

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Análise molecular das proteínas do podócito na nefrite lúpica e sua
correlação com o tipo histológico e grau de atividade da doença**

Dissertação de Mestrado

Mariane dos Santos
Porto Alegre, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Análise molecular das proteínas do podócito na nefrite lúpica e sua
correlação com o tipo histológico e grau de atividade da doença**

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em Medicina:
Ciências Médicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul para a obtenção do título de
Mestre.*

Autor: Mariane dos Santos

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese

Porto Alegre, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Mariane

Análise molecular das proteínas do podócito na nefrite lúpica e sua correlação com o tipo histológico e grau de atividade da doença / Mariane dos Santos. - 2013.

124 f.

Orientador: Francisco José Veríssimo Veronese.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Nefrite Lúpica. 2. Podócitos. 3. Nefrina . 4. Podocina. I. Veríssimo Veronese, Francisco José, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

À minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio e incentivo e pelo exemplo de dignidade, caráter e honestidade.

Ao meu orientador, professor Doutor Francisco Veronese, pela orientação, paciência, confiança e oportunidade dada a mim. Pelo exemplo de profissional dedicado que és e as "cobranças" que certamente contribuíram muito para o meu crescimento profissional.

Ao meu namorado, amigo, parceiro e confidente, Diego Baronio, que esteve presente em todos os momentos desse projeto, sempre com uma palavra de incentivo. Obrigada pela paciência, por suportar meu mau humor, por toda a ajuda, por me animar quando eu achava que não conseguiria chegar ao fim (CD20 que não marcava, número de pacientes insuficiente). Obrigada por todo amor, carinho e apoio, sem os quais esse percurso teria sido muito mais difícil. Obrigada, também, pelo exemplo de generosidade que és para mim.

Aos colegas de laboratório, em especial à Patrícia Rodrigues por toda paciência e disponibilidade em ensinar as técnicas de Biologia Molecular. Agradecimento especial também à colega Tuany Di Domênico pela ajuda e pelo companheirismo durante esse período, principalmente nos meses em que ficávamos aguardando nossas biópsias na "doce" esperança de alcançar logo o "N" desejado.

À Virna Carpio por transmitir os princípios da técnica de imunistoquímica e por toda paciência em responder aos meus emails

desesperados quando eu não conseguia de forma alguma obter êxito na técnica do CD20.

A toda equipe do serviço de Nefrologia do HCPA, àqueles que de uma forma ou outra participaram da minha vida e da realização desse trabalho ao longo desses dois anos.

À equipe da Patologia do HCPA e a Flávia Giusti pelos vários dias que pude acompanhar a realização da técnica de imunistoquímica. À Flávia meu agradecimento por todo esse período, onde por diversas vezes desabafei e compartilhei minhas alegrias e angústias sempre ouvindo uma palavra de conforto e esperança.

Ao Dr. Rafael Bringhenti por ajudar a enriquecer esse trabalho, empenhando-se em ajudar na quantificação da imunistoquímica e na reclassificação dos casos de nefrite lúpica.

À equipe da Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por não deixarem de comunicar das marcações de biópsias renais. Muitos dos quais apenas contatos por telefone, mas que não deixaram de ser importantes para que eu soubesse das marcações de biópsias renais.

A todos os profissionais da equipe da Radiologia, que sempre atenderam às minhas solicitações e forneceram as informações necessárias.

À equipe do Dr. Waldir Pedro de Castro e do Dr. Mirandolino Mariano, pela forma com que fui recebida nas coletas. Muitas pessoas aqui que não me conheciam, mas que me ajudaram de uma forma muito atenciosa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa pelo apoio financeiro (FIPE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

À todos os pacientes, por aceitarem participar do trabalho e assim permitirem a realização do mesmo.

À todas as outras pessoas que, de alguma maneira, ajudaram na realização desse trabalho e que não foram citadas, mas que apesar disso foram muito importantes. Sem a ajuda de cada pessoa, anônima ou não, a concretização do meu projeto de mestrado não seria possível.

Resumo

Introdução: A etiopatogenia da nefrite lúpica (NL) ainda não está clara. A deposição de imunocomplexos no glomérulo induzida pelo lúpus sistêmico causa injúria aos podócitos glomerulares e descolamento de suas proteínas na urina.

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram quantificar o nível do RNAm das proteínas associadas ao podócito no tecido renal e no sedimento urinário na NL, e correlacioná-lo com as classes histológicas, inflamação e proteinúria.

Métodos: Foram incluídos 33 pacientes portadores de NL em atividade. A expressão do RNAm das proteínas específicas do podócito foi quantificada para nefrina, podocina, podocalixina, alfa-actinina 4, *transient receptor potential cation channel 6* (TRPC-6), *Forkhead box P 3* (FOXP3), fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF-A) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β_1) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Foram utilizadas amostras de tecido renal e sedimento urinário dos pacientes com NL. O infiltrado inflamatório da biópsia renal foi fenotipado identificando-se macrófagos CD68⁺, linfócitos T citotóxicos CD8⁺ e células B CD20⁺. O RNAm do VEGF-A, FOXP3 e TGF- β , associado a lesão proliferativa, densidade do infiltrado celular e fibrose renal, respectivamente, também foi mensurado. O RNAm dos marcadores do podócito foi correlacionado com a proteinúria, função renal e título do anti-DNAs.

Resultados: O RNAm das moléculas associadas ao podócito (exceto VEGF-A e FOXP3) foi significativamente menos expresso no tecido renal nos casos de NL

em relação aos controles. No tecido, não houve diferença dos níveis do RNAm entre as classes histológicas, agrupadas por gravidade da nefrite (I e II vs. III, IV e V). Na urina, a quantidade de RNAm dos marcadores podocitários (exceto alfa actinina-4 e TRPC6), de TGF β ₁, VEGF-A e FOXP3 foi significativamente maior nos pacientes com NL, e esse aumento foi determinado pelas classes III, IV e V. A correlação entre o RNAm do TGF β ₁ e VEGF-A foi forte, tanto na biópsia renal quanto no sedimento urinário. O RNAm na urina da nefrina, podocina, podocalixina, TGF β ₁ e FOXP3 correlacionou-se com a proteinúria, mas não com a duração da doença, função renal ou título de anti-DNAs. A densidade das células T CD8⁺ no infiltrado túbulo-intersticial (TI) e intra-glomerular (IG) foi significativamente maior nas classes III, IV e V comparado as classes I e II (p=0,026 e p=0,012, respectivamente). O RNAm na urina da nefrina, podocina, podocalixina e alfa actinina-4 correlacionou-se com as células CD8⁺, CD20⁺ e CD68⁺ do infiltrado inflamatório. Na biópsia, somente houve correlação entre as células CD8⁺ e TGF β ₁, FOXP3 (TI) e nefrina e alfa-actinina-4 (IG). A densidade do infiltrado inflamatório foi maior nos pacientes com proteinúria em nível nefrótico em relação aqueles com proteinúria sub-nefrótica para todos os fenótipos celulares estudados.

Conclusão: Nestes pacientes com NL ativa foi detectada redução de marcadores do podócito no tecido renal, o que é compatível com podocitopenia, e concomitantemente aumento de sua excreção na urina, sugerindo a presença de podocitúria. A podocitúria foi de maior magnitude nos pacientes com NL com depósitos endocapilares e/ou subepiteliais, o que sugere correlação entre a podocitúria e essas classes histológicas da NL, nas quais a injúria ao podócito é potencialmente mais grave.

Abstract

Background: The etiopathogenesis of lupus nephritis is not clear yet. Immune complexes deposition in the glomerulus, induced by systemic lupus, causes injury to glomerular podocytes and detachment of their proteins in urine.

Aims: The aims of this study were to quantify the level of mRNA of the podocyte-associated proteins in kidney tissue and urine in LN, and to correlate the mRNA of podocyte markers with histological classes, inflammation and proteinuria.

Methods: Thirty-three patients with active LN were included in this study. The mRNA levels of the podocyte-associated proteins, nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin 4, *transient receptor potential cation channel 6* (TRPC-6), as well as the mRNA levels of *Forkhead box P 3* (FOXP3), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) e transforming growth factor beta (TGF- β) were quantified by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Kidney tissue from biopsies and urinary sediment cells were utilized as samples. The inflammatory infiltrated in the renal biopsies were phenotyped identifying CD68⁺ macrophages, CD8⁺ T cytotoxic lymphocytes e CD20⁺ B cells. The mRNA levels of VEGF-A, FOXP3 e TGF- β_1 which is associated with proliferative lesions, density of the cellular infiltrate and renal fibrosis, respectively, was also measured. Messenger RNA levels of podocyte markers were correlated with proteinuria, renal function and anti-dsDNA titers.

Results: Messenger RNA of podocyte-specific molecules (except for VEGF-A and FOXP3) was significantly lower expressed in the renal tissue in cases of LN as compared to controls. In kidney tissue, there was no difference in mRNA

levels among the histological classes, which were grouped according to the severity of nephritis (I and II vs. III, IV and V). In urine, the amount of mRNA of podocyte markers (except for alpha actinin-4 and TRPC6), TGF β ₁, VEGF-A and FOXP3 was significantly higher in patients with LN, in account of the classes III, IV and V. The correlation between mRNA of TGF- β ₁ and VEGF-A was strong, both in kidney biopsy and in the urinary sediment. Urinary mRNA levels of nephrin, podocin, podocalyxin, TGF- β ₁ and FOXP3 correlated with proteinuria, but not with disease duration, renal function or anti-dsDNA titers. The density of CD8⁺ T cells either in the tubulointerstitial (TI) and in the intraglomerular (IG) compartments was significantly higher in classes III, IV and V as compared to classes I and II (p=0.026 and p=0.012, respectively). Urine mRNA of nephrin, podocin, podocalyxin and alpha actinin-4 correlated with CD8⁺, CD20⁺ and CD68⁺ cells of the inflammatory infiltrate. In kidney biopsies, there was only a correlation between CD8⁺ T cells and TGF- β ₁ and FOXP3 (TI) and nephrin and alpha actinin-4 (IG). The density of the inflammatory markers was higher in patients with nephrotic range proteinuria for all studied cell phenotypes as compared to those with subnephrotic proteinuria.

Conclusion: In these patients with active LN there was a reduction in tissue levels of podocyte markers suggesting intra-renal podocytopenia, with a concomitant increase of podocyte-associated mRNAs in urine, indicating the presence of podocyturia. Podocyturia was of a greater magnitude in patients with endocapillary and/or subepithelial deposits, suggesting the existence of a correlation between podocyturia and these histological class of LN, in which the podocyte injury is potentially more severe.

Lista de tabelas

<i>Tabela 1. Mecanismos Etiopatogênicos da Nefrite Lúpica</i>	31
---	----

Lista de Figuras

<i>Figura 1. Dermatologista Moritz Kaposi.....</i>	19
<i>Figura 2. A etiopatogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....</i>	22
<i>Figura 3. Desregulação da função dos macrófagos</i>	24
<i>Figura 4. Patogênese da Nefrite Lúpica.....</i>	33
<i>Figura 5. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas.....</i>	42

Lista de abreviaturas

ANA - Anticorpos antinucleares

DNAdS- DNA de dupla hélice

ELISA - Imunoensaio Enzimático

ICs – Imunocomplexos

IL - Interleucina

ISN/RPS - International society of nephrology/Renal pathology society

DF - Diafragma em fenda

DRC – Doença renal crônica

FcR - receptores Fc

FOXP3 - *Forkhead box P 3*

GESF – Glomeruloesclerose segmentar e focal

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

MBG – Membrana basal glomerular

NL – Nefrite lúpica

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SLEDAI - Índice de atividade da doença

TFG – Taxa de filtração glomerular

TGF β - Fator de crescimento transformador beta

TLR - Toll like receptor

TRPC6 - Transient Receptor Potential Cation Channel 6

TWEAK - Indutor fraco de apoptose do fator de necrose tumoral

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

WT1 – proteína 1 do Tumor de Wilms

SRA - sistema renina angiotensina

ROS - espécies reativas de oxigênio

Sumário

1. Introdução	16
2. Revisão da literatura	17
2.1. Doenças autoimunes	17
2.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico	18
2.2.1. <i>Histórico</i>	18
2.2.2. <i>Epidemiologia</i>	19
2.2.3. <i>Patogênese</i>	22
2.2.3.1. <i>Macrófagos</i>	23
2.2.3.2. <i>Células B e T</i>	24
2.2.3.3. <i>Autoanticorpos</i>	25
2.3. Nefrite Lúpica (NL)	26
2.3.1. <i>Epidemiologia</i>	28
2.3.2. <i>Patogênese da NL</i>	29
2.3.3. <i>Classes Histológicas</i>	33
2.3.4. <i>Tratamento</i>	36
2.4. Células Epiteliais Podocitárias	38
2.4.1. <i>Estrutura molecular do podócito</i>	41
2.4.2. <i>Funções do podócito</i>	46
2.4.3. <i>Podocitopatia na Nefrite Lúpica</i>	46
2.4.4. <i>O fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) na nefrite lúpica</i>	49
2.4.5. <i>Forkhead box P3 (FOXP3) na Nefrite Lúpica</i>	52
3. Justificativa	54
4. Objetivos	55
4.1 Geral	55
4.2 Específicos	55
5. Referências	57
6. Artigo	71
8. Anexos	116

1. Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multissistêmica, autoimune e apresenta diversas manifestações clínicas. Órgãos como o rim, cérebro, coração, articulações e pele são afetados em grande parte dos pacientes(1).

Alterações no sistema imune, além de fatores genéticos, ambientais e hormonais no LES contribuem para a lesão dos órgãos. Essa doença é caracterizada pela perda da tolerância imunológica a autoantígenos nucleares produção de autoanticorpos patogênicos direcionados contra um ou mais componentes celulares e linfócitos hiper reativos(2, 3).

Uma das manifestações mais severas do LES é a nefrite lúpica (NL), que pode apresentar-se como uma síndrome nefrítica ou nefrótica com proteinúria, hematúria, perda da função renal e hipertensão arterial. A apresentação clínica pode não correlacionar-se com o tipo histológico e a severidade da NL na biópsia renal, que permanece sendo o padrão ouro para o diagnóstico e para determinação do grau de atividade e cronicidade da doença e escolha do tratamento(4).

As alterações histológicas na NL variam desde a ausência de lesões na microscopia óptica, proliferação mesangial isolada e depósitos subepiteliais na membrana basal glomerular (MBG) até as formas graves proliferativas, com proliferação endocapilar, depósitos subendoteliais, necrose e até crescentes nos glomérulos(5).

Mais recentemente, a lesão podocitária na NL e a sua contribuição na fisiopatogênese da glomerulonefrite tem sido melhor estudada(6-8). Entretanto, a podocitopatia da NL não é um fenômeno bem definido, isto é, como se correlaciona com a classe histológica, intensidade do processo inflamatório e regulatório e a relação com o grau de atividade e cronicidade que o paciente apresenta no rim.

2. Revisão da literatura

2.1. Doenças autoimunes

As doenças autoimunes podem desenvolver-se em consequência de alterações no controle de linfócitos autoreativos, que podem reconhecer os antígenos normais como potencialmente patogênicos. Os múltiplos mecanismos de dano tecidual dessas doenças podem ser desencadeados por exposição a fatores ambientais, hormonais e susceptibilidade genética, entre outros(9).

As doenças autoimunes podem ser classificadas em sistêmicas, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou órgão-específicas, no caso do Diabetes Mellito tipo I. Os mecanismos podem diferir entre as doenças no que se refere a alteração na seleção, regulação e morte de células B e/ou T, e àquelas em que uma resposta anormal a um antígeno-específico, autoantígeno ou não, provoca a autoimunidade(9).

2.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico

2.2.1. Histórico

O termo lúpus foi usado primeiramente na idade média para descrever lesões de pele, que aparentavam de terem sido causadas pela mordida de um lobo(10). O lúpus foi descrito primeiramente como lúpus eritematoso por Pierre-Louis-Alphée Cazenave na revista *Clinique Hebdomadaire* do Hospital Saint-Louis em Paris(11).

As manifestações sistêmicas e a natureza inflamatória do lúpus foram descritas posteriormente pelo dermatologista húngaro Moritz Kaposi (Figura 1)(11, 12). William Osler também ajudou a desenvolver o conceito de LES. Nos seus trabalhos publicados no *The American Journal of Medical Sciences* e no *British Journal of Dermatology*, Osler descreveu pacientes com LES, que além de apresentarem manifestações cutâneas da doença, frequentemente apresentavam doença renal(13).

Em 1952, Hench e colaboradores introduziram o manejo terapêutico com os corticosteróides e outros imunossupressores(13). Atualmente, a imunoterapia com anticorpos monoclonais oferece oportunidade para remissão clínica e imunológica, redução do uso de corticóides, redução de dano renal irreversível e possível melhora da qualidade de vida dos pacientes(14).



Figura 1. Dermatologista Moritz Kaposi (1837-1902). Adaptado de Braun M, referência 12.

2.2.2. Epidemiologia

A taxa de prevalência mundial do LES varia de 14,6 a 122 casos por 100 mil habitantes(2). No Brasil, a prevalência não é determinada precisamente, apenas um estudo determinou a incidência de 8,4 por 100 mil habitantes em uma cidade do nordeste do Brasil(15). Em uma coorte brasileira(16) de 888 pacientes com LES, a média de idade observada no início da doença foi 29,9 anos e a média de duração da doença desde o diagnóstico foi 14,5 anos, sendo esses dados similares aos apresentados em estudos anteriores(17, 18).

Evidências indicam que fatores étnicos podem estar relacionados com o desencadeamento do LES. Enquanto no estudo de Borba e colaboradores(16) mais de um terço dos pacientes definiram-se como caucasianos (69,9%),

outros estudos mostram que a incidência do LES é maior em afro-americanos e em afro-caribenhos em relação aos caucasianos(19). Nos Estados Unidos, as populações de origem africana, hispânica ou asiática têm maior prevalência e envolvimento de órgãos vitais em comparação a outros grupos étnicos(20). Essa diferença do Brasil em relação aos outros países pode ser subjetiva já que as taxas de miscigenação são altas e a maioria da população classifica-se como caucasiana(21).

Na coorte brasileira(16) houve maior prevalência da doença no sexo feminino (91,9%), em acordo com outros estudos epidemiológicos(20, 22). Isso pode ser explicado por alterações hormonais que podem desencadear a doença autoimune, além de condições patológicas, uso de contraceptivos orais e terapias de reposição hormonal que poderiam alterar o nível de estrogênio sérico(23).

A manifestação mais comum observada foi a cutânea (90,7%). *Rash* malar (83,2%) e fotossensibilidade (76,9%) também foram observados frequentemente, sendo similares apenas aos índices apresentados em estudo realizado em Porto Rico(18). O predomínio de manifestações cutâneas pode ser explicado pela exposição à luz ultravioleta com índices que podem ser extremamente altos nos dois países, Brasil e Porto Rico(15, 18).

Observado em 776 pacientes (87,4%), o envolvimento articular foi a segunda manifestação mais comum na coorte de Borba e colaboradores(16), já as manifestações hematológicas foram constatadas em 391 pacientes (44%) e abrangem linfopenia (26,1%), leucopenia (18,5%), trombocitopenia (14,5%) e anemia hemolítica autoimune (8,7%). Nessa coorte, a manifestação renal foi

observada em 36,9% dos pacientes, comparável ao encontrado em outros estudos, com prevalências variando entre 27,9% a 58,3%(17, 18).

Dentre as alterações imunológicas, destaca-se a presença de anticorpos anti DNA de dupla hélice (DNAds) verificados em 35,1% dos pacientes, frequência que foi menor comparada a outros estudos(17, 18). Outros anticorpos específicos do LES são menos prevalentes como o anti-Sm, detectado em 21,8% dos pacientes, proteína anti-P ribossomal em 19,8%, além da presença de anticorpos anticoagulante lúpico, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, e o anticorpos antifosfolipídicos (aCL) das classes IgG e IgM.

Considerando a idade de início da doença, não há diferença entre homens e mulheres. *Rash malar* foi a manifestação clínica mais comum em mulheres (84,5%), enquanto 69,4% dos homens apresentaram essa manifestação. A NL foi mais comum entre os homens (47,2%) enquanto entre as mulheres apenas 36% apresentaram alguma manifestação renal do LES. Em relação aos autoanticorpos, houve maior frequência de anti-DNAds entre os homens (45,8%) que entre as mulheres (34,2%)(16).

