GABRIELA DE MENDONÇA REZENDE

**Lesão podocitária na nefrite lúpica membranosa pura
e proliferativa: mecanismos distintos de proteinúria?**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e
Infecciosos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eloísa Silva Dutra de
Oliveira Bonfá

**SÃO PAULO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rezende, Gabriela de Mendonça

Lesão podocitária na nefrite lúpica membranosa pura e proliferativa : mecanismos distintos de proteinúria? / Gabriela de Mendonça Rezende. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientadora: Eloísa Silva Dutra de Oliveira Bonfá.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Nefrite lúpica 3.Podócitos
4.Proteinúria

USP/FM/DBD-409/14

*"In life you're gonna go far
If you do it right, you'll love where you are
Just know, wherever you go
You can always come home
Sometimes it may seem dark
But the absence of the light is a necessary part
Just know, you're never alone
You can always come back home"*

Jason Mraz

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Vilton de Rezende Júnior (*in memoriam*) e à minha mãe, Regina Célia de Mendonça Rezende, que me deram a base para ser o que sou hoje, pelo apoio e amor incondicional.

À minha irmã Mariana, meu cunhado César e ao meu sobrinho Nicolas.

À minha irmã Margarida, meu cunhado Victor, e meus sobrinhos Pedro e João.

Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Eloísa Bonfá, por ter me dado esta oportunidade de grande crescimento pessoal e profissional, pela sua orientação e ensinamentos durante esta jornada. Do convívio resultou uma grande admiração e respeito.

À minha coorientadora, Dr^a. Vilma dos Santos Trindade Viana, pela sua orientação e apoio constantes durante todo o processo de aprendizado no desenvolvimento desta tese, pelo carinho e amizade.

À Dr^a. Denise M.A.C. Malheiros, pela sua contribuição, dedicação e carinho durante o desenvolvimento desta tese.

Ao Dr. Eduardo Ferreira Borba e à Dr^a. Irene Noronha, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Elaine Pires Leon, Neila Aparecida de Souza Silva, Cleonice da Silva, pela dedicação, competência e suporte laboratorial e técnico.

À Prof^a. Dr^a. Rosa Pereira, Dr. Ricardo Fuller e Dr^a. Sheila Siqueira, que compuseram minha banca de qualificação com contribuições relevantes para a tese.

Às colegas Elaine Leon, Cleonice Bueno, Margarete Vendramini, Elislaine Fiori, Virginia Bonoldi, Eliana Marcelino e Aurora Gomes, as quais se tornaram grandes amigas.

À equipe da secretaria da Reumatologia, Claudia, Marta e Iná, no apoio sempre que necessário.

Aos colegas Monique, Luciana, Patrícia, Juliane, Levi, Carol, Rafael e Zilcem, que me acolheram quando iniciei meu estágio nos ambulatórios de LES e Vasculites.

Aos colegas Domingos, Renata, Priscilla, Cristiane, Diogo, Thiago e outros, que também estavam desenvolvendo seus projetos de tese durante este período tão desafiador.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste projeto.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta 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. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO	11
3	MÉTODOS	13
3.1	Biópsias	14
3.2	Pacientes	15
3.3	Imunohistoquímica	16
3.4	Análise Estatística	18
4	RESULTADOS	19
4.1	Características Demográficas e Clínicas dos Pacientes Lúpicos	20
4.2	Análise dos Biomarcadores do Podócito na Nefrite Lúpica	20
5	DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÕES	34
7	ANEXOS	36
8	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICES	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	- <i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
CAPPesq	- Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
dsDNA	- <i>Double-stranded deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonuclêico de dupla hélice)
GESF	- Glomeruloesclerose segmentar e focal
GLEPP1	- <i>Glomerular epithelial protein 1</i> (proteína epitelial glomerular 1)
GN	- Glomerulonefrite
HC-FMUSP	- Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ISN/RPS	- <i>International Society of Nephrology/Renal Pathology Society</i> (Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal)
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
NL	- Nefrite lúpica
SLEDAI	- <i>Systemic lupus erythematosus disease activity index</i> (índice de atividade de doença do lúpus eritematoso sistêmico)
Synpo	- Sinaptopodina
WT1	- <i>Wilms tumor protein 1</i> (proteína 1 do tumor de Wilms)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração de tufo capilar glomerular	4
Figura 2	Estrutura da barreira de filtração glomerular. Microscopia eletrônica de transmissão de glomérulo revelando as camadas da barreira de filtração glomerular	5
Figura 3 -	Micrografia eletrônica de varredura de capilares glomerulares de rato	6
Figura 4 -	Ilustração de corte coronal de dois pedicelos podocitários, da fenda diafragmática entre eles e algumas proteínas constitucionais dessas estruturas	7
Figura 5 -	Padrões de expressão de sinaptopodina em seções de tecido renal de indivíduos normais (A) e pacientes com nefrite lúpica (B-E)	21
Figura 6.	Expressão representativa de WT1, GLEPP1 e nefrina em seções de tecido renal de indivíduos normais (A a-c) e pacientes com nefrite lúpica (B e C). Imunomarcação com peroxidase, aumento de 400x	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Expressão de biomarcadores podocitários nas biópsias de nefrite lúpica membranosa pura classe V e proliferativa	23
Tabela 2 - Expressão de biomarcadores podocitários em biópsias de nefrite lúpica membranosa pura classe V, membranoproliferativa (classes III e V/IV e V) e proliferativas pura (classe III e classe IV)	24
Tabela 3 - Comparação de dados clínicos, laboratoriais e renais em pacientes com biópsias de NL membranosa pura classe V com expressão de sinaptopodina preservada e reduzida nos podócitos	25
Tabela 4 - Comparação de dados clínicos, laboratoriais e renais em pacientes com biópsias de NL com expressão de sinaptopodina preservada e reduzida nos podócitos.....	27

RESUMO

Rezende GM. *Lesão podocitária na nefrite lúpica membranosa pura e proliferativa: mecanismos distintos de proteinúria?* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Proteinúria é a principal manifestação da nefrite lúpica (NL) e reflete lesão no podócito. Análise dos biomarcadores do podócito foi realizada com o objetivo de identificar se o fenótipo podocitário é distinto na NL membranosa pura e proliferativa. Expressão de sinaptopodina, proteína 1 do tumor de Wilms (*Wilms tumor protein 1 - WT1*), proteína epitelial glomerular 1 (*glomerular epithelial protein 1 - GLEPP1*) e nefrina foi avaliada em 52 biópsias de NL por imunohistoquímica. Expressão preservada de sinaptopodina foi observada em apenas 10 (19,2%) de todas as biópsias enquanto que 42 (80,8%) apresentavam expressão reduzida. Ambos os grupos tinham proteinúria semelhante no momento da biópsia ($p = 0,22$), porém, no seguimento médio de quatro anos houve uma tendência para menores níveis médios de proteinúria nos pacientes com marcação preservada de sinaptopodina ($0,26 \pm 0,23$ vs $0,84 \pm 0,90$ g/24 h, $p = 0,05$) do que naqueles com expressão reduzida. Trinta e nove (75%) biópsias foram classificadas como proliferativa e treze (25%) como membranosa pura. Comparação dos biomarcadores do podócito demonstrou predomínio de marcação preservada de sinaptopodina (69,2%), WT1 (69,2%), GLEPP1 (53,9%) e nefrina (60%) no grupo membranosa pura enquanto apenas <10% das proliferativas apresentaram expressão preservada. Nossos dados sugerem que nas classes proliferativas parece haver lesão estrutural do podócito, enquanto que na membranosa pura o padrão predominantemente preservado sugere uma lesão funcional do podócito que pode ser responsável pelo melhor prognóstico a longo prazo do desfecho da proteinúria.

Descritores: Lúpus eritematoso sistêmico. Nefrite lúpica. Podócito. Proteinúria.

SUMMARY

Rezende GM. *Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria?* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Proteinuria is a major feature of lupus nephritis (LN) and reflects podocyte injury. Analysis of podocyte biomarkers was performed attempting to identify if podocyte phenotype is distinct in pure membranous and proliferative LN. Expression of synaptopodin, Wilms tumor protein 1 (WT1), glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) and nephrin was evaluated in 52 LN biopsies by immunohistochemistry. Preserved synaptopodin expression was observed in only 10 (19,2%) of all biopsies while 42 (80,8%) had a reduced expression. Both groups had comparable proteinuria at the time of biopsy ($p=0,22$), however, in the mean follow-up of four years there was a tendency to lower mean levels of proteinuria in patients with preserved synaptopodin staining ($0,26 \pm 0,23$ vs. $0,84 \pm 0,90$ g/24 h, $p=0,05$) than those with diminished expression. Thirty-nine (75%) biopsies were classified as proliferative and thirteen (25%) as pure membranous. Comparison of podocyte biomarkers demonstrated a predominance of preserved staining of synaptopodin (69,2%), WT1 (69,2%), GLEPP1 (53,9%) and nephrin (60%) in the pure membranous group whereas only <10% of the proliferative showed preserved expression. Our data suggest that in proliferative forms there seems to occur structural podocyte damage, whereas in the pure membranous the predominant preserved pattern suggests a dysfunctional podocyte lesion that may account for the better long-term prognosis of proteinuria outcome.

Descriptors: Systemic lupus erythematosus. Lupus nephritis. Podocyte. Proteinuria.

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune, com acometimento multissistêmico, etiopatogenia multifatorial (hormonal, ambiental, genético e imunológico) e evolução clínica com períodos de atividade e remissão dos sintomas. Acomete principalmente mulheres jovens em idade reprodutiva, com pico de incidência no final da adolescência até o início da quarta década, em uma proporção aproximada de nove mulheres para cada homem^{1,2}. A prevalência pode variar de sete a 160 casos para cada 100.000 pessoas, e a incidência estimada em diferentes locais do mundo é de aproximadamente um a 22 casos para cada 100.000 pessoas por ano³⁻⁶. No Brasil, a incidência calculada para a cidade de Natal foi de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, de acordo com o estudo feito por Vilar *et al.*⁷. Relatos na literatura mostram que negros e asiáticos são os que apresentam uma maior frequência da doença em relação aos outros grupos étnicos⁸.

A Nefrite Lúpica (NL) é um dos acometimentos mais graves nos pacientes com LES, sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade, tanto por lesão direta no órgão quanto por complicações do tratamento. Nos Estados Unidos da América, aproximadamente 35% dos pacientes com lúpus apresentam evidências clínicas de nefrite no momento do diagnóstico, sendo que 50 a 60% podem desenvolver nefrite nos

próximos 10 anos após o diagnóstico. Aproximadamente de 10% a 30% evoluem para um quadro de insuficiência renal terminal. A prevalência da nefrite é variável, sendo maior em pacientes afro-americanos e hispânicos e no sexo masculino^{9,10}.

