Leonardo de Abreu Testagrossa

**Estudo de aspectos
moleculares podocitários nas
variantes histológicas da
glomerulosclerose segmentar e focal**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Denise Maria
Avancini Costa Malheiros

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Testagrossa, Leonardo de Abreu

Estudo de aspectos moleculares podocitários nas variantes histológicas da glomerulosclerose segmentar e focal / Leonardo de Abreu Testagrossa. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientadora: Denise Maria Avancini Costa Malheiros.

Descritores: 1.Glomerulosclerose segmentar e focal 2.Podócitos
3.Imunoistoquímica 4.Glomerulosclerose/classificação

USP/FM/DBD-171/11

Dedico

***Aos meus pais, Antonio Carlos e Jozélia,
eternos espelhos dos valores***

***À minha esposa, Clarissa, e às minhas filhas Giulia e
Giovana, que tornam qualquer sacrifício
suportável. Com as minhas desculpas pelos
longos períodos de ausência.***

À família Abreu, fonte de orgulho e inspiração

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus.

À Profa. Denise Maria Avancini Costa Malheiros, pela orientação, paciência e confiança, que se tornaram amizade e parceria.

Ao Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto, pelos inestimáveis ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Venancio Avancini Ferreira Alves, pelas dicas preciosas para o projeto.

Aos Profs. Drs. Luis Balthazar Saldanha, Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Maria Cláudia Nogueira Zerbini pelo incentivo ao longo da carreira de patologista.

Ao Prof. Dr. Aristides Chetto de Queiroz, da disciplina de patologia da Universidade Federal da Bahia, que me mostrou a beleza da patologia durante a graduação.

À Profa. Dra. Viktoria Woronik e à Dra. Adriana Gelmetti, pela ajuda com os dados clínicos dos pacientes.

Ao Dr. Aloisio Souza Felipe da Silva, pelo apoio e amizade.

À secretária Ingrid Marta Franke pela ajuda com o levantamento dos casos.

Às biomédicas Cristina Maria Podestá e Andrea Monteiro Peixoto, pelas reações imuno-histoquímicas e organização primorosa dos casos.

Às minhas irmãs Carla e Mariana, pelo carinho e compreensão.

Finalmente, aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da USP, da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, e da Anatomia Patológica do Fleury, pela paciência e colaboração.

Agradecimento

Ao apoio financeiro: Fundação de amparo à pesquisa do Estado
de São Paulo- FAPESP

Relatório científico e prestação de contas do projeto
apresentados e aprovados

“A sabedoria não se transmite, é preciso que nós a descubramos fazendo uma caminhada que ninguém pode fazer em nosso lugar e que ninguém nos pode evitar, porque a sabedoria é uma maneira de ver as coisas.”

Marcel Proust

Normalização adotada

Esta tese segue as seguintes normas em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver);

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Cestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *list of Journals Indexed in Index Medicus*

Sumário

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Morfologia e imunofluorescência da GESF.....	03
1.2 Etiologia.....	04
1.3 Fisiopatogenia da GESF.....	06
1.3.1 Caracterização morfológica e estrutural do podócito.....	06
1.3.2 Caracterização molecular do podócito.....	08
1.3.3 Resposta podocitária à lesão na GESF.....	10
1.4 Classificação de Columbia.....	12
2 OBJETIVOS.....	20
3 MÉTODOS.....	22
3.1 Seleção dos casos e critérios de exclusão.....	23
3.2 Revisão das biópsias.....	24
3.3 Imuno-histoquímica.....	24
3.4 Análise imuno-histoquímica	27
3.5 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 Classificação morfológica	30
4.2 Imuno-histoquímica.....	34
4.2.1 Marcadores de diferenciação do podócito.....	35
4.2.2 Marcadores de desdiferenciação do podócito.....	41
4.2.3 Marcadores do citoesqueleto e membrana do pedicelo	46
4.2.4 Marcadores de MBG.....	53

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	54
5.1 Classificação histológica.....	55
5.2 Achados imuno-histoquímicos.....	60
5.3 Considerações finais e perspectivas.....	67
6 CONCLUSÕES	68
7 ANEXOS	71
8 REFERÊNCIAS	76

Lista de tabelas

TABELA 1- Classificação etiológica da GESF.....	05
TABELA 2- Principais características morfológicas das variantes da GESF segundo a classificação de Columbia	16
TABELA 3- Anticorpos primários utilizados	27
TABELA 4- Distribuição segundo idade e número de glomérulos dos casos GESF analisados no estudo.....	31
TABELA 5 - Classificação dos casos de GESF primária diagnosticados no HC-FMUSP comparada com casuística de outro centro internacional.....	31
TABELA 6- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores de diferenciação podocitária nas variantes da GESF.....	37
TABELA 7- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno- histoquímica do marcador CD10 nas lesões glomerulares dos casos estudados.....	38
TABELA 8- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno- histoquímica do marcador WT-1 nas lesões glomerulares dos casos estudados	38

TABELA 9- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores de desdiferenciação podocitária nas variantes da GESF	43
TABELA 10- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a neo-expressão imuno-histoquímica do marcador CK8/18 nas lesões glomerulares dos casos estudados.....	44
TABELA 11- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a neo-expressão imuno-histoquímica do marcador CK19 nas lesões glomerulares dos casos estudados	44
TABELA 12- Comparação dos grupos das variantes COL+CEL versus TIP+NOS+PHI segundo a expressão imuno-histoquímica do marcador de divisão celular Ki-67 nas lesões glomerulares dos casos estudados	44
TABELA 13- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores do citoesqueleto e membrana dos pedicelos	48
TABELA 14- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno-histoquímica do marcador α -actinina-4 nas lesões glomerulares dos casos estudados	49

TABELA 15- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno- histoquímica do marcador GLEPP-1 nas lesões glomerulares dos casos estudados	49
--	----

Lista de figuras

- FIGURA 1- Desenho esquemático de podócito para ilustrar sua disposição espacial sobre a MBG. O retângulo em vermelho realça dois pedicelos adjacentes, que serão detalhados na figura 2.....pg. 07
- FIGURA 2- Desenho esquemático demonstrando a disposição das moléculas nos pedicelos podocitários (α -actinina-4, actina, GLEPP-1, podocina e sinaptopodina), na MBG (dístroglicanos) e no diafragma podocitário (nefrina) pg. 10
- FIGURA 3- Algoritmo para classificação da GESF conforme critérios de Columbia pg. 18
- FIGURA 4- Distribuição das variantes da GESF conforme classificação de Columbia em 131 casos do HC-FMUSP..... pg. 30
- FIGURA 5- Variante NOS da GESF, presença de esclerose do tufo circundada por coroa podocitária no lado direito (HE, 400x) pg. 32
- FIGURA 6- Variante COL da GESF, presença de colapso do lado esquerdo do tufo, circundado por podócitos hiperplásicos (Masson, 400x) pg. 32
- FIGURA 7- Variante TIP da GESF, presença de esclerose no pólo apical do glomérulo, em contato com a saída do túbulo proximal (PAS, 400x) pg. 33
- FIGURA 8- Variante PHI da GESF, presença de esclerose e hialinização no hilo do glomérulo (PAS, 400x)..... pg. 33
- FIGURA 9- Variante CEL da GESF, presença de hiper celularidade endocapilar, com células de aspecto xantomatoso (HE, 400x) pg. 34
- FIGURA 10- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de CD10 em podócitos pg. 39
- FIGURA 11- Glomérulo de GESF COL com CD10 negativo em podócitos da lesão pg. 39

FIGURA 12- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de WT-1 em podócitos	pg. 40
FIGURA 13- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de vimentina em podócitos	pg. 40
FIGURA 14- Glomérulo de GESF COL com neo-expressão de CK8/18 em podócitos da lesão	pg. 45
FIGURA 15- Glomérulo de GESF NOS negativo para CK8/18 em podócitos	pg. 45
FIGURA 16- Glomérulo de GESF COL positivo para Ki-67 em podócitos da lesão	pg. 46
FIGURA 17- Glomérulo de GESF COL negativo para α -actinina-4 em podócitos da lesão	pg. 50
FIGURA 18- Glomérulo de GESF TIP positivo para α -actinina-4 em podócitos	pg. 50
FIGURA 19- Glomérulo de controle normal positivo para GLEPP-1 em podócitos	pg. 51
FIGURA 20- Glomérulo de GESF COL negativo para GLEPP-1 em podócitos da metade superior do tufo	pg. 51
FIGURA 21- Glomérulo normal positivo para sinaptopodina em podócitos	pg. 52
FIGURA 22- Glomérulo de GESF TIP negativo para sinaptopodina em podócitos da lesão	pg. 52
FIGURA 23- Glomérulo de GESF TIP positivo para colágeno IV em membrana basal e em trecho esclerótico	pg. 53

Lista de abreviaturas e siglas

C1q e C3	Frações C1q e C3c do sistema complemento
CALLA	Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
CD2AP	Proteína associada ao CD2
CD10, CD35	“Cluster of differentiation”, números 10 e 35
CEL	Variante celular da GESF
CK	Citoqueratina
COL	Variante colapsante da GESF
DAB	Diaminobenzidina
DAP	Divisão de Anatomia Patológica
DNA	Deoxyribonucleic acid
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
G1, S	Fases G1 e S do ciclo celular
GESF	Glomerulosclerose Segmentar e Focal
GLEPP-1	“Glomerular Epithelial Protein 1”
GNM	Glomerulopatia membranosa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Hospital das Clínicas
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIVAN	Nefropatia associada ao HIV
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ki-67	Proteína do gene MKI67
MBG	Membrana basal glomerular
NLM	Nefropatia por lesões mínimas
NOS	Variante usual, ou sem outras especificações da GESF
NPHS 1	“Gene nephrosis 1, congenital, Finnish type (nephrin).”
p27, p21, p57	Proteínas inibidoras das ciclinas dependentes de quinases
PAMS	Coloração Prata Metenamina

PAS	Ácido Periódico de Schiff
PAX-2	“Paired Box gene 2”
PBS	Tampão salina-fosfato
PCNA	“Proliferating Cell Nuclear Antigen”
pH	Potencial hidrogeniônico
PHI	Variante perihilar da GESF
SV-40-	Simian vírus 40
TIP	Variante de lesão apical (tip lesion) da GESF
USP	Universidade de São Paulo
WT-1	Proteína do “Wilms Tumor Supressor gene
ZO-1	“Zonula Occluden protein 1”

Resumo

Testagrossa, LA. *Estudo de aspectos moleculares podocitários nas variantes histológicas da Glomerulosclerose Segmentar e Focal [tese]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: A Glomerulosclerose Segmentar e Focal (GESF) é a glomerulopatia primária mais prevalente no Brasil e sua incidência vem aumentando no mundo inteiro. Na sua forma primária, caracteriza-se clinicamente por acometer pessoas jovens e causar proteinúria acentuada, geralmente acompanhada de síndrome nefrótica. O mecanismo patogênico tem como evento principal a lesão ao podócito, desencadeado por fatores de natureza variada: vírus, drogas/medicamentos, imunológicos, etc. Em 2004, foi publicada a classificação de Columbia, propondo 5 variantes morfológicas distintas na GESF: colapsante (COL), usual (NOS), apical ou *tip lesion* (TIP), perihilar (PHI) e variante celular (CEL). Diversos estudos comprovam alterações moleculares em podócitos na GESF. Essas alterações são observadas em diversos sítios podocitários: em moléculas envolvidas na fenda de filtração (*slit diaphragm*), por exemplo, nefrina, podocina e CD2AP; em moléculas do citoesqueleto podocitário, como a α -actinina-4 e sinaptopodina; em moléculas marcadoras de diferenciação dos podócitos, como CD10 e WT-1; e ainda em marcadores de divisão celular como Ki-67 e PCNA. Os objetivos desse estudo foram: 1-) classificar as lesões morfológicas de GESF em biópsia renais nas 5 variantes da GESF propostas na Classificação de Columbia; e 2-) analisar a ocorrência de alterações moleculares podocitárias nestes casos. **MÉTODOS:** Foram selecionados 131 casos de biópsias renais com diagnóstico de GESF primária no período de 1996 a 2006. Os casos foram classificados de acordo com os critérios de Columbia e posteriormente submetidos a reações imuno-histoquímicas para os marcadores CD10, WT-1, vimentina, sinaptopodina, α -actinina-4, GLEPP-1, citoqueratina 8/18, citoqueratina 19 e Ki-67. Os resultados foram submetidos à análise estatística através do teste qui-quadrado. **RESULTADOS:** A classificação das variantes da GESF se distribuiu da seguinte forma: 38,2% de variante NOS, 36,6% de variante

COL, 14,5% de variante TIP, 6,9% de variante PHI e 3,8% de variante CEL. Os casos da variante COL se destacaram das demais variantes pela perda de expressão de marcadores de diferenciação celular, como o CD10 e o WT-1 ($p<0,01$), perda da molécula do citoesqueleto α -actinina-4 ($p<0,01$) e neo-expressão de citoqueratinas 8-18 ($p<0,05$) e 19 ($p<0,01$). Adicionalmente, os casos das variantes COL e CEL se destacam das outras variantes pela expressão do marcador de divisão celular Ki-67 ($p<0,05$). **CONCLUSÃO:** a variante COL destacou-se das demais em relação às alterações moleculares observadas na análise imuno-histoquímica. O diagnóstico diferencial desta forma de GESF tem importância clínica por ela estar associada a pior evolução e prognóstico em relação às demais variantes. A integração destes marcadores na rotina diagnóstica pode auxiliar no diagnóstico diferencial da GESF COL.

Descritores: Glomerulosclerose segmentar e focal, GESF, variantes da GESF, Podócitos, imunoistoquímica, classificação de Columbia, GESF colapsante

Summary

Testagrossa, LA. *Podocytes molecular expression in the variants of focal segmental glomerulosclerosis [dissertation]*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUCTION: Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is the most prevalent primary glomerulopathy in Brazil and its incidence is increasing worldwide. Primary FSGS is characterized clinically by affecting young people and causing severe proteinuria, often accompanied by nephrotic syndrome. The pathogenesis is related to podocyte injury, which may be due to several factors: viruses, drugs, immunological, etc. In 2004, the Columbia classification of FSGS identified five histological variants of the disease: collapsing (COL), usual (NOS), tip lesion (TIP), perihilar (PHI) and cellular variant (CEL). Several studies have demonstrated molecular changes in podocytes of FSGS patients, which were observed in molecules involved in the filtering function of these cells (nephrin, podocina and CD2AP), in podocyte cytoskeleton molecules (α -actinin-4, and synaptopodin), as well as in molecular markers of podocyte differentiation (CD10 and WT-1) and of cell division (Ki-67 and PCNA). The aim of this study was to classify the FSGS biopsies according to the Columbia classification and to analyze the occurrence of molecular changes in the five morphological variants.