Em geral, o LES é mais grave em pacientes mais jovens. Apesar dos avanços, os pacientes jovens com SLE têm uma expectativa de vida cerca de quatro vezes menor que a população em geral, quando eles são comparados com pacientes que tem o começo da doença na vida adulta o risco de mortalidade é cerca de 2,5 vezes maior(24).

2.2.3. Patogênese

A fisiopatologia do LES envolve diversos fatores, podendo-se citar os distúrbios da imunorregulação, como falha nos mecanismos de apoptose para remover ou silenciar células B e T autoreativas, exposição anormal ou apresentação de autoantígenos, hiperatividade de células T e células B estimulando a produção de citocinas, entre outros(25).

A figura abaixo mostra os fatores envolvidos na fisiopatogênese do LES.

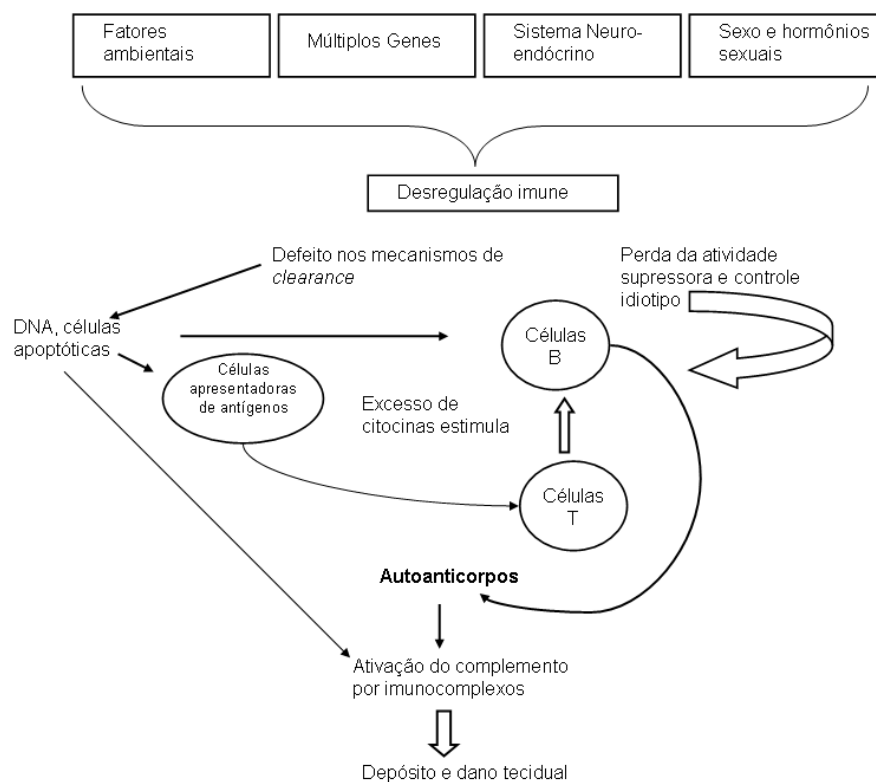


Figura 2. A etiopatogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico. Adaptado de Mok e Lau, referência 33.

2.2.3.1. Macrófagos

A depuração de restos celulares é uma função normal do organismo e é fundamental para a manutenção da auto-tolerância. Células apoptóticas são fagocitadas através de receptores que reconhecem componentes alterados da membrana celular ou autoantígenos opsonizados por IgM que estão presentes no soro de indivíduos normais(26). Defeitos nos mecanismos de depuração resultam em necrose e uma sobrecarga de auto antígenos que, ao invés de serem consumidos por fagócitos, ativam receptores pró-inflamatórios, como os receptores Fc (FcRs) ou os receptores *Toll Like* (TLR) dentro das células do sistema imune inato(27).

As alterações nas células macrofágicas no LES incluem: eliminação inadequada de células apoptóticas, estado de ativação aumentado e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina (IL-10) e interferon tipo I (IFN). Além disso, macrófagos no LES apresentam autoantígenos às células T autoreativas em um contexto inflamatório, ao invés da apresentação imune geralmente associada com material de células apoptóticas(28).

Na figura abaixo, está descrito o papel clássico dos macrófagos em uma situação de tolerância em indivíduos normais e os macrófagos no LES quando acontece a autoimunidade.

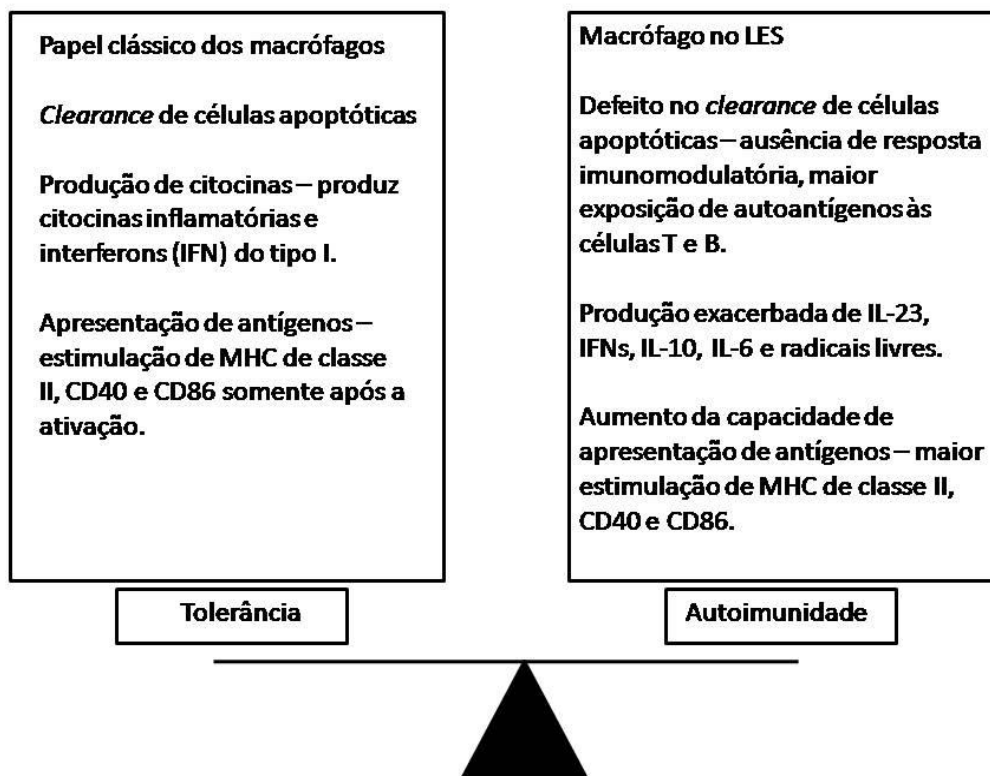


Figura 3. Desregulação da função dos macrófagos no Lúpus Eritematoso Sistêmico. Adaptado de Byrne et al, referência 27.

2.2.3.2. Células B e T

O sistema imune adaptativo envolve a expansão clonal de linfócitos e a geração de células B e T efetoras. Os processos somáticos geram constantemente linfócitos autoreativos que estabelecem um grande repertório de receptores de células B e T necessários para a proteção contra patógenos. A tolerância das células B é defeituosa no LES, sendo que a remoção de células B imaturas autoreativas não é efetiva(29).

Assim como as células B, as células T têm papel importante na patogênese do LES, pois apresentam defeitos na regulação da tolerância e sinalização do seu receptor que contribuem para a sua ativação. Elas também participam da alça de regulação da resposta das células B, além de infiltrarem e causarem danos aos tecidos(30). Funções alteradas das células T no LES, que contribuem para a ativação excessiva ou falha na regulação, incluem a disfunção mitocondrial das células T levando ao estresse oxidativo, redução na atividade citotóxica das células T CD8⁺, aumento da expressão da molécula co-estimulatória CD40 e da molécula de adesão CD44 nas células T CD4⁺(31).

O papel dos subgrupos de células T, recentemente descobertos, estão sendo investigados. Em modelos de camundongos, a desregulação das células T *helper* foliculares (Thf) que promovem a diferenciação de células B em centros germinativos, está associada com o desenvolvimento do LES. Entretanto, o envolvimento de células Thf em humanos ainda não é totalmente claro, sendo relatada a expansão da circulação da população de células Thf em pacientes com LES ativo, porém essa expansão e desregulação também ocorrem em pacientes com outras doenças autoimunes(32). Essas anormalidades nas células B e T resultam na produção de autoanticorpos patogênicos.

2.2.3.3. Autoanticorpos

Os autoanticorpos patogênicos são direcionados contra diversas moléculas encontradas no núcleo, citoplasma e superfície celular(33). A

apresentação de autoanticorpos nos pacientes acometidos por LES têm valor preditivo, devido ao acúmulo de autoanticorpos específicos antes do início da doença, quando os pacientes não apresentaram sintomas. Anticorpos antinucleares (ANA), anti-Ra, anti-Ro, anti-La e antifosfolípídes aparecem primeiro. Após, o DNA de dupla fita (anti-DNAs), anti-Sm e anti-ribonucleoproteína nuclear seguem aumentando até o diagnóstico de LES e a intervenção terapêutica(34).

Os autoanticorpos ligam-se a antígenos e produzem imunocomplexos, que se não forem adequadamente removidos, podem se depositar em vários órgãos como articulações, rins, pele, pulmão, cérebro entre outros, induzindo uma resposta inflamatória exacerbada. A deposição de imunocomplexos e a resposta inflamatória em vários órgãos denotam atividade de doença, cuja extensão e gravidade variam de indivíduo para indivíduo, sendo mais severa em afro-descendentes(33, 35).

A deposição desses imunocomplexos no rim causa inflamação e, conseqüentemente, a doença denominada nefrite lúpica (NL).

2.3. Nefrite Lúpica (NL)

Uma das manifestações comuns do LES é a NL que se manifesta principalmente com proteinúria, hematúria e, em alguns casos, insuficiência renal severa. Essa manifestação renal ocorre em 40-60% dos pacientes acometidos por LES que, dependendo da severidade da doença, evoluirão

para o estágio final da doença renal crônica. Porém, essas ocorrências dependem da população estudada e dos critérios diagnósticos usados(36).

A NL compreende diversos padrões de doença renal no LES, incluindo patologia glomerular, tubulointersticial e vascular. Uma característica do envolvimento glomerular na NL é a deposição de imunocomplexos circulantes e a formação *in situ* de outros anticorpos. Outros padrões de doença renal independente da NL são a podocitopatia e microangiopatia trombótica, que também podem estar presentes nos pacientes acometidos por LES(37).

A nefropatia do LES caracteriza-se pela heterogeneidade na apresentação histológica, pela frequente superposição de lesões e pelo potencial de transformação de uma classe de nefrite em outra que ocorrem em 15 a 40% dos pacientes(37, 38). Biópsias renais de protocolo são utilizadas para avaliar essas variações de classes histológicas(39).

Alguns pacientes com NL não apresentam evidências clínicas como proteinúria, sedimento urinário ativo ou perda de função renal. Neste contexto, a biópsia é a única forma de diagnóstico possível, pois podem ocorrer lesões proliferativas graves na ausência de manifestações clínicas de doença renal (*Silent Lupus Nephritis*)(40).

Em um estudo com 18 pacientes sem manifestações clínicas renais, a biópsia renal indicou que 50% deles apresentaram características histológicas compatíveis com NL classe I, 33% com classe II, 6% com classe IV e 12% com classe V(40). Assim, a biópsia renal é essencial para estabelecer o esquema de tratamento e prognóstico da doença(41).

2.3.1. Epidemiologia

O prognóstico da NL é, às vezes, difícil de estabelecer. Pode ser influenciado por fatores demográficos, socioeconômicos, genéticos, clínicos, histológicos e fatores sorológicos(42). A etnia africana e latina americana são fatores de risco identificados para o envolvimento renal e um mais rápido desenvolvimento de nefrite em diferentes coortes dos Estados Unidos(43), América Latina(20), Reino Unido(44) e França(45). Na população latino-americana, a insuficiência renal aguda ou crônica e a hipertensão foram mais frequentes em mestiços que em brancos, e os afro-descendentes tiveram uma prevalência significativamente maior de síndrome nefrótica em comparação com a população caucasiana(20).

Evidências indicam que a etnia também pode influenciar a resposta ao tratamento na NL. Já foi demonstrado que pacientes caucasianos apresentam melhor resposta à ciclofosfamida intravenosa(46). A etnia afro-americana também está associada à NL recorrente e, possivelmente, com sobrevida reduzida nos pacientes com LES que foram submetidos a transplante renal(47).

O impacto que o status socioeconômico pode desempenhar nos pacientes com LES é outro fator a ser considerado. Nos Estados Unidos, o pior prognóstico de afro-americanos foi associado com seu baixo status socioeconômico, refletido pela menor renda familiar e menor disponibilidade de plano de saúde(48). Outro estudo americano, usando a renda familiar, nível educacional e plano de saúde como indicadores do status econômico e social

em uma população de etnia afro-americana, relatou que a pobreza foi um importante fator de progressão de NL proliferativa. O risco de progressão renal nos afro-americanos foi amplamente relatado pela perda de seguro e pobreza, independente de etnia, genética ou fatores biológicos. Pacientes hispânicos também mostraram um elevado risco de perda da função renal, que também foi atribuído ao seu status socioeconômico(49).

O sexo masculino nos pacientes com LES mostrou estar associado com maior frequência de envolvimento renal. Na coorte do *Grupo Latino Americano de Estudio del Lupus* (GLADEL) mais de 50% dos pacientes tiveram alguma forma de envolvimento renal em algum momento, com uma frequência em homens de 61% e em mulheres de 50,7%, sendo que o sexo masculino mostrou uma tendência maior de desenvolvimento de glomerulonefrite e síndrome nefrótica que mulheres(20).

2.3.2. Patogênese da NL

A patogênese da NL envolve a deposição de autoanticorpos e imunocomplexos nos glomérulos, ativação de complemento e macrófagos, proliferação celular, produção de proteínas da matriz extracelular, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que através de diversos mecanismos causam dano tubular, inflamação tubulointersticial e fibrose(50).

O envolvimento renal no LES ocorre mais frequentemente pela deposição de imunocomplexos em mesângio, subepitélio e subendotélio, com proliferação de células endoteliais e mesangiais de forma segmentar ou difusa,

acompanhada de lesões ativas com infiltrado inflamatório intersticial, trombos hialinos, espessamento da membrana basal glomerular por depósitos de imunocomplexos, necrose, e mais raramente crescentes. Podem coexistir ou predominar lesões crônicas, como esclerose glomerular global ou segmentar, fibrose intersticial e atrofia tubular, com ou sem lesões vasculares associadas(38, 51).

O depósito de imunocomplexos no mesângio, subendotélio, espaço subepitelial e/ou em capilares peritubulares depende da atividade dos autoanticorpos, duração e da severidade da NL. Sendo que a formação de imunocomplexos no mesângio causa lesões de classe I e classe II, lesões de classe III e IV são causadas pela deposição de imunocomplexos no espaço subendotelial e as lesões de classe V se formam pela deposição de imunocomplexos no subepitélio, além de lesões nas formas mistas(52).

Na tabela abaixo, estão descritas as alterações histológicas da NL no interior do rim.

Tabela 1. Mecanismos Etiopatogênicos da Nefrite Lúpica

Patologia Glomerular	Patologia tubulointersticial
Mesangial e subendotelial: depósito de imunocomplexos (ICs), ativação de complemento	Depósito de ICs nos vasos periglomerulares
Ativação de células renais e infiltração de leucócitos. ICs subepiteliais causam NL Classe V e dano ao podócito com intensa proteinúria	Ativação do complemento
Expressão de citocinas	Ativação de células endoteliais, adesão de moléculas no espaço luminal
Recrutamento de leucócitos	Recrutamento de leucócitos
Proliferação de células endoteliais e mesangiais	Produção de anticorpos por células B incluindo formação terciária de órgãos linfóides
Proteinúria e hematúria causadas pelo dano à barreira de filtração	Células T citotóxicas e T auxiliares 17 (Th17)
Necrose celular renal causando fibrose	Citocinas pró-apoptóticas
Proliferação de células do epitélio parietal e formação crescente	Dano celular no túbulo proximal causando proteinúria
Inflamação periglomerular	Atrofia tubular e vascular
Glomerulosclerose global	Reparo tubular e vascular insuficiente e isquemia promovem fibrose intersticial

Adaptado de Lech M 2013, referência número 51 .

Entre os marcadores sorológicos autoimunes do LES, estão os anticorpos anti-dsDNA, anti-C1q e os fatores do complemento C3 e C4. Os anticorpos anti-dsDNA foram os primeiros detectados e analisados, sendo usados para auxiliar no diagnóstico e manejo terapêutico da doença pela sua sensibilidade e especificidade. Os níveis desse autoanticorpo podem ser correlacionados com a atividade da doença, que em combinação com anticorpos como o anti-C1q estão associados à atividade da doença e pior prognóstico renal nos pacientes com NL(53).

Anticorpos anti-DNA constituem um subgrupo de anticorpos nucleares que podem se ligar a DNA de fita simples ou DNA de fita dupla. Esses anticorpos são parte do espectro normal de anticorpos em indivíduos saudáveis que reagem fracamente com auto-antígenos e são da classe IgM. Em pacientes acometidos com LES, esses anticorpos sofrem uma mudança de isotipo para a classe IgG fazendo com que o seu potencial patogênico aumente(53). A presença de anticorpos, como o DNAds, que se depositam como imunocomplexos no rim, é necessária para o desenvolvimento da nefrite. Esses anticorpos da subclasse IgG podem fixar complemento, sendo importantes na patogênese e como biomarcador da doença(34).

O nível sérico do anticorpo anti-C1q também pode ser considerado um marcador não invasivo para atividade da NL. Ele possui maior sensibilidade e especificidade que outros marcadores tradicionais da atividade da doença, como o consumo de C3 e C4 e a presença de anti-DNAds(54). Os anticorpos anti-C1q são direcionados contra o C1q, componente da via clássica do complemento. A presença ou ausência do anticorpo anti-C1q representa um marcador biológico sanguíneo não invasivo no seguimento de pacientes com

nefrite ativa, já que esses anticorpos são mais prevalentes em pacientes com nefrite que em pacientes sem nefrite(55).

Na figura abaixo, estão representados fatores etiopatogênicos da NL em cada segmento do néfron.

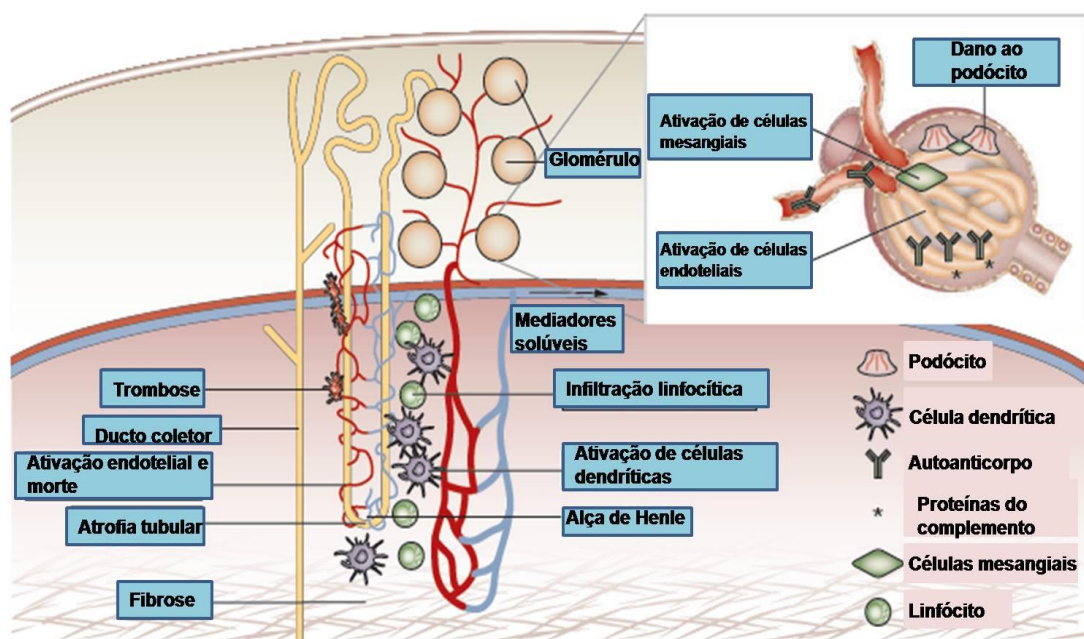


Figura 4. Patogênese da Nefrite Lúpica. Adaptado de Davidson A, referência 9.