A nefrite lúpica é classificada de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Nefrologia/Sociedade de Patologia Renal (*International Society of Nephrology/Renal Pathology Society* [ISN/RPS]) de 2003, onde além das características histológicas, são avaliados os índices de atividade e cronicidade das lesões, e presença de alterações tubulares e vasculares¹¹. De acordo com esses critérios foram estabelecidas seis classes histológicas, classe I - glomerulonefrite (GN) mesangial mínima caracterizada por mínimos depósitos imunes mesangiais na imunofluorescência sob microscopia óptica normal; classe II - GN mesangial proliferativa caracterizada por expansão da matriz ou hiper celularidade mesangial de qualquer grau na microscopia óptica com esparsos depósitos subepiteliais ou subendoteliais à imunofluorescência ou microscopia eletrônica; classe III - GN proliferativa focal com depósitos imunes subendoteliais e alterações proliferativas em até 50% dos glomérulos, além de lesões ativas (A) e/ou crônicas (C); classe IV - GN proliferativa difusa com depósitos subendoteliais e alterações glomerulares proliferativas envolvendo 50% ou mais dos glomérulos, com lesões ativas (A) e/ou crônicas (C) e predominantemente segmentar (S) ou global (G); classe V - GN membranosa caracterizada pela presença de depósitos subepiteliais globais ou segmentares ou suas sequelas à microscopia óptica, imunofluorescência ou microscopia eletrônica, combinada ou não às classes III e IV e classe VI -

GN esclerosante avançada onde se observa mais de 90% de glomérulos escleróticos sem lesões ativas residuais.

A presença de proteinúria é a manifestação predominante nas diferentes classes histológicas de glomerulonefrite no LES, e reflete alterações estruturais e funcionais na barreira de filtração glomerular.

O glomérulo é constituído pela cápsula de Bowman e pelo tufo capilar (Figura 1), sendo neste último onde se encontra a barreira de filtração, responsável pela seletividade de moléculas que irão compor o filtrado urinário. A barreira é constituída por três camadas: o endotélio fenestrado do capilar na parte interna, seguido pela membrana basal glomerular e, na parte externa, pelos podócitos¹² (Figura 2).

Figura 1 - Ilustração de tufo capilar glomerular*

* Fonte: Disponível em: <<http://www.mdsaude.com>>. Acesso em: 20 ago 2014.

Figura 2 - Estrutura da barreira de filtração glomerular. Microscopia eletrônica de transmissão de glomérulo revelando as camadas da barreira de filtração glomerular. EF: Endotélio fenestrado do capilar; F: fenda diafragmática; P: pedicelo podocitário; MBG: membrana basal glomerular [Fonte: Modificado de Gilbert (2007)[†]]

Os podócitos, ou células epiteliais viscerais glomerulares, são células altamente especializadas que desempenham importante papel na formação do ultrafiltrado glomerular, com participação na estabilidade dos capilares, função de barreira, modulação do coeficiente de ultrafiltração e renovação da membrana basal glomerular, entre outros¹³. O processo de filtração glomerular é dependente tanto das características estruturais como da carga elétrica negativa dos podócitos^{14,15}.

O podócito se caracteriza morfológicamente por um corpo celular de onde se projetam prolongamentos denominados pedicelos primários, os quais, por sua vez, estendem-se em pedicelos secundários (Figura 3). O corpo celular e os pedicelos primários flutuam livremente no filtrado urinário dentro do espaço de Bowman, enquanto que os pedicelos secundários são fixados à membrana glomerular basal via moléculas de integrinas e

[†] Disponível em: <<http://ocw.tufts.edu>>. Acesso em: 29 ago 2014.

distroglicanos. Os pedicelos secundários se interdigitam extensivamente com pedicelos de podócitos vizinhos formando uma fenda entre eles, denominada fenda diafragmática. Esta estrutura constitui-se numa junção extracelular composta por proteínas, as quais formam uma membrana fina com permeabilidade seletiva quanto à carga elétrica, tamanho e forma das moléculas presentes no sangue, e são responsáveis pela função de filtração e sinalização do podócito^{16,17} (Figura 4).

Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura de capilares glomerulares de rato. A face externa dos capilares é recoberta pelo podócito e suas várias ramificações (aumento 6000x). CP: corpo celular do podócito; PP: pedicelo primário do podócito; PS: pedicelo secundário do podócito; EU: espaço urinário da cápsula de Bowman; CG: capilar glomerular [Fonte: Modificado de Pavenstädt et al. (2003)[‡]]

[‡] Disponível em: <<http://www.physrev.physiology.org>>. Acesso em: 30 set 2014.

Figura 4 - Ilustração de corte coronal de dois pedículos podocitários, da fenda diafragmática entre eles e algumas proteínas constitucionais dessas estruturas [Fonte: Meyrier (2005)[§]]

As proteínas expressas pelo podócito são importantes para a integridade da barreira de filtração¹⁸, e incluem, entre outras, a Sinaptopodina (Synpo), proteína 1 do tumor de Wilms (*Wilms Tumor Protein 1* [WT1]), proteína epitelial glomerular 1 (*Glomerular Epithelial Protein 1* [GLEPP1]) e nefrina.

A sinaptopodina apresenta uma distribuição citoplasmática nos pedículos do podócito, é uma proteína rica em prolina e está associada à actina, e exerce um papel na modulação do formato e motilidade dos processos pediosos. Ela está expressa somente no podócito completamente diferenciado, sendo, portanto considerada um importante marcador fenotípico de maturidade desta célula. Sua distribuição não se restringe aos podócitos, sendo também expressa nas gêmulas dendríticas das sinapses telencefálicas, e é principal responsável pela regulação da dinâmica da actina na manutenção da plasticidade celular^{19,20}.

[§] Disponível em: < www.nature.com>. Acesso em: 18 set 2014.

WT1 é um fator de transcrição nuclear do tipo *zinc finger* envolvido na regulação do crescimento e diferenciação celular, e apresenta função crucial durante o desenvolvimento normal do sistema urogenital e hemopoiético. No rim sua presença é fundamental para uma nefrogênese bem sucedida como também para a manutenção da função renal na vida adulta²¹. Mutações no gene WT1 estão presentes no tumor de Wilms, um tumor renal maligno frequente em crianças, na Síndrome de Frasier, Síndrome de Denys-Drash e em algumas leucemias agudas, o que sugere uma ação como inibidor de proliferação celular²²⁻²⁴.

A GLEPP1 é uma proteína tirosina fosfatase expressa na membrana do podócito que age como receptor celular e participa em mecanismos regulatórios relacionados à estrutura e/ou função dos processos pediosos através da transdução de sinais celulares²⁵. Esta proteína também desempenha um papel na preservação da área de filtração e da pressão sanguínea²⁶.

Já a nefrina se localiza exclusivamente na região da fenda diafragmática do processo pedioso do podócito²⁷, é uma proteína de adesão da superfamília de imunoglobulinas com distribuição transmembrânica e age como uma molécula de sinalização²⁸. Ela apresenta um papel relevante na integridade estrutural da fenda e mutações no gene NPHS1 que codifica a nefrina são responsáveis pela síndrome nefrótica congênita do tipo Finlandês, caracterizada por proteinúria maciça intraútero e nefrose ao nascimento²⁹.

Na busca para discriminar mecanismos potencialmente envolvidos na lesão podocitária nos diferentes tipos de glomerulonefrites, vários estudos

nos últimos anos foram conduzidos com o objetivo de identificar alterações na expressão dos marcadores fenotípicos dos podócitos associados com proteinúria em diversas condições clínicas com acometimento renal. Nesse sentido, existem relatos evidenciando uma diminuição na expressão da Synpo em pacientes com Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) primária³⁰ e com doença de lesões mínimas³¹ resistente ao corticoide, e também em pacientes com glomeruloesclerose idiopática colapsante e nefropatia associada ao HIV³². Em contraposição, a expressão da Synpo é preservada na doença de lesões mínimas responsiva ao corticoide³¹, glomerulonefrite membranosa³² e nefropatia por IgA com pequenas alterações glomerulares³³. De maneira semelhante, estudos mostram que a expressão da GLEPP1 está preservada na doença de lesões mínimas e glomerulonefrite membranosa³², e reduzida na GESF primária³⁰. Além disso, a expressão de nefrina encontra-se diminuída em biópsias de pacientes com síndrome nefrótica primária adquirida (glomerulonefrite membranosa, doença de lesões mínimas, GESF e nefropatia por IgA) conforme demonstrado por Doublier *et al.*³⁴.

Por outro lado, esse tipo de estudo na nefrite lúpica é escasso na literatura. Um dos relatos avaliando biópsias renais de apenas quatro pacientes com NL proliferativa difusa na infância mostrou que a expressão das proteínas associadas aos podócitos, Synpo, nefrina e podocina, apresentava-se atenuada³⁵. Já Kubiak-Wlekly *et al.*³⁶ avaliaram a expressão de Synpo em 10 pacientes com NL (classe II n = 2, classe IV n=4 e classe V n = 4) e verificaram redução na expressão desta proteína em todos os

subgrupos, principalmente nos casos com acentuada proliferação celular glomerular e/ou lesões escleróticas.

Em outro estudo com 15 pacientes com nefrite lúpica (classe II n = 5, classe IV n = 4 e classe V n = 6), observou-se uma marcação fraca e não contínua para a nefrina nas biópsias classe proliferativa, marcação fraca, mas homogênea na classe membranosa e marcação similar ao controle (normal) na classe mesangial³⁷. Koop *et al.*³⁸ também relataram diminuição da expressão de nefrina em sete biópsias de pacientes com nefrite lúpica, mas a classe histológica não foi especificada.

É importante ressaltar que o número limitado das amostras incluídas nesses estudos e a análise limitada a um único ou poucos marcadores de proteínas podocitárias compromete uma conclusão mais abrangente sobre a relevância desses achados em relação aos diversos padrões histopatológicos da nefrite lúpica e suas associações clínicas.

2 OBJETIVO

O presente estudo tem, portanto, como objetivo, uma avaliação sistemática da expressão de um painel mais amplo de proteínas podocitárias com diferente distribuição celular em uma série de biópsias de nefrite lúpica. Para tanto, as proteínas Synpo, WT1, GLEPP1 e nefrina foram selecionadas visando tentar identificar possíveis alterações fenotípicas do podócito entre as classes histopatológicas de nefrite lúpica membranosa pura, membranoproliferativa e proliferativas puras e sua potencial relevância nos parâmetros renais.

3 MÉTODOS

3.1 Biópsias

Foram selecionadas biópsias renais de 88 pacientes com nefrite lúpica dos arquivos do Laboratório de Patologia Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1999 a 2009, com a autorização do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, responsável pelo biorrepositório. Cinquenta e duas biópsias compuseram o grupo de estudo e 34 foram excluídas devido à presença de comorbidades nos pacientes como diabetes *mellitus*, como também por apresentarem um número inferior a cinco glomérulos elegíveis na secção. Também foram excluídas duas biópsias classificadas como NL mesangial classe II, número não representativo para a análise.

No momento da biópsia percutânea com agulha, uma das amostras do espécime renal foi fixada em Dubosq-Brasil, seguido por formaldeído 10%, e após inclusão em parafina foi processada para procedimentos histológicos padrão. A segunda amostra foi congelada instantaneamente em nitrogênio líquido, e microscopia com imunofluorescência direta foi realizada em secções de criostato para fins diagnósticos. Todas as lâminas foram analisadas às cegas por uma patologista renal especializada (DMACM) e dados histológicos foram registrados de acordo com os critérios revisados da ISN/RPS de 2003 para classificação de glomerulonefrite lúpica³⁹.