METHODS: 131 cases of renal biopsies with a diagnosis of primary FSGS in the period 1996 to 2006 were classified according to the criteria of Columbia and then submitted to immunohistochemical reactions with the following antibodies: CD10, WT-1, Vimentin, Synaptopodin, α -actinin-4, GLEPP-1, cytokeratin 8-18, cytokeratin 19, and Ki-67.

RESULTS: FSGS cases were classified into five variants as follows: 38.2% of NOS variant, 36.6% COL, 14.5% TIP, 6.9% PHI and 3.8% CEL. The COL variant cases distinguished themselves among the other for having lost the expression of CD10 and WT-1 ($p < 0.01$), and also of α -actinin-4 ($p < 0.01$). Furthermore, they gained expression of the cytokeratin 8-18 ($p < 0.05$) and 19 ($p < 0.01$). The group of CEL and COL variants together differed from the other variants regarding the expression of cell division marker Ki-67 ($p < 0.05$).

CONCLUSION: COL

variant of FSGS presents molecular changes that differs from others and can be demonstrated by immunohistochemistry. The differential diagnosis of this variant is important because of the worse clinical outcome and prognosis it presents in comparison with other variants. The identification of these markers by immunohistochemical on the routine practice may be useful in the diagnosis of COL FSGS.

Keywords: Focal segmental glomerulosclerosis, FSGS, variants of FSGS, podocytes, immunohistochemistry, FSGS Columbia classification, collapsing FSGS

1 INTRODUÇÃO

A Glomerulosclerose Segmentar e Focal (GESF) é uma síndrome clínico-patológica renal causadora de proteinúria geralmente em nível nefrótico e que predomina em indivíduos jovens. Descrita em 1957 por Rich, a GESF habitualmente não responde à corticoterapia, progride para insuficiência renal em intervalo de tempo variável e recidiva com elevada frequência em pacientes submetidos a transplante renal (Canaud et al., 2009). Ela pode ser classificada em forma primária (idiopática) quando a patogenia se limita ao rim, nas quais as manifestações sistêmicas representam uma consequência direta da disfunção glomerular, ou forma secundária quando faz parte de uma doença multissistêmica (Davison et al., 1998). A forma secundária refere-se com frequência à fibrose de parte do tufo glomerular consequência de distúrbios hemodinâmicos que causem hiperfluxo e aumento da pressão capilar glomerular. Esses distúrbios podem ser oriundos de más adaptações estruturais causadas tanto por condições que provoquem perda do número de néfrons, quanto por condições que gerem stress funcional e hemodinâmico numa população de néfrons inicialmente normal.

Por razões desconhecidas, cada vez mais pessoas no mundo são acometidas pela GESF. A prevalência da doença é maior e a evolução mais desfavorável em indivíduos da raça negra. O tempo de progressão para insuficiência renal crônica é variável. Da década de 70 à de 90, a incidência da GESF em biópsias de grandes centros americanos vem aumentando significativamente nas raças negra e branca, mas com maior intensidade na primeira. Comparativamente, a incidência de casos de glomerulopatia

membranosa (GNM) e nefropatia por lesões mínimas (NLM) não mostraram aumento significativo (Haas et al., 1995 e 1997).

1.1 Morfologia e imunofluorescência da GESF

A lesão da GESF caracteriza-se, histologicamente, por esclerose de parte ou segmento do tufo em alguns dos glomérulos renais, com oclusão dos capilares nesse segmento, aderências entre o tufo e a cápsula de Bowman (sinéquias) e presença de depósitos hialinos. As áreas não afetadas dos glomérulos encontram-se normais. Esse padrão de distribuição segmentar e focal torna difícil seu diagnóstico em biópsias por punção de agulha, uma vez que a lesão pode não estar representada na amostra examinada (Corwin et al., 1988). O mesmo quadro histológico pode ser encontrado em diversas condições patológicas ou superposto a outras glomerulopatias (Couser, 1999). A imunofluorescência direta com pesquisa de imunoglobilinas A, G e M, fibrinogênio, e frações C₃ e C_{1q} do complemento, habitualmente tem resultado negativo ou apresenta depósitos inespecíficos de IgM e C₃ nos segmentos glomerulares lesados. A microscopia eletrônica de transmissão demonstra lesões com achatamento dos pedicelos podocitários, que se distribui difusamente, mas pode ser focal em alguns casos, em geral nas formas secundárias. Pode ainda ser encontrada alteração viliforme e vacuolização exacerbada dos citoplasmas dos podócitos.

Além dos achados histológicos mais habituais, descritos anteriormente, outros podem ser encontrados na GESF, tais como hiper celularidade, colapso

do tufo, células de aspecto xantomatoso dentro e fora dos capilares. São frequentes alterações patológicas túbulointersticiais (Korbet, 1998).

1.2 Etiologia

Do ponto de vista etiológico, a GESF pode estar relacionada a infecções virais (HIV, SV-40, Parvovírus B19), uso de drogas e medicamentos (heroína, pamidronato, interferon), respostas funcionais adaptativas à hiperfiltração (hipertensão arterial, obesidade, anemia falciforme), mutações genéticas (familiar) e forma idiopática (Korbet, 1998). Estudos em andamento permitem reconhecer e acrescentar novos agentes etiológicos à lista (TABELA 1).

TABELA 1- Classificação etiológica da GESF

GESF Primária (idiopática)	
Mediada por fator imunológico circulante (?)	
GESF secundária	
<p>Familiar/Genética</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mutações da nefrina - Mutações na podocina - Mutações da α-actinina-4 - Mutações do CD2AP - Mutações do WT-1 - Mutações do PLCE-1 - Mutações do SMARCAL1 - Mutações de proteínas mitocondriais - Mutações da Integrina β4 - Mutações da Tetraspanina 24 - Mutações da laminina β2 	<p>Mediada por respostas mal adaptativas estruturais/funcionais</p> <ul style="list-style-type: none"> - Massa renal reduzida <ul style="list-style-type: none"> Oligomeganeftrofia Agenesia renal unilateral Displasia renal Nefropatia por refluxo Seqüela de necrose cortical Ablação cirúrgica renal Nefropatia crônica do enxerto Qualquer doença renal com redução do número de néfrons funcionantes - Massa renal inicialmente normal <ul style="list-style-type: none"> Hipertensão Ateroembolia ou outros processos vaso-oclusivos Obesidade Doença cardíaca congênita cianótica Anemia falciforme (drepanocitose)
<p>Associada a vírus</p> <ul style="list-style-type: none"> - HIV - Parvovirus B19 - SV40 - CMV 	
<p>Induzida por drogas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heroína - Interferon - Litium - Pamidronato - Sirolimus 	

* adaptado de D'Agati et al., 2004; PLCE1: 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase epsilon-12; SMARCAL1: SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1

1.3 Fisiopatogenia da GESF

A fisiopatogenia da GESF vem sendo amplamente estudada nos últimos anos, já tendo sido correlacionada com diversos distúrbios renais hemodinâmicos, fatores imunológicos circulantes e defeitos genéticos (hereditários ou não) (Brenchley, 2003; Sharma et al., 2004; Barisoni et al., 2007 e 2009). O evento central para o desenvolvimento da doença parece ser o insulto ao podócito, seja por *stress* mecânico, medicamentos, toxinas, infecções virais, toxinas circulantes, dentre outros.

1.3.1 Caracterização morfológica e estrutural do podócito

Os podócitos ou células epiteliais viscerais são células glomerulares altamente diferenciadas e terminais, ou seja, não proliferam em situações de normalidade. Estão localizadas entre a membrana basal dos capilares glomerulares e o espaço de Bowman e constituem parte da barreira de filtração (por onde circula o filtrado glomerular). Exercem papel fundamental para as funções de filtração do glomérulo, assim como na produção de constituintes da membrana basal e manutenção da arquitetura do tufo glomerular (Pavenstadt et al., 2003). Essas células se caracterizam por possuir processos citoplasmáticos primários e secundários denominados pedicelos, semelhantes aos tentáculos de um polvo, que se estendem e envolvem os capilares glomerulares fixando-se à membrana basal (FIGURA 1). Os pedicelos se interpõem com aqueles do podócito adjacente a intervalos regulares. O pequeno hiato entre pedicelos adjacentes é denominado fenda de filtração (“slit

filtration”). Unindo os pedicelos adjacentes, está o diafragma (*slit diaphragm*), formado por uma sucessão de moléculas proteicas cuja unidade é denominada nefrina (Kestilla et al., 1998). As moléculas de nefrina apresentam disposição espacial em forma de zíper entre os pedicelos (figura 2).

FIGURA 1- Desenho esquemático de podócito para ilustrar sua disposição espacial sobre a MBG. O retângulo em vermelho realça dois pedicelos adjacentes, que serão detalhados na figura 2

Quando vistas à microscopia eletrônica de transmissão, os pedicelos têm disposição perpendicular em relação à membrana basal em glomérulos normais, mas nos casos de GESF essa configuração encontra-se alterada com achatamento dos mesmos, provocando uma disposição longitudinal ao longo da membrana basal, que muitos denominam “fusão de pedicelos”.

1.3.2 Caracterização molecular do podócito

A fenda diafragmática é componente da barreira de filtração glomerular, sem a qual o glomérulo não seria capaz de selecionar quais moléculas poderiam ou não passar para o filtrado glomerular, precursor da urina. Ela pode ser definida como o microambiente estrutural que se forma entre pedicelos paralelos sobre a membrana basal glomerular (MBG), interligados por proteínas que formam pontes ou diafragmas a intervalos constantes de aproximadamente 30-40 nm. Há evidência de que esta ponte ou diafragma seja uma forma de junção intercelular diferenciada, do tipo “junções aderentes” (Pavenstadt et al., 2003). Sua conformação estrutural e molecular é responsável por grande parte da filtração seletiva que ocorre do sangue para o espaço de Bowman nos glomérulos, e depende da interação harmônica entre proteínas presentes na membrana celular, citoplasma dos podócitos e membrana basal glomerular. Estudos recentes demonstram que essas proteínas encontram-se danificadas nos glomérulos de pacientes com GESF (Pavenstadt et al., 2003; Koop K et al., 2003; Bariéty et al., 2005 e 2007).

Atualmente, são conhecidas várias moléculas relacionadas à filtração glomerular, tais como nefrina, podocina, α -actinina-4, Proteína Associada ao CD2 (CD2AP), podocalixina, sinaptopodina, P-caderina etc. Além dessas, outras moléculas podocitárias e não-podocitárias encontram-se alteradas em doenças glomerulares, como o WT-1, CD10 (antígeno CALLA), GLEPP-1, e distroglicanos (Pavenstadt et al., 2003; Koop et al., 2003; Bariéty et al., 2005; Giannico et al., 2009; Regele et al. 2000).

A GESF tem sido relacionada também a defeitos nos genes responsáveis pela produção de proteínas podocitárias. As principais proteínas defeituosas nos casos de GESF de origem genética são a α -actnina-4, podocina e CD2AP, relacionadas a casos hereditários, autossômicos dominantes e autossômicos recessivos, respectivamente. Sabe-se que esses genes podem ser afetados tanto por mutações somáticas (que ocorrem especificamente no local) quanto germinativas (que ocorrem em todas as células do corpo por mecanismo de herança genética) (Bariéty et al., 2005). Mutações em DNAs mitocondriais também têm sido relacionadas com a ocorrência de GESF (Yamagata et al., 2002).

A nefrina é uma proteína produto do gene NPHS1, presente na face voltada para o espaço de Bowman dos pedicelos, e liga-se à nefrina do pedicelo adjacente com disposição em zíper (FIGURA 2). Sua expressão defeituosa está relacionada com proteinúria, sendo esta a base fisiopatogênica da síndrome nefrótica congênita do tipo finlandês (Kestilla et al., 1998). A podocina é outra molécula que se situa na membrana celular do pedicelo. Alterações na sua expressão têm sido relacionadas à GESF hereditária autossômica (Akhtar et al., 2004). As moléculas sinaptopodina e CD2AP situam-se no citoplasma do pedicelo, em conexão com proteínas do citoesqueleto e moléculas de actina. Danos a estas proteínas têm sido relacionados à proteinúria (Akhtar et al., 2004; Barisoni et al., 2009). A proteína α -actinina-4 localiza-se no citoesqueleto podocitário e está ligada a casos de GESF hereditários autossômicos dominantes (Winn, 2003; Barisoni et al., 2007). As proteínas WT-1, CD10 e vimentina estão relacionadas à embriogênese e diferenciação podocitárias. A proteína GLEPP-1 é uma tirosina

fosfatase de membrana específica do podócito, situada na face apical do pedicelo. O CD10 também é conhecido como CALLA, da sigla em inglês para Antígeno Comum da Leucemia Linfoblástica Aguda. A aquisição e/ou perda de antígenos hematopoiéticos tem sido relatada em vários estágios do desenvolvimento e diferenciação do néfron. Enquanto alguns antígenos hematopoiéticos são expressos transitoriamente durante a embriogênese (como o CD35), o CD10 é mantido nos podócitos dos glomérulos maduros. Barisoni et al (1999) observaram extensa perda de marcação de CD10 em casos de GESF Colapsante (COL) e em casos de Nefropatia por HIV (HIVAN), mas não encontrou o mesmo achado nos casos de glomerulopatia membranosa (GNM) e nefropatia por lesões mínimas (NLM).

