consistente nas indicações para biópsia renal (Alshami *et al.*, 2017). Além disso, as
28 características clínico-epidemiológicas e o seguimento de pacientes com DLM e GESF podem
29 ser úteis na determinação da etiologia da doença, no melhor entendimento dos resultados do
30 tratamento e na previsão prognóstica das podocitopatias (Ali *et al.*, 2017).

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

1 2 JUSTIFICATIVA

2 As glomerulopatias primárias que cursam com SN ou proteinúria apresentam clínica
3 muito semelhante. Assim faz-se necessária a realização da biópsia renal para o diagnóstico
4 diferencial dessas entidades. Porém, em alguns casos, como GESF e DLM alguns aspectos
5 morfológicos também são semelhantes. Especialmente, nos casos de GESF em que a esclerose
6 segmentar não foi amostrada por ser focal ou até mesmo quando o número de fragmentos para
7 a análise for insuficiente, faz-se necessário o uso biomarcadores.

8 Dessa forma, o estudo das principais proteínas que compõem o DS pode contribuir para
9 a diferenciação das Podocitopatias, uma vez que a alteração da expressão destas proteínas
10 parece ser diferente entre DLM e GESF.

11 Na última década tem se estudado o papel do suPAR como possível fator circulante
12 relacionado a patogêneses da GESF, entretanto há poucos estudos que mostram o papel do seu
13 receptor, uPAR, em biópsias renais. Dessa forma, como os níveis de suPAR estão aumentados
14 na corrente sanguínea dos pacientes com GESF, acredita-se que seu receptor, uPAR, esteja mais
15 expresso nos podócitos, podendo ser um biomarcador para diagnóstico dessa entidade.

16 Além disso, os níveis circulantes de suPAR estão relacionados com menor TFG em
17 pacientes com GESF, que geralmente cursam com resistência terapêutica. Isso se deve ao fato
18 do suPAR participar diretamente na patogênese da GESF causando apagamento podocitário e
19 proteinúria. Dessa forma, é possível que o uPAR esteja mais expresso em pacientes que cursam
20 com resistência terapêutica.

21 Atualmente, não há parâmetros clínicos adequados ou biomarcadores disponíveis para
22 garantir o diagnóstico e prever a evolução clínica dos pacientes com DLM e GESF. Assim, para
23 proporcionar aos pacientes um melhor prognóstico e terapias mais direcionadas, um marcador
24 de diferenciação diagnóstica, bem como um preditor evolutivo se faz necessário.

1 3 HIPÓTESE

2 Acredita-se que a DLM e a GESF sejam glomerulopatias que apresentam densidade de
3 podócitos diferentes, bem como a expressão de proteínas do DS, como nefrina e podocina. Em
4 DLM a expressão de CD80 será maior, que nos pacientes com GESF, e de maneira oposta, o
5 uPAR será mais expresso em indivíduos com GESF e com pior prognóstico.

OBJETIVOS

1 **4 OBJETIVO GERAL**

2 Analisar a expressão de biomarcadores em DLM e GESF, bem como detectar seu
3 potencial de diagnóstico em biópsias renais pediátricas e descrever a evolução clínica desses
4 pacientes diagnosticados pelo Serviço de Nefropatologia da Universidade Federal do Triângulo
5 Mineiro.

6

7 **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 8 I. Descrever o perfil epidemiológico (idade, gênero, cor) nas biópsias renais com o
9 diagnóstico de podocitopatias (DLM e GESF) no Serviço de Nefropatologia da UFTM
10 no período de 1998 a 2015;
- 11 II. Descrever o perfil clínico-laboratorial (hipertensão, hematúria, creatinina, ureia,
12 proteinúria, albumina e colesterol total) nas biópsias renais com o diagnóstico de
13 podocitopatias (DLM e GESF) no Serviço de Nefropatologia da UFTM no período de
14 1998 a 2015;
- 15 III. Quantificar a densidade de podócitos, através da expressão de WT1, nos glomérulos das
16 biópsias renais pediátricas e no grupo controle;
- 17 IV. Quantificar a expressão de nefrina, podocina, CD80 e uPAR nos glomérulos das biópsias
18 renais pediátricas e no grupo controle;
- 19 V. Correlacionar as expressão das proteínas imunomarcadas nas biópsias renais pediátricas
20 e no grupo controle;
- 21 VI. Avaliar o desempenho diagnóstico dos biomarcadores testados na biópsia renal;
- 22 VII. Descrever a evolução clínica dos pacientes submetidos à biópsia renal, com base nos
23 medicamentos utilizados, na resposta ao tratamento e nos resultados da creatinina sérica
24 e da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe);
- 25 VIII. Classificar os pacientes em remissão e resistência terapêutica de acordo com a resposta
26 terapêutica;
- 27 IX. Analisar possíveis marcadores de prognóstico com base na resposta terapêutica nas
28 Biópsias renais pediátricas.

CASUÍSTICA

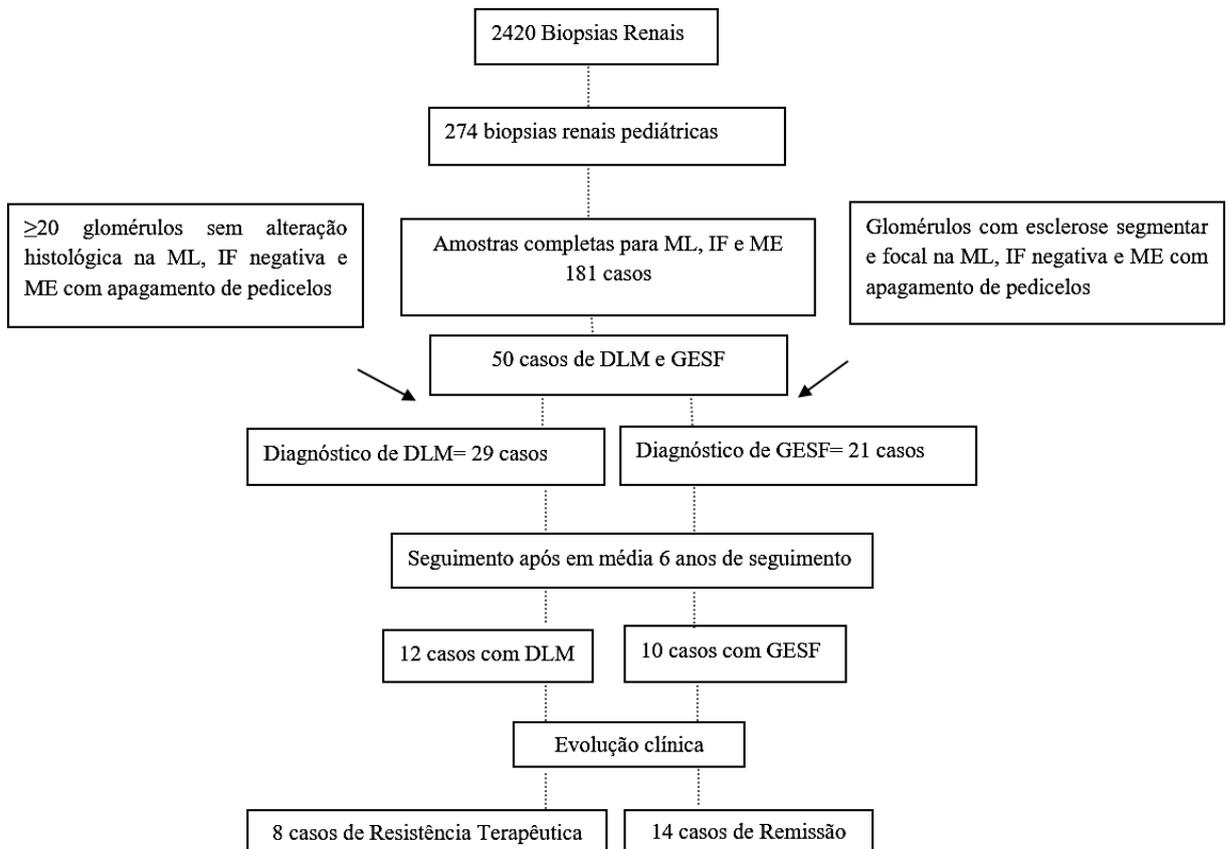
5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Foram analisados formulários de solicitações de biópsias renais de pacientes pediátricos, entre 2 a 18 anos, que tiveram suas amostras avaliadas pelo Serviço de Nefropatologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro de 1998 a 2015. Foram obtidas 2420 biópsias renais, sendo 274 casos na faixa pediátrica. Desses casos, aqueles com critérios diagnósticos para DLM e GESF primária, e com fragmentos de rins com amostras para ML, IF e ME completos, totalizaram 50 pacientes. Obteve-se o grupo de GESF com 21 casos e DLM com 29. Para análise da evolução clínica desses pacientes foi coletada informações dos nefrologistas que conduziram o tratamento dessas crianças em um período em média de 6 anos após o diagnóstico dado pela biópsia renal. Foi possível acompanhar o seguimento de 22 pacientes, sendo 12 de DLM e 10 de GESF.

O grupo controle foi formado por 15 amostras de crianças autopsiadas, com idade abaixo de 18 anos, sem quadro clínico prévio de infecção e sem alterações renais prévias. Casos com autólise, necrose tubular aguda e congestão com alterações de moderadas a intensas foram excluídos. A análise histológica do rim autopsiado foi realizada pela mesma nefropatologista que avaliou os casos de podocitopatias. Essas amostras foram obtidas do Serviço de Patologia Pediátrica da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto (USP/RP).

1 Figura 1 - Organograma de seleção dos casos para estudo



2

3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4

1 5.2 COMPILAÇÃO DOS DADOS E CLASSIFICAÇÃO

2 Foi confeccionada uma planilha eletrônica com informações contidas nos laudos das
3 biópsias renais e sobre a evolução dos pacientes relativas aos dados epidemiológicos (idade,
4 gênero e cor), dados clínicos (presença ou não de hipertensão arterial sistêmica no momento da
5 biópsia renal, medicamentos usados no tratamento após o diagnóstico de DLM e GESF,
6 evolução clínica) e laboratoriais (hematúria, proteinúria, albumina, colesterol total e Cr sérica
7 no momento da biópsia renal, e após acompanhamento os valores de Cr sérica).

8 A remissão foi considerada quando o paciente apresentou proteinúria menor que 4
9 mg/m²/h (remissão completa) ou menor que 2 g/1,73m²/dia, ou ainda, diminuição em 50% da
10 proteinúria inicial e albumina sérica \geq 2,5 g/dL (remissão parcial) (KDIGO, 2012; Mak et al.,
11 1996; Ahmad et al.,2000). A resistência a esteroides foi definida como ausência de remissão
12 completa em 8 semanas de tratamento com manutenção da proteinúria acima de 50 mg/kg/dia
13 (Levey et al., 2009; KDIGO, 2012; Moura, Franco, Kirsztajn, 2015). Os pacientes foram
14 classificados de acordo com a evolução clínica frente a resposta ao tratamento como em
15 remissão ou resistência terapêutica. A alteração da Cr sérica foi definida como acima do limite
16 superior do normal para idade (pré-escolar: 0,2-0,5mg/dL, escolar: 0,3-0,7mg/dL, adolescentes:
17 0,5-1,0mg/dL) (KDIGO, 2012). A taxa estimada de filtração glomerular (TFGe) foi calculada
18 a partir da fórmula de Schwartz, baseada na Cr sérica e na altura da criança (Schwartz et al.,
19 2009). Após o seguimento de em média seis anos, a TFGe foi novamente calculada utilizando
20 a fórmula de Schwartz para menores de 18 e a fórmula de CKD-EPI para aqueles acima de 18
21 anos.

22

23 5.3 MÉTODOS

24

25 5.3.1 Exame anatomopatológico

26 Como rotina de análise do fragmento para biópsia renal, foram realizados o exame
27 anatomopatológico composto da avaliação macroscópica e microscópica, bem como das
28 colorações de rotina diagnóstica.

29 As análises das alterações foram feitas de acordo com o compartimento em que se
30 encontrava a lesão: 1) glomérulos (matriz mesangial; membrana basal, células endoteliais e
31 podócitos;), 2) túbulos, 3) interstício e 4) vasos, levando-se em consideração as áreas atingidas
32 pela biópsia (córtex e medular) e o número de glomérulos apropriados para estudo.

33

1 5.3.1.1 *Análise Macroscópica*

2 Refere-se às características e ao número de fragmentos e tipos de fixadores usados
3 (Bouin ou paraformaldeído para a ML e glutaraldeído ou Karnovosk +Vermelho de Rutênio
4 para a microscopia eletrônica).

6 5.3.1.2 *Microscopia de luz comum*

7 O fragmento foi desidratado em uma sequência de álcoois (70%, 80%, 90%, 95%) e
8 diafanizado em xilol (I, II e III). Após esse processamento, o fragmento foi incluído em parafina
9 e o bloco foi submetido a cortes seriados de 2µm de espessura. Após a confecção, as lâminas
10 foram colocadas na estufa por 30 minutos e em seguida foram realizadas as colorações de
11 hematoxilina e eosina (HE), picro-sírius (PS), prata metenamina (PAMS) e tricrômico de
12 masson azul (TMA).

13

14 5.3.1.3 *Microscopia de imunofluorescência*

15 O fragmento para IF foi lavado em tampão fosfato (PBS) pH 7,2 e congelado no
16 nitrogênio líquido em solução para inclusão em criostato (Tissue-tek). Em seguida o bloco foi
17 cortado e foram feitas 9 lâminas, sendo um controle negativo e o restante incubadas com os
18 anticorpos: Cadeias pesadas de imunoglobulinas A, M e G (IgA, IgM e IgG), cadeias leves das
19 imunoglobulinas (*kappa e lambida*), proteínas do complemento (C3 e C1q) e Fibrinogênio.

20 A análise desta técnica foi utilizada para descartar doenças com depósitos de
21 imunocomplexos.

22

23 5.3.1.4 *Microscopia eletrônica*

24 Os fragmentos fixados em glutaraldeído ou Karnovosk +Vermelho de Rutênio e pós-
25 fixados em tetróxido de ósmio foram processados para inclusão em resina e submetidos a cortes
26 semi-finos de 0,5µm de espessura e corados pelo azul de toluidina. Após análise desses cortes
27 em microscópio de luz, foram feitos cortes ultrafinos com espessura de 50 a 70 nm contrastados
28 com uranila e citrato de chumbo que foram examinados em microscópio eletrônico de
29 transmissão Zeiss EM-900.