2.3.3. Classes Histológicas

A relação entre características clínicas e a evolução da NL tem sido reconhecida. Normalmente, pacientes com NL mesangial (classe II) e membranosa pura (classe V) tem menor perda de função renal, já os pacientes com glomerulonefrite lúpica proliferativa tem doença mais agressiva com maior perda da função renal em um grande número de casos. A nefrite lúpica pode

assumir uma grande variedade de expressões histopatológicas, sendo as formas proliferativas mais prevalentes e com maior potencial de gravidade.

A *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* (ISN/RPS) publicou recentemente uma nova classificação da NL com base em critérios morfológicos e de atividade e cronicidade da nefrite(52):

Classe I – Alterações mesangiais mínimas. Caracteriza-se por glomérulos normais à microscopia ótica (MO), porém com depósitos imunes na imunofluorescência (IF).

Classe II – Alterações proliferativas mesangiais. Caracterizada por hiperplasticidade mesangial de qualquer grau, ou expansão da matriz mesangial pela MO, com depósitos imunes no mesângio. Podem existir poucos e isolados depósitos subepiteliais visíveis pela IF ou microscopia eletrônica (ME), porém com MO normal.

Classe III – NL proliferativa focal: a nefrite focal envolve menos de 50% dos glomérulos com depósitos focais, subendoteliais, com ou sem alterações mesangiais.

- a) Classe III (A): Com lesões ativas – NL proliferativa focal.
- b) Classe III (A/C): Com lesões ativas e crônicas – NL proliferativa focal e esclerosante.
- c) Classe III (C): Lesões crônicas inativas com cicatrizes glomerulares – NL esclerosante focal.

Classe IV – NL proliferativa difusa: envolve mais de 50% dos glomérulos, com depósitos difusos subendoteliais, com ou sem alterações mesangiais.

- a) Classe IV-S(A) ou IV-G(A): lesões puramente ativas - difusa segmentar (S) ou global (G) na nefrite lúpica proliferativa.
- b) Classe IV-S(A/C) ou IV-G(A/C): lesões ativas e crônicas - difusa segmentar ou proliferativa global e NL esclerosante.
- c) Classe IV-S(C) ou IV-G(C): lesões inativas com cicatrizes glomerulares - NL difusa segmentar ou esclerosante global.

Classe V - Nefrite lúpica membranosa: depósitos imunes associados à hiperplasticidade mesangial com depósitos de imunoglobulinas e complemento no espaço subepitelial do glomérulo. Apresenta quatro sub-classes:

Va: Membranosa pura

Vb: Associada à proliferação mesangial moderada

Vc: Associada à doença proliferativa focal

Vd: Associada à doença proliferativa difusa

Classe VI – NL com esclerose avançada. Mais de 90% dos glomérulos tem esclerose global, sem atividade inflamatória residual.

2.3.4. Tratamento

O LES é caracterizado por períodos de atividade e remissão da doença e grande variação na severidade, envolvimento de diferentes órgãos e resposta ao tratamento. A sobrevida dos pacientes melhorou consideravelmente nos últimos trinta anos, mesmo assim a mortalidade é superior à população em geral(56).

Atualmente, o tratamento do LES inclui antimaláricos, drogas imunossupressoras como a ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato e/ou metotrexato e antiinflamatórios esteróides e não esteróides. As terapias biológicas e drogas de pequenas moléculas podem corrigir a função anormal das células do sistema imune e estão sendo desenvolvidas na expectativa de que serão mais eficazes e menos tóxicas que os tratamentos farmacológicos disponíveis atualmente(2, 57).

Em relação ao tratamento da NL, a combinação de corticosteróides (prednisona), citotóxicos (ciclofosfamida) e/ou uma droga anti-proliferativa (micofenolato mofetil, azatioprina) é eficaz em controlar a nefrite em atividade e prevenir a sua reativação. O uso dessas drogas associadas faz com que aumente significativamente a sobrevida renal destes pacientes(56, 58).

A ciclofosfamida (CCF) endovenosa ou oral associada à pulsoterapia com metilprednisolona endovenosa seguido de prednisona oral é o protocolo de indução mais utilizado em todo mundo para tratamento da NL grave, sendo indicados nas formas proliferativas da nefrite (classes III e IV)(56, 58, 59). Mais

recentemente, o micofenolato mofetil (MMF) tem sido investigado tanto para terapia de indução quanto de manutenção da NL(60).

Em comparação à CCF, e os resultados desses estudos apontam para uma eficácia equivalente à ciclofosfamida, e talvez com menor índice de efeitos adversos. Sugere-se que o MMF poderia ser usado na terapia de indução de casos menos graves, e também no tratamento de manutenção em pacientes que não toleram a azatioprina ou que apresentam recidivas da NL(56, 58-60). De forma geral, poderia se resumir o manejo da NL de acordo com a classe histológica:

- Classe I e Classe II: Para essas classes não há terapia específica, somente são tratadas as manifestações extra-renais do lúpus.

- Classe III: Quando a NL focal acomete menos de 25% dos glomérulos, com ausência de crescentes, função renal normal e sem hipertensão arterial pode-se utilizar prednisona por três meses para tratamento das manifestações extra-renais do lúpus. Se a NL acometer de 40% a 50% dos glomérulos com presença de crescentes e função renal alterada, o tratamento será como na classe IV.

- Classe IV: o tratamento na NL proliferativa difusa é realizado em duas fases. A primeira é a fase de indução onde o paciente é tratado com metilprednisolona associada à ciclofosfamida ou opcionalmente micofenolato mofetil (MMF). A segunda fase é a de manutenção, em que o paciente permanece com prednisona em doses baixas, MMF ou azatioprina. Mesmo na indução, o MMF tem sido de amplo uso na prática clínica sendo eficaz no controle da NL(61).

Estudo realizado por Mok et AL(42) testou o inibidor da calcineurina tacrolimus como terapia de indução da NL em nove pacientes com a forma proliferativa difusa. Após seis meses de tratamento, houve remissão completa em seis pacientes e remissão parcial em dois pacientes. O tacrolimus é considerado uma alternativa terapêutica somente aos pacientes nos casos não responsivos ao tratamento convencional.

- Classe V: Nos pacientes com NL membranosa e proteinúria assintomática, com função renal normal, o tratamento é não imunossupressor, com reavaliações trimestrais. Quando houver proteinúria nefrótica e piora da função renal, o tratamento não é definido, mas preconiza-se prednisona associada à ciclofosfamida, MMF, azatioprina ou ciclosporina(62).

- Classe VI: não há terapia específica, apenas medidas de nefroproteção para retardar a progressão da doença renal crônica a um quadro terminal.

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento que ocorreram na última década, 10 a 15 % dos pacientes com NL evoluem para insuficiência renal crônica terminal, sendo necessário o tratamento com diálise ou transplante renal para substituição da função renal.

2.4. Células Epiteliais Podocitárias

O glomérulo é composto por um filtro onde ocorre o processo de filtração glomerular. Inicialmente, o sangue é distribuído por ramificações da artéria renal, terminando no glomérulo através da arteríola aferente. Depois de passar

pelo capilar glomerular, o sangue já filtrado segue pelas arteríolas eferentes e entra em uma rede capilar (capilares peritubulares) os quais se envolvem ao redor dos túbulos. O sangue passa às vênulas renais, saindo do rim através da veia renal. O mesângio e as células mesangiais sustentam as alças da rede capilar. A rede de capilares glomerulares é composta de três camadas: as células endoteliais, a membrana basal glomerular (MBG) e as células epiteliais ou podócitos, situados no exterior dos capilares(63).

Os podócitos são células epiteliais altamente diferenciadas e especializadas, terminais, com prolongamentos primários, secundários e terciários, denominados pedicelos, que cobrem a superfície externa da membrana basal glomerular(63, 64). Embriologicamente derivam das células mesenquimais, e o corpo celular do podócito maduro situa-se no espaço urinário no lado luminal, e seus pedicelos (processos podocitários) situados no lado oposto estão ancorados à membrana basal glomerular via $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e α , β -dístroglicanos. Os pedicelos estão conectados entre si através de uma estrutura especializada de junção célula-célula, denominada diafragma em fenda(63-65).

O diafragma em fenda situa-se entre dois podócitos adjacentes, e atualmente considera-se ser uma importante barreira à filtração de proteínas. O endotélio fenestrado parece ser muito grande para impor perme-seletividade à macromoléculas, mas em que proporção a MBG e o podócito contribuem para esse processo, assim como se a seletividade por carga ou por tamanho de molécula é o mecanismo mais determinante, são perguntas que ainda não tem uma resposta definitiva até o momento(63-65).

O podócito é uma célula dinâmica que exerce um papel crítico na filtração glomerular e na manutenção da MBG, na forma e integridade dos capilares e na transdução de sinais intracelulares à célula epitelial. As células podocitárias podem sofrer diversos tipos de agressão. A fusão e achatamento dos pedicelos é a primeira reação dos podócitos a qualquer tipo de injúria. A lesão no diafragma em fenda leva a um rearranjo do citoesqueleto e das fibras de actina e ruptura dos pedicelos, podendo levar a apoptose dos podócitos(64).

Agressões ao glomérulo podem resultar em apoptose dos podócitos e/ou o seu desprendimento da MBG, ocasionando redução significativa do número de podócitos (podocitopenia) e formando áreas de desnudamento na MBG. Os podócitos restantes não são capazes de recobrir a MBG ou de manter uma filtração glomerular normal. A MBG desnuda adere à cápsula de Bowman (sinéquia), e a partir desta adesão inicia-se o processo de esclerose glomerular e fibrose intersticial, esta pelo “derramamento” de proteínas do espaço urinário para a trama túbulo intersticial(63-65).

Os podócitos, em situações específicas, podem sofrer um processo de dediferenciação. Nesta forma de lesão, o podócito readquire a capacidade proliferativa do período embrionário pela inibição dos mecanismos que impedem a mitose celular. A dediferenciação e consequente proliferação desordenada leva à hiperplasia, como pode ser visto na glomerulonefrite colapsante e crescêntica(66).

As podocitopatias são clinicamente manifestas por proteinúria, indicando a importância dos podócitos na manutenção da barreira de filtração. Em

algumas nefropatias, como a diabética, ocorre podocitopenia e hipertrofia dos podócitos, com supressão dos pedicelos adjacentes(67).

Serão discutidos a seguir com maior detalhamento o tipo e as funções das proteínas que compõem todos os domínios da célula podocitária.

2.4.1. Estrutura molecular do podócito

Os podócitos são células polarizadas, carregadas negativamente, e sua forma peculiar e dinamicamente modificável deve-se ao citoesqueleto rico em microfilamentos de F-actina e miosina. O citoesqueleto é constituído por três elementos ultraestruturais: microfilamentos (7-9 nm), filamentos intermediários (10 nm) e microtúbulos (24 nm). Diversas proteínas mantêm a arquitetura podocitária através de ligações com a actina, como a sinaptopodina, no seu interior, e a alfa actinina-4, próxima a membrana basal(63-65).

A alfa actinina-4 atua na regulação da morfologia e da motilidade do podócito, e também na cascata de sinalização intracelular. No interior do rim, esta proteína está localizada predominantemente nos pedicelos dos podócitos e nas células mesangiais(68).

Os podócitos possuem quatro diferentes domínios com base na anatomia molecular de cada segmento, conforme descrito a seguir. Na figura 5 estão ilustradas a estrutura do podócito e as principais proteínas associadas.

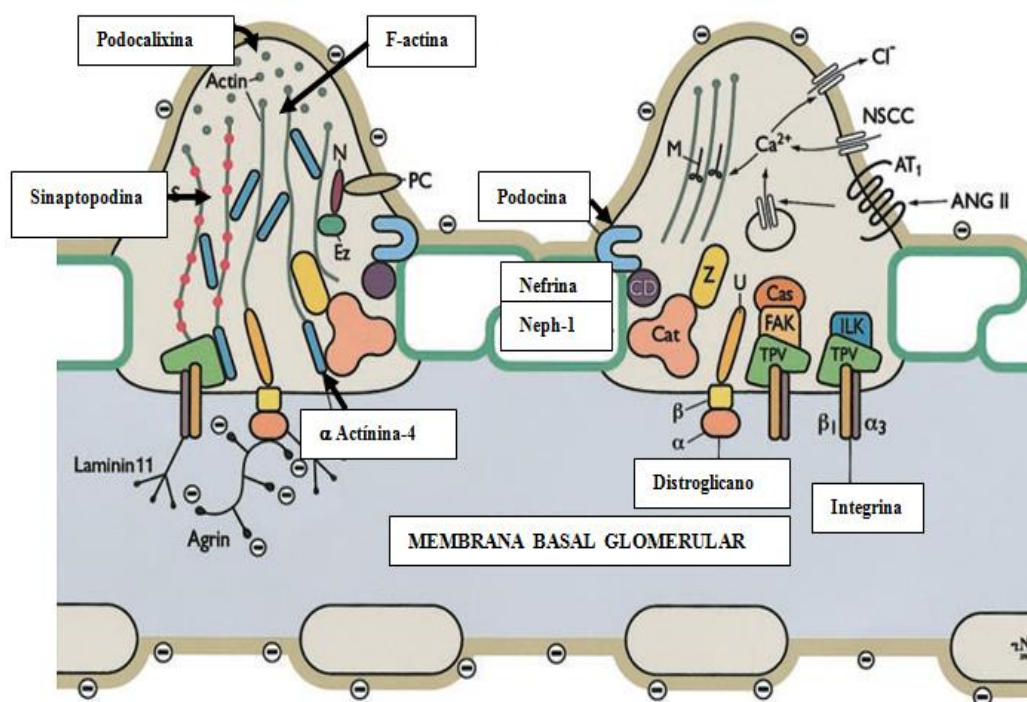


Figura 5. Estrutura do podócito e principais proteínas associadas. Adaptado de Barisoni e Mundel, referências 63 e 68, respectivamente.

1) Diafragma em fenda

a) Nefrina: Foi descoberta inicialmente por Tryggvason(69) a nefrina é o produto do gene NPHS1, uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas (Igs). Contém um domínio extracelular longo com oito repetições do tipo imunoglobulina e um módulo de fibronectina tipo III, e um pequeno domínio intracelular. As moléculas de nefrina estendem-se umas sobre as outras a partir das interdigitações dos pedicelos, com disposição em paralelo e ligadas por pontes dissulfeto, permitindo o fechamento da fenda como um “zíper”.

A nefrina participa das funções do citoesqueleto do podócito interagindo com a actina, através de proteínas adaptadoras Nck, e com a proteína NEPH1, formando cis-oligômeros heterogêneos(70). Uma mutação autossômica recessiva do gene NPHS1 que codifica a nefrina causa síndrome nefrótica congênita do tipo Finnish, com surgimento de proteinúria ainda intra-útero. Histologicamente é caracterizada por esclerose mesangial, em que ocorre perda progressiva de função renal e evolução para DRC terminal(71).

b) Podocina: Proteína que pertence à família das estomatinas sendo codificada pelo gene NPHS2. A podocina está associada ao componente lipídico do diafragma em fenda e apresenta forma de “grampo de cabelo” e interage com a nefrina e com a CD2AP, facilitando a sinalização da nefrina. Essa interação auxilia na organização estrutural do diafragma em fenda, pois estudos mostram que há interação entre nefrina e podocina com filamentos de actina(72).

A apresentação fenotípica da mutação no gene NPHS2 é uma síndrome nefrótica córtico-resistente, que também evolui para doença renal crônica terminal (DRC). A mutação desse gene está presente em famílias com glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) hereditária, sendo mais frequente em crianças. Concluindo, a nefrina e a podocina são componentes fundamentais do diafragma em fenda e garantem a estrutura normal dos podócitos e da barreira de filtração.

2) Domínio da membrana luminal

A membrana apical do podócito é carregada negativamente devido à presença de diversas sialoproteínas de superfície aniônicas, como a podocalixina, podoplanina e podocandina. Essas proteínas mantêm a carga negativa da membrana basal glomerular, limitando a passagem de albumina (carregada negativamente), e também mantêm a separação física dos podócitos adjacentes(73).

a) Podocalixina: A podocalixina é a maior das sialoproteínas, da família das sialomucinas, e tem uma importância essencial para a formação e preservação da arquitetura celular dos podócitos, possivelmente impedindo a adesão das células parietais da cápsula de Bowman aos podócito(73).

b) *Transient Receptor Potential Cation Channel 6* (TRPC6): O TRPC6 é um membro da subfamília C dos canais de potencial de receptor transitório. O *Transient Receptor Potential Channels* consistem em 28 membros que estão divididos em sete famílias, e possuem diversos mecanismos de ativação, função e distribuição específica nos tecidos. É um grupo de canais seletivos para os íons cálcio (Ca^{2+})(74).

Esses canais são compostos por sete subgrupos (TRPC1 a TRPC7), sendo que o TRPC2 é um pseudogene. Essa divisão tem como base uma sequência específica de aminoácidos e similaridades funcional. Os canais TRPC se dividem em 2 grupos: 1) TRPC1, TRPC4 e TRPC5; e 2) TRPC3, TRPC6 e TRPC7. O TRPC6 é uma proteína transmembrana de canais iônicos

localizada na membrana celular do podócito e está adjacente ao diafragma em fenda (DF)(74).

O TRPC6 desregula a actina do citoesqueleto do podócito e induz proteinúria em diversas glomerulopatias, especialmente em pacientes com glomerulonefrite membranosa(75). Em estudos experimentais, a hiperglicemia, espécies ativas de oxigênio e proteína quinase C suprimem a expressão de TRPC6 no glomérulo de ratos diabéticos(76).

3) Domínio basal

Esse domínio é necessário para ancorar o podócito na membrana basal glomerular (MBG), através das $\alpha_3\beta_1$ -integrinas e dos α , β -dístroglicanos. Essas proteínas ligam-se a diversos componentes da membrana, como colágeno IV, fibronectina, laminina e endactina, e também à proteínas do corpo podocitário, como a alfa actinina-4 e a sinaptopodina, o que permite que as alterações da membrana basal repercutam na forma e movimento do podócito(63-65).

4) Citoesqueleto

No citoesqueleto os principais componentes moleculares são a actina, a α -actinina e a sinaptopodina. A sinaptopodina interage diretamente com a alfa actinina-4, modulando a sua expressão e promovendo o alongamento dos filamentos de actina, o que modifica a forma do podócito e produz o achatamento ou simplificação dessas células(68).

2.4.2. Funções do podócito

Os podócitos desempenham um importante papel na filtração glomerular e formação do filtrado glomerular no espaço urinário de Bowman. A complexa arquitetura das suas proteínas é necessária para que essa célula altamente especializada realize as seguintes funções: a) Manutenção da integridade de barreira (tamanho e carga) às proteínas; b) Manutenção da forma da alça capilar glomerular; c) Oposição à pressão gerada dentro do glomérulo; d) Síntese e manutenção da MBG; e) Produção e secreção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) necessário para a integridade da célula endotelial do capilar glomerular(63-65, 77).

A alteração de uma ou mais dessas funções após uma injúria ao podócito resulta em proteinúria, síndrome nefrótica e perda de função renal. Em alguns pacientes lúpicos não há evidência de depósitos de imunocomplexos típicos e, em vez disso, parece haver fusão das células podocitárias(78).

2.4.3. Podocitopatía na Nefrite Lúpica

As nefropatias proteinúricas são associadas à ruptura do diafragma em fenda e/ou da fusão dos pedicelos resultantes da reorganização do sistema de microfilamentos dos podócitos. Os anticorpos anti-DNAs podem levar à

ativação do complemento ou entrar no citoplasma e translocar-se para o núcleo, resultando em proteinúria. Esses anticorpos também podem reagir diretamente através de uma reação cruzada com as proteínas do podócito como a α -actinina 4, lesionando essas células, às vezes de forma irreversível(79).

A dificuldade em identificar os podócitos deve-se, em parte, à sua habilidade de sofrer mudanças fenotípicas de células do tipo mesenquimais para células do tipo epiteliais durante o curso da doença. Este processo de desdiferenciação pode conseqüentemente levar a uma perda de seus epítomos normais e o desenvolvimento de novos epítomos característicos de macrófagos ou originados de miofibroblastos(78, 80).

Atualmente, os podócitos ou os seus fragmentos são identificados no túbulo renal e na urina por diversas técnicas como citometria de fluxo, imunistoquímica ou imunocitoquímica, provavelmente o aumento na excreção de podócitos na urina reflete o dano tecidual e a podocitopenia intra-renal. Maiores escores do índice de atividade da NL foram associados ao aumento do número de podócitos na urina(78).