FIGURA 2. Desenho esquemático demonstrando a disposição das moléculas nos pedicelos podocitários (α -actinina-4, actina, GLEPP-1, podocina e sinaptopodina), na MBG (distróglicanos) e no diafragma podocitário (nefrina)

1.3.3 Resposta podocitária à lesão na GESF

Agressões aos podócitos através de agentes de natureza variada (medicamentos, toxinas circulantes, infecções virais, *stress* mecânico) podem resultar em podocitopenia, com redução absoluta ou funcional no número de

células. Neste mecanismo de lesão, o podócito se destaca da membrana basal, seja devido a uma ação subletal ou morte por necrose ou apoptose. Os podócitos restantes não são suficientes para evitar áreas de desnudamento da membrana basal, que se adere ao epitélio parietal, com formação de sinéquia e posteriormente esclerose (Barisoni et., 2007 e 2009; Wiggins et al., 2005).

Embora o podócito seja uma célula terminal, especializada e restrita à fase G1 do ciclo celular, estudos têm demonstrado que em casos de GESF, principalmente na variante denominada COL, ele é capaz de passar da fase G1 para S, e, portanto voltar a se dividir. Shankland et al. (2000) observaram expressão diminuída das proteínas reguladoras do ciclo celular p27 e p57, e neo-expressão de p21 em podócitos de pacientes com GESF COL, CEL e HIVAN. Barisoni et al. (2000) observaram redução da expressão de p27, p57 e ciclina D1, porém aumento de expressão de ciclina A e Ki-67 em podócitos de pacientes com GESF COL. Em 2006, Srivastava et al. observaram que podócitos de crianças com GESF COL e CEL reduzem a expressão de p27 e p21 (proteínas inibidoras da divisão celular), porém expressam proporcionalmente mais ciclinas D1 e A1 (moléculas estimulantes da divisão celular), do que pacientes com GESF usual (NOS), NLM e rins normais. Neste mecanismo de lesão podocitária, há recuperação da função proliferativa do podócito, presente em fases iniciais de desenvolvimento do rim, resultando em aumento efetivo do número de células. No entanto, algumas funções de podócitos maduros também são modificadas, causando alterações na estrutura podocitária e proteinúria.

1.4 Classificação de Columbia

Com base nos diferentes achados morfológicos encontrados nas lesões da GESF primária, alguns autores propuseram a existência de variantes distintas da doença.

Em 2004, um grupo de nefropatologistas coordenado por D'Agati et al. (2004) publicaram a classificação de Columbia para GESF primária, que divide esta entidade em cinco variantes com base em aspectos morfológicos. São elas: 1. Usual ou sem outras especificações (NOS); 2. Colapsante (COL); 3. Celular (CEL); 4. Lesão apical ou *tip lesion* (TIP) e 5. Perihilar (PHI). Tais variantes parecem corresponder a diferentes implicações clínicas, prognósticas e terapêuticas (D'Agati et al., 1994, 2003, 2004 e 2008; Thomas et al., 2006; Chun et al., 2004; Silverstein et al., 2007). As variantes “hipercelularidade mesangial difusa” e “nefropatia do C1q” não foram incluídas na classificação de Columbia e serão brevemente comentadas adiante.

Os critérios histológicos e características clínicas de cada variante serão comentados a seguir.

Na variante COL, parte do tufo glomerular ou todo ele apresenta obliteração de capilares por retração e colabamento da membrana basal, circundados por podócitos hipertróficos e hiperplásicos, com aspecto em “pseudocrescentes”. Os túbulos frequentemente apresentam dilatação microcística. Nesta variante, os podócitos podem apresentar positividade imuno-histoquímica para marcadores de divisão celular (Ki-67, PCNA), indicando uma volta ao ciclo de divisão celular (Pavenstadt et al., 2003).

Clinicamente, esta forma ocorre com maior frequência em negros e se acompanha de síndrome nefrótica grave, proteinúria elevada e deterioração precoce e rápida da função renal, muitas vezes irreversível (Valeri et al., 1996., Weiss et al. 1986., Thomas et al., 2006; Chun et al., 2004).

A CEL é a menos comum e se caracteriza por hiper celularidade endocapilar de parte do tufo, à custa de células com citoplasmas xantomatosos e leucócitos, por vezes em *cariorrhexis*. A maior parte dos casos exhibe graus variáveis de hipertrofia e hiperplasia de podócitos, que, assim como na COL, podem assumir aspecto de pseudocrescentes. Entretanto, estas alterações não devem estar localizadas no ápice do tufo em continuidade com a saída do túbulo proximal no glomérulo, já que lesões neste segmento do tufo fazem parte da caracterização da variante apical (*tip lesion*, comentada mais adiante). De acordo com o critério proposto pela classificação, na variante celular estes achados precisam estar presentes em pelo menos um dos glomérulos lesados. Hialinização do tufo pode estar presente. Não se observam lesões colapsantes típicas ou lesões da interface do tufo com o túbulo proximal (lesão apical). Clinicamente, estes casos costumam se manifestar por proteinúria acentuada, com síndrome nefrótica. Seu prognóstico é intermediário entre a COL (pior) e a TIP (favorável) em relação à recuperação da função renal. Há controvérsia sobre esta lesão constituir realmente uma variante. Alguns autores propõem que ela faça parte da COL. Outros interpretam que a lesão pode corresponder à TIP não devidamente representada nos níveis avaliados (Stokes et al., 2006).

A variante TIP, ou com lesão apical, caracteriza-se por esclerose de até 25% da periferia do tufo, com hipertrofia podocitária, no orifício de saída do túbulo proximal, em confluência com células parietais da cápsula de Bowman e

frequente formação de sinéquia neste ponto. O compartimento tubular e interstício estão quase sempre preservados. Não pode haver lesões colapsantes nesta variante e a presença de esclerose em localização perihilar exclui o diagnóstico. Do ponto de vista de evolução clínica, esta variante se assemelha a NLM, a não ser pela prevalência maior em adultos por volta dos 40 anos, os quais apresentam síndrome nefrótica completa e de rápida instalação, mas com elevado índice de resposta ao tratamento com corticosteróides e agentes citotóxicos (Howie et al., 1984 e 1986; Stokes et al., 2004). Acredita-se que esta lesão possa ocorrer como consequência da proteinúria maciça que acompanha algumas glomerulopatias, tais como Nefropatia da IgA ou GNM. Portanto, este diagnóstico deve ser reservado para os casos onde não haja outras formas de glomerulopatias proteinúricas associadas. Em casos não responsivos ao tratamento, foi observada a conversão do padrão histológico de GESF TIP para NOS em biópsias subsequentes (Howie et al., 2005).

A GESF variante PHI caracteriza-se pela localização da lesão esclerótica no pólo vascular ou hilar do glomérulo. As suas características morfológicas são encontradas com maior frequência em adultos e associadas a causas secundárias tais como hiperfiltração glomerular, obesidade e hipertensão arterial (Fogo et al., 1995; Verani, 1992; Kambham et al., 2001). Para o diagnóstico dessa variante é preciso que haja 50% ou mais dos glomérulos lesados com lesão perihilar. É comum haver glomerulomegalia, sinéquias e hialinização de arteríolas e do hilo glomerular. Células com citoplasmas xantomatosos podem ser observadas aprisionadas em meio às áreas de esclerose. Os podócitos podem ou não apresentar hipertrofia, mas em

menor grau do que nas variantes apresentadas previamente. Conforme D'Agati et al. (2004), o diagnóstico desta variante requer a exclusão das variantes COL, CEL e TIP.

A variante NOS pode ser considerada uma variante de exclusão: para seu diagnóstico é necessário que todas as outras variantes sejam excluídas. Alguns glomérulos apresentam esclerose de parte do tufo, acompanhada ou não de hialinose, aumento da matriz mesangial e obliteração de lumens capilares. Pode haver colapso segmentar da parede capilar, mas sem hiperplasia podocitária circunjacente (o que caracterizaria uma GESF COL). As lesões escleróticas podem afetar segmentos perihilares e/ou periféricos, de qualquer número de glomérulos, com ou sem glomerulosclerose global no tecido adjacente. Qualquer proporção de glomérulos pode ser afetada por lesões segmentares com ou sem esclerose global associada. Células com citoplasmas xantomatosos podem ser observadas aprisionadas em áreas de esclerose. Alças acometidas podem gerar adesões entre o tufo glomerular e a cápsula de Bowman. Hiper celularidade mesangial e glomerulomegalia integram com frequência o quadro histológico. Pode ser observada hipertrofia podocitária revestindo segmentos fibróticos do glomérulo, geralmente de leve intensidade (coroa podocitária).

TABELA 2- Principais características morfológicas das variantes da GESF segundo a classificação de Columbia

VARIANTES	LOCALIZAÇÃO NO GLOMÉRULO	DISTRIBUIÇÃO NO GLOMÉRULO	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
NOS	Qualquer	Segmentar	- Obliteração de capilares por aumento segmentar da matriz - Excluir PHI, CEL, TIP e COL
PHI	Perihilar	Segmentar	- Hialinose perihilar em mais de 50% dos glomérulos lesados - Excluir CEL, TIP e COL
CEL	Qualquer	Segmentar	- Hiper celularidade endocapilar ocluindo a luz capilar - Excluir TIP e COL
TIP	Apical	Segmentar	- Lesão segmentar envolvendo a saída do túbulo proximal ou ápice - O pólo tubular tem que ser identificado. - Lesões caracterizadas por sinéquia com as células parietais e tubulares - Não ocorre esclerose perihilar. - Excluir COL
COL	Qualquer	Segmentar ou global	Pelo menos um glomerulo com colapso, hipertrofia e hiperplasia de podócitos

* adaptado de D'Agati et al., 2004

Embora não tenham sido contempladas nesta classificação da GESF, cabem alguns comentários sobre outras possíveis variantes: a GESF com hiper celularidade mesangial difusa e a Nefropatia por C1q. A primeira, conforme o nome indica, seria caracterizada por hiper celularidade mesangial difusa nos glomérulos comprometidos ou não por esclerose. Não está claro se esta lesão faz parte do espectro da NLM ou da GESF. Clinicamente, caracteriza-se por síndrome nefrótica resistente ao tratamento com corticosteróides, predominantemente em crianças. (Fogo et al., 1990; Ostalska-Nowicka et al., 2007). Alguns autores propõem a Nefropatia por C1q como uma variante da GESF. Ela foi descrita por Jennette et al. em 1985 e se caracteriza por padrões variáveis de lesão histológica, com predomínio de consolidação

segmentar e focal . A imunofluorescência mostra positividade dominante para C1q em distribuição paramesangial (Markowitz et al., 2003). Ainda não há consenso na literatura quanto à inclusão da hiper celularidade mesangial difusa e nefropatia por C1q como variantes da GESF.

Uma característica importante da classificação de Columbia para a GESF é que as diferentes categorias são mutuamente excludentes. Assim, o diagnóstico de GESF NOS requer a exclusão das outras quatro variantes: COL, CEL, TIP e PHI. O diagnóstico da variante PHI requer a exclusão das variantes COL, CEL e TIP, além de exigir mais de 50% dos glomérulos lesados com padrão perihilar de lesão. A variante CEL requer a exclusão da variante TIP e COL. A variante TIP requer a exclusão da variante COL. A única variante com critérios soberanos é a COL, pois a presença de parâmetros histológicos que a caracterizem é o suficiente para permitir o diagnóstico, independente da presença ou não de traços histológicos de outras variantes (D'Agati et al., 2004) (FIGURA 3).

FIGURA 3- Algoritmo para classificação da GESF conforme critérios de Columbia

No Brasil, há poucos levantamentos epidemiológicos sobre a incidência da GESF. Dados do Registro Paulista de Glomerulopatias referentes às biópsias registradas em 11 centros do estado de São Paulo no período de 1999 a 2005, demonstraram que de 1844 biópsias registradas, 54,2% dos casos foram diagnosticados como glomerulopatias primárias, sendo a GESF o diagnóstico mais frequente entre elas, correspondendo a 29,7% dos casos,

seguida da GNM (20,7%) e da Nefropatia da IgA (17,8%) (Malafronte et al., 2006). Na Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DAP-HC-FMUSP) foram analisadas cerca de 600 biópsias renais por ano no período de 1996 a 2006, das quais aproximadamente 50 (8%) receberam o diagnóstico de GESF. Bahiense-Oliveira et al. (2004) demonstraram que a GESF é a glomerulopatia primária mais comum em biópsias analisadas no HC-FMUSP e sua incidência vem aumentando anualmente, a exemplo do que vem ocorrendo em diversos grandes centros internacionais (D'Agati, 1994).

Até o momento, não há publicações na literatura indicando a porcentagem e incidência das diferentes variantes da GESF no nosso meio, conforme propostas pela Classificação de Columbia (ver adiante). Os estudos realizados com a Classificação de Columbia enfatizam a possibilidade dos subtipos morfológicos da GESF poderem corresponder a diferentes etiologia, patogênese e prognóstico, assim como o importante impacto terapêutico que poderia representar a caracterização dos tipos diferentes de lesões podocitárias nas várias subcategorias da GESF (D'Agati et al., 2004). O reconhecimento destas variantes morfológicas em nossos casos de GESF e sua caracterização molecular seria de grande interesse clínico e permitiria, talvez, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) Classificar morfológicamente as biópsias renais diagnosticadas como GESF na DAP-HC-FMUSP conforme as variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI propostas pela Classificação de Columbia.
- b) Analisar a expressão imuno-histoquímica das moléculas de diferenciação podocitária CD10, WT-1 e vimentina nas variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI da GESF.
- c) Analisar a expressão imuno-histoquímica de moléculas marcadoras de desdiferenciação podocitária CK8/18, CK19 e Ki-67 nas variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI da GESF.
- d) Analisar a expressão imuno-histoquímica das moléculas do citoesqueleto e membrana do pedicelo: sinaptopodina, α -actinina-4 e GLEPP-1 nas variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI da GESF.
- e) Analisar a expressão imuno-histoquímica das moléculas da MBG α -distroglicano e colágeno IV nas variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI da GESF.
- f) Analisar a expressão imuno-histoquímica da molécula do diafragma podocitário, nefrina, nas variantes COL, CEL, NOS, TIP e PHI da GESF.

3 MÉTODOS

O protocolo deste estudo retrospectivo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa- CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob numero de protocolo 0608/07.

