

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA - CLÍNICA MÉDICA

LÁZARO BRUNO BORGES SILVA

Lipidúria se correlaciona com proteinúria e albumina sérica, mas não com marcadores de lesão renal em pacientes com glomerulopatias proteinúricas

RIBEIRÃO PRETO-SP

2022

Lázaro Bruno Borges Silva

Lipidúria se correlaciona com proteinúria e albumina sérica, mas não com marcadores de lesão renal em pacientes com glomerulopatias proteinúricas.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina (Clínica Médica) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

RIBEIRÃO PRETO-SP

2022

Autorizo a divulgação e reprodução parcial ou completa desse trabalho, por qualquer meio convencional ou digital, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Lázaro Bruno Borges

Lipidúria se correlaciona com proteinúria e albumina sérica,mas não com marcadores de lesão renal em pacientes com glomerulopatias proteinúricas. Ribeirão Preto, 2022.

80 p:il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Clínica Médica

Orientador: Dantas, Márcio

1.Lipidúria. 2.Síndrome Nefrótica. 3. Glomerulopatias

FICHA DE APROVAÇÃO

Silva, Lázaro Bruno Borges. **Lipidúriase correlaciona com proteinúria e albumina sérica, mas não com marcadores de lesão renal em pacientes com glomerulopatias proteinúricas.**

Aprovado em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família
pelo apoio, ajuda, amparo e
colaboração em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

À fonte da vida, Deus, pelas bênçãos recebidas e orientação nos momentos de dúvidas e incertezas;

À Universidade de São Paulo e à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela oportunidade de realização desse projeto;

Ao professor Márcio Dantas, muito além de professor e orientador...um segundo pai. Minha eterna gratidão pelos ensinamentos científicos e de vida, os quais tento diariamente seguir por considerá-lo e enxergá-lo como exemplo de ser humano e homem;

Ao professor Roberto Silva Costa, professora Terezila Machado Coimbra e professor Alceu Jordão Júnior, pela colaboração e confiança ao utilizar os laboratórios de Patologia, Fisiologia e Nutrição/Metabologia da FMRP-USP;

À Heloísa Della Coletta Francescato pela amizade, paciência e ensinamentos na bancada de laboratório;

À Cleonice Giovanini, Paula Payão Ovidio, Flávio Henrique Leite, Guilherme de Paula Lemos pela ajuda prática nos laboratórios;

Aos pacientes que aceitaram participar do projeto, dedicando tempo e paciência para a coleta de amostras.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

APOIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, Lázaro Bruno Borges. **Lipidúria se correlaciona com proteinúria e albumina sérica, mas não com marcadores de lesão renal em pacientes com glomerulopatias proteinúricas.** 2022. 80f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O termo lipidúria significa a presença de ésteres de colesterol na urina e é encontrada em pacientes com síndrome nefrótica, apesar de não ser essencial para este diagnóstico. Lipidúria é identificada pela presença de partículas lipídicas na urina e são identificadas pelo seu aspecto de cruz de Malta sob microscopia com luz polarizada. Entretanto, a lipidúria raramente é avaliada e tampouco tem sua importância estabelecida. Este estudo tem como objetivo investigar a relevância da lipidúria em pacientes com síndrome nefrótica e sua possível participação na formação da fibrose intersticial.

Métodos: A lipidúria foi avaliada em amostras de urina de pacientes adultos com proteína nefrótica e não nefrótica submetidos à biópsia renal. A medida da gordura urinária foi feita através da contagem de partículas lipídicas em câmara de Neubauer em microscópio sob luz polarizada, e também pela dosagem de gordura total urinária (GTU) calculada pelo índice concentração de GTU/concentração urinária de creatinina. Estas dosagens foram comparadas com proteinúria de 24 h, albumina sérica, filtração glomerular, fibrose intersticial (FI) e com a expressão de sinaptopodina glomerular e de cubulina tubular (imuno-histoquímica). Dados estão expressos como média e desvio padrão ou mediana e variação. A comparação numérica entre os grupos com proteinúria nefrótica e não nefrótica foi feita com o Mann-Whitney *U*-test. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para a correlação entre a contagem de partículas lipídicas ou da GTU com as demais variáveis quantitativas. Foi considerado $p < 0,05$ como nível de significância estatística