Em pacientes com NL ativa e pacientes com NL inativa, foi avaliada a expressão do RNAm das proteínas do podócito nefrina, podocina e sinaptopodina por RT-PCR. A expressão urinária de nefrina e podocina foi correlacionada com o índice de atividade da doença. Nesse estudo, não houve correlação entre a classe histológica de NL e a expressão gênica na urina das proteínas do podócito, mas a expressão dessas proteínas foi significativamente maior em relação ao grupo com NL inativa. A nefrina também foi

correlacionada com proteinúria, mas não com taxa de filtração glomerular (TFG) e a podocina não foi correlacionada com proteinúria ou TFG(8). Em biópsias renais de pacientes com NL proliferativa difusa, a expressão de nefrina avaliada por imunistoquímica estava reduzida. Isso sugere que as proteínas do diafragma em fenda, nefrina e podocina sofrem nos danos estágios iniciais da NL e a sua expressão se correlaciona com a histologia da doença(81).

A redução dos podócitos glomerulares em correlação com o aumento progressivo na excreção urinária foi detectada por imunoenensaio enzimático (ELISA) em pacientes com NL. Nesse estudo, houve associação entre proteinúria e podocitopenia glomerular nas formas proliferativas de classe III e classe IV, mas o índice de apoptose não se correlacionou com os podócitos urinários, sugerindo-se que essas células podem estar viáveis na urina(6).

Em outro estudo que avaliou a relação entre podócitos urinários e atividade da NL, os pacientes foram divididos em três grupos: grupo A - função renal estável; grupo B - NL ativa e grupo C - controles. Os pacientes do grupo B apresentaram podocitúria, porém o mesmo não foi observado em pacientes dos grupos A e C. O grupo B foi tratado com metilprednisolona seguido por prednisona. Após o tratamento, os podócitos urinários não foram mais detectados em todos os pacientes deste grupo(82).

Lu et al(83) estudaram a relação entre a classe histológica de NL e a expressão gênica do indutor fraco de apoptose do fator de necrose tumoral (TWEAK) em biópsias renais de protocolo. No estudo, o índice de atividade diminuiu quando ocorreu mudança de classe de NL da forma proliferativa para

a membranosa e aumentou na mudança da forma membranosa para a proliferativa e o contrário ocorreu com o índice de cronicidade histológica. Além disso, o índice de atividade histológica correlacionou-se com a expressão glomerular de Fn14 e com a expressão tubulointersticial de TWEAK, porém não houve qualquer correlação entre a expressão gênica e o índice de atividade da doença (SLEDAI).

Em pacientes com NL membranosa, o grau de achatamento dos pedicelos dos podócitos foi maior nas biópsias dos pacientes nefróticos em relação aos não nefróticos. Além disso, a proteinúria não estava associada com a quantidade de depósitos de agregados imunes(7).

A proteína do tumor de Wilms 1 (WT-1) é um marcador fenotípico dos podócitos(63-65). Biópsias de pacientes com NL e controles normais mostram diferenças significativas na marcação para WT-1. Nos controles, o WT-1 foi fortemente expresso ao longo dos capilares glomerulares, já nas biópsias com NL houve uma diminuição marcada dessas células o que indica lesão podocitária pela atividade imunológica da nefrite(6).

2.4.4. O fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) na nefrite lúpica

O fator de crescimento vascular derivado do endotélio (VEGF) é um mediador de vários tipos de neovascularização e do aumento da permeabilidade vascular, além de proteger a célula endotelial de apoptose em

vasos neoformados. Em modelos experimentais, o VEGF acelera a regeneração renal na microangiopatia trombótica e na insuficiência renal crônica(84). Nesse estudo, a excreção urinária de VEGF aumentou em proporção indireta com a queda da filtração glomerular.

O VEGF se expressa no glomérulo normal, no podócito e nas células endoteliais, e sua expressão é induzida pelo fator de crescimento transformador beta (TGF- β)(85). O VEGF pertence à superfamília do fator derivado de plaquetas (PDGF), e é composta por cinco membros: VEGF (também chamado VEGF-A), PIGF (placental growth factor), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D(86).

O VEGF-A liga-se aos seus receptores 1 e 2 (VEGFR1 e VEGFR2), sendo que seus receptores são expressos nos podócitos, células tubulares e a maioria em células endoteliais. A sinalização via VEGFR-2 é considerada a via mais angiogênica, e o VEGFR-1 é um regulador negativo da angiogênese quando liga-se ao VEGF-A, mas ele é um estimulador da angiogênese em ligantes específicos, como o PIGF e o VEGF-B(87) .

O VEGF-B tem um potencial angiogênico muito limitado e está associado ao metabolismo dos lipídios. Em nefropatias como na síndrome nefrótica idiopática, o VEGF apresenta uma expressão variável: aumentada nas alterações glomerulares mínimas e reduzida na glomeruloesclerose segmentar e focal em relação a controles normais(86, 88).

A administração de VEGF está associada com estabilização da função renal em vários modelos de fibrose renal. Em sua forma endógena o VEGF é relacionado à sobrevivência das células endoteliais glomerulares, através dos

processos de proliferação e diferenciação. Essa ação protetora se deve, principalmente, pela preservação das estruturas, como os capilares glomerulares e peritubulares(89).

No estudo realizado por Navarro e colaboradores(90), houve correlação entre as manifestações clínicas e os níveis plasmáticos de VEGF em pacientes lúpicos com dano renal em relação aos controles normais, sendo que o nível plasmático de VEGF foi maior nos pacientes com dano renal. Avihingsanon e colaboradores descreveram que os níveis urinários do RNAm de VEGF e TGF- β , foram maiores em pacientes com classe IV de NL em comparação classes II, III e V(91).

Os níveis urinários aumentados do RNAm de VEGF e WT-1 correlacionaram-se com a atividade proliferativa e inflamatória na NL ativa. Por outro lado, os níveis intra-renais do RNAm de VEGF e WT-1 estariam reduzidos em biópsias de NL ativa, mas não houve diferença nos níveis de TGF- β entre pacientes com NL e controles. Nesse estudo, houve associação entre VEGF e o TGF- β (77). O aumento da expressão do RNAm do VEGF também foi observado em outro estudo experimental e clínico nos estágios iniciais da nefropatia diabética, sugerindo que o VEGF poderia estar associado ao processo de reparação da injúria do tecido(89).

O TGF- β está associado à síntese de colágeno, fibrose extracelular, aumento de matriz extracelular e inibe a sua degradação(92). O TGF- β também estimula a proliferação e deposição de fibroblastos no tecido renal, causando dano crônico irreversível. O TGF- β está supra-regulado na doença podocitária

progressiva, o que resulta do aumento da pressão mecânica, secreção de angiotensina II e suprarregulação de cadeias biomecânicas no podócito(93).

A angiotensina II também está supra-regulada nas glomerulonefrites bem como os receptores de TGF- β , que em uma alça de retroalimentação positiva, estimula a produção de mais TGF- β (93, 94). A angiotensina II, produto do sistema renina angiotensina (SRA), pode aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos podócitos induzindo estresse oxidativo e ativação do TGF- β (93).

2.4.5. Forkhead box P3 (FOXP3) na Nefrite Lúpica

O FOXP3 é o gene mestre e marcador específico das células T reguladoras, cuja função é reduzir a reação inflamatória que ocorre em diversas condições como rejeição de transplantes, glomerulonefrites e doenças inflamatórias intestinais, entre outras. Além disso, ele possui a função de promover um estado de tolerância imunológica e aceitação de enxertos(95, 96). A ação do FOXP3 na NL tem sido estudada, pois a potente reação inflamatória gerada pelo LES induziria a transcrição de FOXP3 para inibição desta resposta, teoricamente influenciando a evolução da doença.

Os níveis de RNAm de FOXP3, presentes na urina de pacientes com NL foram correlacionados com a atividade de doença. A expressão de RNAm de FOXP3 urinário foi significativamente maior em pacientes com NL ativa se comparado aqueles com NL inativa e controles saudáveis. Nos pacientes com

NL proliferativa, expressão do RNAm de FOXP3 foi maior em relação aqueles com nefrite não proliferativa, e houve correlação com a atividade histológica. Além disso, a expressão urinária de RNAm de FOXP3 correlacionou-se com a SLEDAI e proteinúria no grupo com NL ativa(97).

No estudo de Tsugawa e colaboradores, foi demonstrado que o nível de expressão do RNAm de FOXP3 no sedimento urinário foi menor em pacientes com NL em relação aos controles saudáveis. Não houve correlação do FOXP3 com parâmetros clínicos como proteinúria, taxa de filtração glomerular, níveis séricos de C3 e C4 e título de anti-DNAs(98).

Com base nesses estudos, conclui-se que o papel do FOXP3 na NL é ainda controverso, não se podendo determinar se o FOXP3 é um marcador inespecífico de inibição da resposta inflamatória ou se participa na etiopatogênese da NL.

3. Justificativa

A nefrite lúpica (NL) é uma doença que acomete cerca de 50% dos pacientes portadores de LES, e dependendo da gravidade da lesão o paciente pode evoluir para insuficiência renal crônica terminal e necessidade de diálise ou transplante, gerando custos extremamente elevados para o sistema de saúde. A correta avaliação da atividade imunológica da doença, associada a detecção do tipo de dano glomerular que ela ocasiona identificando alvos moleculares específicos, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controle da NL. A identificação indireta da lesão podocitária no tecido renal (podocitopenia) e na urina (podocitúria) por uma ferramenta acurada como o PCR em tempo real tem mostrado que esses achados se correlacionam com a injúria glomerular, podendo contribuir para o diagnóstico de atividade da doença e manejo terapêutico na NL, e potencialmente influenciar a sua evolução e prognóstico.

Portanto, este estudo se justifica pela necessidade de investigação dos mecanismos de lesão podocitária que provavelmente antecedem a proteinúria, e para avaliar a hipótese de que existe correlação entre a expressão dos marcadores do podócito com a classe histológica e o dano agudo e crônico, será quantificado o RNAm das proteínas podocitárias em dois compartimentos - tecido renal e sedimento urinário - nas diferentes classes histológicas de NL, separando as lesões proliferativas das não proliferativas e avaliando o índice de atividade e fenotipando as células do infiltrado inflamatório da biópsia renal.

4. Objetivos

4.1 Geral

Avaliar a expressão do RNA mensageiro de proteínas associadas ao podócito no tecido renal e na urina de pacientes portadores de nefrite lúpica, assim como a sua correlação com a classe histológica e a atividade da doença.

4.2 Específicos

1. Quantificar o RNAm de proteínas específicas do podócito, no tecido renal e na urina, comparando essa expressão na NL com depósitos mesangiais (classes I e II) em relação a NL com depósitos endocapilares e/ou subepiteliais, (classes III, IV e V).

2. Correlacionar a densidade do infiltrado celular de células T citotóxicas, células B e macrófagos com a expressão do RNAm de proteínas específicas do podócito na NL.

3. Quantificar o RNAm do fator de transcrição FOXP3, do fator de crescimento transformador beta (TGF- β_1) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEFG-A), determinando a sua associação com a lesão histológica, o nível do RNAm das proteínas podocitárias e a densidade do infiltrado inflamatório na biópsia renal.

4. Avaliar a associação entre a expressão do RNAm das proteínas do podócito com a proteinúria, a função renal e o título do anti-DNAs, no momento da biópsia renal.

5. Referências

1. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007;369(9561):587-96.
2. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2011;365(22):2110-21.
3. Font J, Cervera R, Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Sents J, Herrero C, et al. Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center. *Semin Arthritis Rheum*. 2004;33(4):217-30.
4. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev*. 2012;12(2):174-94.
5. Lewis EJ, Schwartz MM. Pathology of lupus nephritis. *Lupus*. 2005;14(1):31-8.
6. Bollain-Y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-Del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol*. 2011;21(3):166-71.
7. Desai N, Cimbaluk D, Lewis EJ, Whittier WL. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. *Lupus*. 2013;22(5):461-8.

8. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol.* 2007;34(12):2358-64.
9. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2001;345(5):340-50.
10. Blotzer JW. Systemic lupus erythematosus I: historical aspects. *Md State Med J.* 1983;32(6):439-41.
11. Holubar K, Fatović-Ferencić S. Cazenave, Kaposi and lupus erythematosus. A centennial and a sesquicentennial. *Dermatology.* 2001;203(2):118-20.
12. Braun M. Classics in Oncology. Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin by Kaposi. *CA Cancer J Clin.* 1982;32(6):340-7.
13. Scofield RH, Oates J. The place of William Osler in the description of systemic lupus erythematosus. *Am J Med Sci.* 2009;338(5):409-12.
14. Leszczyński P, Pawlak-Bus K. New treatment strategy including biologic agents in patients with systemic lupus erythematosus. *Pol Arch Med Wewn.* 2013.
15. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002;11(8):528-32.
16. Borba EF, Araujo DB, Bonfá E, Shinjo SK. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. *Lupus.* 2013;22(7):744-9.

17. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 1993;72(2):113-24.
18. Vilá LM, Mayor AM, Valentín AH, García-Soberal M, Vilá S. Clinical and immunological manifestations in 134 Puerto Rican patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1999;8(4):279-86.
19. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Ann Rheum Dis*. 1994;53(10):675-80.
20. Pons-Estel BA, Catoggio LJ, Cardiel MH, Soriano ER, Gentiletti S, Villa AR, et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among "Hispanics". *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(1):1-17.
21. Oliveira-Santos M, Verani JF, Klumb EM, Albuquerque EM. Evaluation of adherence to drug treatment in patients with systemic lupus erythematosus in Brazil. *Lupus*. 2011;20(3):320-9.
22. Cervera R, Abarca-Costalago M, Abramovicz D, Allegri F, Annunziata P, Aydintug AO, et al. Systemic lupus erythematosus in Europe at the change of the millennium: lessons from the "Euro-Lupus Project". *Autoimmun Rev*. 2006;5(3):180-6.
23. Petri M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2008;17(5):412-5.

24. Hersh AO, Trupin L, Yazdany J, Panopalis P, Julian L, Katz P, et al. Childhood-onset disease as a predictor of mortality in an adult cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2010;62(8):1152-9.
25. Nowling TK, Gilkeson GS. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):250.
26. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(12):964-74.
27. Byrne JC, Ní Gabhann J, Lazzari E, Mahony R, Smith S, Stacey K, et al. Genetics of SLE: functional relevance for monocytes/macrophages in disease. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:582352.
28. Kawai M, Szegedi G. Immune complex clearance by monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2007;6(7):497-502.
29. Cappione A, Anolik JH, Pugh-Bernard A, Barnard J, Dutcher P, Silverman G, et al. Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 2005;115(11):3205-16.
30. Moulton VR, Tsokos GC. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(2):207.
31. Perl A, Fernandez DR, Telarico T, Doherty E, Francis L, Phillips PE. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2009;21(5):454-64.

32. Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):234-44.
33. Mok CC, Lau CS. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 2003;56(7):481-90.
34. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349(16):1526-33.
35. Korbet SM, Schwartz MM, Evans J, Lewis EJ, Group CS. Severe lupus nephritis: racial differences in presentation and outcome. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(1):244-54.
36. Cameron JS. Lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(2):413-24.
37. Markowitz GS, D'Agati VD. Classification of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(3):220-5.
38. Stokes MB, Nasr SH, D'Agati VD. Systemic Lupus Erythematosus and other Autoimmune Diseases (Mixed Connective Tissue Disease, Rheumatoid Arthritis, and Sjogren's Syndrome). In: Silva's. *Diagnostic Renal Pathology.* 1sted, New York: Cambridge, University Press, 2009, p. 229 – 272.
39. Moroni G, Pasquali S, Quaglini S, Banfi G, Casanova S, Maccario M, et al. Clinical and prognostic value of serial renal biopsies in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 1999;34(3):530-9.

40. Gonzalez-Crespo MR, Lopez-Fernandez JI, Usera G, Poveda MJ, Gomez-Reino JJ. Outcome of silent lupus nephritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1996;26(1):468-76.
41. Hsieh YP, Wen YK, Chen ML. The value of early renal biopsy in systemic lupus erythematosus patients presenting with renal involvement. *Clin Nephrol.* 2012;77(1):18-24.
42. Mok CC, Tong KH, To CH, Siu YP, Au TC. Tacrolimus for induction therapy of diffuse proliferative lupus nephritis: an open-labeled pilot study. *Kidney Int.* 2005;68(2):813-7.
43. Burgos PI, McGwin G, Pons-Estel GJ, Reveille JD, Alarcón GS, Vilá LM. US patients of Hispanic and African ancestry develop lupus nephritis early in the disease course: data from LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LXXIV). *Ann Rheum Dis.* 2011;70(2):393-4.
44. Hopkinson ND, Jenkinson C, Muir KR, Doherty M, Powell RJ. Racial group, socioeconomic status, and the development of persistent proteinuria in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2000;59(2):116-9.
45. Huong DL, Papo T, Beaufils H, Wechsler B, Blétry O, Baumelou A, et al. Renal involvement in systemic lupus erythematosus. A study of 180 patients from a single center. *Medicine (Baltimore).* 1999;78(3):148-66.
46. Isenberg D, Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Jayne D, et al. Influence of race/ethnicity on response to lupus nephritis treatment: the ALMS study. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(1):128-40.

47. Burgos PI, Perkins EL, Pons-Estel GJ, Kendrick SA, Liu JM, Kendrick WT, et al. Risk factors and impact of recurrent lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus undergoing renal transplantation: data from a single US institution. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2757-66.
48. Ward MM, Pyun E, Studenski S. Long-term survival in systemic lupus erythematosus. Patient characteristics associated with poorer outcomes. *Arthritis Rheum.* 1995;38(2):274-83.
49. Barr RG, Seliger S, Appel GB, Zuniga R, D'Agati V, Salmon J, et al. Prognosis in proliferative lupus nephritis: the role of socio-economic status and race/ethnicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(10):2039-46.
50. Gurevitz SL, Snyder JA, Wessel EK, Frey J, Williamson BA. Systemic lupus erythematosus: a review of the disease and treatment options. *Consult Pharm.* 2013;28(2):110-21.
51. Lech M, Anders HJ. The pathogenesis of lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(9):1357-66.
52. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int.* 2004;65(2):521-30.
53. Yang XW, Tan Y, Yu F, Zhao MH. Combination of anti-C1q and anti-dsDNA antibodies is associated with higher renal disease activity and predicts renal prognosis of patients with lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(9):3552-9.

54. Chen Z, Wang GS, Wang GH, Li XP. Anti-C1q antibody is a valuable biological marker for prediction of renal pathological characteristics in lupus nephritis. *Clin Rheumatol*. 2012;31(9):1323-9.
55. Akhter E, Burlingame RW, Seaman AL, Magder L, Petri M. Anti-C1q antibodies have higher correlation with flares of lupus nephritis than other serum markers. *Lupus*. 2011;20(12):1267-74.
56. Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, Bombardieri S, Cervera R, Dostal C, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(2):195-205.
57. Yildirim-Toruner C, Diamond B. Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *J Allergy Clin Immunol*. 2011;127(2):303-12; quiz 13-4.
58. Uchida K, Nitta K. Recent advances in the treatment of lupus nephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2012;16(2):202-13.
59. Alshayeb H, Wall BM, Gosmanova EO. Treatment of proliferative and membranous lupus nephritis: review of key clinical trials. *Am J Med Sci*. 2012;343(1):86-90.
60. Chan TM, Li FK, Tang CS, Wong RW, Fang GX, Ji YL, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *N Engl J Med*. 2000;343(16):1156-62.

61. Radhakrishnan J, Cattran DC. The KDIGO practice guideline on glomerulonephritis: reading between the (guide)lines--application to the individual patient. *Kidney Int.* 2012;82(8):840-56.
62. Austin HA, Illei GG, Braun MJ, Balow JE. Randomized, controlled trial of prednisone, cyclophosphamide, and cyclosporine in lupus membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):901-11.
63. Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol.* 2003;23(5):353-60.
64. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006;69(12):2131-47.
65. Johnstone DB, Holzman LB. Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2(5):271-82.
66. Bariéty J, Bruneval P, Meyrier A, Mandet C, Hill G, Jacquot C. Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2005;68(3):1109-19.
67. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005;54(6):1626-34.
68. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol.* 1997;139(1):193-204.

69. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(11):2440-5.
70. Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S, et al. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1475-83.
71. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998;1(4):575-82.
72. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1621-9.
73. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest.* 2001;108(2):289-301.
74. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005;37(7):739-44.
75. Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, et al. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(1):29-36.

76. Graham S, Gorin Y, Abboud HE, Ding M, Lee DY, Shi H, et al. Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(2):C304-15.
77. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int*. 2009;75(12):1340-8.
78. Kraft SW, Schwartz MM, Korbet SM, Lewis EJ. Glomerular podocytopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):175-9.
79. Mason LJ, Ravirajan CT, Rahman A, Putterman C, Isenberg DA. Is alpha-actinin a target for pathogenic anti-DNA antibodies in lupus nephritis? *Arthritis Rheum*. 2004;50(3):866-70.
80. Trivedi S, Zeier M, Reiser J. Role of podocytes in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(12):3607-12.
81. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus*. 2011;20(8):781-91.
82. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci*. 2000;320(2):112-6.

83. Lu J, Szeto CC, Tam LS, Lai FM, Li EK, Chow KM, et al. Relationship of intrarenal gene expression and the histological class of lupus nephritis -- a study on repeat renal biopsy. *J Rheumatol.* 2012;39(10):1942-7.
84. Kitamoto Y, Takeya M, Tokunaga H, Tomita K. Glomerular endothelial cells are maintained by vascular endothelial growth factor in the adult kidney. *Tohoku J Exp Med.* 2001;195(1):43-54.
85. Nakagawa T, Li JH, Garcia G, Mu W, Piek E, Böttinger EP, et al. TGF-beta induces proangiogenic and antiangiogenic factors via parallel but distinct Smad pathways. *Kidney Int.* 2004;66(2):605-13.
86. Ostalska-Nowicka D, Malinska A, Zabel M, Witkiewicz W, Nowicki M. Nephrotic syndrome unfavorable course correlates with downregulation of podocyte vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-2. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(3):472-8.
87. Lohela M, Bry M, Tammela T, Alitalo K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(2):154-65.
88. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7(5):661-6.
89. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D, et al. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004;65(6):2003-17.

90. Navarro C, Candia-Zúñiga L, Silveira LH, Ruiz V, Gaxiola M, Avila MC, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2002;11(1):21-4.
91. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int*. 2006;69(4):747-53.
92. García-Sánchez O, López-Hernández FJ, López-Novoa JM. An integrative view on the role of TGF-beta in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;77(11):950-5.
93. Lee HS. Pathogenic role of TGF- β in the progression of podocyte diseases. *Histol Histopathol*. 2011;26(1):107-16.
94. Durvasula RV, Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Mundel P, et al. Activation of a local tissue angiotensin system in podocytes by mechanical strain. *Kidney Int*. 2004;65(1):30-9.
95. Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, et al. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant*. 2007;7(4):914-22.
96. Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol*. 2012;26(1):1-10.

97. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, et al. Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis--relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(7):755-60.
98. Tsugawa K, Oki E, Suzuki K, Imaizumi T, Ito E, Tanaka H. Expression of mRNA for functional molecules in urinary sediment in glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(3):395-401.

6. Artigo

Podocyte-associated mRNA profile in lupus nephritis and its relationship with histopathology and inflammatory cell populations

Mariane dos Santos¹, Rafael Bringhenti², Patrícia Garcia Rodrigues¹, Jonathan Fraportti do Nascimento¹, Odirlei André Monticielo³, Andrese Aline Gasparin³, Waldir Pedro de Castro⁵, Francisco Veríssimo Veronese^{1,4}.

¹Graduate School of Medicine: Medical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Pathology Department of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ³Rheumatology Department of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴Nephrology Department of the Clinical Hospital of Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁵Nephrology Department of the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.

Corresponding author: Francisco Veríssimo Veronese MD, PhD. Serviço de Nefrologia, sala 2030, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, ZIP Code: 90035-003. Brazil. Fax: 55 51 3359-8121. e-mail: fveronese@hcpa.ufrgs.br

Short title: Podocyte mRNA in lupus nephritis

Number of tables: 2

Number of figures: 7

Abstract

Background: In lupus nephritis (LN), the deposition of immune complexes in glomeruli induces inflammation and podocyte excretion in the urine. The aims of this study were to quantify the expression of podocyte-associated mRNA in the kidney tissue and urine of patients with LN, and to correlate these values with patient histological classes and inflammatory infiltrate variables.

Patients and Methods: Thirty-three patients with active LN were included in the study, and were grouped according to the presence of mild (classes I and II) or moderate-to-severe (classes III, IV and V) immune deposits and inflammation. Messenger RNA levels of nephrin, podocin, podocalyxin, alpha-actinin 4, *transient receptor potential cation channel 6* (TRPC-6), and of the regulatory factors *Forkhead box P3* (FOXP3), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) e transforming growth factor beta (TGF- β) were quantified by real time polymerase chain reaction. Messenger RNA levels of podocyte-associated markers were correlated with histopathological features, the density of the intra-renal inflammatory infiltrate, proteinuria, renal function, and anti-dsDNA titers.

Results: Podocyte-associated mRNA expression was significantly lower in the renal tissue but higher in the urine of patients with LN as compared to controls. The expression of mRNA of subcellular podocyte components and of TGF β_1 and FOXP3 were significantly higher in the urine of patients with class III, IV and V LN. In classes III and IV, the most significant alterations were observed in podocin, podocalyxin, TRPC-6, and TGF β_1 mRNA levels, which may reflect the presence of more intense podocyte injury in proliferative disease. Nephrin, podocin, podocalyxin, TGF- β_1 and FOXP3 levels were correlated with

proteinuria, but not with disease duration, renal function or anti-dsDNA titers. The density of CD8⁺ T cells, B cells and macrophages in kidney biopsy samples were positively correlated with urinary levels of podocyte-associated mRNA. In kidney tissue, correlations were found between CD8⁺ T cells and the expression of TGF- β_1 and FOXP3. Podocin mRNA levels were able to predict pathological proteinuria after one year of follow up.

Conclusion: Podocyte-associated mRNA were significantly reduced in kidney tissue but increased in the urine of patients with active LN, especially in the presence of more intense immune deposits, as observed in proliferative LN. Inflammatory infiltrate density was associated with podocyte mRNA expression. The association between T cells and regulatory factors may reflect ongoing immune mechanisms in active LN.

Keywords: systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, podocytes, nephrin, podocin, VEGF-A, FOXP3.

Introduction

Lupus nephritis (LN) is present in 40 to 60% of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Its clinical manifestations include proteinuria, hematuria, and in some cases, severe kidney failure. The histological alterations observed in LN range from no visible lesions and mild mesangial proliferation to endocapillary proliferation and subendothelial deposits, crescent formation, necrosis, and intense glomerular and tubulointerstitial inflammation (1).

In several glomerulopathies (2-4) as well as in LN (5, 6), podocyte injury may suppress the renal expression of podocyte-associated molecules, and increase their urinary excretion (podocyturia). This process is associated with increased proteinuria, disease activity levels and with the progressive loss of kidney function (3, 5).

In SLE, self-reactive T- and B-cells produce proinflammatory cytokines such as IL-17 and antibodies to specific nuclear antigens which may also have cross-reactivity to podocyte antigens such as alpha-actinin (7, 8). The presence of glomerular immune complex deposits composed of IgG anti-double stranded DNA (dsDNA) and anti-nucleosome antibodies in the mesangium, capillary loops, tubular membranes and vessels, as well as a "full house" immunofluorescence patterns are both characteristic findings of SLE (9).

In SLE, the number and function of regulatory FOXP3⁺ T-cells (Tregs), which control the autoimmune processes in several diseases by suppressing proinflammatory mechanisms, appear to contribute to immune dysregulation by

impairing self-tolerance (10). Similar findings have also been reported in patients with LN (11).

Glomerular injury in LN may also be associated with the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which regulates vascular homeostasis, and is induced by transforming growth factor- β (TGF- β). VEGF is also produced by activated T cells and macrophages during the inflammatory response, and in patients with active LN, serum VEGF levels are high (12). Additionally, the increased expression of VEGF and TGF- β mRNA in patients with proliferative LN is higher than that observed in other histological classes (13).

However, the relationship between these mechanisms and the severity of podocyte injury and of alterations in the urine and kidney tissue of patients with LN is still unclear. In the present study, the expression of podocyte-associated mRNA and of regulating factors (VEGF-A, TGF- β and FOXP3) in different histological classes was investigated. The association between the mRNA of these molecules and the phenotype and cell density of the renal inflammatory infiltrate was also assessed.

Material and Method

Patients

A total of 33 adult patients with active SLE who had been recommended for kidney biopsies were recruited between March 2012 and September 2013 from the outpatient and inpatient units of the Nephrology and Rheumatology

Departments of the Clinical Hospital of Porto Alegre (HCPA) and the Nephrology Service of the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. LN activity was determined based on the following methods: presence of proteinuria, as measured by the proteinuria/creatinuria ratio (Pr/Cr) in isolated urine samples (pathological: 0.3-3.0; nephrotic: >3.0), active urinary sediment (hematuria and/or cell cylinders), positivity for anti-dsDNA antibodies, C3 and C4 intake, and presence or absence of altered kidney function. Two types of control group were used: a tissue control, consisting of the neoplasia fragments of 10 patients who underwent tumor nephrectomy and had no evidence of any other diseases, and a urine control, obtained from 10 healthy individuals. Volunteers were considered healthy if they reported no personal or family history of kidney disease, had blood pressure levels <140x90 mmHg, estimated GFR higher than 90 mL/min/1.73 m² and no evidence of hematuria or proteinuria in their urine. This study was approved by the Research Ethics Committee of the HCPA. All subjects agreed to participate in the study, and signed an informed consent form prior to enrollment.

Age, gender, ethnicity, duration of LN, systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP), as well as current medications and doses were recorded. Serum creatinine was measured by the Jaffe reaction (Modular P Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) traceable to isotope dilution mass spectrometry (ID-MS). Glomerular filtration rate was estimated by the CKD-EPI equation. Serum albumin, proteinuria (Pr/Cr) (assessed by the colorimetric Pyrogallol Red and Jaffe methods, respectively), C3 and C4 serum levels, anti-nuclear factor (ANF) and anti-dsDNA levels were also measured.

Histopathological diagnosis

Histopathological diagnosis

Each patient's first biopsy was included in the study. Histopathology was reviewed by a renal pathologist according to the following International Society of Nephrology and Renal Pathology Society criteria (16): minimal lesions (class I, N=1), mesangial proliferation (class II, n=7), focal proliferative (class III N=10), diffuse proliferative (class IV, N=11) and pure membranous glomerulonephritis (class V, N=4). The activity index (AI) of the kidney biopsy ranged from 0 to 24, and was computed based on the following factors: endocapillary proliferation, the glomerular infiltrate, *wire loops*, necrosis/karyorrhexis, crescents and the interstitial infiltrate. The chronicity index (CI), which ranged from 0 to 12, was calculated considering the presence of glomerular sclerosis, fibrous crescents, tubular atrophy and interstitial fibrosis.

Immunohistochemistry of CD8 T and CD20 lymphocytes, and CD68 macrophages

Cells in the biopsy infiltrate were phenotyped by immunohistochemistry using a peroxidase-based technique. The infiltrate was stained for CD8⁺ T-cytotoxic lymphocytes, CD20⁺ B lymphocytes and CD68⁺ macrophages.

Endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide in methanol (4.5%), and antigen retrieval was performed in a digital pressure cooker (Biocare Medical, Concord, CA, USA). B lymphocyte and macrophage

antigens were retrieved using a 10mM citrate buffer (pH 6.0), and T lymphocyte antigens were retrieved with a tris buffer (pH 8.0).

The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-CD20 antibodies (Dako, Carpinteria, CA, USA) at a 1:200 dilution in Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical, Concord, CA, USA); rabbit monoclonal anti-CD8 antibodies (Biocare Medical, Concord, CA, USA) at a 1:25 dilution in Van Gogh Yellow diluent (Biocare Medical, Concord, CA, USA) and mouse anti-CD68 monoclonal antibody (Biocare Medical, Concord, CA, USA) at a 1:500 dilution in Da Vinci Green Diluent (Biocare Medical, Concord, CA, USA).

CD20 staining was developed using a Romulin AEC Chromogen Kit (Biocare Medical, Concord, CA, USA), while T CD8 lymphocyte and CD68 macrophages were developed using a Betazoid DAB Chromogen Kit (Biocare Medical, Concord, CA, USA).

Quantification of cells in the kidney biopsy sample

The cell infiltrate was quantified using the *Image J* software (*Research Services Branch, National Institute of Health*, Bethesda, MA, USA), which analyzed cell expression in tubule-interstitial and glomerular regions. Tubular-interstitial fields were chosen using the Greek line method to avoid image field overlap. A mean of 30 fields per fragment were selected, and images at 400x magnification were acquired using Image ProExpress software (Media Cybernetics, Warrendale, PA, USA) (17). The total number of cells in CD8 (T lymphocytes), CD20 (B lymphocytes) and CD68 (macrophage) slides was

assessed using the *Cell Counter* tool in the *Image J* software. The size of the cortical area in each slide was measured in square millimeters (mm^2). The number of cells was then divided by cortical area to give the number of cells per mm^2 of cortex. Lastly, the number of cells inside the glomeruli in each immunohistochemical slide was divided by the total number of glomeruli, obtaining the number of each cell type in the glomerulus.

Quantification of podocyte-associated mRNA in kidney tissue and urine

Podocyte marker mRNA expression in kidney tissue and in the urinary sediment of a morning urine sample was assessed by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Messenger RNA Extraction and Complementary DNA Transcription

Messenger RNA was extracted from urine samples using the QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc. Chatsworth, CA, USA) according to manufacturer instructions. Urine samples were centrifuged for 10 min at 1800 rpm. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in buffered saline and centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes before being stored at -80°C until use. Total RNA concentration was quantified using the NanoDrop® 1000 Spectrophotometer v.3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). The 260/280 nm absorbance ratio was used to assess RNA purity. Reverse RNA transcription was performed using the High-Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the

manufacturer's instructions. The final volume of 20 μ L purified RNA was then stored at -20°C .

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using a Taqman[®] Universal PCR Master Mix. Specific primers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) to the following genes were used, according to manufacturer instructions: NPHS1, nephrin (ID:HS00190446_m1); NPHS2, podocin (ID: Hs00387817_m1); podocalyxin (ID:Hs01574644_m1); Transient receptor potential cation channel, member 6, TRPC6 (ID: Hs00989190_m1); alpha actinin-4 (ID:Hs00245168_m1); FOXP3 (ID: HS00203958_m1); VEGF-A (ID:HS00173626_m1) and TGF- β_1 (ID: HS00998133_m1). Additionally, 18s rRNA (Taqman[®] PDAR, Foster City, CA, USA) was used as an endogenous control for variations in the samples. RT-PCR was performed in duplicate in 96-well plates containing 2 μ L cDNA. Data were collected in the ABI PRISM SDS 7000 thermal cycler (Applied Biosystems), using the following cycling parameters 50 $^{\circ}\text{C}$ for 2 minutes, 60 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes, and 95 $^{\circ}\text{C}$ for 5 minutes, followed by 40 cycles at 94 $^{\circ}\text{C}$ for 20 seconds and 62 $^{\circ}\text{C}$ for 60 seconds. The relative quantification of target gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ comparative method, in which threshold cycle numbers (CT) were determined by the point at which a statistically significant increase in fluorescence was first detected.

Statistical Analysis

Data were presented as mean±standard deviation (SD), or median and percentiles (P25-P75). Associations between categorical variables were investigated using Chi-squared and Fisher's exact tests. RNA values were log-transformed to reduce asymmetry. Continuous variables were compared using ANOVA or Kruskal Wallis tests. Spearman correlation coefficients were used to assess the relationships between podocyte-associated mRNA, proteinuria, kidney function and inflammatory infiltrate cells. The predictive value of podocyte RNA on tissue and urine markers of reduced kidney function (eGFR < 60ml/min/1.73m²) and pathological proteinuria (PR/Cr > 1) was determined by logistic regression analysis. All analyses were performed using the SPSS software for Windows (version 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Significance was set at p < 0.05.

Results

Clinical characteristics

The demographic and clinical characteristics of subjects in the LN and control groups are displayed in table 1. Tissue control patients were older than individuals in the remaining groups, since kidney cancer is more prevalent in older age groups. No between-group differences were observed on any other demographic factors.

Twenty-eight (85%) of the 33 patients with LN received immunosuppressive treatments. These patients comprised all class III, IV or V

subjects in the sample, as well as three patients with class II LN. Patients with proliferative lesions were treated with intravenous methylprednisolone, followed by oral prednisone and six monthly doses of intravenous cyclophosphamide. Maintenance was performed with mofetil or sodium mycophenolate (N=15) or azathioprine (N=6), associated with 5 mg/day prednisone. Class V patients were treated with oral prednisone and mofetil mycophenolate (N=2) or azathioprine (N=2), while class II patients received oral prednisone. Twenty-six (78%) patients had chronic hydroxychloroquine use, while 20 (61%) received angiotensin inhibitors.

Activity and Chronicity Indices and LN Histological Classes

The severity of the activity grading was classified as follows: 0-7 (mild to moderate) and 8-15 (severe), while the CI was divided into 0-6 (mild to moderate) and 7-12 (severe). The distribution and extension of immune deposits was used to divide subjects into those with mesangial or endocapillary deposits only (classes I-II), and those with mesangial and/or subepithelial deposits (classes III-IV-V). AI values over seven were not found in any patients with class I or II LN, but were observed in 48% of class III-IV-V patients ($p=0.015$). CI scores over six were not found in any class I or II patients, and only in 12% of class III-IV-V patients ($p=0.422$), suggesting that most cases of LN in the sample were acute.

Proteinuria (≥ 3 , N=18 or <3 , N=15) was significantly associated with AI and CI values as assessed by kidney biopsy. Non-nephrotic patients had a mean AI of 2 (1-8), while nephrotic ones had a mean AI of 7 (2-13) ($P=0.014$).

The two groups of patients also displayed CI values of 0 (0-2) and 2 (2-4), respectively (P=0.007).

Correlation of podocyte associated mRNA expression in kidney tissue and urine

The expression of all forms of podocyte-associated mRNA save for FOXP-3 and VEGF-A was significantly lower in the kidney tissue of patients with LN than in that of control individuals (figure 1). When patients were categorized by histological class, no significant differences were found between mRNA expression in the biopsy molecules of class I-II versus class III-IV-V patients. However, urine mRNA levels were significantly higher in patients with LN than in controls (save for alpha actinin-4 and TRPC6) (figure 2). This discrepancy (as well as differences in TRPC-6 levels) was most significant for class III-IV-V patients (figure 3). The glomerular expression of podocyte-related mRNA in class I and II patients was also lower than that of controls. These results were found for nephrin (0.76[0.32-1.58] and 2.84[1.41-4.24], p=0.021), podocin (0.61[0.43-1.50] and 1.99[0.90-3.99], p=0.032), podocalyxin (0.70[-0.09 – 1.60] and 1.94[0.64-4.00], p=0.041), alpha-actinin-4 (0.10[-0.47- 0.96] and 2.27[0.45-3.70], p=0.026) and TGF- β_1 (-0.95[-0.21 – 0.36] and 1.00[-0.83 – 2.86], p=0.033).

In patients with LN, a strong positive correlation was observed between the expression of VEGF-A and TGF- β_1 mRNA in the kidney tissue (r=0.743, P<0.001) and urine (r=0.812, P<0.001). No correlations were found between the expression of podocyte-associated mRNA in the kidney tissue and proteinuria, eGFR and anti-dsDNA levels. However, correlations were observed between proteinuria and the levels of nephrin (r=0.531, p<0.001), podocin

($r=0.473$, $p=0.002$), podocalyxin ($r=0.398$, $p=0.005$), TGF- β_1 ($r=0.310$, $p=0.041$) and FOXP3 ($r=0.296$, $p=0.039$) RNA in the urine. The duration of LN was not correlated with podocyte-associated mRNA expression.