30

31 **5.3.2 Imunoperoxidase**

32 As lâminas foram confeccionadas com cortes de material a 2 µm de espessura, e foram
33 desparafinizadas em xilol e hidratadas em álcool. Foi realizada recuperação de antígenos com

1 tampão Citrato pH 6,0 em panela Pascal (DAKO) e após as lâminas foram lavadas com tampão
2 PBS e incubadas em câmara úmida e escura com bloqueador de peroxidase (Peroxidase block,
3 Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK) por 50 minutos. Foi realizado o bloqueio de
4 proteínas por 50 minutos (Protein block Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK).
5 Após, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, anti-WT1 (DAKO) diluído
6 1:100, anti-Nefrina (anti-NPHS1 Abcam) 1:150, anti-Podocina (anti-NPHS2 Abcam) 1:600 e
7 anti-CD80 (anti-CD80 Abcam) 1:150 por 2 horas em temperatura ambiente e anti-uPAR
8 (Abcam) 1:50 *overnight* em câmara úmida e escura a 4°C. Após, as lâminas foram lavadas com
9 PBS e incubadas com o reagente pós-primário (Kit Novolink Polymer Detection System, BL,
10 UK) por 50 minutos à temperatura ambiente, sendo lavadas com PBS e incubadas com o
11 polímero (Kit Novolink Polymer Detection System, BL, UK) por 50 minutos. Por fim, foram
12 lavadas com PBS e incubadas com o cromógeno (Liquid DAB, Kit Novolink Polymer Detection
13 System, BL, UK) por um 1 minuto para anti-NPHS1 e anti-NPHS2 e por 2 minutos para anti-
14 WT1 e anti-uPAR. Posteriormente, foram lavadas com água corrente e contra-coradas em
15 Hematoxilina de Harris por um 1 minuto.

16

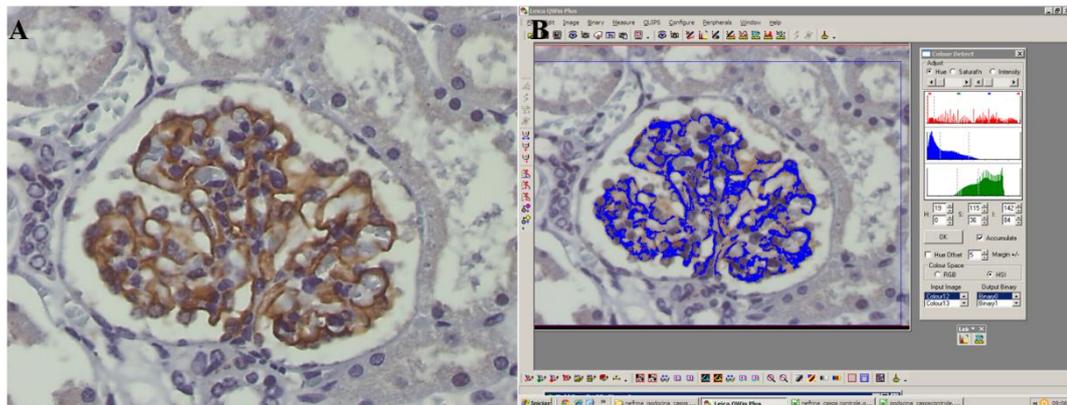
17 **5.3.3 Quantificação das imunomarcações**

18 Todos os campos das lâminas de biópsias renais e dos fragmentos de rim das autópsias
19 foram avaliados, com análise de todos os glomérulos. Na marcação por nefrina e podocina, a
20 coloração acastanhada foi indicada pelo observador utilizando-se um sistema analisador de
21 imagens interativo semiautomático, Leica Qwin, em objetiva de 40x (1600X) (Figura 2). A
22 análise foi feita em toda lâmina e os resultados foram expressos em porcentagem de área
23 marcada em relação ao total dos campos avaliados (Rocha et al., 2016).

24 Nas marcações positivas de WT1, CD80 e uPAR, as áreas dos núcleos acastanhadas em
25 cada glomérulo foram contadas afim de se obter a densidade de células marcadas por área
26 glomerular. O resultado total foi expresso em densidade de células por área (cel/mm²) (Figura
27 3) (adaptado de Sanden et al., 2003).

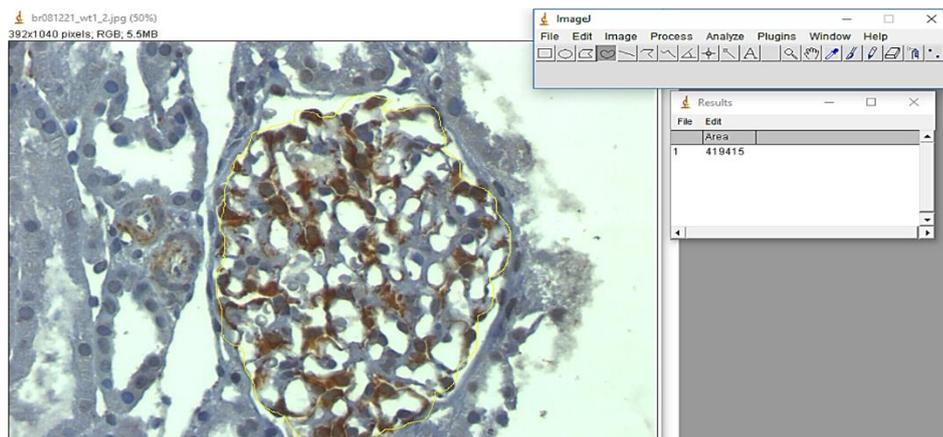
28

- 1 Figura 2 - Quantificação da expressão das imunomarcações de Nefrina e Podocina



- 2
3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.
4 A) Imunomarcação pela técnica de imuno-histoquímica nas marcações de Nefrina e Podocina. B) Quantificação
5 da área imunomarcada pelo software Leica Qwin.
6

- 7 Figura 3 - Quantificação da expressão das imunomarcações por contagem de células



- 8
9 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.
10 Imunomarcação pela técnica de imuno-histoquímica nas marcações WT1, CD80 e uPAR. Quantificação da área
11 imunomarcada pelo software ImageJ.
12

13 5.3.4 Análise estatística

- 14 A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism versão 5.0. As variáveis
15 categóricas foram apresentadas como porcentagem e as variáveis numéricas como média e
16 desvio-padrão, quando a distribuição era normal; ou mediana com mínimo e máximo [Min-
17 Max], quando não normal. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de
18 Fisher ou pelo teste do Qui quadrado. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste t de
19 Student, quando a distribuição das variáveis era normal e variâncias semelhantes, ou pelo teste
20 de Mann-Whitney, nos demais casos. A normalidade foi testada pelo teste de Shapiro Wilk.
21 Para análise de três grupos, nos casos de distribuição normal e variâncias semelhantes, utilizou-
22 se o teste paramétrico ANOVA (F) seguido do pós-teste de Tukey. Nos casos em que a

1 distribuição não foi normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis (H) seguido do pós-teste de
2 Dunn. A correlação entre duas variáveis com distribuição não normal foi analisada pelo teste
3 de Spearman (rS), quando foi normal utilizou-se Pearson (r). O desempenho de diagnóstico dos
4 biomarcadores testados na biópsia renal foi avaliado ao calcular a sensibilidade e especificidade
5 com a utilização da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic* -ROC). A área sob a curva
6 ROC (Area Under Curve - AUC), intervalos de confiança de 95% e os pontos de corte foram
7 calculados usando o método não-paramétrico. As diferenças foram consideradas
8 estatisticamente significantes quando “p” foi menor que 0,05.

9

10 **5.3.5 Normas para a confecção do manuscrito**

11 Para a elaboração escrita do trabalho foi consultado o manual para apresentação de
12 trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da Associação Brasileira de
13 Normas Técnicas (ABNT) organizadas pela biblioteca universitária da UFTM (Alves, Silva,
14 Almeida, 2013).

15

16 **5.3.6 Aspectos éticos**

17 O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do
18 Triângulo Mineiro, sob o número 1.715.838.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

2

6.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO

Dos 50 casos de biópsias pediátricas, 26 são do sexo masculino (52%), 37 são brancos (74%) e a mediana da idade foi de 12 anos (Min: 2, Máx: 18). Nos pacientes com DLM a mediana da idade foi de 12 anos (Min: 2, Máx: 17), com 15 casos do sexo feminino (51,72%) e 22 de cor branca (76%). Os casos de GESF também tiveram a mediana da idade de 12 anos (Min: 2, Máx: 18), com 12 pacientes do sexo masculino (57%) e 15 brancos (71,43%).

9

Tabela 1 - Dados epidemiológicos dos casos de DLM, GESF e grupo controle

	Controle (n=15)	DLM (n=29)	GESF (n=21)	Total de pacientes (n=50)
Idade				
<i>Média ± DP</i>	7,467±4,32	10,62 ± 4,64	11,38 ± 4,98	10,94±4,75
<i>Mediana (Min-Máx)</i>	7 (2-14)	12 (2-17)	12 (2-18)	12 (2-18)
Gênero n (%)				
<i>Masculino</i>	12 (80%)	14 (48,28%)	12 (57,14%)	26 (52,0%)
<i>Feminino</i>	3 (20%)	15 (51,72%)	9 (42,86%)	24 (48,0%)
Cor				
<i>Branco</i>	NI	22 (75,86%)	15 (71,43%)	37 (74,0%)
<i>Não Branco</i>	NI	4 (13,79%)	6 (28,57%)	10 (20,0%)

11 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

12 DLM: Doença de Lesões Mínimas; GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e focal; n: Número de casos; NI: Não
13 informado

14

1 6.2 PERFIL CLÍNICO

2 Com relação aos dados clínicos, 4 pacientes em cada grupo eram hipertenso, e a
3 hematuria esteve presente em 6 pacientes com DLM e em 7 com GESF. Quanto à proteinúria,
4 a média em DLM foi de $2,5 \pm 3,975$ g/24h e em GESF foi de $4,7 \pm 2,861$ g/24h. A média de Cr
5 sérica nos pacientes com GESF foi de $2,1 \pm 4,231$ mg/dL e nos pacientes com DLM foi de
6 $0,6 \pm 0,2667$ mg/dL. A média de ureia em GESF foi de $46,6 \pm 50,55$ mg/dL e em DLM foi de
7 $24,6 \pm 6,889$ mg/dL. Não houve diferença significativa entre os grupos, quanto aos valores de
8 proteinúria 24h ($p=0,06$; $U=104,0$), de Cr sérica ($p=0,1532$; $U=88,0$) e ureia ($p=0,0535$;
9 $U=59,6$). A albumina teve média de $2,96 \pm 1,07$ g/dL em casos de GESF e de $2,86 \pm 1,16$ g/dL nos
10 casos de DLM, e não houve diferença significativa entre eles ($p=0,6135$, $t=0,5185$). Em GESF,
11 a média do colesterol total foi de $348,9 \pm 165,5$ mg/dL e em DLM foi de $285,4 \pm 106,0$ mg/dL, sem
12 diferença estatística entre eles ($p=0,1562$; $t=1,493$). A média da TFGe foi maior nos pacientes
13 com DLM ($128,0 \pm 80,04$), do que naqueles com GESF ($102,2 \pm 95,36$), porém sem diferença
14 estatística ($p = 0,1629$; $U=42,0$) (Tabela 2).

1 Tabela 2 - Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com GESF e LM.

Caso	Dx	Idade	HAS	Hematúria	Prot g/24h	Cr mg/dL	Ur mg/dL	Alb (g/dL)	CT mg/dl	TFG
1	DLM	15	Não	Não	1,6	0,8	17,0	NI	272,0	77,4
2	DLM	16	Não	NI	3,4	0,7	NI	NI	424,0	NI
3	GESF	16	Não	Não	5,0	NI	NI	NI	NI	NI
4	DLM	14	NI	Não	5,0	0,9	19,0	1,5	417,0	78,0
5	GESF	17	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
6	DLM	17	NI	NI	4,0	0,9	28,0	NI	NI	NI
7	GESF	2	Sim	Sim	15	0,7	NI	1,5	579,0	47,2
8	DLM	14	NI	Sim	NI	NI	NI	NI	NI	NI
9	DLM	13	Sim	Não	5,1	0,9	35,0	2,2	336,0	73,4
10	DLM	8	Não	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI
11	DLM	11	Não	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI
12	GESF	10	Não	NI	NI	0,5	28,0	4,0	231,0	116,5
13	DLM	14	Não	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14	GESF	3	Sim	Sim	0,3	NI	NI	NI	NI	NI
15	GESF	15	NI	Sim	4,7	1,9	30,0	0,8	609,0	NI
16	DLM	6	NI	NI	1,0	NI	NI	NI	NI	NI
17	DLM	5	Não	NI	0,4	0,3	NI	NI	421,0	NI
18	GESF	7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
19	DLM	2	Não	NI	NI	0,1	16	1,2	194,0	363,4
20	DLM	16	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
21	DLM	14	Não	Não	2,0	1,1	22,0	NI	NI	55,9
22	GESF	9	NI	NI	NI	NI	NI	NI	678,0	NI
23	GESF	7	NI	Sim	3,6	NI	NI	NI	315,0	NI
24	GESF	10	NI	Não	0,8	0,7	30,0	4,3	171,0	NI
25	GESF	3	Sim	NI	NI	0,2	18,0	NI	234,0	190,0
26	DLM	12	Não	Não	6,3	0,8	38,0	3,2	224,0	72,3
27	DLM	5	Não	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
28	DLM	16	Não	Não	0,7	0,4	17	3,7	289,0	169,3
29	DLM	12	Não	Não	1,7	0,4	31	4,6	170,0	153,8
30	DLM	3	NI	NI	10,8	NI	NI	1,8	510,4	NI
31	GESF	8	Não	Sim	4,1	0,16	11	2,2	397,0	325,2
32	DLM	12	Não	Não	0,4	0,7	30,0	4	198,0	89,1
33	DLM	12	Não	Sim	7,5	0,47	23,0	0,8	384,0	147,6
34	DLM	7	Não	Sim	0,7	0,42	23,9	3,7	209,8	NI
35	GESF	18	Não	Não	1,3	1,12	43,0	3,2	196,0	55,3
36	DLM	15	Não	Sim	0,1	0,5	21	3,9	158,0	130,5
37	DLM	5	Sim	NI	0,05	NI	NI	NI	NI	NI
38	GESF	11	Não	Não	0,4	0,81	46,0	4,0	258	77,5
39	DLM	6	Não	NI	0,1	NI	NI	NI	NI	NI
40	DLM	5	Não	Não	1,0	0,3	25,0	2,9	210	147,3
41	DLM	9	Sim	Sim	0,7	0,5	17,0	2,5	178	NI
42	DLM	7	Não	Não	0,7	NI	NI	4,0	256	NI
43	GESF	14	Não	Sim	8,8	0,57	39,0	2,6	443	NI
44	DLM	17	Sim	Sim	1,1	0,7	31,0	2,9	286	106,2
45	GESF	17	Não	Não	7,4	0,73	27,0	2,7	492	NI
46	GESF	16	Não	Não	5,5	2,2	67,0	2,8	309	33,6
47	GESF	15	Sim	Sim	NI	16	208,0	3,5	170	3,7
48	GESF	16	Não	NÃO	3,4	1,59	39,0	4,3	198	44,9
49	GESF	12	Não	Não	8,1	0,5	20,0	2,6	302	128,0
50	GESF	13	Não	Não	1,4	NI	NI	NI	NI	NI

2 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018. Dx: Diagnóstico; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; NI: Não informado;

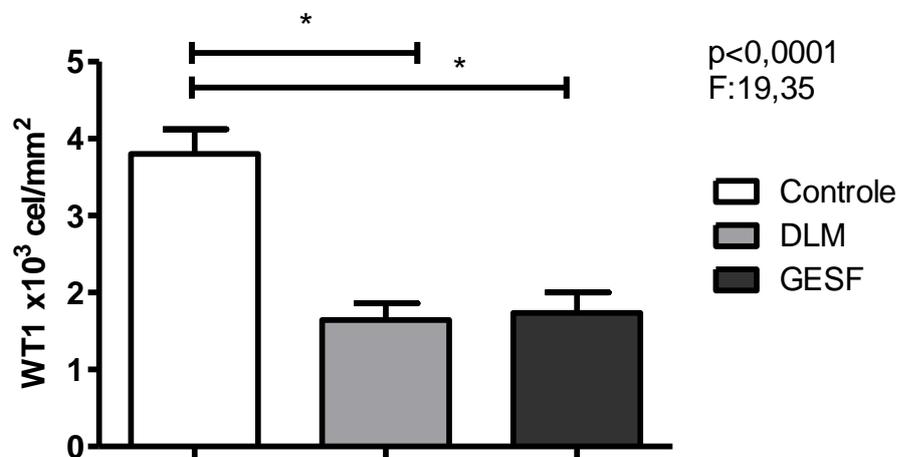
3 Cr: creatinina; Ur: Ureia; Alb: Albumina; CT: Colesterol total; TFGe: Taxa de Filtração Glomerular estimada.