Resultados: A contagem de partículas lipídicas foi de 3500/mL (1763; 21550/mL) nos pacientes com síndrome nefrótica ($n=13$) e de 400/mL (250; 850/mL) naqueles com proteinúria não nefrótica ($n=11$; $p < 0,005$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre estes grupos para a GTU e tampouco houve correlação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis. A contagem de partículas lipídicas mostrou correlação estatisticamente significativa com a proteinúria ($r: 0,5202$; $p < 0,01$) e com a albumina sérica ($r: - 0,4554$; $p < 0,05$), mas não com a filtração glomerular, FI e com a expressão de sinaptopodina e de cubulina. A dosagem de GTU não mostrou correlação significativa com qualquer variável estudada.

Conclusão: A lipidúria pode ser medida pela contagem das partículas lipídicas urinárias pela sua associação com a proteinúria e a albuminemia, mas não pela dosagem da gordura total urinária. Além disso, a ausência de correlação da contagem das partículas lipídicas urinárias com a filtração glomerular, a fibrose intersticial e expressa o tubular de cubulina não confirma a hipótese da sua

participação na patogênese da doença renal progressiva nas glomerulopatias proteinúricas. Todavia, este resultado pode ser consequência da amostra insuficiente de pacientes, da heterogeneidade das glomerulopatias e também pela não avaliação dos diversos componentes dos ésteres de colesterol que compõem as partículas lipídicas.

Palavras-Chave: lipidúria, síndrome nefrótica, glomerulopatias

ABSTRACT

SILVA, Lázaro Bruno Borges. **Lipiduria correlates with proteinuria and serum albumin, but not with markers of kidney damage in patients with proteinuric glomerulopathies 2022.** 80f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Lipiduria is present in the urine of patients with nephrotic syndrome. It can be recognized by its Maltese cross appearance of the lipid particles when viewed by a polarizing microscope. However, lipiduria is not searched on the clinical routine. This study aims to study the relevance of lipiduria in patients with nephrotic syndrome and its possible role in the pathogenesis of interstitial fibrosis.

Methods: Lipiduria was evaluated in urine samples of adult patients with nephrotic and non-nephrotic proteinuria who underwent renal biopsy. The quantification of urinary fat was carried out by counting lipid particles in the Neubauer chamber with a polarizing microscope. The total urinary fat (TUF) measured the urinary fat concentration/urinary creatinine concentration index. These measurements were compared with 24 h proteinuria, serum albumin, glomerular filtration, interstitial fibrosis (IF), and the glomerular and tubular expression of synaptopodin and cubilin respectively. Data are presented as media and standard deviation or median and range. The comparison between the nephrotic and non-nephrotic proteinuria groups was made with the Mann-Whitney *U*-test. A Spearman's rank correlation was used to estimate the correlation between the counting of urinary lipid particles and the other quantitative variables. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results: the counting of urinary lipid particles was 3,500/mL (1,763; 21,550/mL) in the nephrotic proteinuria group (n = 13), and 400/mL (250; 850/mL) in the patients with non-nephrotic proteinuria group (n=11; *p*<0.005). There was no statistically significant difference between the two groups for TUF. There was no correlation between urinary lipid particles and TUF. The counting of urinary lipid particles showed a significant statistical difference correlation with proteinuria (*r*: 0.5202; *p*<0.01) and with serum albumin (*r*: - 0.4554; *p*<0.05), but not with glomerular filtration, IF, and with the expression of glomerular synaptopodin and tubular cubilin. The TUF showed no significant correlation with any variable.

Conclusion: Lipiduria can be evaluated by the counting of urinary lipid particles because of its association with proteinuria and serum albumin; however, the total urinary fat did not show this association. Furthermore, the no correlation of the urinary lipid particles with the glomerular filtration and markers of interstitial fibrosis did not confirm the hypothesis of the role the urinary lipid particles in the pathogenesis of the progressive renal disease in the proteinuric glomerulopathies. It must be emphasized that these results may be a consequence of the small sample of patients, the heterogeneous glomerulopathies.