Correlation between cells in the inflammatory infiltrate

Figure 4 shows the results of immunohistochemical analyses for the presence of cytotoxic CD8⁺ T cells, B CD20⁺ lymphocytes and CD68⁺ macrophages. The median level of each inflammatory marker in tubulointerstitial (TI) and intraglomerular (IG) regions was quantified in cells/mm² and compared between class I-II and class III-IV-V patients. The results of these analyses are displayed in Figure 5. The number of CD8⁺ cells was significantly higher in class III-IV-V patients. Although the density of CD68⁺ macrophages was greater in class III-IV-V patients, this result did not reach statistical significance, probably due to the presence of significant variability in the number of CD68⁺ cells in the biopsy (TI = classes I-II: 23(3-143) vs. III-IV-V: 79(2-515), $p=0.145$; IG: classes I-II: 1.6(0.6-3.1) vs. III-IV-V: 4.0(0.6-7.0), $p=0.100$). The number of CD20⁺ B lymphocytes in the biopsy of TI and IG regions did not differ between groups.

The correlation between inflammatory infiltrate cells and podocyte-associated mRNA expression in renal tissue and urine are shown in figures 6 and 7. Unlike B lymphocytes and macrophages, CD8⁺ T cell expression was correlated with TGF- β_1 and FOXP3 mRNA in the kidney biopsy. Positive correlations were also observed between CD8⁺ T cells and nephrin, podocin, podocalyxin and alpha actinin-4 in urine samples. Podocin and podocalyxin

levels were also significantly correlated with B lymphocyte, nephrin, and macrophage expression.

Positive associations were also identified between proteinuria and cell infiltrate density in all phenotypes studied. The median and percent values corresponding to the amount of CD8⁺, CD20⁺ and CD68⁺ cells in the TI biopsies of nephrotic versus non-nephrotic patients, were, respectively: 175(49-281) vs. 40(19-83), p=0.003; 14(3-52) vs. 1.5(0.3-4.0), p=0.002; and 116(23-186) vs. 25(8-63), p=0.011. Differences between these two groups were also observed in the number of CD8⁺ cells in glomerular biopsies: 0.52(0.10-1.25) vs. 0.07(0.01-0.45), p=0.031. No correlations were found between the inflammatory infiltrate and renal function or anti-dsDNA serum levels.

Clinical and molecular characteristics of class IV patients as compared to those with other histological classes

Patients with class IV proliferative LN were compared to individuals with class III proliferative LN and to subjects with class I-II-V non-proliferative LN. Class IV patients had lower serum C3 and C4 levels and a greater AI than individuals in the other two groups. Baseline TFG was also lower in class IV patients than in the other two groups, although this difference was not statistically significant. Class IV patients were also found to express higher levels of TRPC6 and TGF- β_1 mRNA in kidney tissue and lower levels of podocin, podocalyxin and TGF- β mRNA in urine samples than class III and I-II-V patients. The density of T CD8⁺ cells and CD68⁺ macrophages in the TI and glomerular inflammatory infiltrate of class IV patients was also higher than that observed for patients with other histological classes.

Kidney deposits and podocyte mRNA expression

The intensity of glomerular IgG and C3 deposits in capillary loops and in the mesangium were assessed by immunofluorescence and semi-quantitatively scored from 0 to 3+. The presence of kidney deposits was also categorized as absent to mild (0 to 1+) or moderate to severe (2+ to 3+). Most class I-II patients (75% of cases) obtained scores of 0 to 1+ for IgG and C3 deposits, while 14 (56%) and 16 (64%) of class III-IV-V patients received scores of 2+ and 3+, respectively ($p < 0.05$). Our results also revealed that patients whose biopsies had a greater intensity or distribution of deposits (scores 2+ to 3+) also had higher urinary nephrin mRNA levels (3.54 [2.68-4.10] vs. 2.45 [1.98-3.51], $p = 0.047$), TRPC6 (2.83 [2.01-4.02] vs. 1.6 [0.81-2.51], $p = 0.012$), TGF- β_1 (3.12 [2.46-3.89] vs. 2.15 [1.60-2.88], $p = 0.021$) and FOXP3 levels (3.40 [2.61-4.25] vs. 2.05 [1.42-3.16], $p = 0.041$). Patients with more intense kidney deposits were also found to have higher VEGF-A mRNA levels than those with fewer deposits (-0.61 [-1.13 – 0.04] vs. 0.10 [-0.51 – 1.43], $p = 0.016$).

Relationship between podocyte-associated mRNA and clinical outcomes

A logistic model adjusted for the presence of class II and IV LN revealed that the expression of podocyte-associated mRNA in kidney tissue or urine samples did not predict TFG below 60 ml/min/1.73 m² after a median of 14 months of treatment. By the end of the study period, ten of the 33 participants had Pr/Cr ratios over 1. This outcome was predicted both by the expression of podocin mRNA in kidney tissue (*Odds Ratio*, OR=2.417 [95%CI 1.131-5.167], $P = 0.023$) and in urine samples (OR=3.309 [95%CI 1.246-8.792], $P = 0.016$). These results

suggest that the likelihood of developing a Pr/Cr ratio over 1 are 2.4 times greater in individuals with reduced mRNA levels in a baseline biopsy specimen, and 3.3 times greater if urinary podocin mRNA levels are elevated. Although urinary podocalyxin (OR=1.845 [95%CI 0.930-3.660], P=0.080), alpha actinin-4 (OR=2.660 [95%CI 0.927-7.628], P=0.069) and FOXP3 mRNA levels (OR=1.768 [95%CI 0.923-3.386], P=0.086) were positively associated with proteinuria, they were not significant predictors of proteinuria according to the regression model.

Discussion

The present study assessed the expression of podocyte-associated mRNA in the kidney tissue and urine of patients with active LN. Podocyte-associated RNA expression was associated with patient histological class, the density of TI and IG inflammatory infiltrate and with immune-regulating factors such as VEGF-A, TGF- β and FOXP3. As in previous studies (3, 5, 6, 11, 14, 15), we found that the expression of podocyte-associated mRNA was higher in the kidney tissue but lower in the urine samples of patients with active LN as compared to control groups. We also found higher urinary levels of TGF- β , VEGF-A and FOXP3 mRNA in patients as opposed to controls. The latter results were most pronounced in class III, IV and V patients, who had a greater intensity of immune deposits distributed in subendothelial and/or subepithelial layers and in the mesangium, as demonstrated in the present study. Podocyte-associated mRNA expression was also more pronounced in these individuals than in class I and II patients, suggesting an association between histological class and the extension of immune deposits in glomerular capillaries. However, the expression of podocyte-associated mRNA in the kidney tissue of class I and II patients was also lower than that observed in healthy controls, which may indicate that systemic autoimmunity may lead to early podocyte dysfunction, podocytopathy and proteinuria, even in the presence of minimal immune complex deposition or in the absence of endocapillary proliferation (16). This hypothesis was corroborated by Desai et al (17), who revealed the presence of diffuse and homogeneous podocyte fusion in the visceral epithelial cells of patients with membrane LN with nephrotic proteinuria, regardless of the intensity of immune deposits.

In SLE, high-affinity anti-DNA antibodies and anti-nucleosomes activate complement components and accumulate in the glomeruli, fusing with resident cells and altering their functioning. Proinflammatory cytokines promote the infiltration of lymphocytes and monocytes into the glomerulonephritic kidney, leading to the accumulation of immune complexes and tissue damage, resulting in compromised cell viability, apoptosis and fibrosis (7, 18). Experimental studies have found that the administration of anti-DNA and anti-alpha actinin antibodies results in subepithelial and subendothelial deposits, extensive podocyte fusion and proteinuria (19). Some studies postulate that structural podocyte dysfunction, as assessed by the degree of glomerular podocytopenia and consequent podocyturia, may be proportional to the degree of nephritis (6, 20). Rezende et al (21) demonstrated that impairments in the expression of podocyte biomarkers in biopsy samples were more evident in patients with proliferative LN than in those with pure membranous LN, suggesting that the former may be associated with structural podocyte lesions, while the latter are more likely to involve podocyte dysfunction. In the present study, due to the small number of patients with pure membranous LN, all individuals with non-proliferative lesions were grouped and compared to those with proliferative forms of the disease. As expected, patients with proliferative lesions had a more aggressive clinical and immunological profile than the remainder of the sample, and presented with higher urinary podocyte and TGF- β mRNA levels than subjects with nonproliferative lesions. This finding may be indicative of greater podocyte loss with the concomitant activation of pro-fibrotic pathways, which may contribute to the worse prognosis of these histological classes.

T cell lineages such as CD4, CD8 and CD4CD25 FOXP3⁺, and B cells have all been found to be involved in tissue damage regardless of the presence of antibodies. The presence of these cells has also been noted in the inflammatory infiltrate of LN. The most common form of glomerular injury involves the recruitment of macrophages, which act as inflammatory effector cells and are involved in the reactivity of T cells to specific nuclear antigens. The induction of inflammation by Th17 cells is also a potent mediator of glomerular injury in LN (7, 18). Therefore, the influx of inflammatory cells into the glomeruli may lead to cytotoxic activity and result in podocyte injury and dysfunction. To assess the association between these factors, we investigated the correlations between the density of the inflammatory infiltrate (composed of CD8⁺, B CD20⁺ and T cells, CD68⁺ macrophages) and the expression of podocyte-associated mRNA and regulatory molecules involved in the physiopathogenesis of LN. As was expected, patients with proliferative lesions displayed higher numbers of cytotoxic T lymphocytes and macrophages, as well as elevated urinary and glomerular mRNA expression, especially of slit diaphragm and podocyte cytoskeleton proteins. As well as leading to podocyte injury, inflammatory processes affect several subcellular compartments, interfering with slit diaphragm complexes and with the reorganization of the podocyte cytoskeleton and pedicels. These mechanisms lead to apoptosis and podocyte detachment, podocytopenia and podocyturia, and studies suggest that abnormalities in the expression of podocyte-associated mRNA in the kidney tissue and urine, respectively, are indirect indicators of podocytopathy in LN (3, 5, 6, 14) and in other glomerulopathies (Rodrigues PG et al, impress), such as diabetic nephropathy (22).

The diagnostic and prognostic potential of podocyte biomarkers for the activity and progression of glomerular disease has been found to be greater than that of traditional parameters such as proteinuria and serum creatinine in several experimental (23) and clinical studies (3). The present study assessed the predictive value of podocyte mRNA for worse kidney function and proteinuria adjusting for histological class. Kidney tissue and urinary podocin mRNA levels were predictive of elevated proteinuria ($Pr/Cr > 1$), but were not associated with reduced kidney function. However, this outcome was only reported in a small ($N=7$) number of patients, and was only measured after 14 months of follow-up. Recently, Wickman et al (3) studied several glomerulopathies including 29 cases of LN, and found that urinary nephrin and podocin mRNA were elevated during the active phase of the disease, but returned to baseline after remission. More importantly, the podocin/creatinine ratio in urine was 79 times higher in patients with glomerulopathies as compared to controls. Additionally, the podocin/creatinine ratios in cases in which approximately 50% of kidney function had been lost or which progressed to chronic terminal kidney failure (CTKF) were approximately 31 to 100 times greater than in control participants. These data corroborate the hypothesis of podocyte involvement in glomerular sclerosis and progressive renal failure.

Growth factors such as TGF- β and VEGF play an important role in inflammation, tissue repair and the progression to renal fibrosis in glomerular disease. The TGF- β is a potent mediator of VEGF secretion, which explains the strong correlation observed between the levels of these two substances in both tissue and urine samples (13). Recent data has shown that, in patients with class IV LN, urinary TGF- β and VEGF mRNA excretion is significantly higher

than that observed in other histological classes, so that the levels of these substances may be more accurate in discriminating between activity levels than clinical markers such as the SLEDAI index and proteinuria (13). In a separate study, these authors (15) found that the expression of VEGF mRNA was reduced in the kidney tissue of patients with proliferative LN, but displayed a positive correlation with urinary podocytes and a negative association with endocapillary proliferation, histological activity and crescent formation. After one year, 53% of patients with reduced VEGF expression in kidney biopsy specimens lost all kidney function. The present results also revealed that urinary TGF- β and VEGF-A mRNA levels were higher in patients with LN as compared to controls. Additionally, class III and IV patients had lower TGF- β levels in kidney tissue but higher such levels in the urine when compared to patients with non-proliferative LN.

Regulatory CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells (Tregs) suppress the function of effector T cells, inhibit antigen-specific immune responses and secrete anti-inflammatory cytokines such as TGF- β and IL-10 in cases of autoimmune disease and graft rejection (24). Patients with SLE present a lower number of Tregs, resulting in reduced suppressant activity, especially in active phases of the disease (25). In experimental models, Treg depletion induces the expansion of self-reactive T cells and antibody production (26). In a clinical study, Xing et al (27) observed a reduction in circulating FOXP3⁺ tregs and an increase in urinary TGF- β in patients with LN, suggesting an association between these two biomarkers and the pathogenesis of kidney disease. In agreement with our findings, Wang et al (11) also demonstrated high urinary FOXP3 mRNA in patients with active LN, especially in the presence of proliferative lesions. These

authors also found correlations between FOXP3 mRNA expression, SLEDAI index values, proteinuria and nephritic activity. An interesting finding in our study was that, in acute LN, both FOXP3 and TGF- β expression had a positive correlation with CD8+ T cell infiltrates in kidney biopsy specimens, suggesting that the acute inflammatory responses in LN are associated with Treg-induced suppression of effector T cell function.

When combined, these data suggest that the monitoring of podocyte-associated mRNA expression and of inflammatory regulatory factors may have important clinical applications for the treatment of active LN, both as clinical evolution markers and as possible molecular targets for new LN therapies. However, to date, molecular studies of podocyte markers in LN do not include more than 50 patients and have short follow-up periods, so that any results regarding the prognostic value of such markers in LN are highly speculative.

Some of the limitations of our study include its small sample size, which had a significant impact on the categorization of patients by histological class. Additionally, given the variability of patient TFG levels at the time of the biopsy, these molecules' mRNA levels may need to be corrected for renal function using the logarithmic mRNA/creatinine ratio. It is also important to assess the long-term treatment effects on functional and structural podocyte recovery by comparing responders and non-responders to treatment.

In conclusion, this study showed that patients with active LN have lower podocyte-associated mRNA levels in kidney tissue, but increased such levels in the urine, especially in the presence of proliferative lesions and class IV LN. We found associations between the intensity of immune deposits, the density of the

inflammatory infiltrate and the expression of podocyte markers. These findings are compatible with the autoimmune patterns expected in SLE. Further research is necessary to determine whether these substances could act as diagnostic and prognostic biomarkers for the early detection of kidney damage in patients with active LN.

Acknowledgements:

The authors would like to thank the Research Incentive Fund of the Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE/HCPA) for their financial support, the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for the graduate fellowship awarded to Mariane dos Santos, and the Laboratory of Molecular Biology in Nephrology of the Nephrology Department of the Clinical Hospital of Porto Alegre for the technical support.

Conflicts of interest: We declare no conflicts of interest.

References

1. Lewis EJ, Schwartz MM. Pathology of lupus nephritis. *Lupus*. 2005;14(1):31-8.
2. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, et al. Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Nov;14(11):2958-66.
3. Wickman L, Afshinnia F, Wang SQ, Yang Y, Wang F, Chowdhury M, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2013 Dec;24(12):2081-95.
4. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, Szeto CY, Yip TW, Woo KS, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta*. 2005 Nov;361(1-2):182-90.
5. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li KM, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urinary sediment of patients with lupus nephritis. *J Rheumatol*. 2007 Dec;34(12):2358-64.
6. Bollain-Y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-Del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol*. 2011 Jul;21(3):166-71.

7. Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med*. 2010 Feb;16(2):47-57.
8. Renaudineau Y, Deocharan B, Jousse S, Renaudineau E, Putterman C, Youinou P. Anti-alpha-actinin antibodies: a new marker of lupus nephritis. *Autoimmun Rev*. 2007 Aug;6(7):464-8.
9. Markowitz GS, D'Agati VD. Classification of lupus nephritis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009 May;18(3):220-5.
10. Sawla P, Hossain A, Hahn BH, Singh RP. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus (SLE); role of peptide tolerance. *Autoimmun Rev*. 2012 Jul;11(9):611-4.
11. Wang G, Lai FM, Tam LS, Li EK, Kwan BC, Chow KM, et al. Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis--relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology (Oxford)*. 2009 Jul;48(7):755-60.
12. Edelbauer M, Kshirsagar S, Riedl M, Billing H, Tönshoff B, Haffner D, et al. Soluble VEGF receptor 1 promotes endothelial injury in children and adolescents with lupus nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2012 May;27(5):793-800.
13. Avihingsanon Y, Phumesin P, Benjachat T, Akkasilpa S, Kittikowit V, Praditpornsilpa K, et al. Measurement of urinary chemokine and growth factor

messenger RNAs: a noninvasive monitoring in lupus nephritis. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(4):747-53.

14. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci.* 2000 Aug;320(2):112-6.

15. Avihingsanon Y, Benjachat T, Tassanarong A, Sodsai P, Kittikovit V, Hirankarn N. Decreased renal expression of vascular endothelial growth factor in lupus nephritis is associated with worse prognosis. *Kidney Int.* 2009 Jun;75(12):1340-8.

16. Kraft SW, Schwartz MM, Korbet SM, Lewis EJ. Glomerular podocytopathy in patients with systemic lupus erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Jan;16(1):175-9.

17. Desai N, Cimbaluk D, Lewis EJ, Whittier WL. Proteinuria in membranous lupus nephritis: the pathology is in the podocyte. *Lupus.* 2013 Apr;22(5):461-8.

18. Yung S, Chan TM. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:139365.

19. Zhao Z, Weinstein E, Tuzova M, Davidson A, Mundel P, Marambio P, et al. Cross-reactivity of human lupus anti-DNA antibodies with alpha-actinin and nephritogenic potential. *Arthritis Rheum.* 2005 Feb;52(2):522-30.

20. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertias G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus*. 2011 Jul;20(8):781-91.
21. Rezende G, Viana V, Malheiros D, Borba E, Silva N, Silva C, et al. Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? *Lupus*. 2014;23(3):255-62.
22. do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, Rodrigues PG, Joelsons G, dos Santos M, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy. *BMC Nephrol*. 2013;14:214.
23. Fukuda A, Wickman LT, Venkatareddy MP, Wang SQ, Chowdhury MA, Wiggins JE, et al. Urine podocin:nephrin mRNA ratio (PNR) as a podocyte stress biomarker. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Nov;27(11):4079-87.
24. Dummer CD, Carpio VN, Gonçalves LF, Manfro RC, Veronese FV. FOXP3+ regulatory T cells: from suppression of rejection to induction of renal allograft tolerance. *Transpl Immunol*. 2012 Jan;26(1):1-10.
25. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*. 2004 Feb;59(2):198-202.

26. Bagavant H, Tung KS. Failure of CD25+ T cells from lupus-prone mice to suppress lupus glomerulonephritis and sialoadenitis. *J Immunol.* 2005 Jul;175(2):944-50.

27. Xing Q, Su H, Cui J, Wang B. Role of Treg cells and TGF- β 1 in patients with systemic lupus erythematosus: a possible relation with lupus nephritis. *Immunol Invest.* 2012;41(1):15-27.

Table 1. Clinical and demographic characteristics of patients with lupus nephritis and control subjects

	<i>Cases</i>	<i>Controls</i>		<i>p</i>
		<i>Urine</i>	<i>Tissue</i>	
N	33	10	10	N
Age (years)	31±14 ^a	32±9 ^a	59±9 ^b	Age (years)
Sex (female)	29 (80)	8(80)	6 (60)	Sex (female)
Ethnicity (Caucasian)	23 (69.7)	10 (100)	9 (90)	Ethnicity (Caucasian)
Duration of SLE(months)	21±36	-	-	Duration of SLE(months)
SBP (mm/Hg)	133±23 ^a	117±5 ^b	111±9 ^b	SBP (mm/Hg)
DBP (mm/Hg)	78±18	77±5	71±7	DBP (mm/Hg)
Serum creatinine (mg/dl)	1.78±1.58 ^a	0.77±0.13 ^b	0.96±0.11 ^b	Serum creatinine (mg/dl)
eGFR (ml/min./1.73m ²)	73 ±39 ^a	106±13 ^b	95±14 ^b	eGFR (ml/min./1.73m ²)
Proteinuria (PCR)	3.3±2.9 ^a	0.06±0.02 ^b	0.06±0.05 ^b	Proteinuria (PCR)

Serum albumin	3.2±0.9 ^a	4.7±0.3 ^b	4.4±0.4 ^b	Serum albumin
Serum C3	68±36	-	-	Serum C3
Serum C4	11±9	-	-	Serum C4
Serum Anti-dsDNA	320±147	-	-	Serum Anti-dsDNA
Activity Index	6±5	-	-	Activity Index
Chronicity Index	2±3	-	-	Chronicity Index

SLE: Systemic lupus erythematosus; SBP: systemic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; PCR: proteinuria/creatinuria ratio; eGFR: estimated glomerular filtration rate; ^{a,b}: letters denote significant between-group differences in mean ± SD values (p<0.05). P-values were obtained through Chi-squared or Fisher's Exact Test, or ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc comparisons.