3.2 Pacientes

Para uma avaliação retrospectiva, os prontuários foram extensamente revistos para dados demográficos, clínicos e laboratoriais relacionados ao momento da biópsia. Todos os pacientes preenchiam pelo menos quatro dos onze critérios revisados de classificação do American College of Rheumatology (ACR) para LES⁴⁰. Evidência para doença renal ativa foi baseada em: proteinúria maior que 0,5 g/24 horas, e/ou presença de sedimentos urinários (cilindros celulares, hematúria > 5 hemácias/campo e/ou leucocitúria > 5 leucócitos/campo, excluindo infecção ou cálculo renal) e/ou albumina sérica menor que 3,5 g/dL. Disfunção renal foi definida como creatinina sérica maior que 1,5 mg/dL e proteinúria nefrótica como superior a 3,5 g/24 h. Anticorpos anti-DNA de dupla hélice (*Double-Stranded DNA*, [dsDNA]) foram detectados por imunofluorescência indireta usando *Crithidia luciliae* como substrato. Atividade hemolítica do complemento foi determinada através de ensaio de difusão radial hemolítica usando eritrócitos sensibilizados com hemolisina de carneiro incorporados em placas de imunodifusão contendo agarose. Valor normal do complemento CH100 foi de 150-350 UI/mL. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética local (CAPPesq HC-FMUSP 1061/09).

3.3 Imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica para determinar a expressão de sinaptopodina, WT1, GLEPP1 e nefrina foram realizados com os sistemas de detecção *Spring Reveal Polyvalent HRP* (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA) ou *NovoLink Polymer Detection System*TM (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, NE, UK), ambos com peroxidase.

Amostras do tecido renal, previamente fixado e incluso em parafina, foram cortadas em fragmentos com 3,0 µm de espessura e dispostos em lâminas para microscopia. A parafina foi removida do tecido após aquecimento a 60°C por 30 minutos e incubações em xilol três vezes por nove minutos. O solvente residual foi removido por duas lavagens de cinco minutos em álcool etílico absoluto e o tecido foi reidratado em etanol a 96% (duas lavagens de três minutos) e em água destilada (duas lavagens de cinco minutos). Para a recuperação dos antígenos previamente mascarados devido ao processo de fixação, as lâminas foram incubadas em tampão citrato 0,01M, pH 6,0, sob aquecimento em panela de pressão por três minutos, ou em panela a vapor por 30 minutos. Após resfriarem e atingirem a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada e transferidas para PBS (salina tamponada com tampão fosfato - NaH₂PO₄ 0,025 M, Na₂HPO₄ 0,007 M e NaCl pH 7,4 ou TBS (salina tamponada com tampão Tris: NaCl 0,0135 M e Tris 0,050 M, pH 7,6). A atividade da peroxidase endógena do tecido foi bloqueada por incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos, os fragmentos foram então lavados em PBS ou TBS, e incubados com a solução *Protein Block* de

acordo com as instruções do fabricante, para o bloqueio de antígenos inespecíficos. As incubações com os anticorpos primários monoclonais de camundongo anti-sinaptopodina, clone G1d4 (Progen and Biotechnick GmbH, Heidelberg, Alemanha), anti-WT1, clone 6F-H2 (Dako Corp., Glostrup, Dinamarca), anti-GLEPP1, clone 5C11 (Biogenex, Fremont, CA, EUA) e anticorpo policlonal de coelho anti-nefrina (gentilmente cedido pelo Dr. Lawrence B. Holzman da *Renal-Electrolyte and Hypertension Division* da Universidade da Pensilvânia, PA, EUA) foram realizadas por períodos de 12 a 14 horas, a 4°C, em concentrações previamente estabelecidas. O controle negativo de cada reação consistiu na omissão da incubação com o anticorpo primário. Em seguida, os fragmentos de tecido foram lavados com PBS ou TBS, e incubados sucessivamente com as soluções *Complement* e *HRP Conjugate* (kit *Spring Reveal Polyvalent HRP*) ou *Post Primary Block* e *Polymer* (kit *Novolink® Polymer Detection System*) de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para a revelação, os fragmentos foram incubados com substrato cromogênico para peroxidase, contendo peróxido de hidrogênio e DAB (3,3'-diaminobenzidina), e contra-corados com solução de hematoxilina de Harris. As lâminas foram então desidratadas em bateria de álcool-xilol e montadas com meio Entellan® (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, NJ, EUA).

A expressão de sinaptopodina, WT1, GLEPP1 e nefrina nos glomérulos renais foi avaliada qualitativamente por microscopia óptica (aumento 400x). Para cada lâmina foram analisados no mínimo cinco glomérulos não totalmente esclerosados. Todas as reações, e as

concentrações ótimas dos anticorpos, foram previamente padronizadas em fragmentos de rim normal de adultos, obtidos por nefrectomia devido a trauma ou presença de pequeno tumor renal localizado.

A expressão dos marcadores dos podócitos nas biópsias foi classificada como padrão de marcação com *preservação global* quando todos os glomérulos na secção apresentavam coloração difusa, e padrão com *redução segmentar* quando pelo menos um glomérulo (focal) na secção apresentava coloração parcial. A expressão de Synpo foi usada como marcador de referência para o podócito maduro.

3.4 Análise Estatística

Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão para variáveis contínuas e como porcentagem para variáveis categóricas. Variáveis contínuas foram comparadas usando o Teste *t* de Student e variáveis categóricas foram comparadas usando o Teste de Pearson qui-quadrado e o Teste Exato de Fisher. Valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Características Demográficas e Clínicas dos Pacientes Lúpicos

À época da biópsia, os 52 pacientes lúpicos (80,8% sexo feminino e 59,6% caucasianos) apresentavam uma média de idade de $34,12 \pm 10,94$ anos, *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* - Índice de atividade de doença do Lúpus Eritematoso Sistêmico [SLEDAI] de $8,48 \pm 3,87$ e média de duração da doença de $5,23 \pm 5,41$ anos. Avaliação laboratorial da função renal dos pacientes demonstrou níveis altos de proteinúria ($4,06 \pm 3,57$ g/24 h) e de creatinina sérica ($1,79 \pm 1,44$ mg/dL) e baixos níveis de albumina sérica ($2,58 \pm 0,80$ g/dL).

4.2 Análise dos Biomarcadores do Podócito na Nefrite Lúpica

Das 52 biópsias analisadas, 39 (75%) foram classificadas como NL classes proliferativas: 51,3% eram de classe proliferativa difusa pura classe IV, 30,7% membranoproliferativa (classes III e V, classes IV e V) e 18% proliferativa focal pura classe III. Nefrite lúpica membranosa pura classe V foi observada nas 13 (25%) biópsias remanescentes.

Avaliação da expressão dos marcadores podocitários Synpo (Figura 5), WT1, GLEPP1 e nefrina (Figura 6) incluídos no estudo em biópsia de rim normal demonstrou coloração global e difusa (padrão preservado) ao longo da parte externa das paredes capilares.

Figura 5 - Padrões de expressão de sinaptopodina em seções de tecido renal de indivíduos normais (A) e pacientes com nefrite lúpica (B-E). A: padrão preservado global e difuso em rim normal; B: padrão preservado global e difuso em nefrite lúpica classe membranosa pura; C: padrão com redução segmentar em nefrite lúpica classe membranosa pura; D: padrão preservado global e difuso em nefrite lúpica classe proliferativa; E: padrão com redução segmentar em nefrite lúpica classe proliferativa. Imunomarcagem com peroxidase, aumento de 400x

Figura 6 - Expressão representativa de WT1, GLEPP1 e nefrina em seções de tecido renal de indivíduos normais (A a-c) e pacientes com nefrite lúpica (B e C). Imunomarcação com peroxidase, aumento de 400x

Nas biópsias de nefrite lúpica, o número médio de glomérulos elegíveis analisados por espécime renal foi de $11,65 \pm 5,80$, não sendo considerados os glomérulos completamente esclerosados.

Comparação da expressão dos biomarcadores do podócito nas diferentes classes histológicas de NL demonstrou uma predominância do padrão globalmente preservado de Synpo (69,2%), WT1 (69,2%), GLEPP1 (53,9%) e nefrina (60%) no grupo membranosa pura. De forma contrária, apenas menos que 10% das nefrites proliferativas mostraram uma expressão globalmente preservada para todas as quatro proteínas analisadas (Tabela 1). Padrões representativos de expressão com preservação global e com redução segmentar de WT1, GLEPP1 e nefrina nas seções de tecido renal de pacientes com NL estão ilustrados na Figura 6 (B e C), respectivamente.

Padrões de expressão com preservação global e redução segmentar de sinaptopodina (marcador referência) na NL membranosa pura (B e C, respectivamente) e na NL proliferativa (D e E, respectivamente) estão ilustrados na Figura 5.

Tabela 1 - Expressão de biomarcadores podocitários nas biópsias de nefrite lúpica membranosa pura classe V e proliferativa

Expressão de biomarcadores podocitários	Grupo membranosa pura classe V n=13 n (%)	Grupo classes proliferativas ^a n=39 n (%)	p
Sinaptopodina			
Preservação global	9 (69,2)	1 (2,6)	< 0,0001
Redução segmentar	4 (30,8)	38 (97,4)	< 0,0001
WT1			
Preservação global	9 (69,2)	3 (7,7)	< 0,0001
Redução segmentar	4 (30,8)	36 (92,3)	< 0,0001
GLEPP1			
Preservação global	7 (53,9)	1 (2,9)*	0,0002
Redução segmentar	6 (46,1)	34 (97,1)*	0,0002
Nefrina			
Preservação global	6 (60) [§]	3 (9,4) [§]	0,0025
Redução segmentar	4 (40) [§]	29 (90,6) [§]	0,0025

^aNL classes proliferativas incluíram: 51,3% classe IV proliferativa difusa pura; 30,7% membranoproliferativa (classes III e V/classes IV e V), e 18% classe III proliferativa focal pura.

*Expressão de GLEPP1 foi avaliada em 35 biópsias de NL proliferativa. [§]Expressão de Nefrina foi avaliada em 10 biópsias de NL membranosa pura e em 32 biópsias de NL proliferativa.

A análise comparativa do grupo de biópsias membranosa pura classe V (n = 13) com os subgrupos de NL de classe proliferativa [membranoproliferativa (n = 12) e proliferativas puras classes III e IV (n = 27)] (Tabela 2) demonstrou que biópsias classe membranoproliferativa exibem padrão de marcação fenotípica do podócito semelhante às classes proliferativas puras. Além disso, o padrão da coloração foi análogo em pacientes com classe proliferativa pura III e IV com aqueles com NL

membranoproliferativa (Synpo: $p = 1,00$; WT1: $p = 0,22$; GLEPP1: $p = 1,00$ e nefrina: $p = 1,00$).

Tabela 2 - Expressão de biomarcadores podocitários em biópsias de nefrite lúpica membranosa pura classe V, membranoproliferativa (classes III e V/IV e V) e proliferativas pura (classe III e classe IV)

Expressão de biomarcadores podocitários	Membranosa pura classe V n = 13 n (%)	Proliferativas puras (III e IV) n = 27 n (%)	Membrano-proliferativa (III + V, IV + V) n = 12 n (%)	p
Sinaptopodina				
Preservação global	9 (69,2)	1 (3,7)	0	< 0,0001
Redução segmentar	4 (30,8)	26 (96,3)	12 (100)	< 0,0001
WT1				
Preservação global	9 (69,2)	1 (3,7)	2 (16,7)	< 0,0001
Redução segmentar	4 (30,8)	26 (96,3)	10 (83,3)	< 0,0001
GLEPP1				
Preservação global	7 (53,9)	1 (4,2)*	0	0,0001
Redução segmentar	6 (46,1)	23 (95,8)*	11 (100)*	0,0001
Nefrina				
Preservação global	6 (60) [§]	2 (9,1) [§]	1 (10) [§]	0,0030
Redução segmentar	4 (40) [§]	20 (90,9) [§]	9 (90) [§]	0,0030

*Expressão de GLEPP1 foi avaliada em 24 biópsias de NL proliferativa pura e 11 biópsias de NL membranoproliferativa; §Expressão de Nefrina foi avaliada em 10 biópsias de NL membranosa pura, 22 proliferativa pura e 10 membranoproliferativa.