Key words: Lipiduria, nephrotic syndrome, glomerulopathy

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Partículas lipídicas em câmara de Neubauer sob luz polarizada em microscopia óptica.....**p. 35**
- Figura 2: Amostra evidenciando massa de gordura em microtubo após método de extração utilizando clorofórmio.....**p. 37**
- Figura 3: Marcação de túbulos proximais com soro anti-Cubulina.....**p. 42**
- Figura 4: Marcação glomerular com soro anti-sinaptopodina de acordo com a intensidade.....**p. 43**
- Figura 5: Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes.....**p. 46**
- Figura 6: Gráficos de correlações entre as contagens de partículas lipídicas urinárias versus as dosagens bioquímicas dos pacientes com proteinúria nefrótica e não nefrótica**p. 50**
- Figura 7: Gráficos de correlações entre a relação gordura total urinária (GTU) versus as dosagens bioquímicas dos pacientes com proteinúria nefrótica e não nefrótica.....**p. 51**
- Figura 8: Gráficos de correlações entre a contagem de partículas lipídicas urinárias *versus* escores de fibrose intersticial, da expressão glomerular de sinaptopodina e da expressão de cubulina em túbulo proximal dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.....**p. 53**
- Figura 9: Gráficos mostram as correlações entre a gordura total urinária (GTU) *versus* escores de fibrose intersticial, da expressão glomerular de sinaptopodina e da expressão de cubulina em túbulo proximal dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.....**p.54**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes.....**p. 47**
- Tabela 2: Contagem de particular lipídicas e do índice de gordura total urinária (GTU) nos grupos de pacientes**p. 48**
- Tabela 3: Correlação entre contagens de partículas lipídicas urinárias e gordura total urinária versus as dosagens bioquímicas nos grupos de pacientes.....**p. 49**
- Tabela 4. Avaliação da fibrose intersticial, da expressão de sinaptopodina glomerular e de cubulina em túbulo proximal nos grupos de pacientes**p. 52**
- Tabela 5. Correlação entre a expressão glomerular de sinaptopodina, a expressão de cubulina e presença de fibrose intersticial versus a contagem de partículas lipídicas urinárias e a concentração de gordura total urinária (GTU) no grupos de pacientes**p. 53**

LISTA DE QUADROS

Quadro1- Fórmula da taxa de filtração glomerular estimada pela equação CDK-EPI	p. 32
Quadro2- Fórmula da quantidade de partículas lipídicas na câmara de Neubauer.....	p. 34
Quadro3- Fórmula simplificada da quantidade de partículas lipídicas na câmara de Neubauer.....	p. 34
Quadro4- Fórmula para expressar a gordura total urinária (GTU).....	p. 37
Quadro5- Fórmula de quantificação de reação para cubulina por Imunohistoquímica.....	p. 41
Quadro6- Fórmula de quantificação de reação para sinaptopodina por Imunohistoquímica.....	p. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS :*American Chemical Society Specifications*

AGCL: ácidos graxos de cadeia longa

ASB: albumina sérica bovina

ASH: albumina sérica humana

BSA :*Bovine serum albumin*

CA: California

CKD-EPI: *Chronic Kidney Disease – Epidemiology Collaboration*

CT: Colesterol total

CTP: células epiteliais de túbulo proximal DAD : 3,3'-diaminobenzidina

EDTA: *ethylenediaminetetraacetic acid*

FI: fibrose intersticial

FMRP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

GM: Glomerulopatia membranosa

GESF: Glomeruloesclerose Segmentar e Focal

GTU: gordura total urinária

HDL: *high density lipoprotein*

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IN: Indiana

LC-CoA: acyl-coenzima A de cadeia longa

LDL: *low density lipoprotein*

MBG: membrana basal glomerular

n: número

NL: Nefrite Lúpica

P: plasma, plasmática

PA: grau de pureza para análise

PBS :*phosphate buffered saline*

PI(4,5)P2: fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

rASH: albumina sérica humana recombinante

SN: Síndrome Nefrótica

TFG: taxa de filtração glomerular

TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

TG: Triglicerídeos

USA: *United States of America*

LISTA DE SÍMBOLOS

°C: temperatura em Celsius

Da: Dalton

dL: decilitro

g: grama

h: hora

m²: metro quadrado

mg: miligrama

min: minuto

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

nm: nanômetro

®: marca registrada

rpm: rotações por minuto

µm: micrômetro

µL: microlitro

%: porcentagem

pH: potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1. Introdução	p. 18
2. Hipótese	p. 25
3. Objetivos	p. 27
4. Material e métodos	p. 29
5. Resultados	p. 45
6. Discussão	p. 55
7. Conclusão	p. 65
8. Referências	p. 67
9. Anexos e apêndices	p. 73

1. Introdução

As glomerulopatias são doenças em que há comprometimento nos glomérulos, podendo ser causadas por agressões infecciosas, tóxicas, alterações hemodinâmicas e auto imunes (Weening, Ronco e Remuzzi, 2013).