Table 2. Comparison of clinical and histological parameters and podocyte-associated mRNA levels between patients with proliferative lupus nephritis and those with non-proliferative forms of the disease

	Class IV (n=11)	Class III (n=10)	Classes I, II e V (n=12)	p
eGFR	28 (19 - 98)	74 (24 - 98)	88 (61 - 116)	0,304
PCR	4,99 (2,53 - 6,8)	4,62 (2,5 - 6,1)	2,41 (0,4 - 3,9)	0,063
AI	12,6 (12 - 14) ^a	5,3 (2 - 7,25) ^b	1,3 (1 - 2) ^b	< 0,001
Serum C3	40 (33 - 61) ^a	83 (57 - 107) ^b	86 (69 - 114) ^b	0,001
Serum C4	7 (6 - 10) ^a	14 (8 - 26) ^b	18 (12 - 21) ^b	0,008
Serum anti-dsDNA (dilution)	320 (100 - 320)	320 (160 - 320)	120 (27 - 280)	0,228
RNAm Podocina urina	3.80 (2.90 - 4.80) ^a	3.60 (2.90 - 4.50) ^a	2.50 (2.0 - 3.10) ^b	0.024
Urinary podocalyxin mRNAm	3.60 (2.75 - 4.20) ^a	3.20 (2.50 - 4.30) ^a	2.0 (1.20 - 2.40) ^b	0.008
Urinary TGβ mRNA	3.21 (2.52 - 3.85) ^a	2.90 (2.21 - 3.63) ^a	1.80 (1.61 - 2.63) ^b	0.015
Tissue TGβ mRNA	-0.7 (-1.4 - -0.16) ^a	- 0.4 (-0.22 - 1.22) ^a	0.6 (-0.5 - 1.7) ^b	0.028

Tissue	TRPC6	-1.23 (-1.61 - -0.34) ^a	-0.25 (-1.57 - -0.66) ^b	0.45 (-0.80 - 1.88) ^c	0.010
mRNA					
CD8 ⁺ T cells					
TI		147.6 (71- 255) ^a	106.9 (35.5 - 172) ^a	36.6 (18.3 - 51.6) ^b	0.060
IG		0.8 (0.5 - 1.5) ^a	0.2 (0.09 - 1.2) ^a	0.06 (0.008 - 0.2) ^b	0.002
Macrophages					
TI		136.6 (47.6 - 238.6) ^a	47.7 (9.6 - 98.4) ^b	22.6 (6.8 - 90.4) ^b	0.048
IG		7.0 (4.7 - 16) ^a	3.5 (0.9 - 5.3) ^a	0.6 (0.2 - 2.7) ^b	< 0.001

AI: Activity Index; eGFR: estimated glomerular filtration rate; PCR: proteinuria/creatinuria ratio; TI: tubulointerstitial; IG: intraglomerular; ^a, ^b or ^c: letters denote significant between-group differences in mean ± SD values (p<0.05).

Figure 1. Messenger RNA expression in kidney tissue

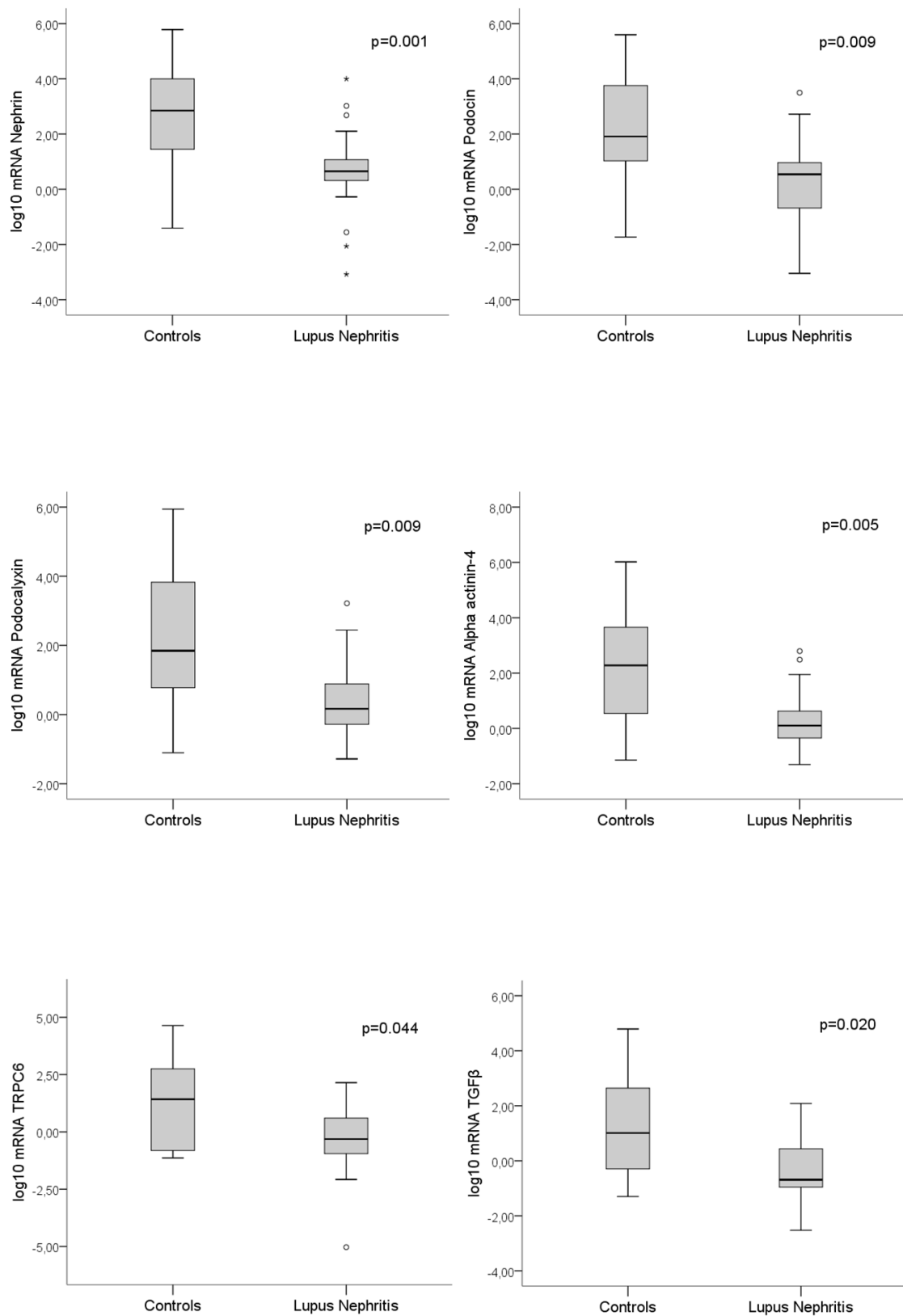


Figure 2. Messenger RNA expression in urine

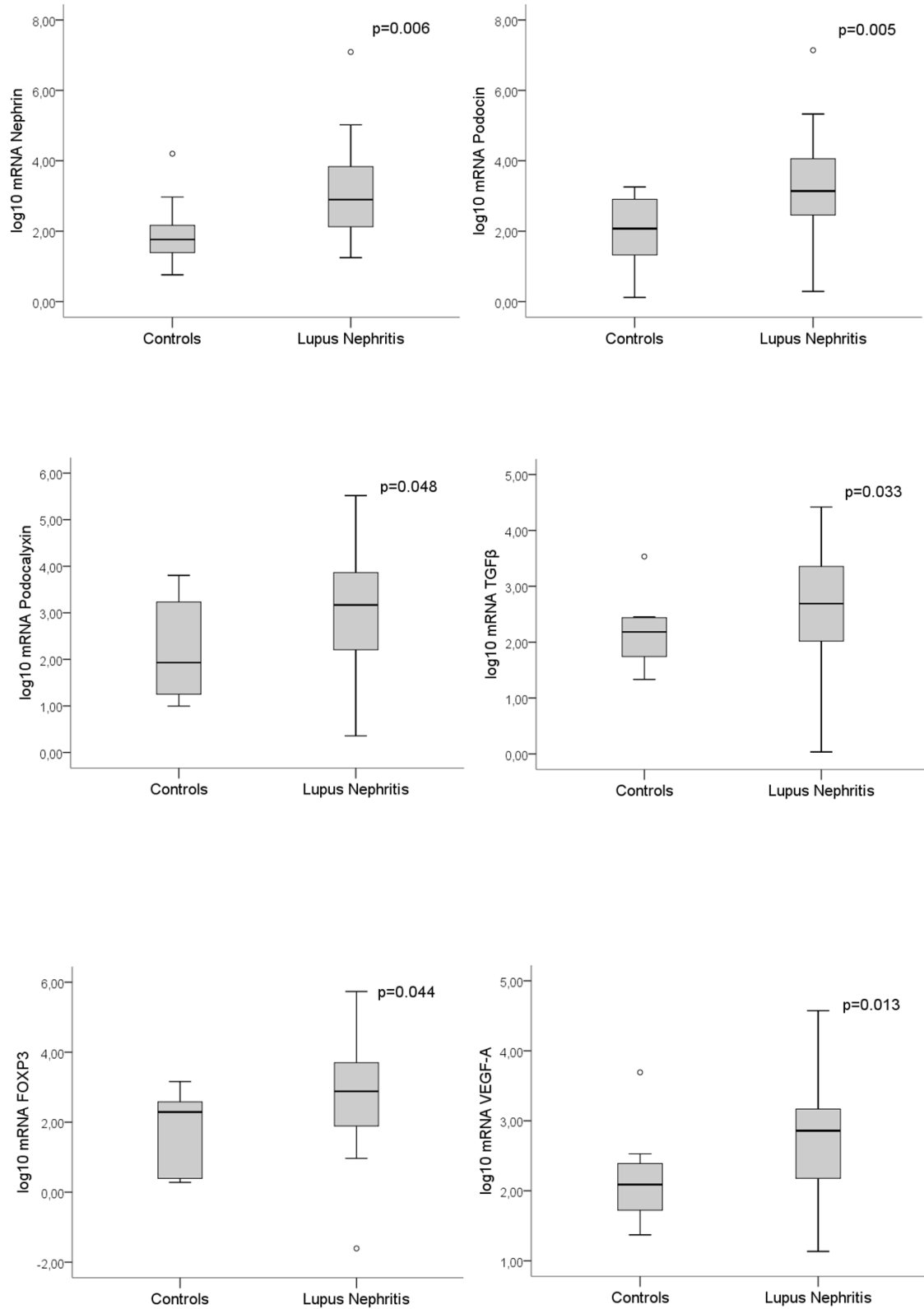
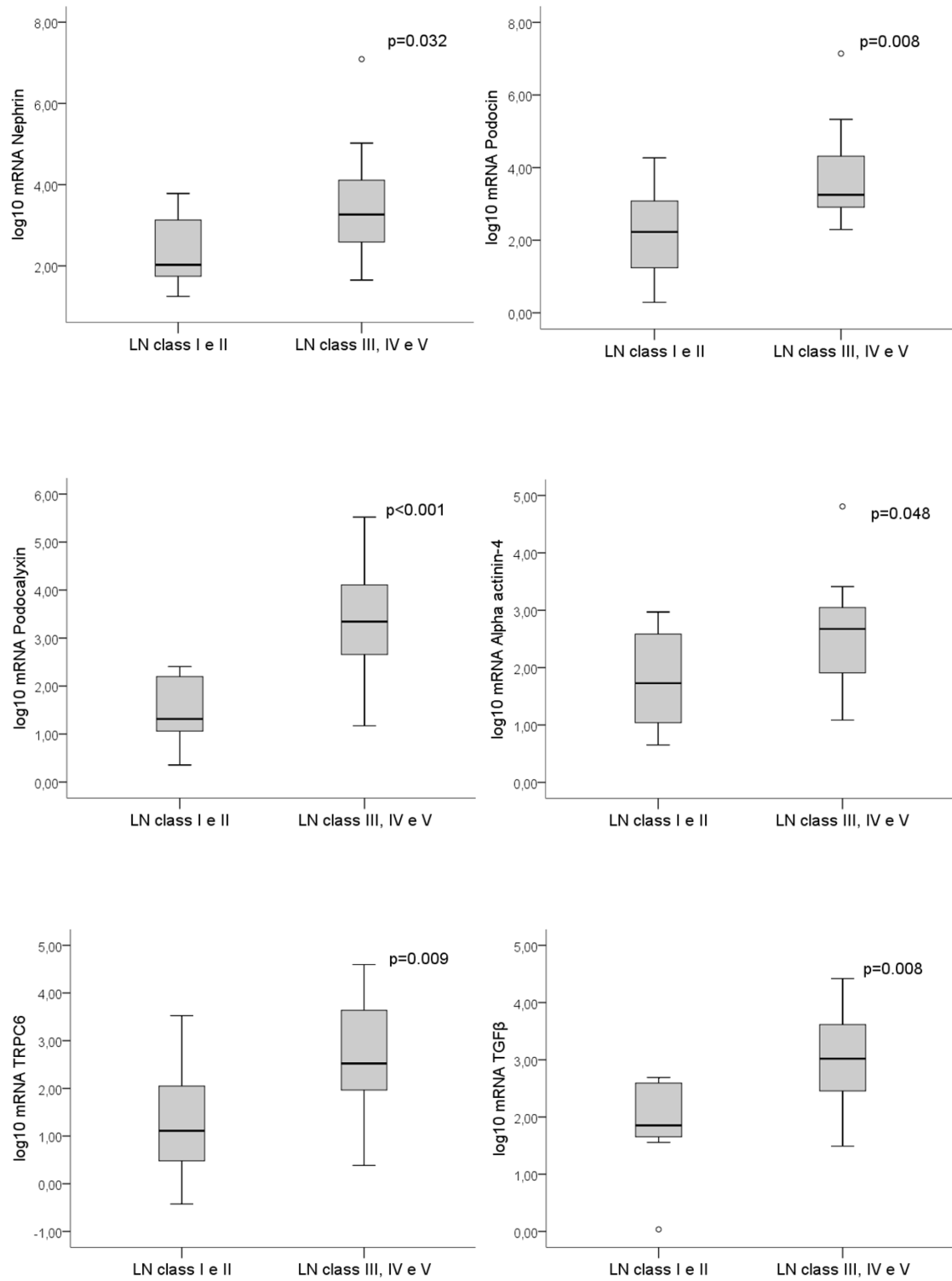


Figure 3. Messenger RNA expression in urine



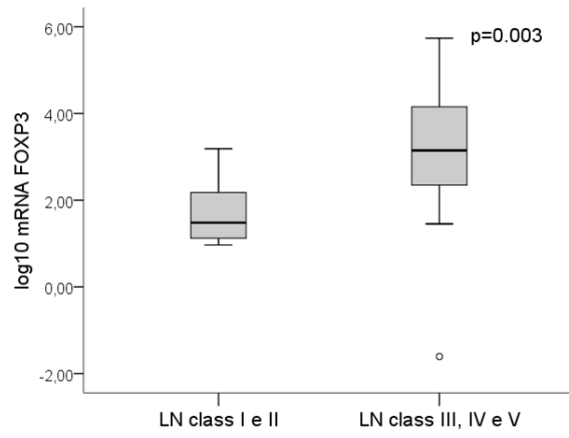


Figure 4. Immunostaining of the inflammatory cells

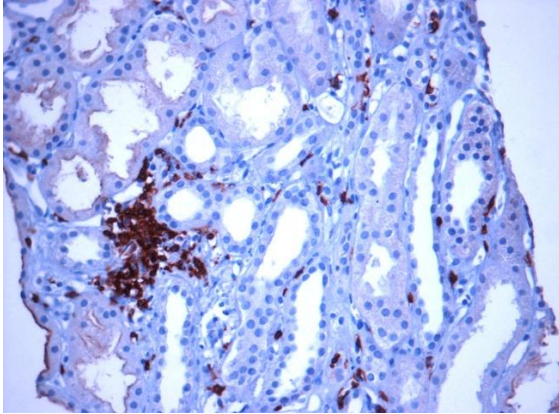
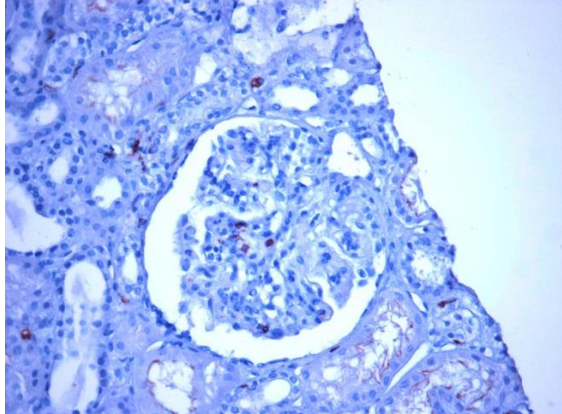
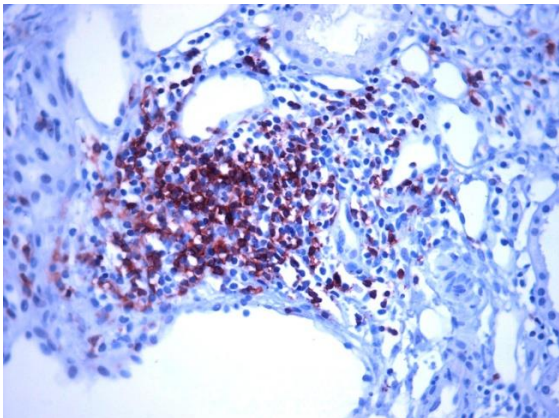
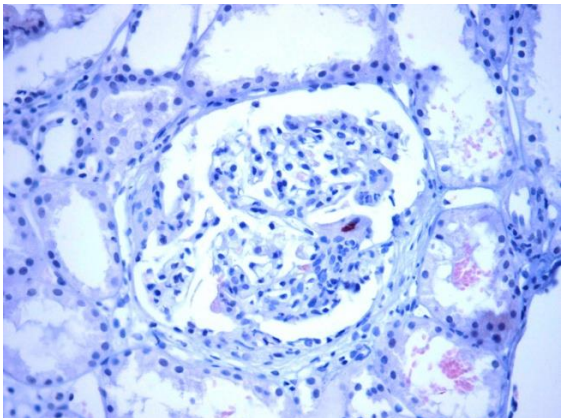
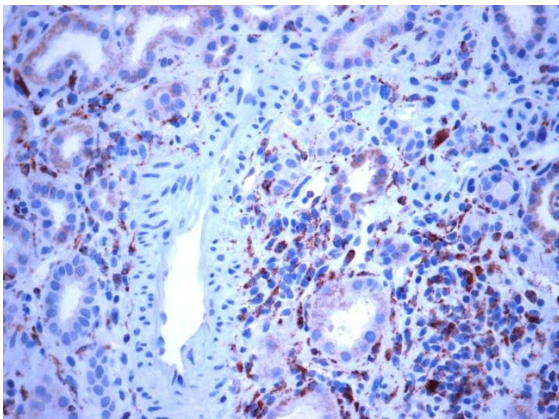
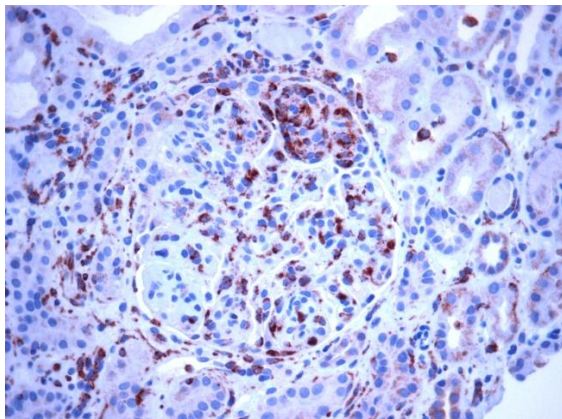
Panel A. CD8⁺ T cells (TI)Panel B. CD8⁺ T cells (IG)Panel C. CD20⁺ B cells (TI)Panel D. CD20⁺ B cells (IG)Panel E. CD68⁺ macrophages (TI)Panel F. CD68⁺ macrophages (IG)