No grupo de NL membranosa pura classe V (n = 13), houve nove pacientes (69,2%) com expressão preservada de Synpo e quatro pacientes (30,8%) com expressão reduzida. Esses dois subgrupos diferiram em relação ao fato que à época da biópsia o primeiro apresentou um menor índice de atividade histológica ($1,17 \pm 0,41$ vs. $2,50 \pm 1,00$, $p = 0,0178$) e albumina sérica ($2,11 \pm 1,09$ vs. $3,84 \pm 0,12$ g/dL, $p = 0,0103$), e maior proteinúria ($5,45 \pm 2,90$ vs. $1,72 \pm 1,67$ g/24 h, $p = 0,0374$) do que o último, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação de dados clínicos, laboratoriais e renais em pacientes com biópsias de NL membranosa pura classe V com expressão de sinaptopodina preservada e reduzida nos podócitos

Dados clínicos, laboratoriais e renais	NL membranosa pura classe V Expressão de sinaptopodina		p
	Preservada n = 9	Reduzida n = 4	
Índice de atividade histológica	1,17 ± 0,41 ^a	2,50 ± 1,00	0,0178
Índice de cronicidade histológica	0,33 ± 0,82 ^a	1,00 ± 1,15	0,31
Albumina sérica na biópsia, g/dL	2,11 ± 1,09	3,84 ± 0,12	0,0103
Albumina sérica seguimento médio 4 anos, g/dL	4,06 ± 0,42	4,10 ± 0,29	0,87
Proteinúria na biópsia, g/24 h	5,45 ± 2,90	1,72 ± 1,67	0,0374
Proteinúria nefrótica na biópsia, n (%)	7 (77,8)	1 (25)	0,22
Proteinúria seguimento médio 4 anos, g/24 h	0,27 ± 0,23	0,37 ± 0,46	0,60
Proteinúria >0,5 g/24 h no seguimento, n (%)	1 (11,1)	1 (25)	1,00
Creatinina sérica na biópsia, mg/dL	0,73 ± 0,15	0,82 ± 0,30	0,47
Creatinina sérica seguimento médio 4 anos, mg/dL	0,78 ± 0,22	0,70 ± 0,10	0,51
Duração da doença, anos	3,21 ± 4,61 ^b	13,00 ± 9,90 ^c	0,06
SLEDAI na biópsia	8,00 ± 4,58	9,25 ± 3,59	0,64
Anti-dsDNA na biópsia, n (%)	1 (11,1)	2 (50)	0,20
CH100 na biópsia, UI/mL	184,44 ± 109,90	130,00 ± 98,57	0,41
Díalise no seguimento médio 4 anos, n (%)	0	0	1,00

Valores estão expressos como média ± DP para variáveis contínuas e em % para variáveis categóricas. ^aExpressão de sinaptopodina foi avaliada em seis biópsias no grupo preservado; ^bExpressão foi avaliada em oito pacientes no grupo preservado; ^cExpressão avaliada em dois pacientes no grupo reduzido.

Análise da expressão de sinaptopodina em todas as 52 biópsias com NL revelou que apenas 10 (19,2%) delas demonstraram um padrão de marcação imunológica globalmente preservado enquanto que 42 (80,8%) exibiam expressão com redução segmentar. Biópsias com coloração preservada da Synpo foram, na maioria, classificadas como NL membranosa pura (90%), com

menores índices de atividade ($p = 0,0007$) e cronicidade ($p = 0,0054$) histológica, e os pacientes apresentavam menor creatinina sérica ($p = 0,0108$), além de uma tendência para menor frequência de anti-dsDNA ($p = 0,07$) e maior proteinúria nefrótica ($p = 0,08$) à época da biópsia (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação de dados clínicos, laboratoriais e renais em pacientes com biópsias de NL com expressão de sinaptopodina preservada e reduzida nos podócitos

Dados clínicos, laboratoriais e renais	Expressão de sinaptopodina		p
	Preservada n = 10	Reduzida n = 42	
NL proliferativa, n (%)	1 (10)	38 (90,5)	< 0,0001
NL membranosa pura, n (%)	9 (90)	4 (9,5)	< 0,0001
Índice de atividade histológica	1,43 ± 0,79 ^a	5,35 ± 2,80 ^a	0,0007
Índice de cronicidade histológica	0,29 ± 0,76 ^a	3,60 ± 2,95 ^a	0,0054
Albumina sérica na biópsia, g/dL	2,17 ± 0,95	2,64 ± 0,75	0,10
Albumina sérica seguimento médio 4 anos, g/dL	4,09 ± 0,41	3,86 ± 0,62 ^b	0,28
Proteinúria na biópsia, g/24 h	5,41 ± 2,60	3,87 ± 3,68	0,22
Proteinúria nefrótica na biópsia, n (%)	8 (80)	20 (47,6)	0,08
Proteinúria seguimento médio 4 anos, g/24 h	0,26 ± 0,23	0,84 ± 0,90 ^b	0,05
Proteinúria >0,5 g/24 h no seguimento, n (%)	1 (10)	16 (45,7) ^b	0,06
Creatinina sérica na biópsia, mg/dL	0,72 ± 0,13	1,97 ± 1,48	0,0108
Creatinina sérica seguimento médio 4 anos, mg/dL	0,73 ± 0,18	1,98 ± 2,44 ^b	0,11
Duração da doença, anos	4,52 ± 5,84 ^c	5,39 ± 5,38 ^c	0,66
SLEDAI na biópsia	7,90 ± 4,33	8,62 ± 3,79	0,60
Anti-dsDNA na biópsia, n (%)	1 (10)	18 (42,9)	0,07
CH100 na biópsia, UI/mL	184,44 ± 109,90 ^d	144,03 ± 118,47 ^d	0,36
Diálise no seguimento médio 4 anos, n (%)	0 ^c	10 (25) ^c	0,17
Uso de corticosteróide na biópsia, n (%)	7 (77,8) ^c	13 (32,5) ^c	0,0221
Uso de ciclofosfamida na biópsia, n (%)	1 (11,1) ^c	21 (52,5) ^c	0,0305

Valores estão expressos como média ± DP para variáveis contínuas e % variáveis categóricas.

^aExpressão de sinaptopodina foi avaliada em sete biópsias no grupo preservado e em 40 no grupo reduzido; ^bExpressão avaliada em 35 pacientes no grupo reduzido; ^cExpressão avaliada em nove pacientes no grupo preservado e em 40 no grupo reduzido; ^dExpressão avaliada em nove pacientes no grupo preservado e em 36 no grupo reduzido.

Ainda dentro do grupo das 52 biópsias, a análise específica de proteinúria na época da biópsia demonstrou níveis semelhantes em pacientes com marcação preservada e reduzida de Synpo ($p = 0,22$). Em contraste, no seguimento médio de quatro anos houve uma tendência para menores níveis médios de proteinúria em pacientes com marcação preservada de Synpo ($0,26 \pm 0,23$ vs. $0,84 \pm 0,90$ g/24 h, $p = 0,05$) e menor frequência de pacientes com proteinúria $> 0,5$ g/24 h (10 vs. 45,7%, $p=0,06$) do que aqueles com expressão reduzida. Não houve diferença estatisticamente significativa no seguimento médio de quatro anos entre os grupos com expressão preservada e diminuída em relação à albumina sérica ($p = 0,28$), creatinina sérica ($p = 0,11$) e diálise ($p = 0,17$) (Tabela 4).

5 DISCUSSÃO

Este estudo é até onde sabemos o primeiro a fornecer evidência de que a expressão dos marcadores selecionados do podócito é distinta na nefrite lúpica membranosa pura e proliferativa, apesar da característica em comum de proteinúria em ambas as apresentações⁴¹.

O número considerável de biópsias com essas duas classes histológicas de nefrite lúpica com maior probabilidade de ser associada com lesão podocitária foi essencial para discriminar o envolvimento do podócito, uma condição não encontrada em relatos prévios, principalmente em relação à representação de nefrite lúpica membranosa pura³⁵⁻³⁷. Além disso, a avaliação dos níveis de proteinúria à época da biópsia e no seguimento médio de quatro anos também foi importante para determinar se a alteração na expressão dos marcadores moleculares selecionados nessas células altamente especializadas poderia prever a gravidade e o desfecho em longo prazo do quadro renal.

Avaliação de moléculas associadas ao podócito com distribuição celular no citoplasma, núcleo, membrana e fenda diafragmática é outra grande vantagem deste estudo, uma vez que a lesão podocitária pode abranger um ou mais desses compartimentos subcelulares. De fato, algumas das principais causas de lesão podocitária incluem alterações no citoesqueleto de actina resultando em reorganização da estrutura dos

pedicelos (retração) e no complexo da fenda diafragmática, bem como desregulação na sinalização ao nível da membrana e ocorrência de mutação genética associada aos marcadores do podócito¹². A podocitopatia diabética, por exemplo, ressalta a importância de se analisar diferentes compartimentos celulares no envolvimento do podócito na proteinúria. Nessa condição, estudos mostram que mecanismos celulares e moleculares distintos exercem um papel relevante na nefropatia diabética e incluem apoptose ou descolamento podocitário resultando em uma diminuição no número dessas células e na expressão de nefrina na fenda diafragmática associada à retração dos pedicelos⁴².

No presente estudo, observou-se uma preservação de podócitos na nefropatia lúpica membranosa pura evidenciada pela expressão global e difusa de Synpo em contraste com uma coloração predominantemente reduzida em áreas com acentuada proliferação celular glomerular e/ou lesões escleróticas nas classes proliferativas puras e membranoproliferativas. Na NL proliferativa, a diminuição na expressão de Synpo sugere a perda de podócitos o que está de acordo com relatos prévios de aumento na excreção urinária desta célula em pacientes com NL com esta classe histológica^{43,44}. Em contrapartida, podocitúria não foi tão evidente no único relato com três pacientes com nefrite lúpica membranosa⁴⁵, o que corrobora com nossos achados de coloração podocitária predominantemente preservada de Synpo, WT1, GLEPP1 e nefrina na maioria das nossas biópsias classe V.

A NL membranosa pura demonstrou um padrão de expressão similar àquele observado na doença de lesões mínimas responsiva ao corticoide³¹,

glomerulopatia membranosa³² e nefropatia por IgA⁴⁶ enquanto que biópsias lúpicas com lesões proliferativas foram semelhantes à GESF idiopática, doença de lesões mínimas resistente ao corticoide, GESF colapsante e nefropatia associada ao HIV^{31,32,47}. Diminuição na expressão de Synpo também foi vista na síndrome nefrótica idiopática infantil²⁰ e em um recente estudo envolvendo sete pacientes com lúpus na infância e nefropatia proliferativa difusa ativa³⁵.