3.1 Seleção dos casos e critérios de exclusão

Foram selecionadas as biópsias renais com diagnóstico de GESF na DAP-HC-FMUSP, no período entre 1996 a 2006. Baseando-se nos laudos arquivados e dados clínicos disponíveis dos pacientes, foram excluídos casos de GESF com: a) etiologia secundária conhecida (escleroses glomerulares cicatriciais, pielonefrite crônica, hipertensão arterial, nefropatia por refluxo); b) idade inferior a 18 anos ou superior a 45 anos; c) recidivas em transplante; e d) casos de pacientes com sorologia positiva para HIV.

Após o levantamento de blocos e lâminas, foram excluídos da casuística os casos com: a) número de glomérulos inferior a cinco na revisão das lâminas; b) avançado estágio de cronicidade nas biópsias (mais de 90% dos glomérulos escleróticos); c) sem registro de imunofluorescência (IF), com IF insatisfatória ou com IF positiva para IgA e/ou IgG nos glomérulos; d) problemas técnicos que causassem inadequação ou inviabilidade do material arquivado para a realização dos testes propostos pelo estudo (por exemplo esgotamento do bloco de parafina); e e) presença de lesões morfológicas sem características de GESF à microscopia óptica (por exemplo: GNM, microangiopatia trombótica, etc).

3.2 Revisão das biópsias

As biópsias renais da DAP-HC-FMUSP são rotineiramente fixadas em Duboscq-Brasil imediatamente após a realização das mesmas, permanecendo neste fixador por 40 minutos, quando então são passadas para Formol 10%. A partir daí é seguido o processamento histológico habitual de inclusão em parafina. Usualmente, são confeccionadas quatro lâminas de rotina com 24 secções de 3µm, coradas pela hematoxilina e eosina, PAS, tricrômico de Masson e impregnação pela prata pelo método da prata metenamina (PAMS). As lâminas apresentando colorações esmaecidas foram coradas novamente.

As quatro lâminas histológicas de cada caso foram analisadas por dois patologistas com experiência em nefropatologia (LAT¹ e DMCM²) de forma independente. Foram aplicados os critérios morfológicos de Columbia (D'Agati et al., 2004) para GESF, para a classificação em TIP, COL, CEL, PHI e NOS. Os casos discordantes foram analisados em conjunto por ambos os patologistas para obtenção de consenso.

3.3 Imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da USP, sempre incluindo reações controle (ver adiante). Para saber a influência da fixação das amostras nas reações, dois tipos de controles foram definidos: biópsias de rins normais transplantados (biópsias “tempo zero”) e tecido renal normal obtido de

¹Dr. Leonardo de Abreu Testagrossa

² Profa. Dra. Denise Maria Avancini Costa Malheiros

nefrectomias radicais devido a tumores. No primeiro caso, as amostras eram fixadas em Duboscq-Brasil e no segundo, em formol tamponado a 10%.

A partir dos blocos de parafina, novos cortes histológicos de quatro μm foram realizados e colocados em 15 lâminas de vidro silanizadas de cada caso, com duas secções por lâmina. Os cortes foram aquecidos a 60° C durante 12 horas, desparafinados com xilol e em seguida reidratados com concentrações decrescentes de etanol até água destilada.

Para garantir máxima sensibilidade e evitar reação de fundo pela interação biotina-avidina, a amplificação foi efetuada com polímeros de segunda geração Novolink (Novocastra, UK), conforme descrição abaixo.

Primeiramente, os cortes foram submetidos a bloqueio da peroxidase endógena por incubação com solução de peróxido de hidrogênio (20 volumes), quatro ciclos de cinco minutos.

A recuperação antigênica foi feita com aquecimento dos cortes em Dako Pascal™ durante três minutos, imersos em tampão citrato 0,01 m/L, com pH 6,0. Para marcadores específicos foi feita recuperação antigênica adicional com tripsina. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o respectivo anticorpo primário por 18 horas a 4° C, nas titulações descritas na TABELA 3. Posteriormente, seguiu-se a aplicação de Novocastra™ Post Primary Block para ativar a penetração do polímero e em seguida a aplicação de NovoLink™ Polymer com a finalidade de reagir com os anticorpos primários ligados ao tecido.

A reatividade foi detectada pela incubação com o substrato cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em solução estabilizadora. A reação com a peroxidase produz precipitado castanho visível à microscopia, no local do

complexo antígeno-anticorpo primário. A contra coloração foi feita com hematoxilina e, após desidratação em bateria de álcool e xilol, os cortes foram montados com Entellan®.

Os anticorpos primários testados foram dirigidos contra os antígenos: CD10, citoqueratina 19 (CK19), citoqueratina 8/18 (CK8/18), vimentina, GLEPP-1, α -actinina-4, WT-1, nefrina, sinaptopodina, Ki-67, colágeno tipo IV e α -dístroglicano. Para os anticorpos primários anti-sinaptopodina e anti-colágeno tipo IV, utilizou-se, adicionalmente, recuperação antigênica com tripsina por um minuto, antes e após a recuperação em Pascal, respectivamente.

Para controle negativo, foram utilizados tecido renal histologicamente normal de nefrectomias radicais devido a neoplasias e biópsias de rins transplantados que são realizadas de rotina após a implantação do enxerto (tempo zero). Para controle positivo do anticorpo primário Ki-67, foram utilizados cortes histológicos de tonsila palatina hiperplásica.

TABELA 3- Anticorpos primários utilizados

ANTICORPO PRIMÁRIO	MARCA	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	TÍTULO	CLONE
CD10	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0	1:3000	56C6
Citoqueratina 19	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0	1:800	B170
Citoqueratina 8/18	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0	1:800	5D3
Vimentina	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0	1:1600	V9
GLEPP-1	Biogenex	Dako Pascal com pH 6,0	1:50	5C11
α -actinina-4	Allexis biogenicals	Dako Pascal com pH 6,0	1:1500	policlonal
WT-1	DakoCytomation	Dako Pascal com pH 6,0	1:1200	6F-H2
Nefrina	Progen Biotechnick	-	-	GP-N2
Sinaptopodina	Progen Biotechnick	Tripsina (1') e depois em Dako Pascal com pH 6,0	1:400	G1D4
α -dístroglicano	Novocastra	-	-	VIA4-1
Colágeno IV	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0 e depois tripsina (1')	1:400	PHM-12
Ki-67	Novocastra	Dako Pascal com pH 6,0	1:1600	MM1

3.4 Análise imuno-histoquímica

A reação foi considerada positiva nas amostras com coloração citoplasmática dos podócitos para os anticorpos CD10, CK19, CK8/18, WT-1, α -actinina-4, vimentina, GLEPP-1 e sinaptopodina. Para Ki-67 e WT-1, considerou-se a coloração nuclear podocitária (superposta com a marcação citoplasmática no caso do WT-1), e para o colágeno IV, considerou-se positiva a coloração da membrana basal e mesângio.

As reações imuno-histoquímicas de cada caso foram analisadas sem conhecimento da classificação morfológica, e rotuladas com códigos para cada anticorpo primário testado, conforme o seguinte esquema: A= Positivo em todos os glomérulos presentes; B= Positivo nos glomérulos normais, mas negativo nas lesões glomerulares; C= Negativo difusamente (nos glomérulos); D= Positivo nas lesões glomerulares apenas, mas negativo no restante dos glomérulos. Os casos insatisfatórios para a análise imuno-histoquímica foram rotulados com a letra E.

3.5 Análise estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado através do teste qui-quadrado cruzando-se as variantes da GESF (NOS, COL, CEL, TIP ou PHI) com os padrões de marcação imuno-histoquímica de cada anticorpo primário observado nos glomérulos, para os quais foi atribuído o respectivo código A, B, C ou D. Os casos insatisfatórios (valor E) foram desconsiderados dos cálculos. A distribuição dos padrões imuno-histoquímicos em cada variante foi comparada e as diferenças desproporcionais analisadas, tomando-se como estatisticamente significativo o nível descritivo inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Classificação morfológica

Nos arquivos da DAP-HC-FMUSP foram identificados 515 casos diagnosticados como GESF no período entre janeiro de 1996 a junho de 2006. Após aplicação dos critérios de exclusão, obteve-se amostra de 131 casos elegíveis (25,4% do total). Estes casos foram classificados de acordo com os critérios histológicos propostos pela classificação de Columbia, resultando em 50 casos NOS, 48 COL, 19 TIP, nove PHI e cinco CEL (FIGURAS 4-10; TABELAS 4 e 5).

A tabela 4 apresenta a distribuição das variantes da GESF de acordo com a idade dos pacientes e número de glomérulos examinados.

A tabela 5 compara a classificação obtida da nossa casuística com casuística publicada por outro centro internacional.

FIGURA 4- Distribuição das variantes da GESF conforme classificação de Columbia em 131 casos do HC-FMUSP.

* período entre 1996 e 2006

TABELA 4- Distribuição segundo idade e número de glomérulos dos casos de GESF analisados no estudo

	NOS	COL	TIP	PHI	CEL
N de casos	50	48	19	9	5
Media de Idade	29,7	30,5	29,7	30,1	29,7
Media do número de glomérulos	13,5	25,4	17,9	15,6	36

TABELA 5- Classificação dos casos de GESF primária diagnosticados no HC-FMUSP comparada com casuística de outro centro internacional

	HC FMUSP (1996-2006)	North Carolina (1982-2001)
	N=131 (%)	N=197 (%)
NOS	50 (38,2)	83(42)
COL	48 (36,6)	22(11)
CEL	5 (3,8)	6(3)
TIP	19 (14,5)	34(17)
PHI	9 (6,9)	52(26)
PHI + NOS	59 (45,1)	135(68)

FIGURA 5- Variante NOS da GESF, presença de esclerose do tufo, circundado por coroa podocitária do lado direito (HE, 400x)

FIGURA 6- Variante COL da GESF, presença de colapso do lado esquerdo do tufo, circundado por podócitos hiperplásicos (Masson, 400x)

FIGURA 7- Variante TIP da GESF, presença de esclerose no pólo apical do glomérulo, em contato com a saída do túbulo proximal (PAS, 400x)

FIGURA 8- Variante PHI da GESF, presença de esclerose e hialinização no hilo do glomérulo (PAS, 400x)

FIGURA 9- Variante CEL da GESF, presença de hipercelularidade endocapilar, com células de aspecto xantomatoso (HE, 400x)

4.2 Imuno-histoquímica

Cento e quatorze casos viáveis foram submetidos às reações imuno-histoquímicas, sendo 43 casos da variante COL, 42 NOS, 18 TIP, sete PHI e quatro CEL. Dezesete casos foram considerados insatisfatórios para imuno-histoquímica devido ao esgotamento do bloco durante os cortes adicionais.

Foram padronizadas com sucesso as reações imuno-histoquímicas para os anticorpos primários: CD10; CK19; CK8/18; Ki-67; vimentina; α -actinina-4; WT-1; sinaptopodina; colágeno IV e GLEPP-1. Os anticorpos primários contra nefrina e distroglicano não funcionaram após diversos testes modificando-se o pH das soluções de recuperação antigênica (de 6.0 para 9.0), os métodos de recuperação antigênica, de panela de pressão para micro-ondas, com ou sem o uso de tripsina.

Diversos casos não apresentaram reações satisfatórias para os marcadores sinaptopodina e colágeno IV, especialmente os mais antigos. Nos casos mais recentes, a reação foi satisfatória com maior frequência. Esse fato foi atribuído à fixação sub-ótima dos casos antigos. O GLEPP-1 funcionou melhor nos controles fixados em formol do que nos fixados em Duboscq-Brasil.

Como a COL é a variante melhor caracterizada na literatura, apresentando diferenças clínicas e prognósticas em relação às demais, os casos foram agrupados em COL e não-COL para fins de comparação estatística. Os casos em que as reações imuno-histoquímicas não funcionaram foram excluídos dos cálculos estatísticos.

4.2.1 Marcadores de diferenciação do podócito

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para CD10 (CALLA), 21 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 93 casos válidos, 43 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: nove casos da COL; 18 NOS; 11 TIP; quatro PHI e um CEL. Os outros 50 casos apresentaram expressão anômala, com negatividade nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 25 (73,5%) casos da COL; 14 (43,8%) casos NOS; cinco (31,3%) TIP; três (42,9%) PHI e três (75,0%) CEL.

A perda de expressão nos segmentos glomerulares lesados ocorreu com maior frequência nos casos COL do que nas outras variantes ($p=0,004$) (TABELA 7). Quando comparamos a COL com cada variante individualmente, observamos maior ocorrência da perda de expressão imuno-histoquímica, com

significância estatística, na distinção entre COL e NOS ($p=0,014$), e entre COL e TIP ($p=0,004$) (FIGURAS 10 e 11). Os grupos das variantes CEL e PHI apresentaram poucos casos conclusivos, invalidando o teste estatístico utilizado.

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para WT-1, 20 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 94 casos válidos, 46 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 10 casos da COL; 22 NOS; 10 TIP; três PHI e um CEL. Os outros 48 casos apresentaram expressão anômala, com negatividade nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 25 (71,4%) casos da COL; 11 (33,3%) NOS; sete (41,2%) TIP; dois (40,0%) PHI e três (75,0%) CEL.

Semelhante ao CD10, a perda de expressão de WT-1 nos podócitos de trechos glomerulares lesados (valor B) ocorreu com maior frequência nos casos da COL do que nas outras variantes ($p=0,002$) (TABELA 8). Quando a comparamos com cada variante, individualmente, observamos maior ocorrência desse achado imuno-histoquímico na comparação entre COL e NOS ($p=0,002$) e entre COL e TIP ($p=0,004$) (FIGURA 12). Os grupos das variantes CEL e PHI apresentaram poucas reações conclusivas, invalidando o teste estatístico utilizado.

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para VIMENTINA, 14 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 100 casos válidos, 93 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 35 casos da COL; 34 NOS; 15 TIP; seis PHI e três CEL (FIGURA 14). Os outros sete casos apresentaram

perda de expressão nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: cinco (12,5%) casos da COL e dois (11,8%) TIP. O pequeno número de casos com esse achado inviabilizou os testes estatísticos propostos.

A tabela 6 detalha os achados imuno-histoquímicos dos marcadores de diferenciação podocitária, com os resultados insatisfatórios, inclusive.