O glomérulo é constituído por capilares originados da arteríola aferente, que posteriormente se transformam em arteríola eferente. A matriz mesangial tem como função a sustentação e organização espacial dos capilares dentro da estrutura glomerular. O sangue é filtrado pela barreira de filtração glomerular, constituída pelo endotélio capilar fenestrado, membrana basal glomerular (MBG) e as células podocitárias (podócitos). O processo de filtração é seletivo, já que algumas substâncias serão filtradas e outras não serão capazes de atravessar a barreira de filtração, caracterizando, portanto, a seletividade da MBG. (Scott e Quaggin, 2015).

O primeiro mecanismo de seletividade à filtração é a presença de carga elétrica negativa no glicocalixe do endotélio vascular. Pelos princípios de afinidade de cargas, partículas e substâncias presentes no sangue que possuem cargas negativas apresentam pouca afinidade a ser filtrada (Rennke HG e Venkatachalam MA, 1977).

O segundo mecanismo se encontra na MBG, a qual é constituída por colágeno IV, laminina, nidógeno e proteoglicanos; sendo este último o responsável por atribuir carga negativa, e assim como o endotélio, restringir a passagem de substâncias com carga negativa (Rennke HG e Venkatachalam MA, 1977).

O último elemento da barreira, porém não menos importante que os primeiros, é a camada de célula podocitária. Os podócitos são células epiteliais

altamente especializadas, com arquitetura única, que cobrem as superfícies exteriores dos capilares glomerulares, aderidos à MBG (Lennon, Randles e Humphries, 2014). Sua estrutura celular apresenta um corpo celular e prolongamentos chamados pedicelos. Os espaços entre os pedicelos são chamados de fendas de filtração, e em condições normais medem aproximadamente 40 nm (Welsh e Saleem, 2012; Benzing e Salant, 2021).

A arquitetura e manutenção da estrutura dos podócitos e a adesão do seu corpo celular, assim como dos seus prolongamentos, à MBG ocorre por várias proteínas. As proteínas de maior destaque são nefrina, podocina, sinaptopodina, α -actinina4, podocalaxina, P-caderina e proteína associada a CD2 (CD2AP). Cada uma desenvolve uma função capaz de manter íntegra a estrutura do diafragma da fenda e assim manter a seletividade das substâncias capazes de serem filtradas.

A presença de fatores de agressão aos podócitos, como medicamentos nefrotóxicos, toxinas circulantes secundárias a infecções e, principalmente, condições que levam à alteração do gradiente pressórico intraglomerular (*stress* hemodinâmico), podem alterar a conformação do citoesqueleto dos podócitos e dos pedicelos, diminuindo a capacidade de repulsão de moléculas negativas e permitindo a passagem de moléculas de tamanho maior que o distanciamento da fenda diafragmática em condições fisiológicas, levando à filtração de substâncias que anteriormente não poderiam ser filtradas, como a albumina (Cheng e Harris, 2010; Benzing e Salant, 2021). A albumina representa 60% das proteínas plasmáticas. Suas características estruturais são: peso molecular aproximado de 65.000 Da, 14 nm de comprimento, 3,8 nm de altura e carga negativa em condição fisiológica com pH 7,4.

As doenças glomerulares podem ser relacionadas a alterações em cada compartimento glomerular, podendo ser lesão nos podócitos, lesão no endotélio, lesão no mesângio e esclerose glomerular. Essas lesões se correlacionam com síndromes clínicas (Weening, Ronco e Remuzzi, 2013), como a síndrome nefrótica, a síndrome nefrítica, hematúrias e proteinúrias assintomáticas.

A síndrome nefrótica (SN) é a principal alteração encontrada nos pacientes com lesão podocitária. É caracterizada por proteinúria ($\geq 3500\text{mg}/24\text{h}$), hipoalbuminemia (albumina sérica $< 3\text{ mg/dl}$), hiperlipidemia (colesterol sérico $> 200\text{ mg/dl}$) e edema (Orth and Ritz 1998; Crew, Radhakrishnan et al. 2004). Além desses achados clínicos-laboratoriais, a presença de gordura na urina, denominada de lipidúria, também é relatada.