Figure 5. Quantification of inflammatory cells in kidney biopsies

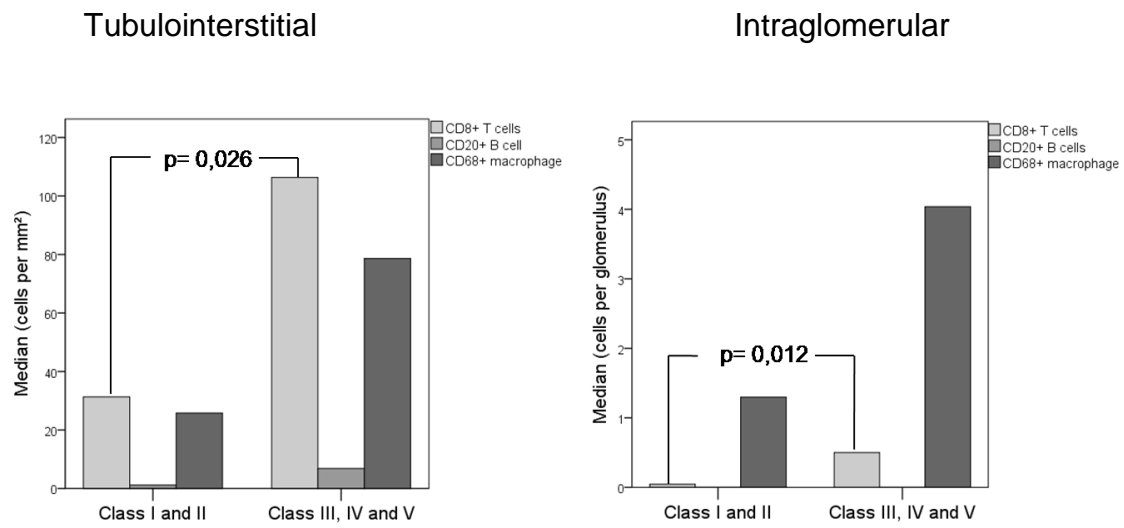
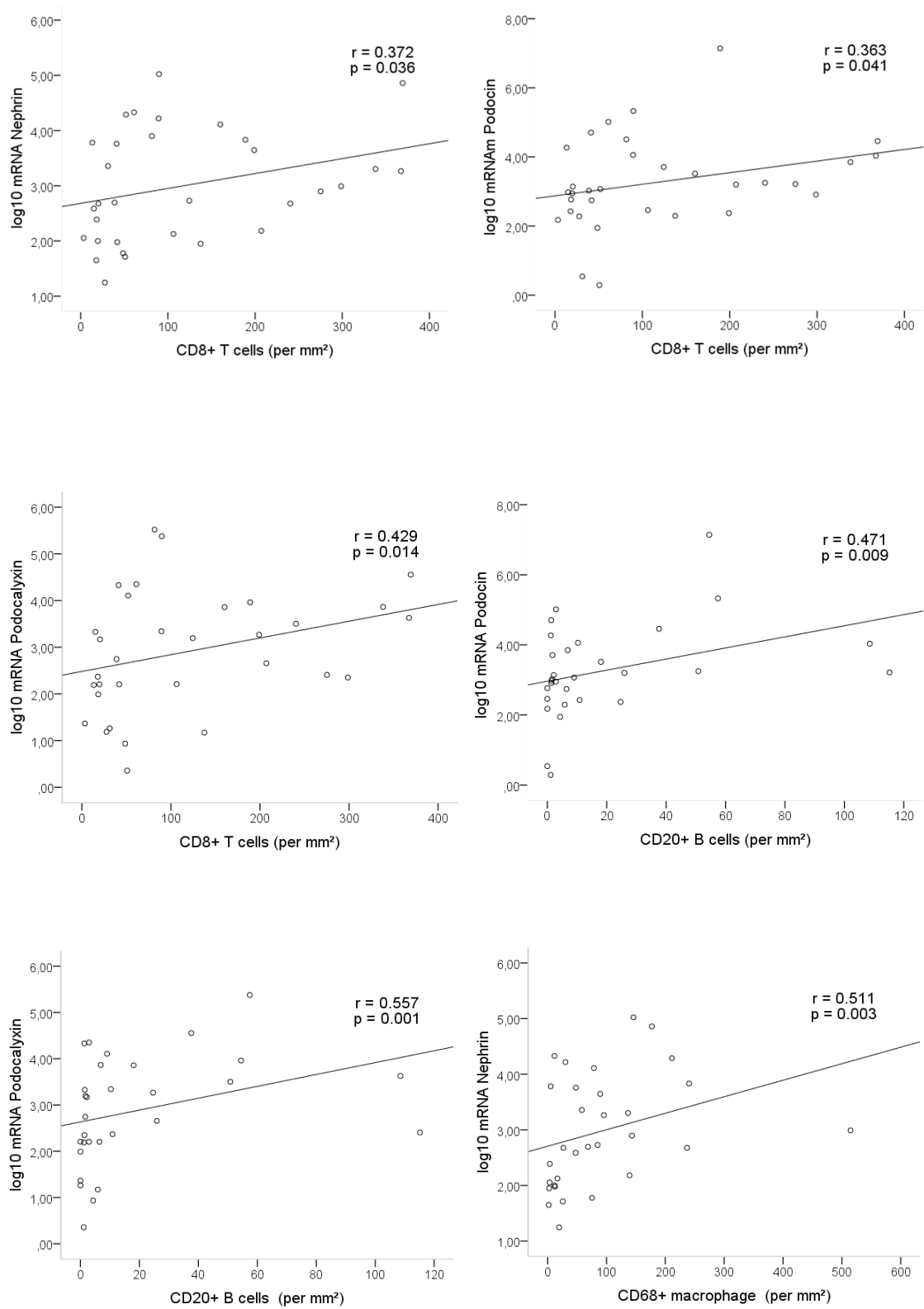


Figure 6. Correlations of mRNA and inflammatory cells in urine



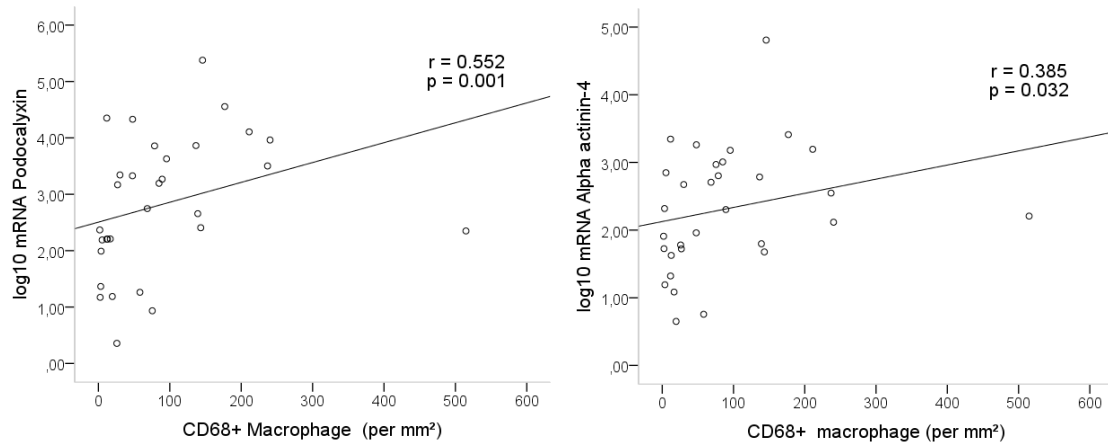


Figure 7. Correlations of mRNA and inflammatory cells in kidney tissue

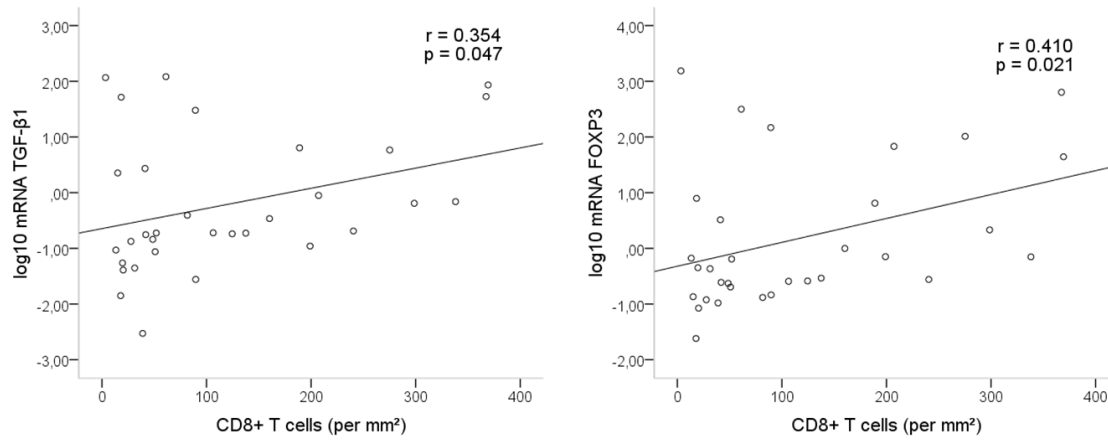


Figure legends:

Figure 1. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in kidney tissue of patients with lupus nephritis compared to controls.

Figure 2. Messenger RNA expression of podocyte-associated molecules in urine of patients with lupus nephritis compared to controls.

Figure 3. Urine podocyte-associated mRNAs of patients with lupus nephritis class I and II compared to class III, IV and V.

Figure 4. Immunostaining of the inflammatory cell infiltrates in tubulointerstitial and glomerular compartments of the kidney biopsy. Panels A and B: CD8⁺ T cells in the tubulo-interstitium and in the glomerulus; Panels C and D: CD20⁺ B cells in the tubulo-interstitium and in the glomerulus; Panels E and F: Macrophages CD68⁺ in the tubulo-interstitium and in the glomerulus (original magnification X 400 in Panels A-F).

Figure 5. Median number of CD8⁺ T cells, CD20⁺ B cells and macrophages CD68⁺ in the tubulo-interstitium and glomeruli compartments of the kidney biopsy in LN classes I and II as compared to LN classes III, IV and V.

Figure 6. Correlations podocyte-associated mRNAs in urine and the cells of the tubulointerstitial and glomerular infiltrate of lupus nephritis.

Figure 7. Correlations of podocyte-associated mRNAs in kidney tissue and cells of the tubulointerstitial and glomerular infiltrate of lupus nephritis

7. Conclusões e Perspectivas

A nefrite lúpica (NL) em suas diversas formas de manifestação tem uma prevalência elevada, podendo acometer até metade dos pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico (LES). É uma doença potencialmente grave, e dependendo da severidade da lesão e do tipo de resposta ao tratamento imunossupressor, o paciente pode evoluir para doença renal crônica (DRC) terminal e necessidade de diálise ou transplante, gerando custos elevados para o sistema de saúde.

As podocitopatias são consideradas hoje a base fisiopatológica de muitas doenças glomerulares, entre elas a NL. Os mecanismos de lesão podocitária, que envolvem insultos hemodinâmicos, tóxicos, auto-ímmunes, inflamatórios e metabólicos, têm sido amplamente investigados nos últimos 15 anos em diversos laboratórios em todo o mundo. Torna-se primordial, principalmente para os casos refratários às drogas imunossupressoras e aos agentes biológicos hoje disponíveis no arsenal terapêutico da NL, identificar novos alvos e assinaturas moleculares para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais específicas, que auxiliem no controle da doença, assim evitando a progressão para fibrose renal irreversível e necessidade de substituição da função renal por diálise ou transplante.

A identificação da lesão podocitária no tecido renal (podocitopenia) e na urina (podocitúria) por análise molecular, como o PCR em tempo real, e outros métodos como a imunohistoquímica e imunofluorescência, torna possível o melhor entendimento da injúria glomerular e do podócito, uma vez que tem valor preditivo de atividade de doença e progressão para DRC. Se a

podocitopatia for identificada e tratada precocemente, poderia se impedir ou pelo menos retardar a progressão da NL para DRC, influenciando positivamente a sua evolução e prognóstico.

Em conclusão, este estudo ainda com resultados preliminares pode demonstrar, em acordo com outros dados da literatura, que pacientes em fase aguda da NL apresentam redução da expressão do RNAm de marcadores do podócito no tecido renal, o que é compatível com podocitopenia, e um concomitante aumento de sua excreção na urina, o que sugere a presença de podocitúria. A podocitúria foi de maior magnitude nos pacientes com NL com depósitos mais intensos e difusos de localização endocapilar e/ou subepitelial, o que sugere a existência de correlação entre a podocitúria e as classes histológicas mais graves da NL, como a proliferativa focal (classe III) e a difusa (classe IV) e a glomerulonefrite membranosa (classe V). Ainda são necessários estudos com um maior número de pacientes em cada classe histológica da NL e envolvendo outras glomerulopatias, com acompanhamento longitudinal a longo prazo, que investiguem a expressão do RNAm tecidual e urinário das proteínas do podócito antes e depois da terapia imunossupressora em comparação com o marcador hoje utilizado de dano glomerular que é a proteinúria, determinando os seus valores prognósticos e as suas acurácias para o desenvolvimento de DRC progressiva.

8. Anexos

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr.(a) a participar do estudo: “ANÁLISE MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DO PODÓCITO NA NEFRITE LÚPICA E SUA CORRELAÇÃO COM O TIPO HISTOLÓGICO E GRAU DE ATIVIDADE E CRONICIDADE” com o objetivo de identificar alterações dos rins relacionadas a sua doença, o lúpus. O lúpus pode fazer com que os rins percam proteínas, o que se chama de nefrite do lúpus. O objetivo dessa pesquisa é entender por que isto ocorre, através de análises de uma biópsia do rim e de uma amostra de urina. A biópsia só será feita por indicação do seu médico, para que ele possa determinar o tipo de nefrite e decidir o melhor tratamento para ela. Os procedimentos a que o (a) Sr.(a) será submetido são: primeiro uma coleta de urina, minutos antes da biópsia, e após a realização da biópsia do rim orientada por ecografia, que será realizada ou pela equipe assistencial ou no Serviço de Radiologia, o que será decidido pela equipe médica. Normalmente são removidos dois fragmentos de rim, uma para um exame chamado anatomo-patológico e outro para outro exame chamado imunofluorescência. Se o fragmento for suficientemente grande, será removido um pequeno fragmento de tecido, que junto com a urina, serão analisados no Laboratório do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Do próprio exame anatomo-patológico serão separadas dez lâminas para outras análises em nosso laboratório. Caso os dois fragmentos retirados sejam

pequenos (< 1 cm), será necessário repetir a biópsia e remover um terceiro fragmento para coleta de material suficiente para as análises laboratoriais.

A coleta de urina no frasco que não oferece nenhum risco. A biópsia do rim é um procedimento que envolve riscos de complicações, mas que são incomuns quando se usa ecografia para orientar a biópsia. A complicação mais frequente é a perda de sangue pela urina (que não se enxerga, só se detecta em exame da urina pois é microscópica) que ocorre em quase todos os casos, e não requer nenhum tratamento específico. Menos frequentemente podem ocorrer hematomas ao redor ou dentro do rim (1 a 2% das biópsias), em geral pequenos, que podem dar dor na região das costas do lado biopsiado. Em menos de 1% das biópsias pode ocorrer hemorragia mais grave com necessidade de cirurgia para estancar o sangramento. Conforme as orientações de rotina dadas pela sua equipe médica, para evitar estas complicações e tratá-las com a maior brevidade é necessário permanecer em repouso absoluto no leito por pelo menos 12 horas após a biópsia, e estar em jejum por 6 horas antes da biópsia e 4 horas após.

Serão analisados também dados do seu prontuário do hospital, para informações sobre a sua doença e os exames que foram feitos. Esses dados serão coletados sigilosamente, e só serão divulgados sem a sua identificação.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para o (a) Sr.(a), mas a sua ajuda será muito importante para se descobrir que alterações tem os rins e a urina de um paciente com nefrite pelo lúpus, o que poderá ajudar no tratamento e no controle desta doença.

Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr (a) poderá entrar em contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia pelos telefones 3359-8295, 3359-8121, ou ainda pelo telefones celulares da pesquisadora Mariane dos Santos (9438-9517) e do Dr. Francisco Veronese (9969-3920). Ainda em caso de urgências pode ser feito contato com o plantão do Serviço de Nefrologia do HCPA, telefones 3359-8121 e 3359-8294. Para esclarecimentos éticos o Sr (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 3359-7640.

Eu, _____ aceito participar desse estudo/
aceito que meu familiar _____ participe e declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

Nome do paciente ou responsável legal

Nome do pesquisador

Assinatura do paciente ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles

O Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo presente termo de consentimento convida o (a) Sr (a) a participar do estudo: “ANÁLISE MOLECULAR DAS PROTEÍNAS DO PODÓCITO NA NEFRITE LÚPICA E SUA CORRELAÇÃO COM O TIPO HISTOLÓGICO E GRAU DE ATIVIDADE E CRONICIDADE” com o objetivo de identificar alterações dos rins. O objetivo dessa pesquisa é entender por que isto ocorre. Embora o(a) Sr.(a) não tenha esta doença mas necessita remover um rim por outro problema como indicado pelo seu médico, estamos lhe convidando para participar da pesquisa e assim fazer parte de um grupo de comparação, para poderemos entender melhor as diferenças entre os que tem e os que não tem lúpus no rim. Os procedimentos aos quais o(a) Sr.(a) será submetido serão uma coleta de amostra de urina antes da cirurgia e quando o seu rim estiver sendo removido na cirurgia, ser feita uma biópsia de um pequeno fragmento do rim, e isto não lhe causará qualquer prejuízo pois todo o rim será retirado como tratamento de sua doença. Esse tecido junto com a urina coletada será analisado no Laboratório do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A coleta de urina no frasco não oferece nenhum risco às pessoas.

Nenhum benefício financeiro será obtido na participação do presente estudo tanto para o Serviço de Nefrologia, quanto para o(a) Sr.(a), mas a sua ajuda será muito importante para se descobrir que alterações tem os rins e a urina de um paciente com nefrite pelo lúpus, o que poderá ajudar no tratamento e no controle desta doença.

Para seu esclarecimento a qualquer momento ou em caso de necessidade o Sr.(a) poderá entrar em contato com os membros da equipe de pesquisa do Serviço de Nefrologia pelos telefones 3359-8295, 3359-8121, ou ainda pelo telefones celulares da pesquisadora Mariane dos Santos (9438-9517) e do Dr. Francisco Veronese (9969-3920). Ainda em caso de urgências pode ser feito contato com o plantão do Serviço de Nefrologia do HCPA, telefones 3359-8121 e 3359-8294. Para esclarecimentos ético o Sr(a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 3359-7640.

Eu, _____ aceito participar desse estudo/aceito que meu familiar _____ participe e declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre o presente estudo;
- Da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuação de meu cuidado e tratamento;
- Do caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;
- Da disponibilidade de tratamento médico caso existam complicações causadas por esta pesquisa;
- De que não terei despesas por participar do estudo.

Nome do paciente ou responsável legal

Nome do pesquisador

Assinatura do paciente ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

Anexo 3. Ficha de coleta de dados

Identificação

Nome					Protocolo n°	
Idade		Sexo	<input type="checkbox"/> 1=Masc <input type="checkbox"/> 2=Fem	Etnia	<input type="checkbox"/> 1=Branco <input type="checkbox"/> 2=Negro	Registro HCPA

Dados clínicos e exames laboratoriais

Hipertensão arterial: () Sim () Não PAS: ____/____mmHg PAD:____/____mmHg	Medicações em uso e doses (incluir data de início)
Albumina sérica (mg/dl):	1.
Creatinina sérica (mg/dl):	2.
EQU: hemácias____cilindros____	3.
Índice proteinúria/creatininúria na urina:	4.
	5.
TFGe (ml/min/1,73 m ²):	6.
C3	7.
C4	8.
Anti-DNAs	9.
FAN	10.

Análise Molecular

URINA

Gene/RNA	Quantificação do RNAm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Nefrina	
Podocina	
Podocalixina	
Alfa actinina-4	
TGF- β_1	
FOXP3	
VEGF-A	
TRPC6	

TECIDO RENAL

Gene / RNAm	Quantificação do RNAm ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Nefrina	
Podocina	
Podocalixina	
Alfa actinina-4	
TGF- β_1	
FOXP3	
VEGF-A	
TRPC6	

Análise Imunohistoquímica:**TECIDO RENAL**

Tipo de célula do infiltrado	Contagem digital
Linfócito T citotóxico CD8+	
Linfócito B CD20+	
Macrófago CD68+	