6.3 QUANTIFICAÇÃO DAS IMUNOMARCAÇÕES

6.3.1 Expressão de WT1

Biópsias renais de pacientes com podocitopatias, DLM ou GESF, apresentaram menor imunomarcagem de WT1, ou seja, menor número de podócitos quando comparado ao grupo controle ($p \leq 0,0001$, $F=19,35$, pós teste de Tukey, Fig.4 e Fig. 10 a, b e c).

Figura 4 - Expressão de WT1 nos glomérulos. Expressão de WT1 no compartimento glomerular



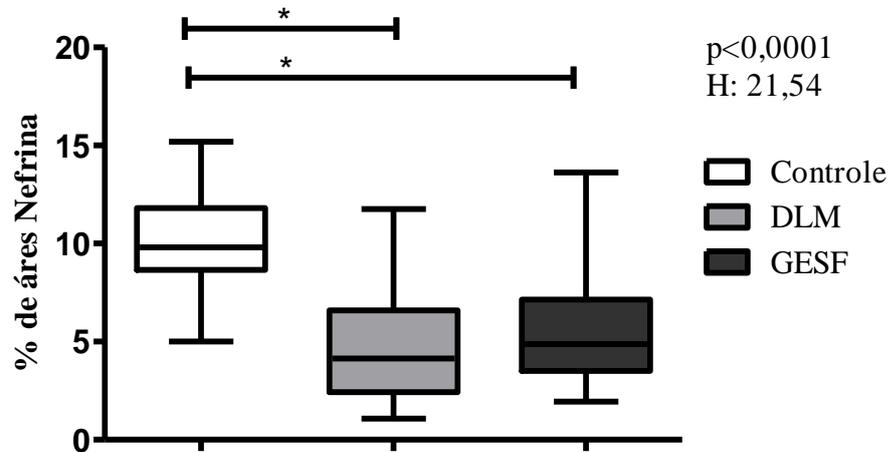
Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Expressão de WT1 nos glomérulos. Expressão de WT1 no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase nos 3 grupos: Controle, DLM e GESF. Teste de ANOVA (F) seguido da comparação múltipla de Tukey. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%, $p < 0,05$. DLM: Doença de Lesões Mínimas e GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

6.3.2 Expressão de Nefrina

De forma semelhante, as biópsias renais de pacientes com DLM ou GESF apresentaram menor imunomarcagem de nefrina quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$; $H=21,54$, pós teste de Dunn, Fig.5 e Fig. 10 d, e e f).

1 Figura 5 - Expressão de nefrina nos glomérulos. Expressão nefrina no compartimento
2 glomerular



3

4 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

5 Expressão de nefrina nos glomérulos. Expressão nefrina no compartimento glomerular, pela técnica de
6 imunoperoxidase nos 3 grupos: Controle, DLM e GESF. Teste de Kruskal-Wallis (H) seguido de comparação
7 múltipla de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as
8 linhas verticais representam os percentis 10-90%. * $p < 0,05$. DLM: Doença de Lesões Mínimas e GESF:
9 Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

10

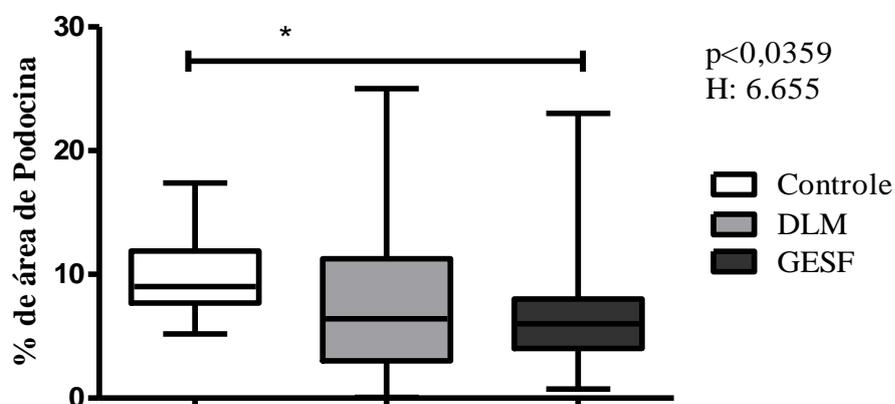
11

12 6.3.3 Expressão de Podocina

13 Biópsias renais de pacientes com GESF, apresentaram menos imunomarcacão de podocina em
14 comparação ao grupo controle. Não foi observado diferença com pacientes do grupo de DLM
15 ($p < 0,0359$; $H = 6,655$, pós teste de Dunn, Fig.6 e Fig. 10 g, h e i).

16

17 Figura 6 - Expressão de podocina nos glomérulos. Expressão podocina no compartimento
18 glomerular, pela técnica de imunoperoxidase



19

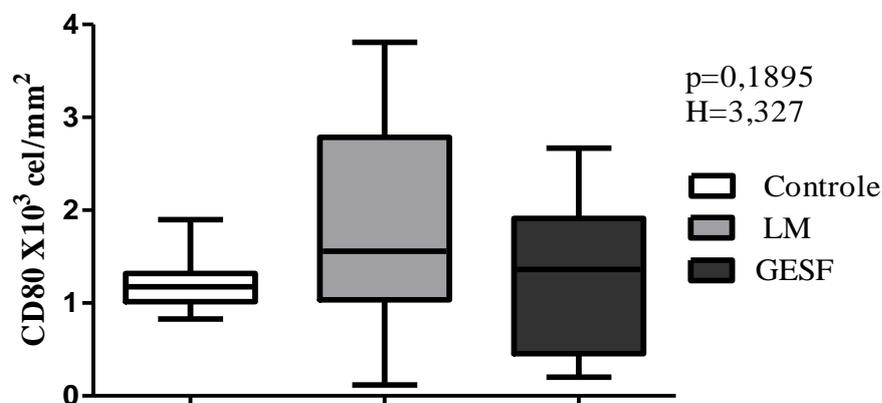
20 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

1 Expressão de podocina nos glomérulos. Expressão podocina no compartimento glomerular, pela técnica de
 2 imunoperoxidase nos 3 grupos: Controle, LM e GESF. Teste de Kruskal-Wallis (H) seguido de comparação
 3 múltipla de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as
 4 linhas verticais representam os percentis 10-90%. * $p < 0,05$. DLM: Doença de Lesões Mínimas e GESF:
 5 Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

6.3.4 Expressão de CD80

9 Não foi encontrado diferença significativa quanto a marcação de CD80 entre os pacientes com
 10 DLM, GESF e o grupo controle ($p = 0,1895$; $H = 3,327$, Fi. 7 Fig. 10 j, k e l).

12 Figura 7 - Expressão de CD80 nos glomérulos. Expressão de CD80 no compartimento
 13 glomerular, pela técnica de imunoperoxidase



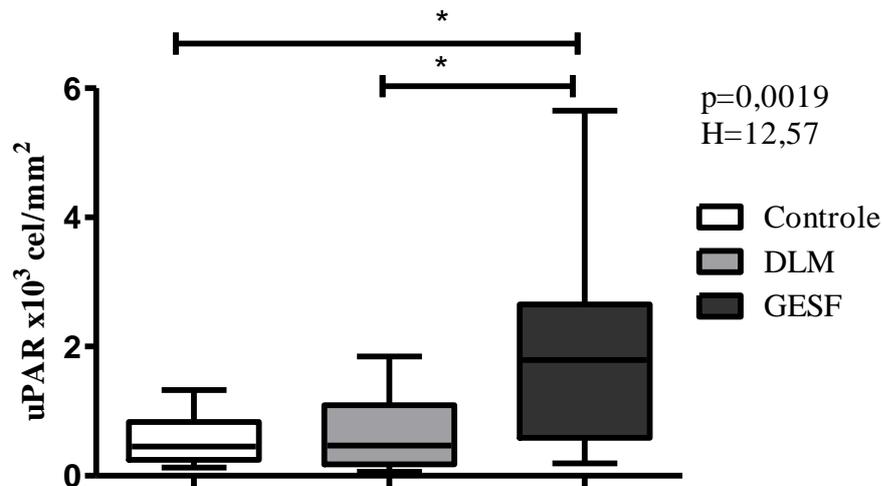
14 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

16 Expressão de CD80 nos glomérulos. Expressão de CD80 no compartimento glomerular, pela técnica de
 17 imunoperoxidase nos 3 grupos: Controle, DLM e GESF. Teste de Kruskal-Wallis (H) seguido de comparação
 18 múltipla de Dunn. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as
 19 linhas verticais representam os percentis 10-90%. $p > 0,05$. DLM: Doença de Lesões Mínimas e GESF:
 20 Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

6.3.5 Expressão de uPAR

24 Os pacientes com GESF apresentaram maior imunoexpressão de uPAR quando comparados
 25 aos pacientes do grupo controle e com DLM ($p = 0,0019$; $H = 12,57$, pós teste de Dunn, Fig. 8 e
 26 Fig. 10 m, n e o).

1 Figura 8 - Expressão uPAR no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase



2

3 Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

4 Expressão de uPAR no compartimento glomerular, pela técnica de imunoperoxidase nos 3 grupos: Controle, DLM
 5 e GESF. Teste de Kruskal-Wallis (H) seguido de comparação múltipla de Dunn. As linhas horizontais representam
 6 as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-
 7 90%. * $p < 0,05$. DLM: Doença de Lesões Mínimas e GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal.

8

9

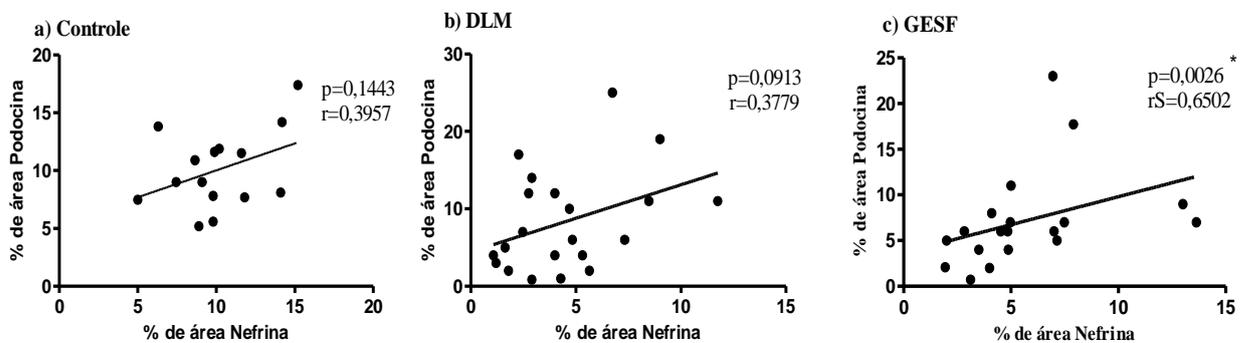
10 6.4 ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES

11 Nos pacientes com GESF observamos correlação positiva e significativa entre nefrina e
 12 podocina ($p=0,0026$, $rS=0,6502$, Fig.9C). Ao analisar essas proteínas no grupo controle e nos
 13 pacientes com DLM não foi observado nenhuma correlação (Fig. 9A e 9B).

14 As análises de correlações realizadas com os outros marcadores não revelaram diferença
 15 significativa.

16

17 Figura 9 - Correlação entre Nefrina e Podocina

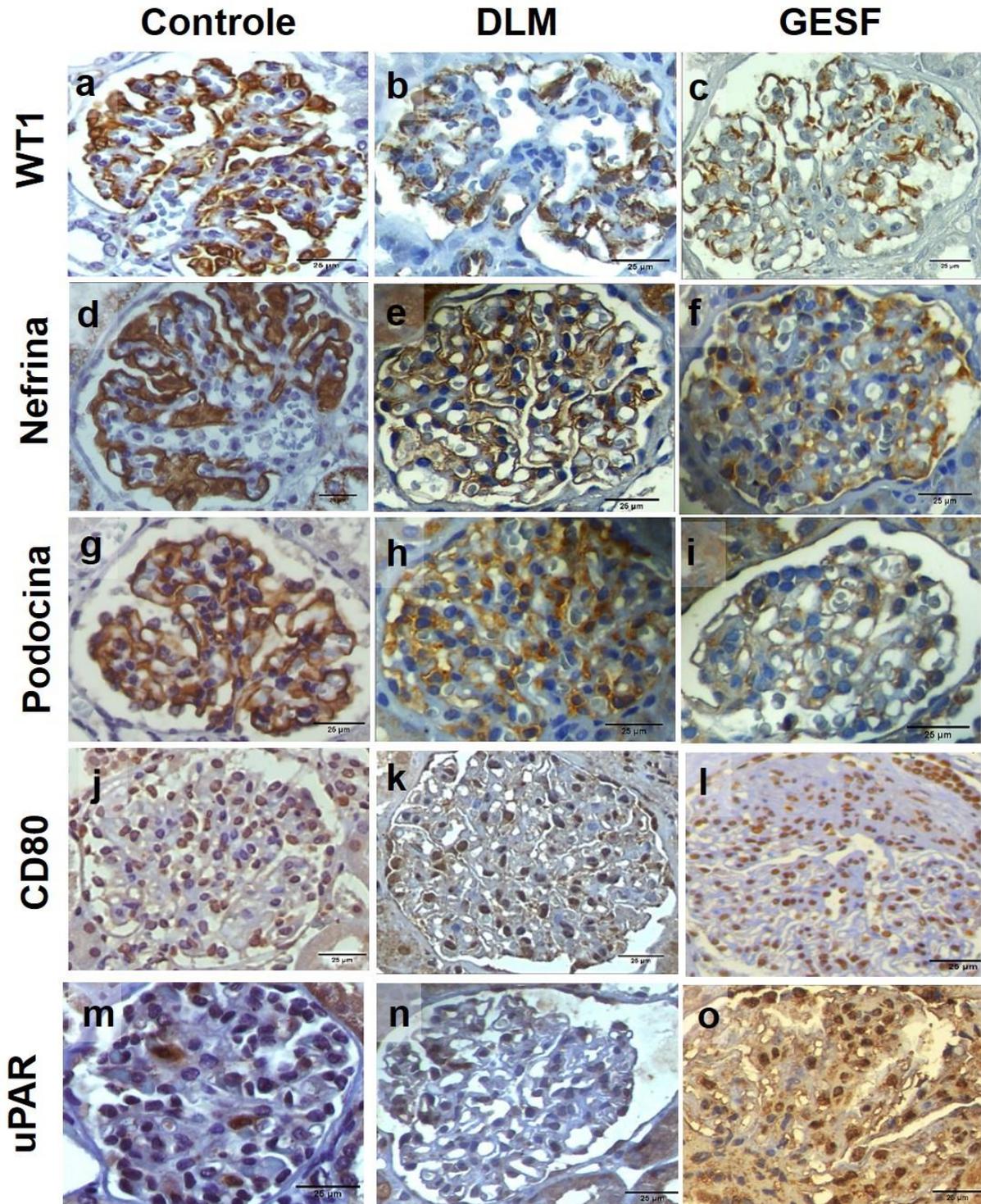


18

19 Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

20 Correlação entre Nefrina e Podocina. Correlação entre (A) a porcentagem em área de nefrina e a porcentagem em
 21 área de podocina em pacientes do grupo Controle, (B) entre os pacientes do grupo de DLM (C) entre os pacientes
 22 do grupo de GESF.