A presença de corpos anisotrópicos no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica tem sido descrita desde o início do século XX, conforme mencionado por Klahr, Tripathy et al (1967). Colesterol livre e ésteres de colesterol são os principais componentes da lipidúria, mas a presença de moléculas de triglicerídeos também pode estar presentes (Martin and Small 1984). Estas substâncias são reconhecidas por análise microscópica do sedimento urinário sob a forma de gotículas com tamanhos variados, ora como gotículas livres em suspensão, ora no citoplasma de células tubulares proximais, quando são denominadas corpos ovais gordurosos (Blackburn, Grignani et al. 1998). As gotículas em suspensão também podem se aderir a cilindros, neste caso classificados como cilindros gordurosos (Alsharhan e Beck Jr, 2021; Ashley Jefferson, 2011).

Os corpos gordurosos ovais consistem de células tubulares que reabsorveram gordura e proteína filtradas e se soltaram do epitélio tubular. Essas células mostram o citoplasma vacuolizado por gotículas arredondadas de gordura. No exame da biópsia renal de pacientes com síndrome nefrótica, essas células correspondem às células tubulares proximais espumosas.

O colesterol livre e os ésteres de colesterol, que são anisotrópicos, têm a propriedade de polarizar a luz. Assim, quando analisadas sob luz polarizada, estas gotículas se apresentam na forma de cruz de Malta (Hudson, Dennis et al. 1978; Haber e Lindner;1977).

Por outro lado, triglicérides não polarizam a luz. Assim, para assegurar que as estruturas vacuolizadas são de colesterol, é necessária a complementação com microscópio de luz polarizada. A microscopia eletrônica de transmissão é capaz de identificar estruturas gordurosas eletrondensas e eletrolucentes (Blackburn, Grignani et al. 1998).

O símbolo Cruz de Malta foi criado há cerca de 1000 anos para identificar os cavaleiros de São João, ou cavaleiros de Malta. Ela é representada por uma cruz branca com 8 pontas. Em medicina, este símbolo vem sendo utilizado para fazer analogia com algumas alterações patológicas, com finalidade didática para facilitar a sua memorização. Além da lipidúria sob luz polarizada, o aspecto de Cruz de Malta também é utilizado para identificar os merozoítos em hemácias infestadas na malária e babesiose (Yokoyama, Bork et al. 2003), depósitos de pó de talco (luvas cirúrgicas, por exemplo) em tecidos biológicos (Batistatou, Kamina et al. 2006), e em placas senis da

Doença de Alzheimer, compostas por lâminas β de $A\beta_{42}$ (Exley, House et al. 2010).

O mecanismo fisiopatológico da lipidúria não é conhecido. Especula-se que nas glomerulopatias, os lípidos estão presentes no túbulo proximal pelo mesmo mecanismo que leva a proteinúria, ou seja, aumento da permeabilidade da barreira de filtração glomerular às macromoléculas. Os ésteres de colesterol são partículas grandes e com baixa probabilidade de serem filtradas pela barreira de filtração glomerular. Os lípidos ultrafiltrados seriam em parte reabsorvidos pelas células do túbulo proximal e transportadas para hidrólise nos lisossomos (Peterson, Hjelle et al. 1984; Saku, Sata et al. 1988). Assim, as células com gotículas encontradas na urina seriam células tubulares proximais que se desprenderam do revestimento epitelial no fluido intratubular após a reabsorção dos lípidos ultrafiltrados. Além disso, os corpos gordurosos livres na urina seriam lisossomos gordurosos originados tanto do descarte ativo das células tubulares (Zimmer, Dewey et al. 1961), ou de células lisadas. Nesses casos, proteinúrias de menores intensidades também teriam potencial para gerar lipidúria, supostamente de menor intensidade.

Há também especulação da síntese de lípidos pelas próprias células tubulares proximais (Zimmer, Dewey et al. 1961), como possível justificativa para a lipidúria.