TABELA 6- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores de diferenciação podocitária nas variantes da GESF

MOLÉCULAS	EXPRESSÃO PODOCITÁRIA		INCONCLUSIVOS
	EXPRESSÃO NORMAL	PERDA DE EXPRESSÃO NAS LESÕES GLOMERULARES	
CD10 (CALLA)	COL= 9 (20,9 %) NOS= 18 (42,9 %) TIP= 11 (61,1 %) PHI= 4 (57,1 %) CEL= 1 (25,0 %)	COL= 25 (58,2 %) NOS= 14 (33,3 %) TIP= 5 (27,8%) PHI= 3 (42,9%) CEL= 3 (75%)	COL= 9 (20,9%) NOS= 10 (23,8%) TIP= 2 (11,1 %) PHI= 0 (0%) CEL= 0 (0%)
WT-1	COL= 10 (23,3%) NOS= 22 (52,4%) TIP= 10 (55,6%) PHI= 3 (42,9%) CEL= 1 (25,0%)	COL= 25 (58,1%) NOS= 11 (26,2%) TIP= 7 (38,9%) PHI= 2 (28,6%) CEL= 3 (75,0%)	COL= 8 (18,6%) NOS= 9 (21,4%) TIP= 1 (5,6%) PHI= 2 (28,6%) CEL= 0 (0%)
Vimentina	COL= 35 (81,4%) NOS= 34 (81,0%) TIP= 15 (83,3%) PHI= 6 (85,7%) CEL= 3 (75,0%)	COL= 5 (11,6%) NOS= 0 (0%) TIP= 2 (11,1%) PHI= 0 (0%) CEL= 0 (0%)	COL= 3 (7,0%) NOS= 8 (19,0%) TIP= 1 (5,6%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 1 (25,0%)

Nota: Os percentuais aqui exibidos incluem todas as biópsias submetidas às reações imuno-histoquímicas, inclusive as reações inconclusivas.

TABELA 7- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno-histoquímica do marcador CD10 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Expressão normal	Perda de expressão	TOTAL
COL	9	25	34
Não-COL	34	25	59
TOTAL	43	50	93
Valor p	0,004		

TABELA 8- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno-histoquímica do marcador WT-1 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Expressão normal	Perda de expressão	TOTAL
COL	10	25	35
Não-COL	36	23	59
TOTAL	46	48	94
Valor p	0,002

FIGURA 10- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de CD10 em podócitos (imunoperoxidase anti-CD10; 400x)

FIGURA 11- Glomérulo de GESF COL com CD10 negativo em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti-CD10; 400x)

FIGURA 12- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de WT-1 em podócitos (imunoperoxidase anti-WT-1; 400x)

FIGURA 13- Glomérulo de GESF NOS com imunoexpressão positiva de vimentina em podócitos (imunoperoxidase anti-vimentina; 400x)

4.2.2 Marcadores de desdiferenciação do podócito

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para CK8/18, 14 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 100 casos válidos, 55 casos apresentaram expressão imuno-histoquímica difusamente negativa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 16 casos da COL; 24 NOS; nove TIP; cinco PHI e um CEL. Os outros 45 casos válidos apresentaram expressão considerada anômala, com positividade nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 24 (60%) dos casos da COL; 10 (29,4%) NOS; oito (47,1%) TIP; um (16,7%) PHI e dois (66,7%) CEL.

A neo-expressão de CK8/18 nos podócitos dos segmentos glomerulares lesados (valor D) ocorreu com maior frequência nos casos da COL do que nas outras variantes ($p=0,014$) (FIGURA 14 e 15; TABELA 10). Quando comparamos a COL com as outras variantes, individualmente, observamos maior ocorrência desse achado imuno-histoquímico, na comparação entre COL e NOS ($p=0,009$). Entretanto, não houve diferença significativa comparando-se COL e TIP ($p=0,367$).

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para CK19, 15 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 99 casos válidos, 64 apresentaram expressão imuno-histoquímica com padrão difusamente negativo em glomérulos, idêntico aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 19 casos da COL; 29 NOS; 10 TIP; quatro PHI e dois CEL. Os outros 35 casos apresentaram expressão anômala, com positividade em células podocitárias nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 20

(51,3%) casos da COL; cinco (14,7%) NOS; seis (37,5%) TIP; dois (33,3%) PHI e dois (50%) CEL.

A neo-expressão de CK19 nos segmentos glomerulares lesados (valor D) ocorreu com maior frequência nos casos de COL do que nas outras variantes ($p=0,008$) (TABELA 11). Quando comparamos a COL com as outras variantes, individualmente, observamos maior ocorrência desse achado imuno-histoquímico na comparação entre COL e NOS ($p=0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa comparando-se COL e TIP ($p=0,352$).

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para Ki-67, 15 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 99 casos válidos, 81 casos apresentaram expressão imuno-histoquímica com padrão difusamente negativo, idêntico aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 28 casos da COL; 33 NOS; 13 TIP; seis PHI e um CEL. Os outros 18 casos apresentaram expressão considerada anômala, com positividade em células podocitárias nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 10 (26,3%) casos da COL; três (8,3%) casos da NOS; três (18,8%) TIP e dois (66,7%) CEL. Nenhum dos casos da PHI apresentou positividade imuno-histoquímica nos trechos glomerulares lesados. Não se observou diferença estatística ao comparar os casos da COL com as outras variantes ($p=0,097$). Entretanto, quando comparadas a COL e CEL agrupadas, com o grupo das variantes NOS, PHI e TIP, observou-se expressão desproporcional significativa no primeiro grupo ($p=0,016$) (FIGURA 16; TABELA 12).

A tabela 9 detalha os achados imuno-histoquímicos dos marcadores de desdiferenciação podocitária, com os resultados insatisfatórios, inclusive.

TABELA 9- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores de desdiferenciação podocitária nas variantes da GESF

MOLÉCULAS	EXPRESSÃO PODOCITÁRIA		
	NEGATIVOS (NORMAL)	NEO-EXPRESSÃO NAS LESÕES GLOMERULARES	INCONCLUSIVOS
CK8/18	COL= 16 (37,2%) NOS= 24 (57,1%) TIP= 9 (50,0%) PHI= 5 (71,4%) CEL= 1 (25%)	COL= 24 (55,8%) NOS= 10 (23,8%) TIP= 8 (44,4%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 2 (50%)	COL= 3 (7,0%) NOS= 8 (19%) TIP= 1 (5,6%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 1 (25%)
CK19	COL= 19 (44,2%) NOS= 29 (69,0%) TIP= 10 (55,6%) PHI= 4 (57,1%) CEL= 2 (50,0%)	COL= 20 (46,5%) NOS= 5 (11,9%) TIP= 6 (33,3%) PHI= 2 (28,6%) CEL= 2 (50,0%)	COL= 4 (9,3%) NOS= 8 (19,0%) TIP= 2 (11,1%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 0 (0%)
Ki-67	COL= 28 (65,1%) NOS= 33 (78,6%) TIP= 13 (72,2 %) PHI= 6 (85,7%) CEL= 1 (25%)	COL= 10 (23,3 %) NOS= 3 (7,1%) TIP= 3 (16,7%) PHI= 0 (0%) CEL= 2 (50,0%)	COL= 5 (11,6%) NOS= 6 (14,3%) TIP= 2 (11,1%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 1 (25,0%)

Nota: Os percentuais aqui exibidos incluem todas as biópsias submetidas às reações imuno-histoquímicas, inclusive as reações inconclusivas.

TABELA 10- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a neo-expressão imuno-histoquímica do marcador CK8/18 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Negativo	Positivo	TOTAL
COL	16	24	40
Não-COL	39	21	60
TOTAL	55	45	100
Valor p	0,014		

TABELA 11- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a neo-expressão imuno-histoquímica do marcador CK19 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Negativo	Positivo	TOTAL
COL	19	20	39
Não-COL	45	15	60
TOTAL	64	35	99
Valor p	0,008		

TABELA 12- Comparação dos grupos das variantes COL+CEL versus TIP+NOS+PHI segundo a expressão imuno-histoquímica do marcador de divisão celular Ki-67 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Negativo	Positivo	TOTAL
COL+CEL	29	12	41
Outras	52	6	58
TOTAL	81	18	99
Valor p	0,016

FIGURA 14- Glomérulo de GESF COL com neo-expressão de CK8/18 em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti-CK8/18; 400x)

FIGURA 15- Glomérulo de GESF NOS negativo para CK8/18 em podócitos (imunoperoxidase anti-CK8/18; 400x)

FIGURA 16- Glomérulo de GESF COL positivo para Ki-67 em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti-Ki-67; 400x)

4.2.3 Marcadores do citoesqueleto e membrana do pedicelo

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para α -ACTININA-4, 14 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 100 casos válidos, 53 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 15 casos da COL; 19 NOS; 14 TIP; quatro PHI e um CEL. Os outros 47 casos apresentaram expressão anômala, com negatividade nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 24 (61,5%) casos da COL; 14 (42,4%) NOS; três (17,6%) TIP; três (42,6%) PHI e três (75,0%) CEL.

A perda de expressão de α -ACTININA-4 nos trechos glomerulares lesados (valor B) ocorreu com maior frequência nos casos da COL do que nas outras variantes ($p=0,019$) (TABELA 14). Quando comparamos a variante COL

com as outras variantes, individualmente, observamos maior ocorrência desse achado imuno-histoquímico na comparação entre COL e TIP ($p=0,002$). Entretanto, não se observou diferença significativa comparando-se COL e NOS ($p=0,105$) (FIGURAS 17 E 18).

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para GLEPP-1, 63 resultaram inconclusivos. Considerando os demais 51 casos válidos, 16 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: quatro casos da COL; quatro NOS; sete TIP e um PHI. Nenhum caso da CEL apresentou esse achado. Os outros 35 casos apresentaram expressão anômala, com negatividade nos segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: 13 (76,5%) casos da COL; 12 (75%) NOS; seis (46,2%) TIP; um (50%) PHI e três (100%) CEL. Não foi observada diferença estatística ao se comparar os casos da COL com as outras variantes ($p=0,393$) (FIGURAS 19 e 20; TABELA 15).

As reações para o anticorpo primário anti-GLEPP-1 foram prejudicadas pela fixação com Duboscq-Brasil, uma vez que foi observada positividade em casos de controles normais fixados em formol, enquanto os casos-controle submetidos à mesma reação imuno-histoquímica, porém fixados em Duboscq-Brasil apresentaram-se negativos.

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para SINAPTOPODINA, 92 resultaram inconclusivos. Dos demais 22 casos válidos, 12 apresentaram expressão imuno-histoquímica global e difusa em células podocitárias, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: dois casos da COL; quatro NOS; quatro TIP e dois PHI. Outros 10 casos apresentaram expressão considerada anômala, com negatividade nos

segmentos glomerulares lesados, distribuídos da seguinte forma: cinco (71,4%) casos da COL; dois (33,3%) NOS; dois (33,3%) TIP e um (100%) CEL (FIGURAS 21 e 22). Nenhum caso válido das variantes PHI e CEL apresentou tal achado. O pequeno número de casos em cada grupo inviabilizou os testes estatísticos propostos.

A tabela 13 detalha os achados imuno-histoquímicos dos marcadores do citoesqueleto e membrana podocitários, com os resultados insatisfatórios, inclusive.

TABELA 13- Resultados da análise imuno-histoquímica com marcadores do citoesqueleto e membrana dos pedicelos

MOLÉCULAS	EXPRESSÃO PODOCITÁRIA		
	EXPRESSÃO NORMAL	PERDA DE EXPRESSÃO NAS LESÕES GLOMERULARES	INCONCLUSIVOS
α -actinina-4	COL= 15 (34,9%) NOS= 19 (45,2%) TIP= 14 (77,8%) PHI= 4 (57,1%) CEL= 1 (25,0%)	COL= 24 (55,8%) NOS= 14 (33,3%) TIP= 3 (16,7%) PHI= 3 (42,9%) CEL= 3 (75,0%)	COL= 4 (9,3%) NOS= 9 (21,4%) TIP= 1 (5,6%) PHI= 0 (0%) CEL= 0 (0%)
GLEPP-1	COL= 4 (9,3%) NOS= 4 (9,5%) TIP= 7 (38,9%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 0 (0%)	COL= 13 (30,2%) NOS= 12 (28,6%) TIP= 6 (33,3%) PHI= 1 (14,3%) CEL= 3 (75,0%)	COL= 26 (60,5%) NOS= 26 (59,5%) TIP= 5 (27,8%) PHI= 5 (71,4%) CEL= 1 (25,0%)
Sinaptopodina	COL= 2 (4,7%) NOS= 4 (9,5%) TIP= 4 (22,2%) PHI= 2 (28,6%) CEL= 0 (0%)	COL= 5 (11,6 %) NOS= 2 (4,8%) TIP= 2 (11,1%) PHI= 0 (0%) CEL= 1 (25%)	COL= 36 (83,7%) NOS= 36 (85,7%) TIP= 12 (66,7%) PHI= 5 (71,4%) CEL= 3 (75,0%)

Nota: Os percentuais aqui exibidos incluem todas as biópsias submetidas às reações imuno-histoquímicas, inclusive as reações inconclusivas.

TABELA 14- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno-histoquímica do marcador α -actinina-4 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Expressão normal	Perda de expressão	TOTAL
COL	15	24	39
Não-COL	38	23	61
TOTAL	53	47	100
Valor p	0,019		

TABELA 15- Comparação dos grupos das variantes COL e não-COL segundo a perda de expressão imuno-histoquímica do marcador GLEPP-1 nas lesões glomerulares dos casos estudados

	Expressão normal	Perda de expressão	TOTAL
COL	4	13	17
Não-COL	12	22	34
TOTAL	16	35	51
Valor p	0,393

FIGURA 17- Glomérulo de GESF COL negativo para α -actinina-4 em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti- α -actinina-4; 400x)

FIGURA 18- Glomérulo de GESF TIP positivo para α -actinina-4 em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti- α -actinina-4; 400x)

FIGURA 19- Glomérulo de controle normal positivo para GLEPP-1 em podócitos (imunoperoxidase anti-GLEPP-1; 400x)

FIGURA 20- Glomérulo de GESF COL negativo para GLEPP-1 em podócitos da metade superior do tufo (imunoperoxidase anti-GLEPP-1; 400x)

FIGURA 21- Glomérulo normal positivo para sinaptopodina em podócitos (imunoperoxidase anti-sinaptopodina; 400x)

FIGURA 22- Glomérulo de GESF TIP negativo para sinaptopodina em podócitos da lesão (imunoperoxidase anti-sinaptopodina; 400x)

4.2.4 Marcadores de MBG

Dos 114 casos submetidos à imuno-histoquímica para COLÁGENO IV, 65 resultaram inconclusivos. Os demais 49 casos restantes apresentaram expressão imuno-histoquímica positiva global e difusa em membrana basal glomerular, idêntica aos controles normais, distribuídos da seguinte forma: 14 casos da COL; 17 NOS; quatro TIP; 12 PHI e dois CEL. Observou-se que as áreas de esclerose glomerular apresentaram maior intensidade de marcação para colágeno IV (FIGURA 23).