1 Figura 10 - Imunomarcação em pacientes dos grupos Controle, DLM e GESF



Expressão de WT1 nos glomérulos nos grupos controle (A), DLM (B) e GESF (C). Expressão de nefrina nos glomérulos nos grupos controle (D), DLM (E) e GESF (F). Expressão da podocina nos glomérulos nos grupos controle (G), DLM (H) e GESF (I). Expressão de CD80 no compartimento glomerular nos grupos controle (J), DLM (K) e GESF (L). Expressão de uPAR no compartimento glomerular nos grupos controle (m), DLM (n) e GESF (o). Escala: 25µm.

6.5 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

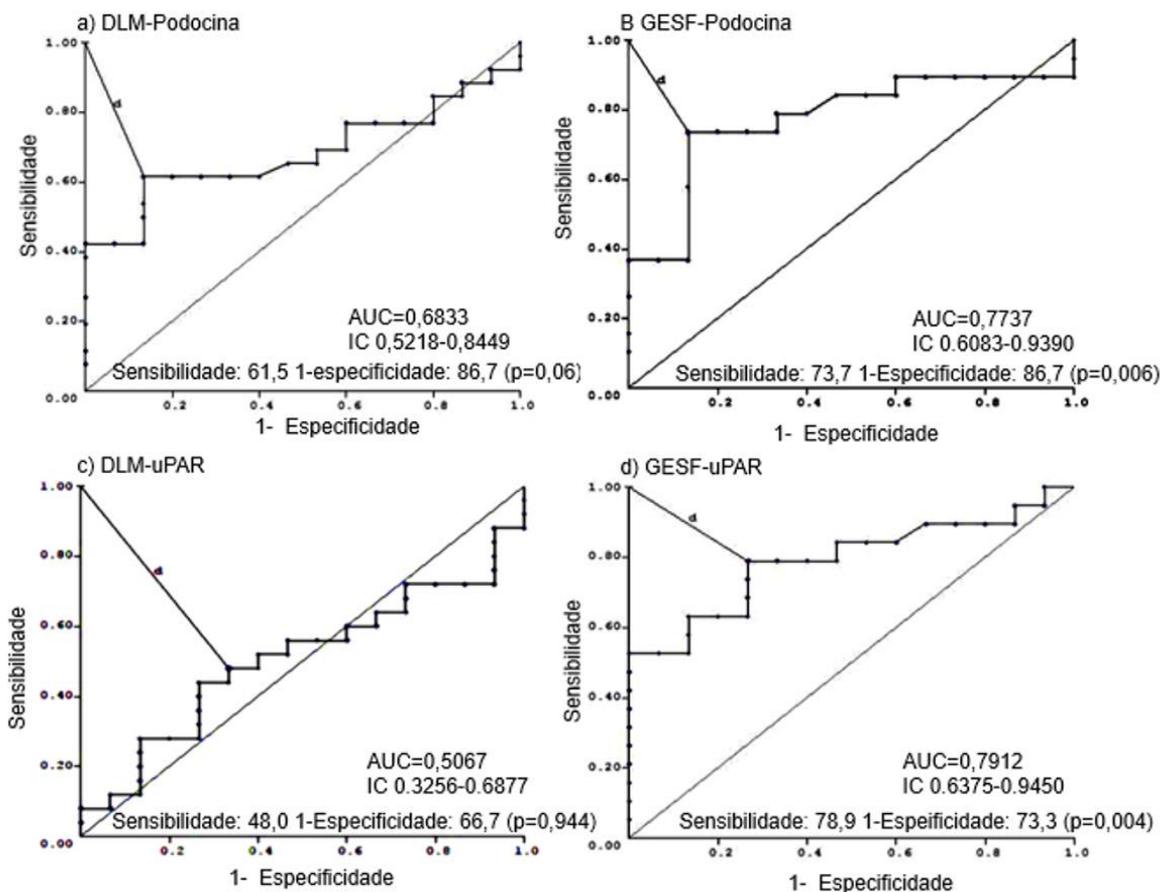
Levando em consideração a menor expressão de podocina e maior expressão de uPAR no grupo GESF, realizamos a curva ROC afim de predizer o potencial dessas proteínas no diagnóstico diferencial entre DLM e GESF.

AUC da podocina na doença de DLM foi de 0,6833 (IC_{95%} 0,5218-0,8449), o ponto de corte foi de 7,0, a sensibilidade de 61,5% e a especificidade de 86,7% (p=0,06, Fig 11A). Em GESF a podocina apresentou AUC de 0,7737 (IC_{95%} 0,6083-0,9390), ponto de corte de 7,0, sensibilidade de 73,3% e especificidade de 86,7% (p=0,006, Fig 11B).

Em relação ao uPAR, a AUC para DLM foi de 0,5067 (IC_{95%} 0,3256-0,6877), o ponto de corte de 0,489, a sensibilidade de 48,0% e a especificidade de 66,7% (p=0,9443, Fig 11C). Em GESF, a AUC foi de 0,7912 (IC_{95%} 0,6375-0,9450), o ponto de corte de 0,589, a sensibilidade de 78,9% e a especificidade de 73,3% (p=0,004, Fig 11D).

13

14 Figura 11 - Curva ROC dos indicadores de diagnóstico



15

16 Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

17 Podocina em pacientes saudáveis e com DLM (A) e em pacientes saudáveis e com GESF (B). uPAR em

18 pacientes saudáveis e com DLM (C) e em pacientes saudáveis e com GESF (D).

19

1 6.6 EVOLUÇÃO CLÍNICA

2 Foi proposto acompanhar os pacientes que foram diagnosticados com DLM e GESF
3 pelo Serviço de Nefropatologia da UFTM. Foi obtido através do contato com os Nefrologistas
4 os medicamentos usados e a evolução clínica dos pacientes após em média 6 anos de
5 seguimento. Inicialmente tínhamos 50 casos, contudo devido às diversas dificuldades de
6 seguimento desses pacientes, chegamos a um número total de 22 casos.

8 6.6.1 Dados laboratoriais

9 Na análise dos 22 pacientes no momento do diagnóstico, a média da Cr sérica foi
10 $1,56 \pm 3,86$ mg/dL e a TFGe foi de $115,9 \pm 90,7$ ml/min/173m². Nos casos de DLM a média de Cr
11 sérica foi de $0,57 \pm 0,27$ mg/dL e em GESF foi de $2,84 \pm 5,8$ mg/dL. A mediana da TFGe dos
12 pacientes com DLM foi de 106,2 (72,3-363,4) ml/min/173m² e nos casos de GESF foi de 66,4
13 (3,7-190,0) ml/min/173m² (Tabela 3).

14
15 Tabela 3 - Valores de creatinina e TFGe no momento do diagnóstico

	Total (n=22)	DLM (n=12)	GESF (n=10)	Valor p
Creatinina (mg/dL)				
<i>Media (±SD)</i>	1,56 (±3,86)	0,57 (±0,27)	2,1 (±5,8)	p=0,34
TFGe (ml/min/173m²)				
<i>Mediana (Min-Max)</i>	115,9 (±90,7)	106,2 (72,3-363,4)	66,4 (3,7-190,0)	p=0,23

16 DLM: Doença de Lesões Mínimas; GESF: Glomeruloesclerose segmentar e focal; n: número de casos; TFGe:
17 Taxa de filtração glomerular estimada.

19 6.6.2 Resposta ao tratamento e evolução clínica

20 A evolução clínica dos pacientes após em média 6 anos foi analisada em relação a
21 terapia medicamentosa aplicada e a resposta ao tratamento. Em seguida, os pacientes foram
22 classificados de acordo com a resposta ao tratamento em remissão completa, parcial e
23 resistência terapêutica.

24 Com relação ao tratamento de escolha frente aos diagnósticos de DLM e GESF, os
25 principais escolhidos foram as associações CSA+IECA/BRA+Esteróide em 31,8% dos
26 pacientes, Esteróides em 22,7% e IECAs/BRA com 13,6%. Os esteróides fizeram parte do
27 esquema terapêutico, sozinhos ou associados, de 77,3% dos pacientes analisados. Em DLM a
28 resposta ao uso apenas de esteroide (41,7%) e a associação de CSA+IECA / BRA+Esteróide
29 (25%) foram as opções terapêuticas mais utilizadas. Em GESF a associações

1 CSA+IECA/BRA+Esteróide (40%) e IECA/BRA (20%) foram as opções terapêuticas mais
2 aplicadas (Tabela 4).

3 A principal evolução clínica dos pacientes com DLM foi a remissão parcial da doença
4 em 41,7% dos casos. Remissão completa foi encontrada em 33% dos casos e outros 25%
5 apresentaram resistência terapêutica. Em GESF, 10% tiveram remissão parcial do quadro, 40%
6 remissão completa e 50% tiveram resistência terapêutica (Tabela 4).

1 Tabela 4 - Estratégia terapêutica e evolução dos pacientes após a média de 6 anos

Case	Diagnóstico	Terapia	Evolução clínica após 6 anos
1	DLM	Esteróide	Remissão completa
2	DLM	Esteróide	Remissão parcial
3	DLM	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Resistência terapêutica
4	DLM	Esteróide	Remissão completa
5	DLM	Esteróide	Remissão completa
6	DLM	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Remissão completa
7	DLM	Esteróide	Remissão parcial
8	DLM	IECA/BRA, Esteróide	Remissão parcial
9	DLM	IECA/BRA	Remissão parcial
10	DLM	CFA, IECA/BRA, Esteróide	Remissão parcial
11	DLM	Tacrolimus e Esteróide	Resistência terapêutica
12	DLM	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Resistência terapêutica
13	GESF	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Remissão completa
14	GESF	CFA, Esteróide	Remissão parcial
15	GESF	IECA/BRA	Remissão completa
16	GESF	Rituximab	Remissão completa
17	GESF	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Remissão completa
18	GESF	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Resistência terapêutica
19	GESF	IECA/BRA	Resistência terapêutica
20	GESF	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Resistência terapêutica
21	GESF	MMF, Esteróide	Resistência terapêutica
22	GESF	CSA, IECA/BRA, Esteróide	Resistência terapêutica

2 DLM: Doença de Lesões Mínimas; GESF: Glomeruloesclerose segmentar e focal; IECA: Inibidor da Enzima
3 Conversora de Angiotensina; BRA: Bloqueador do receptor de Angiotensina

4

5 Na análise dos 22 pacientes após o seguimento de 6 anos, a média da Cr sérica foi
6 $0,95 \pm 0,49$ mg/dL e a TFG_e foi de $94,6 \pm 45,4$ ml/min/173m². Nos casos de DLM a média de Cr
7 sérica foi de $0,75 \pm 0,24$ mg/dL e em GESF foi de $1,2 \pm 0,6$ mg/dL. A mediana da TFG_e dos
8 pacientes com DLM foi de 124,0 (79,0-188,6) ml/min/173m² e nos casos de GESF foi de 69,95
9 (27,0-117,6) ml/min/173m² (Tabela 5).

10

11 Tabela 5 - Valores de creatinina e TFG_e após a média de 6 anos.

	Total (n=22)	DLM (n=12)	GESF (n=10)	Valor p
Creatinina (mg/dL)				
Media ($\pm SD$)	0,95($\pm 0,49$)	0,75 ($\pm 0,24$)	1,2 ($\pm 0,6$)	p=0,09
TFG_e (ml/min/1,73m²)				
Mediana (Min-Max)	94,6 ($\pm 45,4$)	124,0 (79,0-188,6)	69,95 (27,0-117,6)	p=0,06

12 DLM: Doença de Lesões Mínimas; GESF: Glomeruloesclerose segmentar e focal; n: número de casos; TFG_e:
13 Taxa de filtração glomerular estimada.

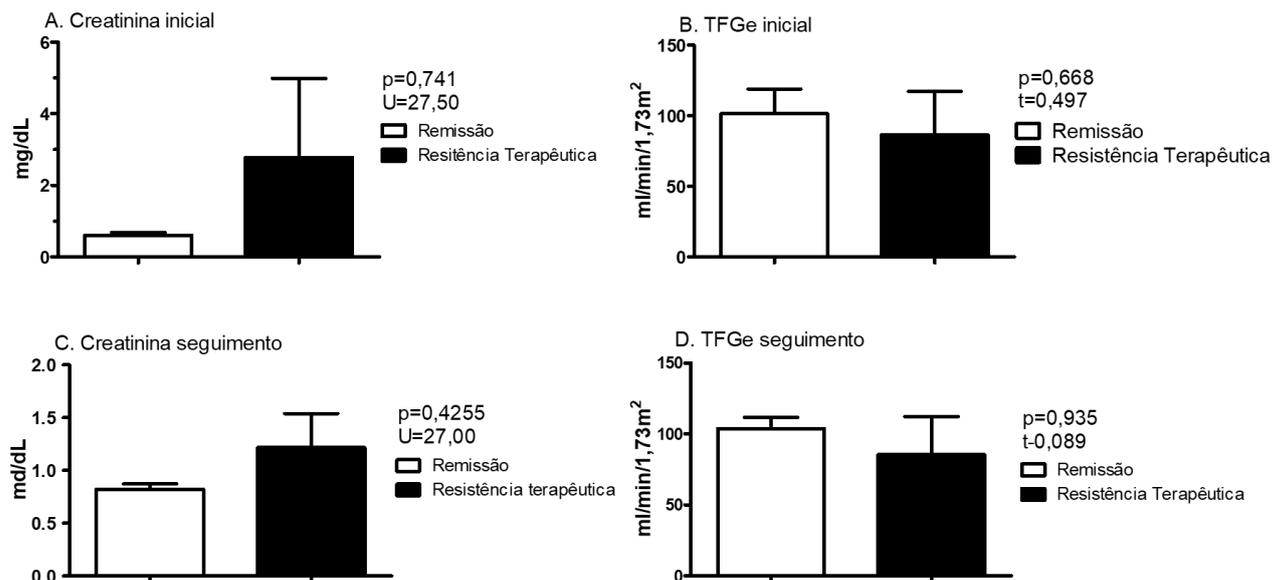
14

6.6.3 Avaliação de marcadores laboratoriais de prognóstico conforme evolução clínica

Na avaliação de marcadores de prognóstico de DLM e GESF foi analisado a Cr sérica, a TFGe e a expressão de uPAR na amostra da biópsia renal no momento do diagnóstico, quanto à resposta ao tratamento. Os pacientes que apresentaram algum grau de remissão foram analisados conjuntamente e comparados com os pacientes com resistência terapêutica.