Nossos achados mostraram que o padrão de expressão dos marcadores selecionados do podócito não se mostrou associado aos níveis de proteinúria no momento da biópsia, mas manteve correlação com a classe histológica de NL. Quando analisamos as biópsias como um todo, observamos que pacientes com padrão preservado de Synpo tinham uma tendência estatística para maior frequência de proteinúria nefrótica no momento da biópsia com representação predominante da nefrite classe membranosa. Essa associação é também sugerida em um relato prévio sobre a expressão de nefrina envolvendo apenas 15 pacientes com NL, no qual se mostrou correlação com a classe histológica renal e não com o nível de proteinúria³⁷. Esses achados reforçam a ideia de que os mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade da barreira de filtração glomerular na nefrite membranosa pura e proliferativa são diferentes.

Vale a pena salientar que dentro da mesma classe histológica, nefrite membranosa pura, a proteinúria no momento da biópsia também foi maior em pacientes que apresentavam expressão preservada de Synpo em relação aqueles com expressão reduzida. Esse achado pode apenas refletir

a manifestação clínica típica de NL membranosa ativa na qual proteinúria em níveis nefróticos geralmente predomina, corroborando para a ideia de alteração funcional e não lesão estrutural do podócito nesses pacientes. O número pequeno da amostra do grupo classe V pura com apenas quatro pacientes com marcação reduzida impossibilita, porém, uma conclusão definitiva. Análise semelhante dentro do grupo de classe proliferativa não foi possível uma vez que apenas um paciente apresentou biópsia com expressão preservada de Synpo.

Em relação ao desfecho da proteinúria, a intensidade de lesão nos podócitos foi relatada como determinante no desfecho renal uma vez que perda significativa de podócitos por glomérulo leva à progressão para falência renal, como demonstrado em modelos humanos e animais^{48,49}. De fato, uma tendência para menores níveis médios de proteinúria no seguimento em longo prazo foi observada nos nossos pacientes cujas biópsias demonstraram coloração preservada dos marcadores do podócito. Em contraste, pacientes lúpicos com lesões renais proliferativas, que possuem semelhança com pacientes com GESF em relação à expressão dos marcadores do podócito, geralmente apresentam um prognóstico pior⁵⁰.

6 CONCLUSÕES

Em resumo, nossos dados sugerem que os mecanismos subjacentes na complexa patologia da proteinúria nas classes histológicas de nefrite lúpica membranosa pura e proliferativa são provavelmente distintos. Nas formas proliferativas aparentemente ocorre dano estrutural do podócito, enquanto que na nefropatia membranosa pura a maioria das biópsias com padrão preservado reforça a possibilidade de alteração funcional podocitária a qual pode ser atribuída ao melhor prognóstico em longo prazo no desfecho da proteinúria.

7 ANEXOS

Anexo A - Aprovação CAPPesq

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 02/12/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1061/09**, intitulado: **"SINAPTOPODINA E GLEPP1 NA NEFRITE LÚPICA: EXPRESSÃO EM PODÓCITOS E AUTORREATIVIDADE"** apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Eloisa Silva Dutra de Oliveira Bonfá**

Pesquisador (a) Executante: **Gabriela de Mendonça Rezende**

CAPPesq, 03 de Dezembro de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

8 REFERÊNCIAS

1. Pisetsky DS, Buyon JP, Manzi S. Systemic lupus erythematosus. In: Klippel JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM. *Primer on the rheumatic diseases*. 1ª Ed.. Atlanta: Arthritis Foundation, 2001. Cap. 17.
2. Rus V, Hajeer A, Hochberg MC. Systemic lupus erythematosus. In: Silman AJ, Hochberg MC (Eds.) *Epidemiology of the rheumatic disease*. 2ª Ed. New York: Oxford University Press, 2001. Cap. 7.
3. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2007; 369:587-96.
4. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*. 1998; 41(5):778-99.
5. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*. 2007; 56(6):2092-4.

6. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39(4):257-68.
7. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002; 11(8):528-32.
8. Liang MA, Partridge AJ, Daltroy LH, Straaton KV, Galper SR, Holman HR. Strategies for reducing excess morbidity and mortality in blacks in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1991; 34(9):1187-96.
9. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, Karpouzas GA, Merrill JT, Wallace DJ, Yazdany J, Ramsey-Goldman R, Singh K, Khalighi M, Choi SI, Gogia M, Kafaja S, Kamgar M, Lau C, Martin WJ, Parikh S, Peng J, Rastogi A, Chen W, Grossman JM; American College of Rheumatology. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res.* 2012; 64(6):797-808.
10. Moroni G, Quaglini S, Gallelli B, Banfi G, Messa P, Ponticelli C. The long-term outcome of 93 patients with proliferative lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(9):2531-9.
11. Markowitz GS, D'Agati VD. The ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis: an assessment at 3 years. *Kidney Int.* 2007; 71(6):491-5.

12. Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74:299-323.
13. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol.* 1995; 192(5):385-97.
14. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest.* 2006; 116(8):2090-3.
15. Farquhar MG. The primary glomerular filtration barrier-basement membrane or epithelial slits? *Kidney Int.* 1975; 8(4):197-211.
16. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003; 7(4):255-9.
17. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int.* 2010; 77(7):571-80.
18. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertension.* 2001; 10(3):331-40.
19. Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol.* 1997; 139(1):193-204.
20. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephritic syndrome of childhood. *Kidney Int.* 2001; 59(1):118-25.

21. Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(6):651-9.
22. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development.* 1993; 119(4):1329-41.
23. Morrison AA, Viney RL, Saleem MA, Ladomery MR. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(1):F12-7.
24. Baird PN, Simmons PJ. Expression of the Wilms' tumor gene (WT1) in normal hemopoiesis. *Exp Hematol.* 1997; 25(4):312-20.
25. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem.* 1994; 269(31):19953-62.
26. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, Dysko RC, Saunders TL, Samuelson LC, Wiggins RC. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp^{pro})-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *J Clin Invest.* 2000; 106(10):1281-90.

27. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(14):7962-7.
28. Benzing T. The promise of well-being: stay in shape with N(i)ck. *J Am Soc Nephrol*. 2009; 20(7):1425-7.
29. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikko 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.
30. Hirakawa M, Tsuruya K, Yotsueda H, Tokumoto M, Ikeda H, Katafuchi R, Fujimi S, Hirakata H, Iida M. . Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci*. 2006; 79(8):757-63.
31. Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Synaptopodin immunoexpression in steroid-responsive and steroid-resistant minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Nefrologia*. 2007; 27(6):710-5.
32. 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.

33. Kemeny E, Dürmüller U, Nickeleit V, Gudat F, Mihatsch MJ. Distribution of podocyte protein (44 KD) in different types of glomerular diseases. *Virchows Arch.* 1997; 431(6):425-30.
34. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K, Camussi G. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol.* 2001; 158(5):1723-31.
35. Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, Mori M, Inayama Y, Yan K, Kobayashi N, Yokota S. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(8):2530-7.
36. Kubiak-Wlekly A, Perkowska-Ptasinska A, Olejniczak P, Rochowiak A, Kaczmarek E, Durlik M, Czekalski S, Niemir ZI. The comparison of the podocyte expression of Synaptopodin, CR1 and Nephrin in human glomerulonephritis: could the expression of CR1 be clinically relevant? *Int J Biomed Sci.* 2009; 5(1):28-36.
37. Perysinaki GS, Moysiadis DK, Bertsias G, Giannopoulou I, Kyriacou K, Nakopoulou L, Boumpas DT, Daphnis E. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus.* 2011; 20(8):781-91.

-
38. 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(8):2063-71.
 39. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(2):241-50.
 40. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(9):1725.
 41. Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. The subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 980286. Epub 2011 Aug 28.
 42. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2008; 4(1):39-45.
 43. Bollain-y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-del-Muro F, Daza-Benitez L, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Padilla C, Avalos-Díaz E, Herrera-Esparza R. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol*. 2011; 21(3):166-71.

-
44. Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, Ebihara I, Koide H. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci.* 2000; 320(2):112-6.
 45. Li JZ, Liu Y, E J, Huang HC, Yu F, Zou WZ, Wang HY. The significance of urinary podocytes in patients with active lupus nephritis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2007; 46(2):127-30.
 46. Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, Iyama K, Furuse A, Arizono K, Machida J, Sakamoto T, Endo F, Hattori S. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. *Kidney Int.* 2003; 64(6):2092-9.
 47. Hill GS, Karoui KE, Karras A, Mandet C, Duong Van Huyen JP, Nochy D, Bruneval P. Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. I. Immunohistochemical studies. *Kidney Int.* 2011; 79(6):635-42.
 48. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67(2):404-19.
 49. Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int.* 1998; 54(3):687-97.
 50. Korbet SM, Schwartz MM. Primary focal segmental glomerulosclerosis: A treatable lesion with variable outcomes. *Nephrology.* 2001; 6:47-56.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado

<p style="text-align: center;">Lupus http://lup.sagepub.com/</p>
<p>Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria? GM Rezende, VS Viana, DMAC Malheiros, EF Borba, NAS Silva, C Silva, EP Leon, IL Noronha and E Bonfa <i>Lupus</i> 2014 23: 255 originally published online 19 December 2013 DOI: 10.1177/0961203313517152</p> <p>The online version of this article can be found at: http://lup.sagepub.com/content/23/3/255</p>
<p style="text-align: center;">Published by: http://www.sagepublications.com</p> <p>Additional services and information for <i>Lupus</i> can be found at:</p> <p>Email Alerts: http://lup.sagepub.com/cgi/alerts</p> <p>Subscriptions: http://lup.sagepub.com/subscriptions</p> <p>Reprints: http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav</p> <p>Permissions: http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav</p> <p style="text-align: center;">>> Version of Record - Feb 14, 2014 OnlineFirst Version of Record - Dec 19, 2013 What is This?</p> <p style="text-align: center; font-size: small;">Downloaded from lup.sagepub.com at CIDADE UNIVERSITARIA on April 17, 2014</p>

PAPER

Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms of proteinuria?

GM Rezende¹, VS Viana¹, DMAC Malheiros², EF Borba¹, NAS Silva², C Silva³, EP Leon¹, IL Noronha³ and E Bonfá¹¹Division of Rheumatology; ²Department of Pathology; and ³Laboratory of Cellular, Genetic, and Molecular Nephrology, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Proteinuria is a major feature of lupus nephritis (LN) and reflects podocyte injury. Analysis of podocyte biomarkers was performed attempting to identify if podocyte phenotype is distinct in pure membranous and proliferative LN. Expression of synaptopodin, Wilms tumor protein 1 (WT1), glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) and nephrin was evaluated in 52 LN biopsies by immunohistochemistry. Preserved synaptopodin expression was observed in only 10 (19.2%) of all biopsies while 42 (80.8%) had reduced expression. Both groups had comparable proteinuria at the time of biopsy ($p = 0.22$); however, in the mean follow-up of four years there was a tendency toward lower mean levels of proteinuria in patients with preserved synaptopodin staining (0.26 ± 0.23 vs. 0.84 ± 0.90 g/24 h, $p = 0.05$) compared with those with diminished expression. Thirty-nine (75%) biopsies were classified as proliferative and 13 (25%) as pure membranous. Comparison of podocyte biomarkers demonstrated a predominance of preserved staining of synaptopodin (69.2%), WT1 (69.2%), GLEPP1 (53.9%) and nephrin (60%) in the pure membranous group whereas only <10% of the proliferative showed preserved expression. Our data suggest that in proliferative forms there seems to occur structural podocyte damage, whereas in the pure membranous the predominant preserved pattern suggests a dysfunctional podocyte lesion that may account for the better long-term prognosis of proteinuria outcome. *Lupus* (2014) 23, 255–262.