FIGURA 23- Glomérulo de GESF TIP positivo para colágeno IV em membrana basal e em trecho esclerótico (imunoperoxidase anti-colágeno IV; 400x)

5 DISCUSSÃO

5.1 Classificação histológica

O aumento no número de pacientes portadores de insuficiência renal crônica levou a um crescente interesse pela melhor compreensão das doenças renais envolvidas, entre as quais se destaca a GESF. O maior entendimento dos mecanismos patogênicos permitiria o desenvolvimento de ações terapêuticas individualizadas e mais eficientes. A incorporação de novas ferramentas biomoleculares à biópsia renal tem gerado importante avanço na compreensão dos processos patogênicos, originando novas classificações histológicas. Com relação à entidade clínico-morfológica conhecida como GESF primária, isso se traduz no recente reconhecimento das variantes usual (NOS), colapsante (COL), celular (CEL), perihilar (PHI) e a “tip lesion” (TIP).

Sabe-se atualmente que algumas características histológicas da GESF estão relacionadas a pior evolução clínica, com rápida deterioração da função renal e proteinúria exacerbada (D’Agati, 1994; Detwiler et al., 1994; Thomas et al., 2006). Vários estudos têm abordado os aspectos moleculares das glomerulopatias e apontam para agravos dos podócitos na gênese da GESF (Pavenstadt et al., 2003; Couser, 1998; Meyrier, 2005; Shankland, 2006; Schmid et al., 2003). Até o momento, são poucos os trabalhos que correlacionam as variantes histológicas da GESF com a expressão imuno-histoquímica de moléculas proteicas podocitárias. Estudos neste sentido são fundamentais para maior compreensão da fisiopatologia, permitindo o reconhecimento de novas categorias diagnósticas e abordagens terapêuticas diferenciadas para cada variante histológica.

Paralelamente, a criação de banco de dados, em nosso meio, com biópsias de GESF classificadas em variantes histológicas específicas é de interesse para pacientes e médicos envolvidos no seu diagnóstico e tratamento, facilitando a realização de novos estudos sobre o tema e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas individualizadas.

A nossa casuística resultou em 131 casos de GESF primária diagnosticados no período entre 1996 e 2006, que foram classificados nas variantes NOS, COL, TIP, PHI e CEL de acordo com os critérios da classificação de Columbia (D'Agati et al., 2004). Desses casos, 50 foram classificados como variante NOS (38,2%), 48 como COL (36,6%), 19 como TIP (14,5%), nove como PHI (6,9%), e cinco como variante CEL (3,8%).

Stokes et al. (2006) reuniram 225 casos não consecutivos distribuídos da seguinte forma: 38,7% da variante NOS e/ou PHI, 26,7% da variante TIP, 24,9% da variante COL e 9,8% da variante CEL. Porém, como trata-se de um agrupamento de casuísticas de diferentes períodos, não refletem a incidência das variantes.

Thomas et al. (2006) publicaram 197 casos registrados na Universidade de *North Carolina* no período de 1982-2001, e obtiveram 42% de NOS, 26% PHI, 17% TIP, 13% COL e 3% de CEL. Neste trabalho não fica claro se foram excluídos casos de glomerulosclerose secundária a doenças como hipertensão arterial ou obesidade.

Os nossos dados mostraram maior prevalência relativa da variante COL, diferentemente dessa casuística. Em nosso estudo, os critérios de Columbia foram mais facilmente caracterizados nas lesões da variante TIP, havendo sobreposição de critérios para as variantes COL e CEL, assim como para NOS e PHI.

Em 1985, Schwartz and Lewis sinalizaram a existência de dois tipos distintos de lesões da GESF, as celulares e as cicatriciais, salientando a sobreposição de aspectos histológicos entre as lesões celulares e colapsantes. De fato, alguns autores questionam a existência da variante CEL alegando que ela seja uma versão da variante COL (Meyrier, 1999). Outros autores acreditam que há dificuldades para se fazer a distinção histológica entre essas variantes e não observaram claramente diferenças clínicas ou prognósticas entre elas (Chun et al., 2004). Vias fisiopatogênicas comuns que atuam nas alterações de proteínas reguladoras do ciclo celular foram demonstradas em ambas variantes (Shankland et al., 2000). No nosso trabalho, verificamos sobreposição de achados histológicos nas duas variantes, juntamente com a presença predominante de hiper celularidade endocapilar (constituída por neutrófilos, macrófagos ou células xantomatosas), e a ausência de lesões colapsantes para a classificação de um caso como CEL, conforme os critérios propostos pela classificação de Columbia (D'Agati et al., 2004; Stokes et al., 2006).

Nos casos em que identificamos COL, chamou-nos a atenção a coexistência de proeminente lesão túbulointersticial, por vezes acompanhada de dilatação microcística dos túbulos, conforme observado por outros autores (Thomas et al., 2006; D'Agati et al., 1994). Embora estas alterações estejam presentes com frequência na GESF COL, podem ser encontradas também em

outras variantes e mesmo em outras glomerulopatias, especialmente quando em estágio avançado de cronicidade (nestes casos, sem a presença de lesões colapsantes e de hiperplasia podocitária). Seu achado, portanto, não deve ser considerado como específico desta variante.

A caracterização das variantes NOS e PHI segundo os critérios de Columbia requer atenção especial. Alguns casos classificados como NOS apresentaram esclerose e hialinização perihilar concomitantemente. De acordo com o critério proposto, devem ser consideradas variante PHI apenas as biópsias onde mais do que 50% dos glomérulos acometidos apresentam as lesões no hilo do glomérulo. A localização da lesão no glomérulo pode variar de uma secção histológica para outra na mesma biópsia, tornando-se necessária a análise de várias secções histológicas para se determinar se as lesões perihilares encontradas comprometem 50% ou mais dos glomérulos. Em nosso estudo, ficou evidente que os critérios propostos por Columbia para diferenciar as variantes PHI e NOS dependem fundamentalmente da representatividade da amostra, sendo obrigatório para sua correta aplicação a análise de vários níveis histológicos. A não observância desta medida por desconhecimento ou por impossibilidade técnica (escassez da amostra ou do número de glomérulos analisáveis) pode levar ao diagnóstico errôneo da lesão, produzindo casuísticas equivocadas quanto a real porcentagem desta variante. Stokes et al. (2006) não incluiu casos da variante PHI em sua casuística por considerar que esta variante habitualmente refere-se à forma secundária de GESF, entretanto ele encontrou lesões perihilares em todas as outras variantes da GESF, com maior ocorrência na variante NOS.

Em nossa análise, encontramos dificuldade para reconhecer a variante TIP nas biópsias em que a lesão apical estava representada marginalmente, sem relação aparente com a saída do túbulo contorcido proximal. Em algumas biópsias, a variante TIP apresentou aspectos morfológicos semelhantes à COL. Nestes casos, a confluência de células podocitárias, muitas vezes hipertróficas, células parietais reativas e epiteliais tubulares, deformou o tufo e conferiu ao glomérulo um aspecto final semelhante ao de uma lesão colapsante. A ausência de colapso típico das alças capilares e de hiperplasia característica de podócitos, assim como de critérios coadjuvantes, tais como lesões túbulointersticiais, auxilia no diagnóstico diferencial (Stokes et al., 2006; Haas, 2005).

Em algumas biópsias de TIP, havia hipercelularidade endocapilar com tumefação endocapilar e macrófagos de aspectos espumosos, o que sugeria o diagnóstico de CEL, porém a análise cuidadosa de diversas secções e a realização de novos cortes histológicos tornou evidente a localização da lesão junto ao pólo urinário. Ficou claro mais uma vez a importância de ampla representatividade das amostras investigadas para a aplicação da classificação de Columbia. Thomas et al. (2006) já haviam chamado atenção para esse aspecto e Stokes et al. (2006) comentaram que existe a possibilidade da CEL representar uma evolução desfavorável da TIP, já que eles encontraram diversos casos previamente diagnosticados como CEL que demonstravam lesões apicais em níveis aprofundados do bloco de parafina.

5.2 Achados imuno-histoquímicos

Em nosso estudo, houve maior ocorrência da perda de expressão da α -actinina-4 nas células podocitárias dos segmentos lesados em glomérulos dos casos de COL quando comparados às outras variantes ($p=0,019$). Considerando-se apenas as reações imuno-histoquímicas conclusivas, 61,5% dos casos de COL apresentaram perda de expressão de α -actinina-4, o mesmo ocorrendo em 17,6% de TIP, 42,4% de NOS. Nas variantes PHI e CEL, a perda de expressão do marcador ocorreu em 42,9 e 75% respectivamente. Cabe lembrar que estes grupos são constituídos por poucas amostras.

A α -actinina-4 é uma proteína de ligação cruzada dos filamentos de actina, constituinte do citoesqueleto do pedicelo podocitário. Sua função está relacionada à manutenção da estabilidade mecânica e conformação estrutural dos pedicelos, promovendo o realinhamento do citoesqueleto do podócito em resposta ao *stress* e, também, à presença de hormônios vasoativos e medicamentos, por exemplo, ciclosporina (Faul et al., 2007 e 2008). A α -actinina-4 mantém ligações com os microfilamentos F-actina e miosina, com filamentos intermediários e microtúbulos dos processos podocitários primários, com proteínas transmembranas da fenda de filtração glomerular e com proteínas de ancoragem entre o pedicelo e a MBG. O citoesqueleto se conecta com as proteínas transmembranas do diafragma podocitário (como a nefrina), através de moléculas adaptadoras como o CD2-AP e o ZO-1. Essas interações permitem a transmissão aos pedicelos das forças tensoras que ocorrem no capilar glomerular (Endlich et al., 2001).

A expressão da α -actinina-4 é demonstrada de forma exclusiva no citoplasma dos podócitos (Lachapelle et al., 1991). Mutações no gene ACTN-4, que codifica esta proteína, podem causar GESF autossômica dominante de início tardio (Kaplan et al., 2000). Henderson et al. (2008) demonstraram que ratos *knockout* para o gene ACTN-4 (que não expressam a α -actinina-4), assim como ratos homozigotos para mutações desse gene (que expressam apenas a forma defeituosa), apresentaram glomerulopatia grave com alterações histológicas glomerulares similares às aquelas encontradas na GESF COL. Entretanto, os ratos desprovidos de α -actinina-4 apresentaram maior percentual de glomérulos lesados e maior dano túbulointersticial do que os mutantes homozigotos. No mesmo estudo, ratos heterozigotos para mutações do ACTN-4, que possuíam um dos alelos do gene normal, apresentaram mínimas alterações morfológicas, caracterizadas por hipertrofia glomerular e cilindros hialinos tubulares (Henderson et al., 2008; Michaud et al., 2003; Haas, 2008). A variante COL tem como característica histológica o “colapso” do tufo glomerular, muitas vezes associado à formação de pseudocrescentes, e nossos dados sugerem que a alteração da α -actinina-4 no citoesqueleto podocitário possa estar associada aos mecanismos patogênicos desta forma de GESF. Atualmente, sabe-se que a GESF COL pode ser desencadeada por fatores etiológicos de natureza diversa, tais como infecções virais (parvovirus-B19) e reações a drogas (pamidronato, interferon), porém até o momento, não é do nosso conhecimento estudos dirigidos para a expressão da α -actinina-4 nas variantes da GESF em humanos. Goode et al. (2004) demonstraram expressão elevada de α -actinina-4 através de imunomicroscopia eletrônica em

podócitos humanos com GNM, porém não observaram o mesmo achado em NLM.

Houve maior perda da expressão de CD10 em segmentos glomerulares lesados dos casos COL, quando comparados com as demais variantes ($p=0,004$). Esse resultado está de acordo com dados da literatura e aponta para a importância de se investigar melhor o papel dessa molécula na função podocitária, sugerindo ainda a possível utilização deste marcador para o diagnóstico diferencial da GESF COL. O CD10 também é conhecido como CALLA, originado da sigla em inglês para Antígeno Comum da Leucemia Linfoblástica Aguda. A aquisição e/ou perda de antígenos hematopoiéticos tem sido relatada em vários estágios do desenvolvimento e diferenciação do néfron. Enquanto alguns antígenos hematopoiéticos são expressos transitoriamente durante a embriogênese, como o CD35, o CD10 é mantido nos podócitos dos glomérulos maduros. Barisoni et al. (1999) demonstraram perda de marcação de CD10 em casos de GESF COL e em casos de HIVAN, mas não encontrou o mesmo achado nos casos de GNM e NLM.

Nossos resultados demonstraram perda de expressão de WT-1 em segmentos glomerulares lesados, que ocorreu com maior frequência na variante COL ($p=0,002$). A proteína WT-1 é um fator de transcrição gênica relacionado à nefrogênese e maturação podocitária. Durante o desenvolvimento do rim, esta proteína é expressa na indução de células mesenquimais, posteriormente situando-se em células epiteliais supostamente podocitárias no estágio de vesícula do embrião, e finalmente restrito aos podócitos nos glomérulos maduros (Ohtaka et al., 2002). Alguns autores demonstraram que na GESF COL os podócitos deixam de expressar esta

molécula e passam a expressar moléculas normalmente presentes apenas durante a embriogênese (Barisoni et al., 2007 e 2009; Albaqumi et al., 2008; Ohtaka et al., 2002). Mutações do gene WT-1 estão associadas com síndromes genéticas como a síndrome de Frasier e a síndrome de Danys-Drash, ambas associadas com proteinúria acentuada e desdiferenciação podocitária (Barisoni et al., 2009).