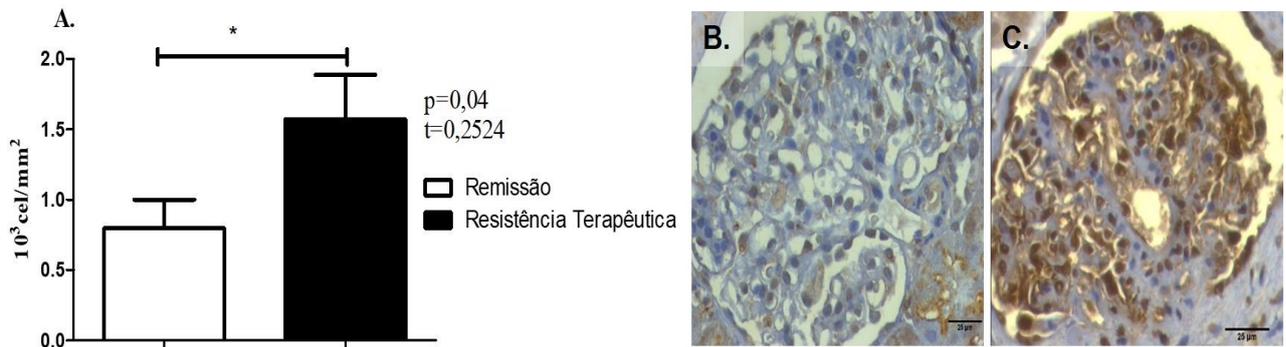
Não houve diferença estatisticamente significativa que pudesse indicar a evolução de corticorresistência entre os pacientes que tiveram remissão ao tratamento e aqueles com resistência terapêutica com relação a Cr sérica e a TFGe no momento do diagnóstico ($p=0,741$, $U=27,50$ e $p=0,668$, $t=0,497$, Figuras 12A e 2B), bem como após o seguimento ($p=0,4255$, $U=27,00$ e $p=0,935$, $t=0,089$, Figuras 12C e 2D). Contudo, foi observada maior expressão de uPAR no momento do diagnóstico naqueles pacientes que evoluíram com resistência terapêutica ($p=0,04$, Figura 13) sem diferenças entre DLM e GESF.

Figura 12 - Creatinina sérica e TFGe no momento do diagnóstico e após seguimento



Avaliação da creatinina sérica (A) e da TFGe (B) no momento da biópsia renal e após o seguimento de em média 6 anos (C) e (D) dos pacientes que tiveram como resposta ao tratamento a remissão da doença ou a resistência terapêutica.

1 Figura 13 - uPAR como marcador prognóstico em podocitopatias



2

3 Expressão *in situ* de uPAR em biópsias renais pediátricas no momento do diagnóstico de acordo com resposta
4 terapêutica após em média 6 anos de acompanhamento (A). Padrão de marcação *in situ* de paciente apresentando
5 remissão completa (B) e paciente com resistência terapêutica (C).

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS

Das doenças renais na infância, a manifestação clínica mais comum é de síndrome nefrótica, e em cerca de 90% dos casos envolve glomerulopatia primária. A síndrome nefrótica em crianças possui como principal diagnóstico a DLM, seguida por GESF e a proliferação mesangial difusa (Sabry *et al.*, 2009; Chugh *et al.*, 2012). Em nosso estudo, os casos de DLM representaram 58% do total e GESF 42%. O número maior de GESF, do que o referenciado na literatura, pode representar a indicação clínica da realização da biópsia renal, visto que pacientes com clínica de DLM e resposta favorável a corticoterapia não necessitam de biópsia renal para confirmação diagnóstica (Alshami *et al.*, 2017). Além disso, trabalhos no mundo todo têm mostrado um aumento no número de pacientes adultos e pediátricos diagnosticados com GESF (Boyer *et al.*, 2007; Polito *et al.*, 2010; Klaassen *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2015; O'shaughnessy *et al.*, 2017).

Na análise de todos pacientes a média de idade foi em torno de 11 anos, a maioria eram do sexo masculino e de cor branca. Esse perfil é predominante na população com síndrome nefrótica na faixa etária pediátrica. A média de idade predominante em DLM, na literatura, é de 6 anos, contudo há grande prevalência até 12 anos. Em GESF a média é maior e pode variar de 9 a 14 anos (Mubarak *et al.*, 2009; Swarnalatha *et al.*, 2015). As podocitopatias parecem afetar mais crianças do sexo masculino que feminino, e há estudos que relatam proporção de 2:1 (Ranganathan, 2016; Zhu *et al.*, 2018). Apesar de não ter havido diferença significativa em nossos casos, houve mais crianças do sexo masculino acometidas. Com relação à cor, há alguns trabalhos que relatam maior frequência de brancos nos casos de glomerulopatias primária na infância (Rocha *et al.*, 2013), contudo estudos de GESF mostram que os pacientes não brancos são mais prevalentes (Shakeel *et al.*, 2014; Ranganathan, 2016). Em adultos, a frequência de GESF em afro-americanos é 2 a 3 vezes maior em comparação com indivíduos caucasianos, apesar de alguns trabalhos mostrarem que esse número tem reduzido (Sprangers *et al.*, 2016).

Os pacientes com DLM do estudo apresentaram o perfil clínico de síndrome nefrótica semelhante ao da literatura, com Cr sérica normal, proteinúria, hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, função renal preservada, bem como valores normais de TFGe. Além disso, apresentaram hematúria e hipertensão em alguns casos. Nossos dados corroboram com o da literatura, que também apresentam um perfil de síndrome nefrótica clássica em sua maioria, e alguns com relatos de manifestações de hipertensão e hematúria, que estão presentes geralmente

1 no início da doença e regridem com a redução da proteinúria (Küster *et al.*, 1990; Singh *et al.*,
2 2013; Ranganathan, 2016; Vivarelli *et al.*, 2017).

3 A GESF, em nossos casos, apresentou a clínica de síndrome nefrótica e com alteração
4 da função renal, além de hipertensão e hematuria. Em pacientes com GESF primária, a
5 manifestação clínica mais comum é de síndrome nefrótica associada, algumas vezes, à
6 hipertensão arterial, hematuria microscópica e algum grau de injúria renal (Sprangers *et al.*,
7 2016). Alguns trabalhos sobre GESF em crianças trazem valores de Cr sérica de 0,9mg/dl em
8 média, contudo na divisão entre os diferentes tipos histológicos de GESF, àqueles com tipos
9 histológicos mais agressivos, como GESF colapsante, apresentam níveis de Cr sérica muito
10 mais elevados que a média. Relacionado a isso, estão os níveis reduzidos da TFG. A proteinúria
11 nos casos de GESF acompanha os valores da síndrome nefrótica, acima de 50mg/kg/dia, por
12 vezes apresenta índices muito mais elevados. Em um estudo de GESF em crianças, 88% da
13 amostra apresentava proteinúria nefrótica, 54% hematuria e 28% hipertensão (Korbet *et al.*,
14 1994; Patrakka *et al.*, 2001; Rheault, 2014; Swarnalatha *et al.*, 2015).

15

16 7.2 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO E CORRELAÇÕES

17 A relação entre DLM e GESF é controversa, visto que ainda há dúvidas se são doenças
18 distintas ou se estão apenas em momentos de evolução diferentes. O diagnóstico morfológico
19 de Podocitopatias (DLM e GESF) é um desafio para o nefropatologista, especialmente nos
20 casos em que as biópsias não contêm número adequado de glomérulos e/ou a lesão de esclerose
21 não é amostrada. Dessa forma, estabelecer biomarcadores específicos para diferenciar estas
22 entidades é de suma importância. Neste trabalho avaliamos por meio de imunomarcagem na
23 biópsia renal a sensibilidade e especificidade de algumas proteínas podocitárias, do CD80 e do
24 uPAR como possíveis biomarcadores no diagnóstico diferencial destas entidades.

25 Do ponto de vista morfológico, as podocitopatias cursam com alterações nos podócitos.
26 Uma forma de avaliar a densidade de podócitos é através da biópsia renal. Dessa forma, alguns
27 autores têm utilizado o WT1, pois durante a nefrogênese ele é expresso em células progenitoras
28 glomerulares e auxilia no desenvolvimento renal. Com o amadurecimento do glomérulo, o WT1
29 torna-se restrito aos núcleos dos podócitos e possui papel importante na sua homeostase, o que
30 torna essa proteína importante na identificação de perda dessas células (Mundlos *et al.*, 1993)

31 No presente estudo, encontramos redução dessa proteína nos pacientes com DLM e
32 GESF quando comparado com o grupo controle. Estudos com animais em que é induzido o
33 desenvolvimento de glomeruloesclerose, foi evidenciado a diminuição do número de podócitos,

1 além do aumento do volume glomerular. Essa redução poderia ter ocorrido pela apoptose dos
2 podócitos e desprendimento da MBG, e conseqüente liberação na urina. Os podócitos
3 remanescentes sofreriam um processo de “esticamento” sobre a MBG para compensar a
4 ausência dos que se destacaram e esse processo de tensão é responsável por ativar receptores
5 AT1 e de Angiotensina II, presentes nos podócitos, que são desencadeadores da apoptose via
6 TGF- β . Esse mecanismo poderia explicar a redução no número de podócitos em nossos casos
7 de GESF (Durvasula *et al.*, 2004). Já nos casos de DLM, esperava-se uma manutenção do
8 número de podócitos. Contudo, encontramos uma redução desse número comparado ao
9 controle. Acredita-se que não haja redução no número de podócitos, mas sim um defeito na
10 transcrição da proteína WT1, decorrente de uma alteração fenotípica do podócito, o que tornaria
11 a expressão de WT1 reduzida (Macconi *et al.*, 2006).

12 Foi encontrado redução na expressão de nefrina nos pacientes com DLM e GESF em
13 comparação aos pacientes do grupo controle. Proteínas localizadas no DS são de grande
14 importância na manutenção da BFG mantendo o controle de toda estrutura podocitária e das
15 vias de sinalização. A nefrina tem um importante papel na estrutura desse diafragma, visto que
16 é seu principal componente, além de fazer várias associações com outras proteínas que auxiliam
17 na manutenção da estrutura da BFG. Doenças glomerulares com proteinúria e apagamento dos
18 processos podocitários apresentam alteração na expressão e localização das proteínas que
19 compõem o DS (Hulkko *et al.*, 2014). Pesquisadores encontraram, em casos de DLM, reduzida
20 marcação de nefrina quando comparado aos casos controle e, associado a isso, níveis de
21 proteinúria bastante elevados (Hulkko *et al.*, 2014). Estudos de expressão da nefrina pela
22 técnica de imunofluorescência mostrou grande perda do padrão de imunomarcacão
23 independente da doença ser primária, adquirida ou congênita, além disso, identificaram que
24 essa perda não foi diferente entre tipos de glomerulopatias como DLM, GESF e Glomerulopatia
25 membranosa (Doublier *et al.*, 2001). Há trabalhos que não encontraram diferença na expressão
26 de nefrina em casos de DLM comparado a GESF com a utilização da técnica de hibridização *in*
27 *situ* e imunohistoquímica (Doublier *et al.*, 2001; Patrakka *et al.*, 2001). Entretanto, trabalhos
28 que utilizaram ratos com glomeruloesclerose avaliaram a estrutura do DS e foi encontrado que
29 tanto nas áreas de esclerose quanto sem esclerose houve uma redução de nefrina. Dessa forma,
30 a esclerose glomerular era responsável pela perda de nefrina devido ao destacamento de
31 podócitos e posterior desestruturação do DS. E nos casos sem esclerose a explicação seria a
32 redistribuição das proteínas do DS, devido a alteração na expressão de nefrina e a fragmentação
33 da sua quantificação (Macconi *et al.*, 2006). É possível que a expressão reduzida de nefrina não

1 esteja relacionada com uma doença glomerular específica, mas sim com o estado de proteinúria,
2 denominador comum entre os casos discutidos, e que a nefrina seja o alvo desses níveis
3 elevados de proteína (Suvanto *et al.*, 2015). Um outro dado importante, é que o WT1 tem o
4 papel de ser fator de transcrição de outras proteínas, dentre elas a nefrina (Kreidberg *et al.*,
5 1993; Mrowka e Schedl, 2000; Kato e Mizuno, 2017). Com base em nossos achados, em que o
6 WT1 está reduzido nos casos de podocitopatias, é possível inferir que ele esteja com a função
7 reduzida e por isso há menos expressão de nefrina.

8 Neste trabalho, os pacientes com GESF apresentaram valores reduzidos de podocina
9 comparado aos indivíduos do grupo controle. Explicações para a redução ou ausência completa
10 da podocina em casos de síndrome nefrótica idiopática ainda necessitam de muitos estudos,
11 mas sabe-se que a redução na expressão de podocina, assim como nefrina está envolvida nas
12 alterações fenotípicas dos podócitos (Mckenzie *et al.*, 2007; Tonna *et al.*, 2008; Agrawal *et al.*,
13 2013). Uma pesquisa realizada no Japão analisou a expressão de podocina em diferentes
14 doenças glomerulares. Em DLM não foi encontrado redução de podocina comparado aos casos
15 controle e todos responderam bem a corticoterapia. Já nos pacientes com GESF, 74% parecem
16 ter tido redução ou ausência na expressão de podocina e a resposta ao tratamento com
17 corticoides foi ruim, sendo que alguns evoluíram para doença renal em estágio final. Além
18 disso, foi encontrada pequena ou nenhuma redução na expressão da podocina em doenças como
19 Nefropatia por IgA, Glomerulopatia Membranosa e nefrite por púrpura de Henoch-Schönlein
20 (Horinouchi *et al.*, 2003). Em outro trabalho com material de biópsia renal, por meio de
21 imunofluorescência e imunoperoxidase, foi encontrado uma redução na expressão de podocina
22 em até 90% dos casos de GESF (Agrawal *et al.*, 2013). Sendo assim é possível inferir que a
23 podocina parece ser uma proteína do DS importante na diferenciação de GESF com outras
24 glomerulopatias, principalmente DLM, que por vezes faz diagnóstico diferencial com GESF.