Key words: Systemic lupus erythematosus; lupus nephritis; podocyte; proteinuria

Introduction

Lupus nephritis (LN) is a major cause of morbidity and mortality in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). Besides glomerular hematuria, renal involvement is characterized by proteinuria, which is the predominant common manifestation in the different histological classes of glomerulonephritis in this disease, and reflects podocyte injury.

Podocytes, or glomerular visceral epithelial cells, are highly specialized cells that have a relevant role in the charge and size filtration characteristics of the glomerulus.^{1,2} Proteins expressed by the podocyte are important for the integrity of the filtration

barrier³ and include, among many others, synaptopodin (Synpo), Wilms tumor protein 1 (WT1), glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) and nephrin. Synpo, a proline-rich actin-associated protein, has a cytoplasmic distribution in glomerular podocytes and plays a role in the modulation of the actin-based shape and motility of the podocyte foot processes.⁴ WT1 is a nuclear zinc finger transcription factor that acts as a repressor of cell proliferation.⁵ GLEPP1 is a membrane protein-tyrosine phosphatase that acts as a cellular receptor and participates in regulatory mechanisms related to the foot process structure and/or function through signal transduction.⁶ Nephrin, located exclusively in the slit diaphragm region of the podocyte foot processes,⁷ is a transmembrane adhesion protein of the immunoglobulin (Ig) superfamily and functions as a signaling protein.⁸ It is relevant for the structural integrity of the slit and its absence results in massive proteinuria.⁹

In the search to discriminate the underlying mechanisms involved in podocyte injury of various

Correspondence to: Eloisa Bonfá, Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr Arnaldo 455, 3º andar, sala 3192, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

Email: eloisa.bonfa@hc.fm.usp.br

Received 12 April 2013; accepted 19 November 2013

© The Author(s), 2013. Reprints and permissions: <http://www.sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav>

10.1177/0961203313517152

types of glomerulonephritis, many studies in the past few years were conducted aiming to identify alterations in the expression of podocyte phenotypic markers associated with proteinuria. In this aspect, Synpo expression is decreased in poorly steroid-responsive patients with primary focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)¹⁰ and minimal change disease (MCD),¹¹ as well as in patients with collapsing idiopathic glomerulosclerosis and human immunodeficiency virus (HIV)-associated nephropathy.¹² To the contrary, Synpo expression is preserved in steroid-responsive MCD,¹¹ membranous glomerulopathy (MGN)¹² and IgA nephropathy with minor glomerular abnormalities.¹³ Likewise, GLEPP1 expression was unaltered in MCD and MGN,¹² whereas it is diminished in primary FSGS.¹⁰ Moreover, nephrin staining was reduced in patients with primary acquired nephrotic syndrome (MGN, MCD, FSGS and IgA nephropathy) as shown by Doublier et al.¹⁴

Similar analysis regarding LN is scarce in the literature. A report enrolling renal biopsies from only four patients with childhood-diffuse proliferative LN showed an attenuated expression of Synpo, nephrin and podocin on podocytes.¹⁵ Additionally, three available studies with adults with LN that included a very small number of patients ($n=10$, $n=15$ and $n=7$, respectively) reported a decrease in the expression of Synpo¹⁶ and nephrin.^{17,18} However, the limited sample size precluded a definitive conclusion about the relevance of these findings concerning the diverse histopathological patterns of LN and their clinical associations.

We therefore performed a systematic evaluation of Synpo, WT1, GLEPP1 and nephrin cellular expression in a large series of LN biopsies and attempted to identify whether podocyte phenotype is distinct in pure membranous and proliferative histopathological classes of LN and its potential relevance in renal parameters.

Material and methods

Patients

Charts were extensively reviewed for demographic, clinical and laboratory data related to the time of biopsy. All patients fulfilled the revised American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE¹⁹ and gave written consent to participate in the study. Evidence for active renal disease was based on: proteinuria higher than 0.5 g/24 h, and/or the presence of altered urinary sediments (cellular casts, hematuria >5 red blood cells/high-power field or

leukocyturia >5 leukocytes/high-power field, excluding infection or stone) and/or serum albumin lower than 3.5 g/dl. Renal dysfunction was defined as serum creatinine higher than 1.5 mg/dl and nephrotic proteinuria as >3.5 g/24 h. This study was approved by the local ethical commission (CAPPesq HC-FMUSP #0717-04). Antibodies to double-stranded DNA (dsDNA) were detected by indirect immunofluorescence using *Crithidia luciliae* as substrate. Hemolytic complement activity was determined by hemolytic radial diffusion assay using sensitized erythrocytes incorporated into agarose-containing immunodiffusion plates. Normal CH100 range: 150–350 IU/ml.

Biopsies

Kidney biopsies from 88 patients with LN were selected from the archives of the Renal Pathology Laboratory at Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo. Fifty-two biopsies comprised the study group and 36 were excluded either because of reported comorbidities in the patients such as diabetes mellitus, the presence of less than five eligible glomeruli in the section or biopsies classified as mesangial class II LN. At the time of percutaneous needle biopsies, one of the samples of the kidney specimen was fixed in Dubosq-Brasil, followed by 10% formaldehyde, and after paraffin embedding it was processed for standard histological procedures. The other sample was snap frozen in liquid nitrogen, and conventional microscopy was carried out in cryostat sections. All slides were blindly analyzed by one expert renal pathologist (DMACM) and histological findings were recorded according to the 2003 International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN-RPS) revised lupus glomerulonephritis classification.²⁰

Immunohistochemistry

Three-micrometer-thick paraffin serially cut sections were mounted onto slides, deparaffinized (60°C/30 minutes), immersed in xylol, and then rehydrated through a graded ethanol series. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxidase in distilled water for 20 minutes, and then rinsed with distilled water. For antigenic recovery, tissue sections immersed in pH 6.0 citrate buffer were submitted to pressuring heating and then rinsed with pH 7.4 phosphate-buffered saline (PBS). Slides were incubated at 4°C overnight with optimal dilution of primary mouse monoclonal antibodies to: WT1, clone 6F-H2 (Dako Corp., Glostrup, Denmark), GLEPP1,

clone 5C11 (Biogenex, Fremont, CA, USA). Tissue quality control was performed by staining sections with specific mouse monoclonal antibody anti-synaptopodin, clone G1d4 (Progen and Biotechnick GmbH, Heidelberg, Germany). Negative controls were used for each reaction by omitting incubation with primary antibody. Subsequently, slides were incubated with Spring Reveal Polyvalent HRP detection system (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) using 3,3' diaminobenzidine as chromogenic substrate following the manufacturer's instructions. Sections were washed, counter-stained with Harris's hematoxylin solution followed by alcohol-xylol dehydration and then mounted using Entellan medium (EMD Chemicals Inc, Gibbstown, NJ, USA). The expression of Synpo, WT1, GLEPP1 and nephrin in renal glomerulus was qualitatively evaluated under optical microscopy (magnification 400 $\times$). At least five non-totally sclerosed glomeruli were analyzed for each slide. The immunohistochemistry assays were standardized using normal adult kidney obtained by nephrectomy for trauma or small localized renal tumor. For analysis of nephrin expression, antigenic recovery was obtained by submitting tissue sections immersed in citrate buffer, pH 6.0 in a steamer at 90°C to 95°C for 30 minutes. After rinsing with pH 7.6 Tris-buffered saline (TBS), slides were incubated at 4°C overnight with optimal dilution of primary specific antibody (kindly provided by Dr Lawrence B. Holzman from the Renal-Electrolyte and Hypertension Division, University of Pennsylvania, PA, USA) and then with the Novolink™ detection system (Polymer Detection System, Leica Microsystems, Newcastle, UK) following the manufacturer's instructions.

Immunorexpression of podocyte markers in the biopsies was classified as *globally preserved* when all glomeruli (diffuse) in the section had a global staining and as *segmentally reduced* when at least one glomerulus (focal) in the section had a segmental staining. Synpo was used as a reference marker for the mature podocyte.^{4,12}

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) for continuous variables and percentage for categorical variables. Continuous variables were compared using the Student's independent *t* test and categorical variables were compared using the Pearson's chi-square and Fisher's exact test. A *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Demographic and clinical features of lupus patients

At the time of biopsy, the 52 lupus patients (80.8% female, 59.6% white) had a mean age of 34.12 ± 10.94 years, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) of 8.48 ± 3.87 , and mean lupus duration of 5.23 ± 5.41 years. Laboratorial evaluation of renal function of the patients revealed high mean levels of proteinuria (4.06 ± 3.57 g/24 h), serum creatinine (1.79 ± 1.44 mg/dl) and low serum albumin (2.58 ± 0.80 g/dl).

Podocyte biomarkers analysis in pure membranous and proliferative LN

Evaluation of the normal kidney revealed global and diffuse (preserved pattern) staining of Synpo, WT1, GLEPP1 and nephrin along the capillary walls (Figures 1.1 (a), (b), (c), and (d), respectively). In LN, the mean number of eligible glomeruli analyzed per renal biopsy was 11.65 ± 5.80 , and completely sclerosed glomeruli were not taken into consideration.

Of the 52 biopsies analyzed, 39 (75%) were classified as proliferative LN: 51.3% of them were pure diffuse proliferative class IV, 30.7% membranoproliferative (class III and V, class IV and V) and 18% pure focal proliferative class III. Pure membranous class V LN was observed in the remaining 13 (25%) biopsies. Comparison of podocyte biomarkers expressions in LN demonstrated a predominance of globally preserved staining of Synpo (69.2%), WT1 (69.2%), GLEPP1 (53.9%) and nephrin (60%) in the pure membranous group. Conversely, only less than 10% of the proliferative showed a globally preserved expression for all four proteins analyzed (Table 1). Representative immunostaining with global and diffuse and segmentally reduced patterns of Synpo, WT1, GLEPP1 and nephrin in kidney tissue sections from LN patients are illustrated in Figures 1.2 (A)–(D) and Figures 1.3 (A)–(D), respectively.

Likewise, similar results were observed in the comparison of the expression of the four podocyte markers in pure proliferative class III/IV ($n=27$), membranoproliferative ($n=12$) subgroups with pure class V ($n=13$) (Table 2). Further analysis demonstrated that the staining pattern was comparable in patients with pure proliferative class III/IV and those with membranoproliferative LN (Synpo: $p = 1.00$, WT1: $p = 0.22$, nephrin: $p = 1.00$ and GLEPP1: $p = 1.00$).

Figure 1 Representative immunostaining of synaptopodin, WT1, GLEPP1 and nephrin in kidney tissue sections from normal individuals and lupus nephritis patients. Figures 1.1 (A)–(D): normal kidney with a global and diffuse pattern, Figures 1.2 (A)–(D): lupus nephritis kidney displaying a global and diffuse pattern and Figures 1.3 (A)–(D): lupus nephritis with segmentally reduced pattern. Immunoperoxidase staining, magnification 400×.

Figure 1.1. Normal kidney. Global and diffuse immunostaining pattern.

Figure 1.2. Lupus nephritis. Global and diffuse immunostaining pattern.

Figure 1.3. Lupus nephritis. Segmentally reduced immunostaining pattern.