A desdiferenciação podocitária no curso da GESF COL é um fato bem documentado na literatura médica, e se caracteriza pela perda de expressão de moléculas relacionadas à maturação celular como o WT-1, vimentina e CD10; perda de marcadores do citoesqueleto podocitário, como sinaptopodina e α -actinina-4; proteínas da membrana celular do pedicelo, como GLEPP-1; e retorno ao ciclo de divisão celular (Barisoni et al., 1999 e 2009; Shankland et al., 2000; Pavenstadt et al., 2003; Nagata et al., 1993).

Nosso trabalho sugere que a desdiferenciação do podócito na variante COL pode vir acompanhada da neo-expressão de CK, porém tal fato não ocorre com a mesma frequência nas variantes NOS, TIP e PHI da GESF.

Observamos maior ocorrência da neo-expressão de CK8/18 e CK19 nas células podocitárias da variante COL da GESF ($p=0,014$ e $0,008$, respectivamente) em relação às demais variantes. Esse achado foi detectado em torno de segmentos lesados nos glomérulos, em conformidade com relatos de literatura, onde os autores interpretaram este evento como consequência da desdiferenciação do podócito que ocorre na variante COL da GESF (Barisoni et al., 1999 e 2009; Albaqumi et al., 2008). As citoqueratinas são filamentos intermediários presentes na maioria das células epiteliais, constituídos por dois pares de polipeptídios de queratina, sendo cada par formado por uma queratina

básica e outra ácida. Os polipeptídios de queratina são enumerados de um a 20, sendo as queratinas de um a oito de tipo II (básicas), e as queratinas de nove a 20 de tipo I (ácidas). As citoqueratinas de baixo peso molecular 8, 18 e 19 são amplamente expressas nos epitélios simples (não estratificados), ductais e pseudoestratificados do organismo humano. Estão expressas em podócitos durante a embriogênese, entretanto essa expressão é perdida no podócito maduro (Quinlan et al., 1985; Holthöfer et al., 1984; Miao et al., 2009; Bhargava et al., 2010). Estudos ultraestruturais e imuno-histoquímicos sugerem que a GESF COL seja uma doença primária do podócito e que as células que se proliferam e preenchem o espaço de Bowman formando “pseudocrescentes” nessa variante sejam podócitos desdiferenciados (Barisoni et al., 1999). Como parte do processo de desdiferenciação, os podócitos perdem proteínas de células maduras, tais como, as proteínas inibidoras do ciclo celular, entrando em proliferação desordenada. Além disso, perdem a expressão de moléculas como WT-1, GLEPP-1 e CD10, voltando a expressar moléculas presentes durante a embriogênese, como as citoqueratinas e PAX-2 (Barisoni et al., 2007; Albaqumi et al., 2008; Ohtaka et al., 2002).

A origem das células que compõem as “pseudocrescentes” em lesões de COL é motivo de controvérsia. Alguns autores acreditam que essas células originem-se das células epiteliais parietais, uma vez que expressam proteínas próprias destas células, como citoqueratinas, e foi observada formação de “pontes” com as células parietais que revestem a cápsula de Bowman nos segmentos lesados dos tufos (Dijkman et al., 2005 e 2006). Outros autores contestam esta hipótese baseando-se no fato dessas “pontes” entre as células epiteliais parietais e viscerais (podocitárias) estarem presentes também em rins

normais (Bariety et al., 2006). É provável que ambos os mecanismos contribuam na formação de pseudocrescentes.

O marcador imuno-histoquímico Ki-67, de proliferação celular, resultou positivo nas células glomerulares em localização de podócitos em um total de 18 dos nossos casos, sendo 10 da COL, três NOS, dois CEL e três TIP. Embora se observe uma aparente predominância desse achado nos casos de COL, quando comparamos o grupo COL com os “não-COL”, essa distribuição não se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,098$). Entretanto, quando comparados os grupos COL e CEL versus NOS, TIP e PHI, observou-se maior ocorrência de positividade em podócitos do primeiro grupo ($p=0,016$). A expressão do antígeno Ki-67 é associada à síntese de DNA que caracteriza a entrada na fase S do ciclo celular. Os podócitos em fase embrionária dividem-se normalmente, porém à medida que amadurecem e se diferenciam, eles saem do ciclo celular e entram no estado quiescente que caracteriza a fase adulta (Nagata et al., 1993; Marshall et al., 2006). Shankland et al. (2000) demonstraram que esse antígeno é expresso em lesões glomerulares causadas pela GESF COL e HIVAN, porém o mesmo não ocorrendo em outras podocitopatias analisadas, como a NLM e a GNM. Achados semelhantes foram descritos por Barisoni et al. (1999). A variante CEL, por sua vez, também é considerada por muitos uma variação da COL, e portanto nela também ocorre desdiferenciação e hiperplasia do podócito (Meyrier et al., 1999; Chun et al., 2004). De fato, quando comparamos os nossos casos COL e CEL (grupo 1) com os NOS, TIP e PHI somados (grupo 2), observamos maior ocorrência de positividade para Ki-67 em podócitos das lesões do grupo COL + CEL

($p=0,016$). Esse é um achado coerente com a literatura conforme explicado acima.

A expressão de sinaptopodina e GLEPP-1, proteínas do citoesqueleto e membrana dos pedicelos podocitários, respectivamente, não revelou diferenças relevantes entre as variantes. No entanto, em ambos os casos houve dificuldades técnicas expressivas devido ao grande número de reações inconclusivas, com prejuízo na obtenção e interpretação dos dados.

A análise da membrana basal dos glomérulos com lesões apresentou positividade imuno-histoquímica preservada para o marcador colágeno IV nas cinco variantes histológicas, com esperado aumento na intensidade de marcação nas áreas escleróticas. Este achado não nos causou surpresa e está de acordo com o conceito de que a lesão da GESF parece ser um evento desencadeado primariamente em podócitos.

5.3 Considerações finais e perspectivas

A classificação das biópsias renais de GESF da DAP – HCFMUSP segundo o critério morfológico de Columbia e a análise imuno-histoquímica de moléculas podocitárias permitiu, no presente estudo, o reconhecimento das diversas variantes e sua distribuição dentro da GESF primária em nosso meio. Dentre as variáveis morfológicas por nós analisadas, a COL apresentou-se como a melhor caracterizada quanto às alterações imuno-histoquímicas. O estudo evidenciou também a importância de uma representação ampla das amostras para se obter uma conclusão diagnóstica correta.

Com base nestes resultados, é nossa intenção implantar, em nossa rotina diagnóstica, um protocolo para avaliação das biópsias renais de GESF que inclua a investigação cuidadosa de um maior número de secções histológicas e o estudo imuno-histoquímico com marcadores moleculares podocitários como ferramenta complementar no diagnóstico diferencial de lesões de COL.

Consideramos ser importante a realização de novo estudo prospectivo utilizando uma casuística mais numerosa, que permita a validação, através da análise multivariada, das conclusões aqui apresentadas. Novos trabalhos poderão permitir ainda a determinação do valor prognóstico das diferentes variantes na progressão da GESF, além de fornecer informações valiosas para a compreensão dos mecanismos patogênicos e identificação de novos alvos terapêuticos.

6 CONCLUSÕES

1. Com relação à análise morfológica das biópsias renais de GESF conforme a classificação de Columbia:

a) 38,2% dos casos foram caracterizados como variante NOS, 36,6% como COL, 14,5% como TIP, 6,9% como PHI e 3,8% CEL.

b) Quando comparada com a casuística de outros centros apresentadas na literatura, a variante COL mostrou uma prevalência maior em relação às demais variantes.

c) Observou-se sobreposição de critérios histológicos entre as variantes COL e CEL, dificultando o diagnóstico diferencial.

d) A caracterização das variantes PHI e TIP dependeu fortemente da representação ampla da amostra; a representação escassa ou inadequada do material analisado pode conduzir a um diagnóstico errôneo.

2. Com relação à análise imuno-histoquímica das moléculas de diferenciação podocitária nas biópsias renais de GESF:

a) A variante COL da GESF distingue-se das demais, apresentando maior ocorrência da perda de expressão de CD10 e WT-1 nas lesões glomerulares.

3. Com relação à análise imuno-histoquímica das moléculas marcadoras de desdiferenciação podocitária nas biópsias renais de GESF:

a) A variante COL apresenta neo-expressão de CK8/18 e CK19 em podócitos dos glomérulos lesados.

b) O marcador de divisão celular ki-67 é mais expresso nos podócitos do grupo das variantes COL e CEL do que no grupo das outras variantes

4. Com relação às moléculas do citoesqueleto do podócito:

a) A variante COL da GESF distingue-se das demais, apresentando maior ocorrência da perda de expressão da molécula α -actinina-4.

5. A variante COL apresentou um conjunto de resultados imuno-histoquímicos que permitiu melhor caracterização na análise em relação às demais variantes.

7 ANEXOS

Tabela de análise imuno-histoquímica dos casos de GESF primária

		Variante	CD10	Ki67	CK19	CK8-18	Vim	Alfa-Ac4	GLEPP	WT-1	Sinaptop	Colag-IV
	2477343	NOS										
2	2698510	COL	A	C	C	C	A	A	B	A	E	E
3	2723700	NOS	A	E	D	C	A	A	B	A	E	E
4	2814919	TIP	E	E	C	C	A	A	E	A	A	E
5	2816822	NOS	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
6	2834804	CEL	A	E	C	E	E	A	B	A	E	A
7	2836122	TIP	A	C	C	C	A	A	B	B	E	E
8	2850044	COL										
9	2867745	TIP	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
10	2908905	COL										
11	2947781	COL										
12	2960613	PHI	A	E	E	E	E	A	E	A	E	A
13	3013065	NOS	B	C	C	C	A	A	A	B	E	D
14	3043959	NOS	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
15	3047806	NOS	B	C	C	C	A	B	E	A	E	E
16	3051110	COL	A	E	C	E	A	A	B	A	E	E
17	3068242	COL	A	C	C	C	A	A	A	A	E	E
18	3071715	COL	B	C	D	D	A	B	B	B	E	A
19	3077853	COL	A	C	C	C	A	B	E	A	E	E
20	3077861	TIP	A	C	E	C	A	A	A	A	E	E
21	3125912	NOS	B	C	D	E	A	A	E	B	E	E
22	3126358	TIP	B	C	D	D	A	A	B	B	E	E
23	3198618	PHI	B	C	D	D	A	B	B	E	E	D
24	3217639	NOS	A	C	C	D	A	A	E	A	E	E
25	3276171	NOS	A	C	C	C	A	B	B	A	E	A
26	3309320	NOS	A	C	C	C	A	A	A	A	E	E
27	3311724	PHI	A	C	C	C	A	A	E	E	E	E
28	3315711	COL	E	E		C	A	A	E	A	E	E
29	3323676	COL	B	C	C	C	A	B	E	A	E	E
30	3324451	NOS	A	D	C	C	A	B	E	E	E	E
31	3386040	NOS	E	C	D	D	A	B	E	E	E	E
32	3386210	COL	A	C	C	D	A	A	B	A	E	E
33	3414949	COL	B	C	D	D	B	B	E	E	E	E
34	3461742	COL	B	C	D	D	A	B	B	B	E	E
35	3737322	TIP	A	C	C	D	A	A	A	A	E	A
36	3831809	NOS	A	C	C	C	A	A	E	E	E	E
37	3858456	NOS	E	C	E	C	A	A	E	A	E	E

38	3858472	NOS		D	C	C	A	B	E	A	E	E
39	3894746	COL	B	D	D	D	A	B	B	B	E	A
40	4073312	NOS	A	C	C	E	E	E		A	E	E
41	4073746	NOS	A	C	C	C	A	B	E	A	E	E
42	4092732	NOS	A	C	E	C	A	E	E	A	E	A
43	4110714	COL	B	C	C	C	B	B	E	A	E	E
44	4194969	CEL	B	D	D	D	A	B	B	B	E	E
45	4486080	NOS	B	C	C	D	A	B	B	B	B	E
46	4552610	NOS										
47	4560493	COL	E	C	C	C	A	A	A	B	B	E
48	4252187	COL	A	C	C	C	A	A	A	A	A	E
49	4294874	PHI	A	C	C	C	A	B	E	B	E	E
50	4305248	TIP										
51	4357884	COL	E	C	D	D	A	B	E	E	E	E
52	4397967	COL	E	D	D	D	A	B	E	B	B	E
53	4410971	NOS										
54	4610610	COL										
55	4635167	COL	E	C	C	D	B	A	E	B	E	A
56	4645081	COL	A	C	D	C	A	B	E	B	B	A
57	4681177	COL	A	C	C	C	E	A	E	E	E	E
58	4691946	COL	B	D	D	D	B	B	E	E	E	E
59	4699157	NOS	E	C	C	C	A	B	E	B	E	E
60	4732928	COL	B	C	C	C	B	E	E	E	E	A
61	4826213	COL	B	C	C	D	A	B	E	B	E	B
62	4853873	NOS	B	C	C	C	E	E		E	E	A
63	4917928	TIP	A	C	C	C	B	A	A	A	A	A
64	4954998	NOS	B	C	C	C	A	A	E	B	E	A
65	5090830	COL	E	E	E	E	A	A	E	B	E	E
66	5120470	TIP	A	C	C	D	A	A	A	A	B	A
67	5145791	NOS	E	E	E	E	E	E		E	E	E
68	5154081	NOS	A	C	C	D	A	A	E	A	A	A
69	5170443	NOS	B	C	C	D	A	B	B	B	E	E
70	5184665	COL	B	C	D	D	A	B	E	B	B	E
71	5203805	NOS	A	D	D	D	A	A	B	A	E	E
72	5242045	NOS	A	C	C	C	A	A	E	A	A	E
73	5309026	COL	B	C	C	D	A	B	B	B	E	E
74	5315891	NOS	A	C	C	D	A	A	A	A	E	A
75	5332842	NOS	A	C	C	C	A	A	A	A	A	A
76	5345723	COL	E	E	E	E	E	E		E	E	E
77	5451531	NOS	B	C	C	A	A	A	E	A	B	A
78	5269628	COL	B	C	D	D	A	B	E	B	E	E