25 Em GESF houve correlação positiva e significativa entre nefrina e podocina. A nefrina
26 tem grande papel na estrutura do DS, visto que é seu principal componente, além de fazer várias
27 associações com outras proteínas, como por exemplo a podocina, que auxilia na manutenção
28 da estrutura da BFG. A podocina pode interagir com CD2AP e principalmente com nefrina,
29 sugerindo uma função reguladora da dinâmica do citoesqueleto de actina, responsável por
30 ancorar o DS (Fuchshuber e Mehls, 2000; Agrawal *et al.*, 2013). Em GESF, o processo de
31 expansão da matriz mesangial, morte de podócitos com posterior destacamento e exposição da
32 MBG (Jefferson *et al.*, 2011), leva a destruição da composição do DS, incluindo suas proteínas
33 principais, nefrina e podocina, e por isso sua correlação direta em GESF.

1 O CD80 não apresentou diferença significativa entre os casos controle, DLM e GESF.
2 Vários estudos têm analisado o CD80 em material sérico e principalmente urinário, tanto em
3 humanos como em modelos animais, com intuito de identificá-lo como marcador da DLM.
4 Algumas pesquisas conseguiram identificar diferença estatística em suas análises e reforçam o
5 papel do CD80 no mecanismo de instalação da DLM (Garin *et al.*, 2009; Kistler e Reiser, 2010;
6 Mishra *et al.*, 2017; Ahmed *et al.*, 2018; Cara-Fuentes *et al.*, 2018). Contudo, trabalhos com
7 análise do CD80 em podócitos utilizando técnicas de IF, imunoperoxidase e análise
8 experimental em ratos não têm identificado essa molécula como possível marcador. O CD80
9 parece ser detectado em doenças renais com proteinúria, não sendo específico para DLM (Cara-
10 Fuentes *et al.*, 2014; Larsen *et al.*, 2014; Novelli *et al.*, 2016).

11 Os pacientes com GESF apresentaram maior expressão de uPAR no glomérulo, quando
12 comparado a DLM e grupo controle. GESF pode representar cerca de 20% das doenças
13 glomerulares, e em média 80% dos casos são de causa idiopática. Em muitas situações, possui
14 uma evolução clínica ruim com necessidade de diálise e transplante. A taxa de recorrência da
15 doença após o transplante é alta, tanto em adultos como em crianças, e o início das lesões no
16 órgão enxertado é rápido. Esse tem sido um forte indício de que haja um fator circulante que
17 participe do desenvolvimento da doença (Wei *et al.*, 2011). Outros achados incluem a redução
18 da proteinúria em resposta a terapia com plasmaferese (Wada *et al.*, 2014) imunoadsorção
19 (Sinha *et al.*, 2014), e um caso de síndrome nefrótica transitória em um recém-nascido cuja mãe
20 tinha GESF (Huang *et al.*, 2013).

21 Alguns estudiosos defendem que o uPAR possui atuação sobre os podócitos no
22 desencadeamento de doenças glomerulares, por atuar como receptor celular de uroquinase e
23 também participar como sinalizador celular com outros receptores transmembranas, como as
24 integrinas. Ele é expresso na superfície celular de vários tipos de células, incluindo células
25 endoteliais e células imunes. O uPAR pode ser clivado nos seus domínios por enzimas
26 proteolíticas ou pela ação de fosfolipases e se tornar solúvel na circulação (suPAR). O suPAR
27 está fisiologicamente na circulação do ser humano em níveis baixos e é proveniente de células
28 hematopoiéticas, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (Blasi e Sidenius,
29 2010; Wei *et al.*, 2011). Além disso, o uPAR também está envolvido em muitos outros
30 processos biológicos não proteolíticos, tais como migração, adesão, angiogênese e
31 proliferação celular (Raghu *et al.*, 2010).

32 A teoria sobre o desenvolvimento de GESF seria a existência de um fator circulante.
33 Contudo, o agente circulante suPAR, é proveniente de um fator ligado à membrana, o uPAR,

1 que ao ser ativado pelo seu ligante permite a clivagem na forma solúvel (Wei *et al.*, 2011).
2 Nosso estudo trabalhou com material de biópsia renal e analisou a forma ligada à membrana de
3 células no glomérulo. Em um estudo com modelo de camundongos *knockout* para uPA
4 induzidos ao desenvolvimento de GESF e proteinúria, foram encontrados níveis elevados de
5 suPAR na circulação. Isso indica que, mesmo sem o ligante do uPAR, houve a sua clivagem e
6 o suPAR foi formado. Parecem existir outras moléculas ligantes ao uPAR, que promovam sua
7 ativação, clivagem e liberação na circulação (Chen *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação está
8 associado à ligação e ativação da integrina $\beta 3$ na membrana podocitária. O citoesqueleto de
9 actina dos podócitos pode ser induzido pelo receptor da uroquinase por meio da ativação do
10 receptor de vitronectina ou da $\alpha \beta 3$ integrina. O uPAR parece ativar a $\alpha \beta 3$ integrina em
11 podócitos e promover a motilidade celular e ativação de pequenas GTPases, sendo
12 provavelmente responsável pela proteinúria (Blasi e Carmeliet, 2002).

13 Estudos com análise urinária de suPAR (Franco Palacios *et al.*, 2013), bem como análise
14 sérica (Huang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015) encontraram níveis desse marcador muito mais
15 elevados em GESF do que em outras doenças, como Nefropatia Diabética, Nefropatia por IgA,
16 Glomerulopatia Membranosa e DLM. Além disso, foi correlacionado com menores valores da
17 TFG e o desenvolvimento de proteinúria (Zhang *et al.*, 2014).

18 Na análise por comparação com DLM, os níveis encontrados em GESF são muito mais
19 elevados, de maneira que em análise histopatológica para diferenciação diagnóstica, o uPAR
20 poderia ser utilizado como diferenciador entre essas duas doenças.

21 Um estudo que trabalhou com uma linha de células de podócitos imortalizados, mostrou
22 que ao serem expostas ao suPAR, houve um aumento de canais TRPC6 na superfície dos
23 podócitos e uma redução de podocina. A podocina reduziu ainda mais quando houve a
24 exposição dos podócitos ao suPAR juntamente com Fator de Necrose Tumoral (TNF). As
25 células que foram expostas a soro e plasma de pacientes que tiveram GESF e estavam
26 recorrentes na doença apresentaram níveis muito reduzidos de podocina. O mecanismo que leva
27 a redução de podocina é incerto, mas parece estar envolvido com a via de ativação da $\alpha \beta 3$
28 integrina (Kim *et al.*, 2017).

29 Devido a diferença na expressão dos biomarcadores entre os grupos e a proximidade de
30 localização e função, questionamos uma possível correlação de densidade entre elas. Em nosso
31 estudo, a análise pela curva ROC permitiu a identificação de marcadores que pudessem auxiliar
32 na distinção entre DLM e GESF. De acordo com o teste de sensibilidade e especificidade, a
33 podocina e o uPAR pareceram os dois melhores alvos de estudos para diferenciação de GESF.

1 Podocina apresentou boa sensibilidade (73,7%) e ótima especificidade (86,7%). O uPAR
2 apresentou boa sensibilidade (78,9%) e especificidade (73,3%). Esses achados fortalecem o
3 papel da podocina e do uPAR no processo de diferenciação entre GESF e DLM.

4 A depleção de podócitos correlaciona-se diretamente com a perda de proteínas do DS,
5 nefrina e podocina, culminando com a alteração na BFG. A podocina mostrou-se seletiva
6 quando reduzida apenas em pacientes com GESF, o que a torna forte indicadora da doença,
7 além de estar envolvida na via de lesão glomerular na presença de uPAR. O mecanismo que
8 apontamos como depletor do podócito em GESF é o desencadeado pelo uPAR, que parece ser
9 um preditor da doença, sendo possível considerá-lo marcador diagnóstico da doença, em
10 conjunto com a podocina.

11

12 7.3 TERAPIA MEDICAMENTOSA E EVOLUÇÃO CLÍNICA

13 A terapia da síndrome nefrótica primária é principalmente de suporte. As principais
14 estratégias incluem terapia anti-hipertensiva e anti-proteinúrica, além das recomendações
15 dietéticas (Ruggenti *et al.*, 2008). Em nosso trabalho os esteroides foram os medicamentos
16 mais utilizados em pacientes com DLM e em combinação com outros imunossupressores. A
17 maioria dos pacientes evoluiu bem com remissão completa da doença ou remissão parcial. Os
18 esteroides são considerados como sendo a terapia de primeira escolha para tratar síndrome
19 nefrótica, com uma porcentagem de remissão da doença em cerca de 80%. Seu mecanismo de
20 ação ainda é incerto, mas parece estar relacionado com a regulação da expressão de citocina
21 através de receptores de glicocorticoides, que levam a indução de genes que codificam citocinas
22 anti-inflamatórias e reprimem genes para citocinas pró-inflamatórias. É possível, que os
23 esteroides possam suprimir a função das células T e estabilizar o citoesqueleto dos podócitos
24 (Hahn *et al.*, 2015; Downie *et al.*, 2017).

25 O uso de IECA e BRA em adultos está bem estabelecido para controle da proteinúria e
26 para evitar a progressão para doença renal crônica (DRC). Recomenda-se o uso de IECA/BRA
27 em casos de SNRE, SNDE e SNFR. Eles são anti-hipertensivos efetivos para pacientes com
28 síndrome nefrótica que apresentam elevação da pressão arterial, bem como para aqueles com
29 glomerulopatias que precisam de terapia complementar aos imunossupressores. Em pacientes
30 com SNRE são utilizados como medicamentos de suporte (Gipson *et al.*, 2009). Para a faixa
31 pediátrica ainda são necessários mais estudos, mas o uso destes medicamentos em crianças com
32 SNRE e proteinúria persistente está justificado com base nas evidências do tratamento em

1 adultos. Eles tem sido utilizados em associação com os outros medicamentos de escolha, como
2 esteroides, CSA, tacrolimus e CFA (Tune e Mendoza, 1997).

3 Outras opções terapêuticas são os agentes poupadores de esteroides, como a CFA, o
4 MMF, os inibidores da calcineurina e o rituximab. Eles são frequentemente utilizados para
5 induzir ou manter a remissão da síndrome nefrótica com resultados diversos. A variabilidade
6 de resposta a esses medicamentos e os riscos de recaídas futuras ainda não estão esclarecidos
7 (Bagga e Mantan, 2005; Lombel *et al.*, 2013; Chanchlani e Parekh, 2016).

8 Os inibidores de calcineurina tem como principais representantes o tacrolimus e a CSA,
9 que podem ser considerados um dos imunossuppressores mais eficazes, principalmente no
10 tratamento de SNSE e SNFR (Klaassen *et al.*, 2015). Em nossos casos, a CSA foi um dos
11 medicamentos mais utilizados, em associação com IECA/BRA e esteroides. A maioria desses
12 pacientes apresentou resistência terapêutica. Em casos de difícil manejo o uso de CSA pra tratar
13 SNRE tem sido a melhor opção, por permitir a remissão parcial ou completa do quadro clínico
14 (Ishikura *et al.*, 2008). Devido aos efeitos adversos da CSA, o tacrolimus tem sido cada vez
15 mais utilizado. Contudo, em nossos estudos a CSA em associação com IECA/BRA e esteroides
16 foi a escolha terapêutica mais frequente. Alguns pesquisadores consideram que a terapia
17 combinada de inibidores de calcineurina e esteroides pode ser uma opção terapêutica para
18 induzir remissão de SNRE, contudo orientam apenas em casos extremos. A CSA tem sido usada
19 em pacientes com SNRE e GESF, sozinha ou em combinação com prednisona ou após o pulso
20 com metilprednisolona. Os resultados tem mostrado boa evolução dos pacientes com uso dessas
21 medicações (Hamasaki *et al.*, 2009; Klaassen *et al.*, 2015). A associação com IECA/BRA
22 auxilia no controle da proteinúria, visto que esses medicamentos são padrões para redução de
23 proteína na urina (Klaassen *et al.*, 2015).

24 Os demais medicamentos citados tiveram menor incidência sobre o tratamento de
25 escolha para os pacientes com DLM e GESF em nosso trabalho. A CFA, por exemplo, parece
26 não beneficiar pacientes com diagnóstico de GESF, nem outras SNRE (Downie *et al.*, 2017).
27 Ele é o agente poupador de esteroide mais utilizado no mundo e possui bons resultados em
28 ensaios múltiplos controlados aleatoriamente para o tratamento de SNFR e SNSE. Ele possui
29 ação apoptótica por impedir a replicação do DNA de linfócitos. Crianças com DLM que
30 desenvolvem síndrome nefrótica com recidiva ou SNDE podem responder bem a essa classe de
31 medicamentos por reduzir os efeitos colaterais secundários da prednisona prolongada. Em
32 nossos casos, os dois pacientes que utilizaram apresentaram remissão parcial da doença. Os
33 outros similares utilizados são levamisole, inibidores da calcineurina, antiproliferativos e

1 Rituximab (Das *et al.*, 2009; Lombel *et al.*, 2013; Webb *et al.*, 2016; Vivarelli *et al.*, 2017).
2 Este último foi uma das escolhas em nossos casos para tratamento de GESF, que apresentou
3 remissão completa. Contudo, os efeitos colaterais causados por essa classe de agentes
4 alquilantes, pesa na escolha desses medicamentos. Eles podem causar leucopenia,
5 trombocitopenia, alopecia, cistite hemorrágica, eleva os riscos de infecções, além de disfunção
6 gonadal e infertilidade (Lombel *et al.*, 2013; Downie *et al.*, 2017). Ele é um anticorpo
7 monoclonal que se liga às células B, é um agente terapêutico novo e avançado para tratar SNSE,
8 além de auxiliar na remissão de SNFR e SNDE. Ele não tem sido associado ao tratamento de
9 SNRE (Ravani *et al.*, 2011).

10 O MMF tem sido utilizado para tratar SNFR e SNDE em opção aos inibidores de
11 calcineurina, que promovem muitos efeitos colaterais. Eles agem inibindo os linfócitos T e B e
12 a expressão de citocinas. Sua eficácia é menor em pacientes com SNFR, mas os poucos efeitos
13 colaterais podem compensar a escolha terapêutica (Moudgil *et al.*, 2005). Ele foi utilizado em
14 um único paciente e esse apresentou resistência terapêutica.

15 Com relação a evolução dos pacientes referente ao tratamento administrado, a maioria
16 dos pacientes com DLM tiveram regressão do caso, apenas com o uso de esteroides. Isso é o
17 esperado em pacientes com diagnóstico de DLM, que mesmo com quadros de recidiva
18 apresentam remissão completa ou parcial da doença e dificilmente evoluem com quadros mais
19 graves, que são mais frequentes em indivíduos com GESF (Klaassen *et al.*, 2015; Vivarelli *et*
20 *al.*, 2017). Os pacientes com GESF apresentaram maior diversidade na evolução clínica da
21 doença. É esperado que pacientes com esse diagnóstico frequentemente sejam resistente a
22 esteroides ou dependentes. Alternativas medicamentosas são estudadas para melhorar o
23 prognóstico desses pacientes, contudo uma considerável parte evolui para DRC e alguns
24 necessitam de transplante renal. Um trabalho que avaliou critérios de indicação de biópsia renal
25 concluiu que a combinação de resistência a esteroide após 6 semanas de terapia e/ou nefrite no
26 momento do diagnóstico produziu sensibilidade e especificidade ótimas para o diagnóstico de
27 GESF (Alshami *et al.*, 2017).