Table 1 Expression of podocyte biomarkers in pure membranous class V and proliferative lupus nephritis biopsies

Expression of podocyte markers in glomerulus	Pure membranous class V group (n=13)	Proliferative classes group* (n=39)	p
Synaptopodin, n (%)			
Globally preserved	9 (69.2)	1 (2.6)	<0.0001
Segmentally reduced	4 (30.8)	38 (97.4)	<0.0001
WT1, n (%)			
Globally preserved	9 (69.2)	3 (7.7)	<0.0001
Segmentally reduced	4 (30.8)	36 (92.3)	<0.0001
GLEPP1, n (%)			
Globally preserved	7 (53.9)	1 (2.9) ^b	0.0002
Segmentally reduced	6 (46.1)	34 (97.1) ^b	0.0002
Nephrin, n (%)			
Globally preserved	6 (60) ^c	3 (9.4) ^c	0.0025
Segmentally reduced	4 (40) ^c	29 (90.6) ^c	0.0025

*Proliferative classes of LN included: 51.3% pure diffuse proliferative class IV; 30.7% membranoproliferative (class III and V/class IV and V), and 18% pure focal proliferative class III.

^bGLEPP1 expression was evaluated in 35 proliferative biopsies of LN.

^cNephrin expression was evaluated in 10 pure membranous and in 32 proliferative biopsies of LN. LN: lupus nephritis; WT1: Wilms tumor protein 1; GLEPP1: glomerular epithelial protein 1.

In the pure membranous class V LN group (n=13), there were nine patients (69.2%) with preserved Synpo expression and four patients (30.8%) with reduced expression. These two subgroups

differed in that at the time of biopsy the first one had a lower histological activity index (1.17 ± 0.41 vs. 2.50 ± 1.00 , $p=0.0178$) and serum albumin (2.11 ± 1.09 vs. 3.84 ± 0.12 g/dL, $p=0.0103$), and a higher proteinuria (5.45 ± 2.90 vs. 1.72 ± 1.67 g/24 h, $p=0.0374$) than the last, respectively (Table 3).

Analysis of the expression of Synpo in all 52 LN biopsies demonstrated that only 10 (19.2%) of them displayed a globally preserved immunostaining pattern while 42 (80.8%) had a segmentally reduced expression. Patients with preserved staining had the majority of biopsies classified as pure membranous LN (90%), with a lower histological activity ($p=0.0007$) and chronicity indexes ($p=0.0054$), lower serum creatinine ($p=0.0108$) and a tendency of lower frequency of anti-dsDNA ($p=0.07$) and higher nephrotic proteinuria ($p=0.08$) at the time of biopsy (Table 4).

The specific analysis of proteinuria at the time of biopsy revealed comparable levels in patients with preserved and reduced Synpo staining ($p=0.22$). In contrast, in the mean follow-up of four years there was a tendency toward lower mean levels of proteinuria in patients with preserved Synpo staining (0.26 ± 0.23 vs. 0.84 ± 0.90 g/24 h, $p=0.05$) and toward lower frequency of patients with proteinuria >0.5 g/24 h

Table 2 Expression of podocyte biomarkers in pure membranous class V, pure proliferative (classes III and IV) and membranoproliferative classes (classes III and V/ IV and V) lupus nephritis

Expression of podocyte markers in glomerulus	Pure membranous class V (n = 13)	Pure proliferative classes III and IV (n = 27)	Membranoproliferative classes (III and V; IV and V) (n = 12)	p
Synaptopodin, n (%)				
Globally preserved	9 (69.2)	1 (3.7)	0	<0.0001
Segmentally reduced	4 (30.8)	26 (96.3)	12 (100)	<0.0001
WT1, n (%)				
Globally preserved	9 (69.2)	1 (3.7)	2 (16.7)	<0.0001
Segmentally reduced	4 (30.8)	26 (96.3)	10 (83.3)	<0.0001
GLEPP1, n (%)				
Globally preserved	7 (53.9)	1 (4.2) ^a	0	0.0001
Segmentally reduced	6 (46.1)	23 (95.8) ^a	11 (100) ^a	0.0001
Nephrin, n (%)				
Globally preserved	6 (60) ^b	2 (9.1) ^b	1 (10) ^b	0.0030
Segmentally reduced	4 (40) ^b	20 (90.9) ^b	9 (90) ^b	0.0030

^aGLEPP1 expression was evaluated in 24 pure proliferative and 11 membranoproliferative LN biopsies.^bNephrin expression was evaluated in 10 pure membranous, 22 pure proliferative and 10 membranoproliferative LN biopsies. LN: lupus nephritis; WT1: Wilms tumor protein 1; GLEPP1: glomerular epithelial protein 1.**Table 3** Comparison of clinical, laboratorial and renal features in patients with pure membranous class V LN with globally preserved and segmentally reduced synaptopodin expression in podocytes

	Synaptopodin expression		p
	PRESERVED (n = 9)	REDUCED (n = 4)	
Histological activity index	1.17 ± 0.41 ^a	2.50 ± 1.00	0.0178
Histological chronicity index	0.33 ± 0.82 ^a	1.00 ± 1.15	0.31
Serum albumin at biopsy (g/dl)	2.11 ± 1.09	3.84 ± 0.12	0.0103
Serum albumin mean follow-up four years (g/dl)	4.06 ± 0.42	4.10 ± 0.29	0.87
Proteinuria at biopsy (g/24h)	5.45 ± 2.90	1.72 ± 1.67	0.0374
Nephrotic proteinuria at biopsy, n (%)	7 (77.8)	1 (25)	0.22
Proteinuria mean follow-up four years (g/24h)	0.27 ± 0.23	0.37 ± 0.46	0.60
Proteinuria > 0.5 g/24 h in follow-up, n (%)	1 (11.1)	1 (25)	1.00
Serum creatinine at biopsy (mg/dl)	0.73 ± 0.15	0.82 ± 0.30	0.47
Serum creatinine mean follow-up four years (mg/dl)	0.78 ± 0.22	0.70 ± 0.10	0.51
Disease duration (years)	3.21 ± 4.61 ^b	13 ± 9.90 ^c	0.66
SLEDAI at biopsy	8.00 ± 4.58	9.25 ± 3.59	0.64
Anti-dsDNA at biopsy, n (%)	1 (11.1)	2 (50)	0.20
CH100 at biopsy (IU/ml)	184.44 ± 109.90	130 ± 98.57	0.41
Dialysis in the mean follow-up four years, n (%)	0	0	1.00

Values are expressed as mean ± SD for continuous variables and percentage (%) for categorical variables.

^aEvaluated in six biopsies in the preserved Synpo expression group.^bEvaluated in eight patients in the preserved Synpo expression group.^cEvaluated in two patients in the reduced Synpo expression group. LN: lupus nephritis; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA.

(10 vs. 45.7%, $p=0.06$) than those with diminished expression. There was no significant statistical difference in the mean follow-up of four years between the preserved and reduced Synpo expression groups regarding serum albumin ($p=0.28$), serum creatinine ($p=0.11$) and dialysis ($p=0.17$) (Table 4).

Discussion

This study is to our knowledge the first to provide evidence that the expression of the selected podocyte markers is distinct in pure membranous and proliferative LN, in spite of the common feature of proteinuria in both conditions.²¹

Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis
GM Rozendo et al.

260

Table 4 Comparison of clinical, laboratorial and renal features in LN patients with globally preserved and segmentally reduced synaptopodin expression in podocytes

	Synaptopodin expression		p
	PRESERVED n=10	REDUCED n=42	
Proliferative LN, n (%)	1 (10)	38 (90.5)	<0.0001
Pure membranous LN, n (%)	9 (90)	4 (9.5)	<0.0001
Histological activity index	1.43 ± 0.79 ^a	5.35 ± 2.80 ^b	0.0007
Histological chronicity index	0.29 ± 0.76 ^a	3.60 ± 2.95 ^b	0.0054
Serum albumin at biopsy (g/dl)	2.17 ± 0.95	2.64 ± 0.75	0.10
Serum albumin mean follow-up four years (g/dl)	4.09 ± 0.41	3.86 ± 0.62 ^b	0.28
Proteinuria at biopsy (g/24h)	5.41 ± 2.60	3.87 ± 3.68	0.22
Nephrotic proteinuria at biopsy, n (%)	8 (80)	20 (47.6)	0.08
Proteinuria mean follow-up four years (g/24h)	0.26 ± 0.23	0.84 ± 0.90 ^b	0.05
Proteinuria >0.5 g/24h in follow-up, n (%)	1 (10)	16 (45.7) ^b	0.06
Serum creatinine at biopsy (mg/dl)	0.72 ± 0.13	1.97 ± 1.48	0.0108
Serum creatinine mean follow-up four years (mg/dl)	0.73 ± 0.18	1.98 ± 2.44 ^b	0.11
Disease duration (years)	4.52 ± 5.84 ^c	5.39 ± 5.38 ^c	0.66
SLEDAI at biopsy	7.90 ± 4.33	8.62 ± 3.79	0.60
Anti-dsDNA at biopsy, n (%)	1 (10)	18 (42.9)	0.07
CH100 at biopsy (IU/ml)	184.44 ± 109.90 ^d	144.03 ± 118.47 ^d	0.36
Dialysis in the mean follow-up four years, n (%)	0 ^e	10 (25) ^e	0.17
Treatment w/ corticosteroids at biopsy, n (%)	7 (77.8) ^e	13 (32.5) ^e	0.0221
Treatment w/ cyclophosphamide at biopsy, n (%)	1 (11.1) ^e	21 (52.5) ^e	0.0305

Values are expressed as mean ± SD for continuous variables and percentage (%) for categorical variables.

^aEvaluated in seven biopsies in the preserved Synpo expression group and 40 in the reduced Synpo expression group.

^bEvaluated in 35 patients in the reduced Synpo expression group.

^cEvaluated in nine patients in the preserved Synpo expression group and 40 in the reduced group.

^dEvaluated in nine patients in the preserved Synpo expression group and 36 in the reduced group. LN: lupus nephritis; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; Anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA.

The sizeable number of biopsies with these two lupus histopathological classes more likely to be associated with podocyte injury was essential to discriminate podocyte involvement, a condition not met by previous reports, particularly with regard to the representation of pure membranous LN.¹⁵⁻¹⁷ In addition, the parallel evaluation of proteinuria levels at the time of biopsy and in the mean follow-up of four years was also important to determine if the alteration in the expression of the selected molecular markers in these highly specialized cells predicts severity and long-term outcome of these parameters.

Assessment of podocyte-associated molecules with cellular distribution in the cytoplasm, nucleus, membrane and slit diaphragm is another major advantage of the present work, since podocyte injury may encompass one or more of these subcellular compartments. Some of the major causes of podocyte injury include direct interference with the actin cytoskeleton resulting in reorganization of the foot process structure (effacement), interference with the slit diaphragm complex, dysregulation of membrane signaling and genetic mutation. In diabetic podocytopathy for example,

which also presents proteinuria, different cellular and molecular mechanisms are involved and include apoptosis or cellular detachment leading to a decrease in podocyte number and reduction in nephrin expression in the slit diaphragm with podocyte foot process effacement,²² showing the importance of analyzing different cellular compartments.

In the present study, podocyte number and/or density seemed to be mostly preserved in lupus pure membranous nephropathy with a global and diffuse expression of Synpo contrasting with predominantly reduced staining in pure proliferative and membranoproliferative classes in areas with marked glomerular cell proliferation and/or sclerotic lesions. In proliferative LN, the decrease in Synpo staining probably infers loss of podocyte, which is in accordance with prior reports of increased excretion of this cell in the urine.^{23,24} Conversely, podocyturia was not as evident in the only report of three patients with membranous LN²⁵ corroborating our data, with predominance of conserved Synpo, WT1, GLEPP1 and nephrin podocyte staining in the majority of biopsies with this histological class.