79	5609437	NOS										
80	5625076	COL	E	C	C	D	A	A		B	E	E
81	5655960	COL	B	D	D	D	A	B	B	B	E	A
82	5693837	NOS	A	C	E	C	A	E		A	E	A
83	5694337	CEL	B	C	D	D	A	B	E	B	B	A
84	5701309	COL	B	D	C	C	A	A	B	B	B	A
85	5720079	NOS	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	6119395	TIP	A	D	D	D	A	A	B	B	A	A
87	5753325	COL	B	C	C	C	E	A	E	E	E	E
88	5759129	NOS	E	E	E	E	E	B		E	E	E
89	5869986	NOS	E	E	E	E	E	E		E	E	E
90	5877245	PHI	E	E	E	E	E	E		E	E	E
91	5881420	TIP	B	C	C	C	A	A	A	B	E	E
92	5938473	COL	E	E	E	C	A	E		E	E	A
93	6001572	TIP	A	C	D	D	A	B	E	B	B	A
94	6003877	PHI	B	C	D	C	A	B	E	B	A	A
95	6183301	NOS	B	C	C	D	A	A	B	A	E	A
96	6305865	NOS	A	C	C	C	A	A	B	A	A	A
97	6315704	TIP	B	D	D	D	A	B	B	B	E	A
98	6385818	TIP	A	C	C	C	A	A	E	A	E	A
99	6447929	TIP	A	C	D	D	A	A	B	A	E	A
100	6452663	COL	B	D	D	D	A	B	E	B	E	E
101	6469671	COL	B	C	D	D	A	B	E	B	E	E
102	6503276	TIP	A	D	C	C	A	A	A	A	A	A
103	6577849	COL	B	C	D	D	A	B	E	B	E	E
104	6586953	NOS										
105	6594573	NOS	B	C	C	C	A	B	B	B	E	A
106	6636667	COL	B	C	D	D	A	B	B	B	E	A
107	6638082	PHI	A	C	C	C	A	A	E	A	E	A
108	6710964	NOS										
109	6834906	NOS	B	C	D	D	A	B	B	B	E	A
110	6875777	COL	B	D	C	C	A	A	E	B	E	E
111	6888070	CEL	B	D	C	C	A	B	B	B	E	E
112	6923879	NOS	B	C	C	E	A	B		B	E	A
113	6964613	COL	B	D	D	D	A	B	B	B	E	E
114	7160186	PHI										
115	7251599	COL	B	D	D	D	A	E		B	E	A
116	7216556	CEL	E	C	E	E	E	E	E	E	E	A
117	7218753	NOS	B	C	C	C	A	A	B	B	E	E
118	7228880	NOS	A	C	C	C	A	A	E	A	E	E
119	7289197	NOS	A	C	C	C	A	A	E	A	E	E

120	7313322	NOS	B	C	C	D	A	B	B	B	E	A
121	7326599	COL	B	D	D	D	A	B	E	B	E	E
122	2601818	TIP	B	C	D	D	B	B	B	B	E	A
123	3217620	NOS	E	C	C	C	E	E	E	E	E	A
124	3766209	COL	A	C	C	C	A	A	A	A	A	A
125	4978552	COL										
126	5350816	TIP	B	C	C	C	A	A	A	A	E	A
127	5528054	COL	B	C	D	D	A	B	B	B	E	A
128	5667925	COL	B	C	D	D	A	B	B	B	E	A
129	5753333	TIP	A	C	C	C	A	A	E	A	E	A
130	6192254	NOS	E	E	E	E	E	E	B	A	E	A
131	6679056	PHI	B	C	C	C	A	A	A	A	A	A

* Legendas dos subtipos: COL= colapsante; NOS= usual; TIP= tip lesion; PHI= perihilar. **
 Legendas da imuno-histoquímica: A= Positivo em todos glomérulos presentes; B= Positivo nos
 glomérulos normais, mas negativo nas lesões glomerulares; C= Negativo difusamente (nos
 glomérulos); D= Positivo nas lesões glomerulares (apenas); E= Insatisfatório para avaliação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol*. 2004; 11(6):304-9.

Albaqumi M, Barisoni L. Current views on collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(7):1276-81.

Bahiense-Oliveira M, Saldanha LB, Mota EL, Penna DO, Barros RT, Romão-Junior JE. Primary glomerular diseases in Brazil (1979-1999): is the frequency of focal and segmental glomerulosclerosis increasing? *Clin Nephrol*. 2004; 61(2):90-7.

Barity J, Bruneval P, Meyrier A, Mandet C, Hill G, Jacquot C. Podocyte involvement in human immune crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2005; 68: 1109-19.

Barity J, Mandet C, Hill GS, Bruneval P: Parietal podocytes in normal human glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17: 2770-2780, 2006

Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10(1):51-61.

Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2(3):529-42.

Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133(2):201-16.

Bhargava R, Dabbs DJ. Immunohistology of Metastatic Carcinomas of Unknown Primary. Elsevier Inc. In: *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*; [edited by] David J. Dabbs.— 3rd Edition; Philadelphia, PA,. 2010: ch 8: p206-55.

Brenchley PE: Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18 Suppl 6:vi21-5.

Chun MJ, Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Focal Segmental Glomerulosclerosis in nephrotic adults: Presentation, prognosis, and response to therapy of the histologic variants. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(8):2169-77.

Corwin HL, Schwartz MM, Lewis EJ: The importance of sample size in the interpretation of the renal biopsy. *Am J Nephrol*. 1988; 8:85-89.

Couser WG. Glomerulonephritis. *Lancet*. 1999; 353:1509-15.

Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 1998; 13:10-15.

Davison AM, Cameron JS, Grunfeld JP, Kerr DNS., Ritz E, Winearls CG. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 2nd ed., Editorial Oxford Medical Publications. 1998.

Dijkman H, Smeets B, van der Laak J, Steenbergen E, Wetzels J. The parietal epithelial cell is crucially involved in human idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney int.* 2005; 68: 1562-72.

Dijkman HB, Weening JJ, Smeets B, Verrijp KC, van Kuppevelt TH, Assmann KK, Steenbergen EJ, Wetzels JF. Proliferating cells in HIV and pamidronate-associated collapsing focal segmental glomerulosclerosis are parietal epithelial cells. *Kidney Int.* 2006; 70: 338-44.

D'Agati V. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003; 23:117-34.

D'Agati V: The many masks of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1994; 46: 1223-41.

D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathological classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis.* 2004; 43:368-82.

D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2008; 17:271-81.

Detwiler RK, Falk RJ, Hogan SL, Jennette JC. Collapsing glomerulopathy: a clinically and pathologically distinct variant of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 1994; 45(5):1416-24.

Endlich N, Kress KR, Reiser J, Utteinweiler D, Kriz W, Mundel P, and Endlich K. Podocytes responses to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 413-22.

Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(9):428-37.

Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser L, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med.* 2008; 14(9):931-8.

Fogo A, Glick AD, Horn SL, Horn RG. Is focal segmental glomerulosclerosis really focal? Distribution of lesions in adults and children. *Kidney Int.* 1995; 47(6):1690-6.

Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, Chiang ML, MacDonell Jr, Ichikawa I. Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 1990; 38:115-23.

Fogo A, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, MacDonell RC Jr, Ichikawa I. Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int.* 1990; 38(1):115-23.

Giannico G, Yang H, Neilson EG, Fogo AB. Dystroglycan in the diagnosis of FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4(11):1747-53.

Goode NP, Shires M, Khan TN, Mooney AF. Expression of α -actinin-4 in acquired human nephrotic syndrome: a quantitative immunoelectron microscopy study. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(4):844-51.

Haas M. Collapsing glomerulopathy: many means to a similar end. *Kidney Int.* 2008 Mar;73(6):669-71.

Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: a comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis.* 1997; 30:621-31.

Haas M, Spargo BH, Coventry S. Increasing incidence of focal-segmental glomerulosclerosis among adult nephropathies: a 20-year renal biopsy study. *Am J Kidney Dis.* 1995; 26(5):740-50.

Haas M. The glomerular tip lesion: What does it really mean? *Kidney Int.* 2005; Mar; 67(3):1188-9.

Holthöfer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I. Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab Invest.* 1984; 50(5):552-9.

Howie AJ, Brewer DB. The glomerular tip lesion: a previously undescribed type of segmental glomerular abnormality. *J Pathol.* 1984; 142:205-20.

Howie AJ, Pankhurst T, Sarioglu S. Evolution of nephrotic-associated focal segmental glomerulosclerosis and relation to the glomerular tip lesion. *Kidney Int.* 2005; 67: 987-1001.

Howie AJ; Changes at the glomerular tip: a feature of membranous nephropathy and other disorders associated with proteinuria. *J Pathol.* 1986; 150:13-20.

Jennette JC, Hippi CG. C1q nephropathy: a distinct pathologic entity usually causing nephritic syndrome. *Am J Kidney Dis.* 1985; 6: 103-10.

Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, D'Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int.* 2001; 59(4):1498-509.

Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodríguez-Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000; 24: 251-6.

Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998; 1(4): 575-82.

Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, de Heer E, Paul LC, Bruijn JA. Expression of podocyte-Associated Molecules in Acquired Human Kidney Diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14; 2063-71.

Korbet SM: Primary focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(7): 1333-40.

Lachapelle M, Bendayan M. Contractile proteins in podocytes immunocytochemical localization of actin and alpha-actinin in normal and nephrotic rat kidneys. *Virchows Arch B cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1991; 60: 105-11.

Malafronte P, Mastroianni-Kirsztajn G, Betônico GN, Romão JE Jr, Alves MA, Carvalho MF, Viera Neto OM, Cadaval RA, Bérnago RR, Woronik V, Sens YA, Marrocos MS, Barros RT. Paulista Registry of glomerulonephritis: year data report. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21(11):3098-105.

Markowitz GS, Schwimmer JA, Stokes MB, Nasr S, Seigle RL, Valeri AM, D'Agati VD. C1q nephropathy: a variant of focal segmental Glomerulosclerosis. *Kidney Int*; 2003; 64(4):1232-40.

Marshall CB, Shankland SJ. Cell Cycle and Glomerular Disease: A minireview. *Nephron Exp Nephrol*. 2006; 102:e39-e48.

Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2005; 1(1):44-5.

Meyrier AY. Collapsing glomerulopathy: Expanding interest in a shrinking tuft. *Am J Kidney Dis*. 1999; 33(4):801-3.

Miao J, Fan Q, Cui Q, Zhang H, Chen L, Wang S, Guan N, Guan Y, Ding J. Newly identified cytoskeletal components are associated with dynamic changes of podocyte foot processes. *Nephrol Dial Transplant*. 2009; 24(11):3297-305.

Nagata M, Yamaguchi Y, Ito K. Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys. *Anat Embryol (Berl)*. 1993; 187(3):275-9.

Ohtaka A, Ootaka T, Sato H, Ito S. Phenotypic change of glomerular podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis: developmental paradigm? *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 11-15. Suppl 9:11-5.

Ostalska-Nowicka D, Zachwieja J, Nowicki M, Kaczmarek E, Witt M. Is mesangial hypercellularity with glomerular immaturity a variant of glomerulosclerosis? *Pediatr Nephrol*. 2007; 22(5):674-83.

Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev*. 2003; 83: 253-307.

Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, Achtstätter T, Moll R, Jorcano JL, Magin TM, Franke WW. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann N Y Acad Sci*. 1985; 455: 282-306.

Regele HM, Fillipovic E, Langer B, Poczewski H, Kraxberger I, Bittner RE, Kerjashki D. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal

change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol. 2000; 11: 403-412.

Rich AR. A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. Bull Johns Hopkins Hosp. 1957; 100(4): 173-86.

Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne H, Schlöndorff D, Kretzler M. Gene Expression Profiles Of Podocytes-Associated Molecules as Diagnostic Markers in Acquired Proteinuric Diseases. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(11):2958-66.

Schwartz MM, Lewis EJ. Focal Segmental Glomerulosclerosis: The cellular lesion. Kidney Int. 1985; 28(6): 968-74.

Shankland SJ. Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease. Kidney Int. 1999; 56(4):1208-15.

Shankland SJ, Eitner F, Hudgkins KL, et al. Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human glomerular disease: Role in podocyte proliferation and maturation. Kidney Int 2000; 58(2):674-83.

Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. Kidney Int. 2006; 69(12):2131-47.

Sharma M, Sharma R, McCarthy ET, Savin VJ: The focal segmental glomerulosclerosis permeability factor: biochemical characteristics and biological effects. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004; 229(1): 85- 98.

Silverstein DM, Craver R. Presenting Features and Short-Term Outcome According To Pathologic Variant in Childhood Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2(4):700-7.

Srivastava T, Garola RE, Singh HK. Cell-cycle regulatory proteins in the podocyte in collapsing glomerulopathy in children. *Kidney Int*. 2006; 70(3):529-35. Epub 2006 Jun 14.

Stokes MB, Markowitz GS, Lin J. Glomerular tip lesion: a distinct entity within the minimal change disease/focal segmental glomerulosclerosis spectrum. *Kidney Int*. 2004; 65:1690-1702.

Stokes MB, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD. Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathological features. *Kidney Int*. 2006; 70(10):1783-92.

Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, ten Holder S, Jennette CE, Falk RJ, Jennette JC. Clinical and Pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants. *Kidney Int*. 2006; 69:920-926.

Valeri A, Barisoni L, Appel G, Seigle R, D'Agati V. Idiopathic collapsing focal segmental glomerulosclerosis: a clinicopathologic study. *Kidney Int.* 1996; 50: 1734-46.

Verani RR. Obesity-associated focal segmental glomerulosclerosis: pathological features of the lesion and relationship with cardiomegaly and hyperlipidemia. *Am J Kidney Dis.* 1992; 20(6):629-34.

Weiss MA, Daquiaoag E, Margolin EG, Pollaak VE. Nephrotic syndrome, progressive irreversible renal failure and glomerular "collapse": A new clinicopathologic entity?. *Am J Kidney Dis.* 1986; 7(1):20-8.

Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK, Wharram BL, Shedden KA, Misek DE, Kuick RD, Wiggins RC. Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(10):2953-66.

Winn MP. Approach to the evaluation of heritable diseases and update on familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18 [Suppl 6]: vi14-vi10.

Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi M, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in Focal Segmental Glomerulosclerosis Lesions. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1816-23.