28

29 7.4 ANÁLISE DE MARCADOR PROGNÓSTICO

30 Com relação aos valores de Cr sérica e TFGe no momento da biópsia e no seguimento,
31 não encontramos diferenças significativas entre os pacientes com remissão e resistência
32 terapêutica. Assim, é possível inferir que esses dois parâmetros clínicos não são bons
33 marcadores de prognóstico em podocitopatias pediátricas, pois não podem prever a resistência

1 terapêutica dos pacientes biopsiados. No entanto, o uPAR analisado nos glomérulos dessas
2 crianças mostrou-se aumentado naquelas que evoluíram com resistência aos tratamentos de
3 escolha, independente do diagnóstico. O uPAR é uma proteína de membrana ligada ao GPI
4 encontrada em várias células imunologicamente ativas, incluindo podócitos, e possui papel
5 importante na regulação de proteólise da matriz extracelular e das interações entre a célula e a
6 MEC. Sua atuação em GESF parece estar relacionada a ativação de $\alpha\beta 3$ integrina nos
7 podócitos que promove a motilidade celular e ativação de pequenas GTPases, levando a
8 desestruturação dos podócitos e perda do DS; culminando em proteinúria (Wei *et al.*, 2008).

9 O uPAR pode ser ligado a vários ligantes como o uPA, vitronectina e integrinas. Quando
10 se liga ao seu ligante uPA ele pode ser clivado e gerar unidades circulantes, como o suPAR. O
11 suPAR é encontrado no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, dentre outros, e tem sido
12 relacionado com o desenvolvimento de GESF. Existem estudos que mostram que pacientes com
13 GESF e sensíveis a esteroides apresentaram níveis elevados de suPAR e que no momento de
14 remissão da doença o suPAR estava reduzido (Li *et al.*, 2014; Königshausen e Sellin, 2016).
15 No entanto, encontramos uma relação inversa em nossa pesquisa, demonstrando que o uPAR
16 está mais elevado em casos com resistência terapêutica, o que nos faz acreditar que o uPAR
17 possa ser utilizado como fator preditivo da resistência terapêutica em biópsias renais
18 pediátricas.

19 Estudos têm mostrado níveis reduzidos de suPAR em pacientes com DLM, comparado
20 a indivíduos com GESF (Li *et al.*, 2014; Königshausen e Sellin, 2016). Em DLM, ainda são
21 necessários estudos que expliquem a ação do uPAR, mesmo porque em pesquisas realizadas
22 por nosso grupo, foram encontrados níveis reduzidos dessa proteína em DLM.

23 Apesar de não termos encontrado diferença significativa, é possível que a TFGe seja um
24 marcador um pouco tardio de lesão renal, bem como a Cr sérica. Nossos resultados apontam
25 que maior expressão de uPAR em biópsias renais com diagnóstico de podocitopatias é fator
26 preditor de resistência terapêutica, mesmo na ausência de diferenças entre dados clínicos e
27 laboratoriais.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

- I. No Serviço de Nefropatologia da UFTM no período de 1998 a 2015 foram analisadas 274 biopsias renais pediátricas, sendo 50 casos (18%) de podocitopatias (29 DLM e 21 GESF), com amostra completa para análise diagnóstica. O perfil dos pacientes estudados é de maioria do sexo masculino, branco e com média de idade de 11 anos;
- II. Os pacientes com DLM e GESF apresentaram quadro clínico de síndrome nefrótica, com proteinúria elevada, hipoalbuminemia e hipercolesterolemia. Hipertensão e hematúria também foram alterações identificadas. A função renal estava alterada na maioria dos casos de GESF;
- III. A densidade dos podócitos foi reduzida em DLM e GESF comparado ao grupo controle.
- IV. Os pacientes com DLM apresentaram menor expressão de nefrina. Em GESF, a nefrina e a podocina foram menores que os casos controle, e o uPAR apresentou expressão acentuada nesses casos. O CD80 não mostrou diferença de expressão entre os casos estudados.
- V. A nefrina possui correlação positiva e significativa com podocina nos casos de GESF.
- VI. A podocina e o uPAR apresentam de bom a ótimo desempenho diagnóstico nos casos de GESF.
- VII. A maioria dos pacientes fez uso principalmente de esteroides e de CSA. A TFGe e a Cr sérica, em GESF, estavam aumentados, tanto no momento da biopsia renal, como no seguimento.
- VIII. A maioria dos pacientes apresentou remissão do quadro de proteinúria inicial (64%). Nos pacientes com DLM a remissão aconteceu em 75%, e em GESF em 50%.
- IX. O uPAR é um bom fator de prognóstico em determinar a reistência terapêutica em pacientes com podocitopatias, diferente da TFGe e da Cr sérica, que não apresentaram diferença quanto a evolução clínica.

1 8.1 CONCLUSÃO FINAL

2 Concluímos que a podocina, juntamente com o uPAR, podem auxiliar na diferenciação
3 entre GESF e DLM e acreditamos que elas sejam lesões glomerulares distintas e não espectros
4 da mesma doença em diferentes estágios. Além disso, o uPAR mostrou-se capaz de prever o
5 prognóstico no momento da biópsia renal em pacientes com podocitopatias. Esses achados nos
6 encorajam a usar a podocina e o uPAR como biomarcadores na biópsia renal de rotina em casos
7 de podocitopatias em que a lesão (esclerose) não é amostrada e o uPAR como preditor
8 prognóstico em casos de resistência terapêutica.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, V. et al. Reduced podocin expression in minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis is related to the level of proteinuria. **Clin Exp Nephrol**, v. 17, n. 6, p. 811-8, Dec 2013. ISSN 1437-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377573> >.

AHMED, H. M. et al. Urinary CD80 as a Replacement for Renal Biopsy for Diagnosis of Pediatric Minimal Change Disease. **Iran J Kidney Dis**, v. 12, n. 2, p. 107-111, 03 2018. ISSN 1735-8604. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29507273> >.

ALAKULPPI, N. S. et al. Diagnosis of acute renal allograft rejection by analyzing whole blood mRNA expression of lymphocyte marker molecules. **Transplantation**, v. 83, n. 6, p. 791-8, Mar 2007. ISSN 0041-1337. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17414714> >.

ALFANO, M. et al. Full-length soluble urokinase plasminogen activator receptor down-modulates nephrin expression in podocytes. **Sci Rep**, v. 5, p. 13647, Sep 2015. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26380915> >.

_____. Urokinase-urokinase receptor interaction mediates an inhibitory signal for HIV-1 replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 13, p. 8862-7, Jun 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084931> >.

ALI, E. M. A. et al. Childhood idiopathic steroid-resistant nephrotic syndrome at a Single Center in Khartoum. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 28, n. 4, p. 851-859, 2017 Jul-Aug 2017. ISSN 1319-2442. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28748888> >.

ALSHAMI, A. et al. Indications for kidney biopsy in idiopathic childhood nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 32, n. 10, p. 1897-1905, Oct 2017. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28540445> >.

ASANUMA, K.; MUNDEL, P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. **Clin Exp Nephrol**, v. 7, n. 4, p. 255-9, Dec 2003. ISSN 1342-1751. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14712353> >.

BAGGA, A.; MANTAN, M. Nephrotic syndrome in children. **Indian J Med Res**, v. 122, n. 1, p. 13-28, Jul 2005. ISSN 0971-5916. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16106086> >.

BLASI, F.; CARMELIET, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 12, p. 932-43, Dec 2002. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461559> >.

BLASI, F.; SIDENIUS, N. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. **FEBS Lett**, v. 584, n. 9, p. 1923-30, May 2010. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036661> >.

BOYER, O.; MOULDER, J. K.; SOMERS, M. J. Focal and segmental glomerulosclerosis in children: a longitudinal assessment. **Pediatr Nephrol**, v. 22, n. 8, p. 1159-66, Aug 2007. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437129> >.

CARA-FUENTES, G. et al. Urinary CD80: a biomarker for a favorable response to corticosteroids in minimal change disease. **Pediatr Nephrol**, Mar 2018. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29492674> >.

_____. CD80 and suPAR in patients with minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis: diagnostic and pathogenic significance. **Pediatr Nephrol**, v. 29, n. 8, p. 1363-71, Aug 2014. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263531> >.

CHANCHLANI, R.; PAREKH, R. S. Ethnic Differences in Childhood Nephrotic Syndrome. **Front Pediatr**, v. 4, p. 39, 2016. ISSN 2296-2360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27148508> >.

CHEN, J. S. et al. Significance of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor in the progression of focal segmental glomerulosclerosis in clinical and mouse models. **J Biomed Sci**, v. 23, p. 24, Feb 2016. ISSN 1423-0127. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26846181> >.

CHUGH, S. S.; CLEMENT, L. C.; MACÉ, C. New insights into human minimal change disease: lessons from animal models. **Am J Kidney Dis**, v. 59, n. 2, p. 284-92, Feb 2012. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21974967> >.

CHUN, M. J. et al. Focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic adults: presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 8, p. 2169-77, Aug 2004. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284302> >.

CHURG, J.; HABIB, R.; WHITE, R. H. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. **Lancet**, v. 760, n. 1, p. 1299-302, Jun 1970. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4193942> >.

CORWIN, H. L.; SCHWARTZ, M. M.; LEWIS, E. J. The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. **Am J Nephrol**, v. 8, n. 2, p. 85-9, 1988. ISSN 0250-8095. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3394725> >.

D'AGATI, V. D.; KASKEL, F. J.; FALK, R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. **N Engl J Med**, v. 365, n. 25, p. 2398-411, Dec 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22187987> >.

DAS, U.; DAKSHINAMURTY, K. V.; PRASAD, N. Ponticelli regimen in idiopathic nephrotic syndrome. **Indian J Nephrol**, v. 19, n. 2, p. 48-52, Apr 2009. ISSN 1998-3662. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368923> >.

DE MIK, S. M. et al. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. **BMC Nephrol**, v. 14, p. 74, Apr 2013. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23547922> >.

DIJKMAN, H. et al. The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 68, n. 4, p. 1562-72, Oct 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16164633> >.

DOUBLIER, S. et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. **Am J Pathol**, v. 158, n. 5, p. 1723-31, May 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11337370> >.

DOWNIE, M. L. et al. Nephrotic syndrome in infants and children: pathophysiology and management. **Paediatr Int Child Health**, v. 37, n. 4, p. 248-258, Nov 2017. ISSN 2046-9055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28914167> >.

DURVASULA, R. V. et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. **Kidney Int**, v. 65, n. 1, p. 30-9, Jan 2004. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675034> >.

EDDY, A. A.; SYMONS, J. M. Nephrotic syndrome in childhood. **Lancet**, v. 362, n. 9384, p. 629-39, Aug 2003. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944064> >.

FOGO, A. B. et al. AJKD Atlas of Renal Pathology: Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Am J Kidney Dis**, v. 66, n. 2, p. e1-2, Aug 2015. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26210729> >.

FRANCO PALACIOS, C. R. et al. Urine but not serum soluble urokinase receptor (suPAR) may identify cases of recurrent FSGS in kidney transplant candidates. **Transplantation**, v. 96, n. 4, p. 394-9, Aug 2013. ISSN 1534-6080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23736353> >.

FUCHSHUBER, A.; MEHLS, O. Familial steroid-resistant nephrotic syndromes: recent advances. **Nephrol Dial Transplant**, v. 15, n. 12, p. 1897-900, Dec 2000. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11096125> >.

FURNESS, P. N. et al. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 14, n. 5, p. 1234-7, May 1999. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10344367> >.

GALLON, L. et al. Resolution of recurrent focal segmental glomerulosclerosis after retransplantation. **N Engl J Med**, v. 366, n. 17, p. 1648-9, Apr 2012. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22533598> >.

GARIN, E. H. et al. Urinary CD80 excretion increases in idiopathic minimal-change disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 2, p. 260-6, Feb 2009. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19056875> >.

GEBESHUBER, C. A. et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. **Nat Med**, v. 19, n. 4, p. 481-7, Apr 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23502960> >.

GIPSON, D. S. et al. Management of childhood onset nephrotic syndrome. **Pediatrics**, v. 124, n. 2, p. 747-57, Aug 2009. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651590> >.

HAHN, D. et al. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD001533, Mar 2015. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25785660> >.

HAMASAKI, Y. et al. Cyclosporine and steroid therapy in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 24, n. 11, p. 2177-85, Nov 2009. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19714370> >.

HOGG, R. J. et al. Evaluation and management of proteinuria and nephrotic syndrome in children: recommendations from a pediatric nephrology panel established at the National Kidney Foundation conference on proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, and elimination (PARADE). **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. 1242-9, Jun 2000. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10835064> >.

HORINOUCI, I. et al. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. **Kidney Int**, v. 64, n. 6, p. 2092-9, Dec 2003. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633131> >.

HOYER, J. R. et al. Recurrence of idiopathic nephrotic syndrome after renal transplantation. **Lancet**, v. 2, n. 7773, p. 343-8, Aug 1972. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4114718> >.

HUANG, J. et al. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 84, n. 2, p. 366-72, Aug 2013. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23447064> >.

_____. Urinary soluble urokinase receptor levels are elevated and pathogenic in patients with primary focal segmental glomerulosclerosis. **BMC Med**, v. 12, p. 81, 2014. ISSN 1741-7015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24884842> >.

HULKKO, J. et al. Neph1 is reduced in primary focal segmental glomerulosclerosis, minimal change nephrotic syndrome, and corresponding experimental animal models of adriamycin-induced nephropathy and puromycin aminonucleoside nephrosis. **Nephron Extra**, v. 4, n. 3, p. 146-54, Sep 2014. ISSN 1664-5529. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25404935> >.

ISHIKURA, K. et al. Effective and safe treatment with cyclosporine in nephrotic children: a prospective, randomized multicenter trial. **Kidney Int**, v. 73, n. 10, p. 1167-73, May 2008. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305467> >.

JEFFERSON, J. A. et al. Podocyte disorders: Core Curriculum 2011. **Am J Kidney Dis**, v. 58, n. 4, p. 666-77, Oct 2011. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868143> >.

JEFFERSON, J. A.; SHANKLAND, S. J. The pathogenesis of focal segmental glomerulosclerosis. **Adv Chronic Kidney Dis**, v. 21, n. 5, p. 408-16, Sep 2014. ISSN 1548-5609. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25168829> >.

KATO, T.; MIZUNO, S. Nephron, Wilms' tumor-1 (WT1), and synaptopodin expression in developing podocytes of mice. **Exp Anim**, v. 66, n. 3, p. 183-189, Aug 2017. ISSN 1881-7122. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28179596> >.

KAWAKAMI, H. et al. Dynamics of absolute amount of nephrin in a single podocyte in puromycin aminonucleoside nephrosis rats calculated by quantitative glomerular proteomics approach with selected reaction monitoring mode. **Nephrol Dial Transplant**, v. 27, n. 4, p. 1324-30, Apr 2012. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862459> >.

KEMPER, M. J.; WOLF, G.; MÜLLER-WIEFEL, D. E. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. **N Engl J Med**, v. 344, n. 5, p. 386-7, Feb 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11195803> >.