Lupus

The pure membranous class V LN displayed an expression pattern similar to that observed in steroid-responsive minimal change disease,¹¹ membranous glomerulopathy¹² and IgA nephropathy,²⁶ whereas lupus biopsies with proliferative lesions resembled idiopathic FSGS, steroid-resistant minimal change disease, collapsing FSGS and HIV-associated nephropathy.^{11,12,27} Attenuation of the immunostaining for Synpo was also seen in idiopathic nephrotic syndrome of childhood²⁸ and in a recent study involving seven childhood-onset lupus patients in which Synpo stained weakly and inconsistently in active diffuse proliferative LN.¹⁵

Our findings showed that the expression pattern of the selected molecular markers of podocytes was not associated with levels of proteinuria at biopsy but instead maintain a correlation with histological class of LN. Supporting this notion, the overall analysis of all biopsies revealed that those with preserved Synpo had a tendency of higher frequency of nephrotic proteinuria at biopsy and, in this group, there is an overrepresentation of membranous nephritis. This association is likewise suggested in a previous report on the expression of nephrin involving only 15 LN patients, which also showed a correlation with histological renal class rather than with the level of proteinuria.¹⁷ These results reinforce the possibility that the underlying mechanism of increased permeability of the filtration barrier in pure membranous and proliferative nephritis is dissimilar.

Of note, within the same histological class, pure membranous nephritis, proteinuria at the time of biopsy was also higher in patients who presented preserved Synpo than those with reduced staining. This finding may only reflect the typical clinical expression of active membranous LN in which nephrotic-range proteinuria generally predominates, endorsing the idea of podocyte functional alteration and not structural damage in the kidney of these patients. The small sample size of the pure class V group with only four patients with reduced staining precludes, however, a definitive conclusion. A similar analysis in the proliferative group was not possible once there was only one patient with preserved Synpo expression in the biopsy.

With regard to proteinuria outcome, the intensity of the damage in podocytes was reported to determine renal outcome, in view of the fact that significant podocyte loss per glomerulus leads to progression to kidney failure, as demonstrated in humans and animal models.^{29,30} Accordingly, a tendency toward lower mean proteinuria levels in the long-term was observed in the overall analysis of patients with preserved staining of podocyte

markers. In contrast, lupus patients with renal proliferative lesions, which bear resemblance to FSGS regarding the expression of the podocyte markers, usually have a more severe prognosis.³¹

In summary, our data suggest that the mechanisms underlying the complex pathology of proteinuria in pure membranous and proliferative histopathological classes of LN are probably distinct. In proliferative forms there seems to occur structural podocyte damage, whereas in the pure membranous nephropathy the majority of biopsies with preserved pattern reinforces the possibility of a dysfunctional podocyte lesion that may account for the better long-term prognosis of proteinuria outcome.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, grant no. 2009/54616-7. The work of Drs Bonfa and Borba was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants: 301411/2009-3 and 306963/2011-6, respectively) and by the Federico Wilhelm Agricola Foundation Research Grant.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgment

The authors thank Dr Lawrence B. Holzman (Renal-Electrolyte and Hypertension Division, University of Pennsylvania, PA, USA) for kindly providing the anti-nephrin antibody.

References

- 1 Farquhar MG. The glomerular basement membrane: Not gone, just forgotten. *J Clin Invest* 2006; 116: 2090–2093.
- 2 Farquhar MG. Editorial: The primary glomerular filtration barrier—basement membrane or epithelial slits? *Kidney Int* 1975; 8: 197–211.
- 3 Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 2001; 10: 331–340.
- 4 Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 1997; 139: 193–204.
- 5 Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 1993; 119: 1329–1341.

- 6 Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19953–19962.
- 7 Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, et al. Nephlin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962–7967.
- 8 Benzing T. The promise of well-being: Stay in shape with N(i)ck. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 1425–1427.
- 9 Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575–582.
- 10 Hirakawa M, Tsuruya K, Yotsueda H, et al. Expression of synaptopodin and GLEPP1 as markers of steroid responsiveness in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Life Sci* 2006; 79: 757–763.
- 11 Wagrowska-Danilewicz M, Danilewicz M. Synaptopodin immunoreactivity in steroid-responsive and steroid-resistant minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrologia* 2007; 27: 710–715.
- 12 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: 51–61.
- 13 Kemeny E, Dürmüller U, Nückeit V, Gudat F, Mihatsch MJ. Distribution of podocyte protein (44 kD) in different types of glomerular diseases. *Virchows Arch* 1997; 431: 425–430.
- 14 Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, et al. Nephlin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001; 158: 1723–1731.
- 15 Machida H, Ito S, Hirose T, et al. Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2530–2537.
- 16 Kubiak-Wlekly A, Perkowska-Ptasinska A, Olejniczak P, et al. The comparison of the podocyte expression of synaptopodin, CR1 and nephrin in human glomerulonephritis: Could the expression of CR1 be clinically relevant? *Int J Biomed Sci* 2009; 5: 28–36.
- 17 Pervinaki GS, Moysiadi DK, Bertias G, et al. Podocyte main slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology. *Lupus* 2011; 20: 781–791.
- 18 Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2063–2071.
- 19 Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
- 20 Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 241–250.
- 21 Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. The subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 980286.
- 22 Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev* 2008; 4: 39–45.
- 23 Bollain-y-Goytia JJ, González-Castañeda M, Torres-Del-Muro F, et al. Increased excretion of urinary podocytes in lupus nephritis. *Indian J Nephrol* 2011; 21: 166–171.
- 24 Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000; 320: 112–116.
- 25 Li JJ, Liu Y, EJ, et al. The significance of urinary podocytes in patients with active lupus nephritis [article in Chinese]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2007; 46: 127–130.
- 26 Horinouchi I, Nakazato H, Kawano T, et al. In situ evaluation of podocin in normal and glomerular diseases. *Kidney Int* 2003; 64: 2092–2099.
- 27 Hill GS, Karoui KE, Karras A, et al. Focal segmental glomerulosclerosis plays a major role in the progression of IgA nephropathy. I. Immunohistochemical studies. *Kidney Int* 2011; 79: 635–642.
- 28 Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney Int* 2001; 59: 118–125.
- 29 Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases—insights from animal models. *Kidney Int* 2005; 67: 404–419.
- 30 Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998; 54: 687–697.
- 31 Korb SM, Schwartz MM. Primary focal segmental glomerulosclerosis: A treatable lesion with variable outcomes. *Nephrology* 2001; 6: 47–56.

Apêndice B - Apresentação oral, durante o Congresso Americano de Reumatologia (ACR), Washington DC, EUA, 2012

To: gabrielarez@hotmail.com
From: acr@confex.com
Subject: ACR Abstract Oral Concurrent Presentation Invitation
Date: Fri, 17 Aug 2012 14:46:49 -0400

Friday, August 17, 2012

Dear Gabriela M. Rezende,

I am pleased to inform you that the ACR Abstract Selection Committee has accepted your abstract titled "Podocyte Injury in Membranous and Proliferative Lupus Nephritis: Distinct Underlying Mechanisms?" for presentation in an Oral Concurrent Session at the 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, to be held in Washington, D.C., November 9-14, 2012.

The schedule for your presentation is as follows:

Session Type: Oral

Session Name: Systemic Lupus Erythematosus - Human Etiology and Pathogenesis II

Date and Session Time: Tuesday, November 13, 2012, 2:30 PM - 4:00 PM

Presentation Time: 3:15 PM - 3:30 PM

Location: WCC: 146 C

Presentation Number: 2496

To accept or decline this invitation, please click the link below.

<http://acr.confex.com/acr/2012/acr/extra/index.cgi?username=26753&password=447728&EntryType=Paper>

Detailed instructions/guidelines for Oral Concurrent Session presentations are available on the ACR/ARHP annual meeting website at www.acrannualmeeting.org/AbstractPresenters.

Acceptance of your abstract does not automatically register you for the annual meeting. Registration and Housing information is contained in the Registration and Preliminary Program, which was mailed in June. Complete details are also available at www.ACRannualmeeting.org.

As the presenting author, it is your responsibility to forward all correspondences to co-authors, including the ACCME Standards for Commercial Support which may be obtained by clicking on the following link ACCME Standards for Commercial Support or by visiting the ACCME website at www.accme.org. The presenting author must adhere to these standards, including disclosure, or be subject to corrective action as deemed appropriate by the leadership of the ACR.

To request a change in the presenting author for your presentation, the presenting author must e-mail us at abstracts@rheumatology.org. Requests must include the abstract presentation number, the title of the abstract, the new presenting author's contact information and acceptance documentation.

In accordance with ACCME Standards for Commercial Support for CME and ACR policy, abstracts selected for oral or poster presentation must be free of bias. Reference to a company or institution as part of the author information or disclosure statement as it appears in the submitted abstract is permitted in printed information - including handouts, brochures or products bearing company or institution reference. Slide #1 must be your title slide and slide #2 must be your disclosure slide with the most current information for you and your co-authors.

GENERAL INFORMATION

To confirm your exact speaking time and session room location, please visit our website in September at www.ACRannualmeeting.org to access the My Annual Meeting, which allows you to search for abstracts by keyword or author, and view all educational sessions to create a personalized itinerary or refer to the session tracker, which will be distributed on site.

Please visit www.ACRannualmeeting.org/abstracts for more details on the abstract process. If you have specific questions regarding your abstract, you may contact Stacey Boyd, Senior Specialist, Annual Scientific Meeting Abstracts, at abstracts@rheumatology.org or 404-633-3777. We look forward to seeing you at this year's Annual Scientific Meeting in Washington, D.C.

Sincerely,

Richard Pope, MD, Basic Science Abstract Selection Chair
Carol A. Langford, MD, Clinical Science Abstract Selection Chair
2012 ACR Annual Meeting Planning Committee

Apêndice C - Prêmios

Apêndice D - Trabalhos apresentados em congresso

THE 10TH INTERNATIONAL CONGRESS ON SLE

LUPUS 2013

BUENOS AIRES - ARGENTINA

18th to 21st April 2013 - Hilton Hotel

This is to certify that the abstract entitled:

"Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms?"

*was selected for **The Guided Poster Tours.***

Mary Carmen Amigo, MD
Congress Chair

Bernardo A. Pons-Estel, MD
Congress Chair

Eloisa Bonfá, MD, PhD
Scientific Committee Chair

P017

Sociedade Argentina de Reumatologia

THE 10TH INTERNATIONAL CONGRESS ON SLE

LUPUS 2013

BUENOS AIRES - ARGENTINA

18th to 21st April 2013 - Hilton Hotel

This is to certify that

G de M. Rezende, V S.T. Viana, D M.A.C. Malheiros, E F. Borba, N Silva, E P. Leon, I L. Noronha, C da Silva, E Bonfá

*have participated **The 10th International Congress on SLE – LUPUS 2013***

as **Authors** of the following paper:

Podocyte injury in pure membranous and proliferative lupus nephritis: distinct underlying mechanisms?

Selected for Poster Presentations

Mary Carmen Amigo, MD
Congress Chair

Bernardo A. Pons-Estel, MD
Congress Chair

Eloisa Bonfá, MD, PhD
Scientific Committee Chair

April 19, 2013 - Atlântico A+B+C - P017