KIM, B. K. et al. Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric diseases. **Am J Kidney Dis**, v. 40, n. 5, p. 964-73, Nov 2002. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407641> >.

KIM, E. Y.; ROSHANRAVAN, H.; DRYER, S. E. Changes in podocyte TRPC channels evoked by plasma and sera from patients with recurrent FSGS and by putative glomerular permeability factors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1863, n. 9, p. 2342-2354, Sep 2017. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28629718> >.

KISTLER, A. D.; REISER, J. Maximal 'CD80-uria' with minimal change. **Kidney Int**, v. 78, n. 3, p. 236-8, Aug 2010. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20631735> >.

KLAASSEN, I. et al. Response to cyclosporine in steroid-resistant nephrotic syndrome: discontinuation is possible. **Pediatr Nephrol**, v. 30, n. 9, p. 1477-83, Sep 2015. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25903641> >.

KORBET, S. M.; SCHWARTZ, M. M.; LEWIS, E. J. Primary focal segmental glomerulosclerosis: clinical course and response to therapy. **Am J Kidney Dis**, v. 23, n. 6, p. 773-83, Jun 1994. ISSN 0272-6386. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8203357> >.

KREIDBERG, J. A. et al. WT-1 is required for early kidney development. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 679-91, Aug 1993. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395349> >.

KRIZ, W.; LEHIR, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. **Kidney Int**, v. 67, n. 2, p. 404-19, Feb 2005. ISSN 0085-2538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673288> >.

KÖNIGSHAUSEN, E.; SELLIN, L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 3765608, 2016. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200372> >.

KÜSTER, S. et al. Blood pressure in minimal change and other types of nephrotic syndrome. **Am J Nephrol**, v. 10 Suppl 1, p. 76-80, 1990. ISSN 0250-8095. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2256479> >.

LAI, K. W. et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 5, p. 1476-85, May 2007. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429054> >.

LARSEN, C. P.; MESSIAS, N. C.; WALKER, P. D. B7-1 immunostaining in proteinuric kidney disease. **Am J Kidney Dis**, v. 64, n. 6, p. 1001-3, Dec 2014. ISSN 1523-6838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25278092> >.

LI, F. et al. Relationship between serum soluble urokinase plasminogen activator receptor level and steroid responsiveness in FSGS. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 11, p. 1903-11, Nov 2014. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25318750> >.

LOMBEL, R. M. et al. Treatment of steroid-sensitive nephrotic syndrome: new guidelines from KDIGO. **Pediatr Nephrol**, v. 28, n. 3, p. 415-26, Mar 2013. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052651> >.

LOMHOLT, A. F. et al. Prognostic value of intact and cleaved forms of the urokinase plasminogen activator receptor in a retrospective study of 518 colorectal cancer patients. **Acta Oncol**, v. 49, n. 6, p. 805-11, Aug 2010. ISSN 1651-226X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524776> >.

MAAS, R. J. et al. Minimal change disease and idiopathic FSGS: manifestations of the same disease. **Nat Rev Nephrol**, v. 12, n. 12, p. 768-776, Dec 2016. ISSN 1759-507X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27748392> >.

MACCONI, D. et al. Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. **Am J Pathol**, v. 168, n. 1, p. 42-54, Jan 2006. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16400008> >.

MACHADO, J. R. et al. An overview of molecular mechanism of nephrotic syndrome. **Int J Nephrol**, v. 2012, p. 937623, 2012. ISSN 2090-2158. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844593> >.

MCKENZIE, L. M. et al. NPHS2 variation in sporadic focal segmental glomerulosclerosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 11, p. 2987-95, Nov 2007. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942957> >.

MEIJERS, B. et al. The soluble urokinase receptor is not a clinical marker for focal segmental glomerulosclerosis. **Kidney Int**, v. 85, n. 3, p. 636-40, Mar 2014. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402090> >.

MISHRA, O. P. et al. Toll-like receptor 3 (TLR-3), TLR-4 and CD80 expression in peripheral blood mononuclear cells and urinary CD80 levels in children with idiopathic nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 32, n. 8, p. 1355-1361, Aug 2017. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28210837> >.

MONTAÑÉS BERMÚDEZ, R. et al. Consensus document. Recommendations on assessing proteinuria during the diagnosis and follow-up of chronic kidney disease. **Nefrologia**, v. 31, n. 3, p. 331-45, 2011. ISSN 1989-2284. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21780317> >.

MOUDGIL, A.; BAGGA, A.; JORDAN, S. C. Mycophenolate mofetil therapy in frequently relapsing steroid-dependent and steroid-resistant nephrotic syndrome of childhood: current status and future directions. **Pediatr Nephrol**, v. 20, n. 10, p. 1376-81, Oct 2005. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15977023> >.

MOURA, L. R.; FRANCO, M. F.; KIRSZTAJN, G. M. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adults: response to steroids and risk of renal failure. **J Bras Nefrol**, v. 37, n. 4, p. 475-80, 2015 Oct-Dec 2015. ISSN 2175-8239. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26648497> >.

MROWKA, C.; SCHEDL, A. Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. **J Am Soc Nephrol**, v. 11 Suppl 16, p. S106-15, Nov 2000. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11065340> >.

MUBARAK, M. et al. Histopathological spectrum of childhood nephrotic syndrome in Pakistan. **Clin Exp Nephrol**, v. 13, n. 6, p. 589-93, Dec 2009. ISSN 1437-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19636666> >.

MUNDLOS, S. et al. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. **Development**, v. 119, n. 4, p. 1329-41, Dec 1993. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8306891> >.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nat Rev Nephrol**, v. 7, n. 6, p. 327-40, Jun 2011. ISSN 1759-507X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537349> >.

NOVELLI, R. et al. Any value of podocyte B7-1 as a biomarker in human MCD and FSGS? **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 310, n. 5, p. F335-41, Mar 2016. ISSN 1522-1466. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26697986> >.

O'SHAUGHNESSY, M. M. et al. Glomerular disease frequencies by race, sex and region: results from the International Kidney Biopsy Survey. **Nephrol Dial Transplant**, Jul 2017. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29106637> >.

PARK, S. J.; SHIN, J. I. Complications of nephrotic syndrome. **Korean J Pediatr**, v. 54, n. 8, p. 322-8, Aug 2011. ISSN 2092-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087198> >.

PATRAKKA, J. et al. Expression of nephrin in pediatric kidney diseases. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 2, p. 289-96, Feb 2001. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158218> >.

PAVENSTÄDT, H.; KRIZ, W.; KRETZLER, M. Cell biology of the glomerular podocyte. **Physiol Rev**, v. 83, n. 1, p. 253-307, Jan 2003. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12506131> >.

POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. **Nephrol Dial Transplant**, v. 25, n. 2, p. 490-6, Feb 2010. ISSN 1460-2385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633091> >.

RAGHU, H. et al. Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines. **PLoS One**, v. 5, n. 8, p. e12458, Aug 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805979> >.

RANGANATHAN, S. Pathology of Podocytopathies Causing Nephrotic Syndrome in Children. **Front Pediatr**, v. 4, p. 32, 2016. ISSN 2296-2360. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27066465> >.

RAVANI, P. et al. Short-term effects of rituximab in children with steroid- and calcineurin-dependent nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, n. 6, p. 1308-15, Jun 2011. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21566104> >.

REA, R. et al. Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 16, n. 2, p. 416-7, Feb 2001. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158426> >.

RHEAULT, M. N. Nephrotic and nephritic syndrome in the newborn. **Clin Perinatol**, v. 41, n. 3, p. 605-18, Sep 2014. ISSN 1557-9840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25155730> >.

ROCHA, L. P. et al. Prevalence of nephropathies in children and adolescents and alterations in renal biopsies in Minas Gerais, Brazil, from 1996 to 2010. **Ann Diagn Pathol**, v. 17, n. 1, p. 22-7, Feb 2013. ISSN 1532-8198. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22658343> >.

_____. Diagnosis of congenital and infantile nephrotic syndromes in renal biopsies in Minas Gerais, Brazil: Six case reports. **Ultrastruct Pathol**, v. 40, n. 6, p. 311-316, 2016 Nov-Dec 2016. ISSN 1521-0758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27669128> >.

RUGGENENTI, P. et al. Role of remission clinics in the longitudinal treatment of CKD. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 6, p. 1213-24, Jun 2008. ISSN 1533-3450. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18354029> >.

SABRY, A. et al. Single-center experience with cyclosporine for treatment of idiopathic minimal change nephrotic syndrome in children. **Iran J Kidney Dis**, v. 3, n. 3, p. 127-35, Jul 2009. ISSN 1735-8582. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19617660> >.

SHAKEEL, S.; MUBARAK, M.; KAZI, J. I. Frequency and clinicopathological correlations of histopathological variants of pediatric idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. **Indian J Nephrol**, v. 24, n. 3, p. 148-53, May 2014. ISSN 0971-4065. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25120291> >.

SHANKLAND, S. J.; PIPPIN, J. W.; DUFFIELD, J. S. Progenitor cells and podocyte regeneration. **Semin Nephrol**, v. 34, n. 4, p. 418-28, Jul 2014. ISSN 1558-4488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217270> >.

SHIMADA, M. et al. Minimal change disease: a "two-hit" podocyte immune disorder? **Pediatr Nephrol**, v. 26, n. 4, p. 645-9, Apr 2011. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052729> >.

SIDENIUS, N. et al. Serum level of soluble urokinase-type plasminogen activator receptor is a strong and independent predictor of survival in human immunodeficiency virus infection. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4091-5, Dec 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110678> >.

SILVA, C. A. et al. Renal Biopsy: Use of Biomarkers as a Tool for the Diagnosis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. **Dis Markers**, v. 2014 (2014), ID 192836. Feb 2014. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719498> >.

SINGH, K. et al. Peritubular capillaries and renal function in pediatric idiopathic nephrotic syndrome. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 24, n. 5, p. 942-9, Sep 2013. ISSN 1319-2442. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24029259> >.

SINHA, A. et al. Serum-soluble urokinase receptor levels do not distinguish focal segmental glomerulosclerosis from other causes of nephrotic syndrome in children. **Kidney Int**, v. 85, n. 3, p. 649-58, Mar 2014. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429405> >.

SMITH, H. W.; MARSHALL, C. J. Regulation of cell signalling by uPAR. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 1, p. 23-36, Jan 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027185> >.

SPRANGERS, B.; MEIJERS, B.; APPEL, G. FSGS: Diagnosis and Diagnostic Work-Up. **Biomed Res Int**, v. 2016, p. 4632768, 2016. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27314022> >.

SRIVASTAVA, T.; SIMON, S. D.; ALON, U. S. High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. **Pediatr Nephrol**, v. 13, n. 1, p. 13-8, Jan 1999. ISSN 0931-041X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100283> >.

STEVENS, P. E.; LEVIN, A.; MEMBERS, K. D. I. G. O. C. K. D. G. D. W. G. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. **Ann Intern Med**, v. 158, n. 11, p. 825-30, Jun 2013. ISSN 1539-3704. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732715> >.

SUVANTO, M. et al. Podocyte proteins in congenital and minimal change nephrotic syndrome. **Clin Exp Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 481-8, Jun 2015. ISSN 1437-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25117488> >.

SWARNALATHA, G. et al. Focal and segmental glomerulosclerosis: does prognosis vary with the variants? **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v. 26, n. 1, p. 173-81, Jan 2015. ISSN 1319-2442. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25579744> >.

SWIERCZEWSKA, M. et al. Molecular basis of mechanisms of steroid resistance in children with nephrotic syndrome. **Acta Biochim Pol**, v. 60, n. 3, p. 339-44, 2013. ISSN 1734-154X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020059> >.

THUNØ, M.; MACHO, B.; EUGEN-OLSEN, J. suPAR: the molecular crystal ball. **Dis Markers**, v. 27, n. 3, p. 157-72, 2009. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893210> >.

TONNA, S. J. et al. NPHS2 variation in focal and segmental glomerulosclerosis. **BMC Nephrol**, v. 9, p. 13, Sep 2008. ISSN 1471-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18823551> >.

TRYGGVASON, K.; PATRAKKA, J.; WARTIOVAARA, J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. **N Engl J Med**, v. 354, n. 13, p. 1387-401, Mar 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16571882> >.

TRYGGVASON, K.; WARTIOVAARA, J. How does the kidney filter plasma? **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p. 96-101, Apr 2005. ISSN 1548-9213. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772298> >.

TUNE, B. M.; MENDOZA, S. A. Treatment of the idiopathic nephrotic syndrome: regimens and outcomes in children and adults. **J Am Soc Nephrol**, v. 8, n. 5, p. 824-32, May 1997. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9176855> >.

VAN DE LEST, N. A. et al. Nephrin Loss Can Be Used to Predict Remission and Long-term Renal Outcome in Patients With Minimal Change Disease. **Kidney Int Rep**, v. 3, n. 1, p. 168-177, Jan 2018. ISSN 2468-0249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340328> >.

VAN DEN BERG, J. G.; WEENING, J. J. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. **Clin Sci (Lond)**, v. 107, n. 2, p. 125-36, Aug 2004. ISSN 0143-5221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157184> >.

VIVARELLI, M. et al. Minimal Change Disease. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 12, n. 2, p. 332-345, Feb 2017. ISSN 1555-905X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940460> >.

WADA, T. et al. A multicenter cross-sectional study of circulating soluble urokinase receptor in Japanese patients with glomerular disease. **Kidney Int**, v. 85, n. 3, p. 641-8, Mar 2014. ISSN 1523-1755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429394> >.

WANG, H. J. et al. On the influence of sample size on the prognostic accuracy and reproducibility of renal transplant biopsy. **Nephrol Dial Transplant**, v. 13, n. 1, p. 165-72, Jan 1998. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9481734> >.

WEBB, H. et al. Cyclophosphamide and rituximab in frequently relapsing/steroid-dependent nephrotic syndrome. **Pediatr Nephrol**, v. 31, n. 4, p. 589-94, Apr 2016. ISSN 1432-198X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26525199> >.

WEI, C. et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Med**, v. 17, n. 8, p. 952-60, Aug 2011. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804539> >.

_____. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. **Nat Med**, v. 14, n. 1, p. 55-63, Jan 2008. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18084301> >.

WERNERSON, A. et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, n. 1, p. 70-6, Jan 2003. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12480962> >.

WING, K. et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 271-5, Oct 2008. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18845758> >.

WU, C. Z. et al. Urokinase plasminogen activator receptor and its soluble form in common biopsy-proven kidney diseases and in staging of diabetic nephropathy. **Clin Biochem**, v. 48, n. 18, p. 1324-9, Dec 2015. ISSN 1873-2933. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162494> >.

YAO, J. et al. Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. **PLoS Biol**, v. 2, n. 6, p. e167, Jun 2004. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208719> >.

ZHANG, N. et al. A higher frequency of CD4⁺CXCR5⁺ T follicular helper cells in adult patients with minimal change disease. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 836157, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25243187> >.

ZHU, H. et al. A diagnostic model for minimal change disease based on biological parameters. **PeerJ**, v. 6, p. e4237, 2018. ISSN 2167-8359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340242> >.