Merece destaque a diferenciação entre lipidúria e quilúria. A quilúria é uma doença relativamente rara, definida pela excreção urinária de quilo, o que torna a urina turva e leitosa. Ela ocorre como consequência do desenvolvimento de fístula linfática no sistema excretor urinário por anastomose anormal entre os sistemas linfáticos intestinais e urinários. Como

mencionado acima, as doenças glomerulares podem causar lipidúria, mas não quilúria. Todavia, a ocorrência simultânea de ambas as doenças, apesar de rara, tem sido descrita (Lai, Siu et al. 1986). Além disso, a lipidúria não torna a urina turva e leitosa, ou com coágulos (Cheng, Mohan et al. 2006; Graziani, Cucchiari et al. 2011). Por outro lado, corpos gordurosos ovais ou cilindros gordurosos não ocorrem nos pacientes com quilúria (Zimmer, Dewey et al. 1961). Moléculas de triglicerídeos são os principais componentes da quilúria, cuja composição é semelhante ao quilo intestinal (Blomstrand, Thorn et al. 1958; Levy, Turner et al. 1966), e que gera cargas elevadas de gordura excretada na urina (Blomstrand, Thorn et al. 1958). Finalmente, as alterações clínicas da quilúria variam desde formas assintomáticas até disúria, hematúria, perda urinária de gordura e proteína, dor lombar ou mesmo cólica nefrética e obstrução urinária, devido aos coágulos de gordura (Diamond and Schapira 1985; Cheng, Mohan et al. 2006).

O mecanismo e as conseqüências, se alguma, da presença de lipídeos na urina têm sido pouco investigados. A associação da intensidade da lipidúria com a proteinúria, com a lesão de estruturas glomerulares, com a lesão do túbulo proximal e com a fibrose intersticial também não foram estudadas. Estas questões foram o estímulo para a realização deste estudo.

2. Hipótese

Apesar do achado de lipidúria na síndrome nefrótica ser bem conhecido, há poucos estudos que avaliaram o mecanismo de sua geração, uma vez que são moléculas grandes e, pelo conhecimento vigente, têm baixa probabilidade de serem filtradas pela barreira de filtração glomerular. Além disso, há pouca descrição da associação da lipidúria com a intensidade da proteinúria, assim como outros indicadores de lesão glomerular ou túbulo-intersticial. Como hipótese, considera-se que a lipidúria apresenta correlação positiva com a proteinúria e com a reabsorção de gordura pelas células do túbulo proximal.

3. Objetivos

Este estudo tem como objetivos avaliar a associação entre a intensidade da lipidúria com marcadores de lesão glomerular como a proteinúria, com alteração da barreira de filtração glomerular, com a lesão das células epiteliais do túbulo proximal e com a fibrose intersticial em pacientes com síndrome nefrótica.

4. Material e Métodos

O projeto consiste em análise transversal de pacientes com glomerulopatias primárias e secundárias em acompanhamento com a Divisão de Nefrologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), avaliando a intensidade da lipidúria e sua associação com características clínicas com intensidade da proteinúria e de alterações histopatológicas tubulares e intersticiais.

4.1. Aspectos éticos:

Esse projeto foi aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob o número de parecer 1.117.214 em 22 de junho de 2015 (ANEXO A).

4.2. Critérios de inclusão:

Foram incluídos pacientes de ambos os gêneros, com idade acima de 15 anos com glomerulopatias primárias ou secundárias diagnosticadas por biópsia renal.

4.3. Critérios de exclusão:

Foram excluídos do estudo os pacientes com pelo menos um dos seguintes critérios: biópsia com menos que 8 glomérulos na microscopia óptica (baixa representatividade da região cortical) ou com tecido renal insuficiente para análise; incapacidade para coletar a urina por micção espontânea; com

diurese inferior a 200 mL/24h; com infecção urinária ou queixa de infecção da região genital (balanopostite, vulvovaginite, leucorréia); com urina turva ou com hematúria macroscópica; em uso de medicamentos nefrotóxicos; em uso de antibióticos ou substâncias que geram pigmentos que mudam a cor da urina; pacientes que se neguem a participar do estudo ou a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

1.1. Diagnóstico das glomerulopatias

O diagnóstico das glomerulopatias utilizado foi o estabelecido pela equipe de Nefrologia em prontuário de cada paciente. Os diagnósticos das glomerulopatias foram obtidos a partir das informações da observação clínica, das avaliações bioquímicas séricas e urinárias, dos exames sorológicos e pela biópsia renal.

1.2. Dados da história clínica e dos exames laboratoriais:

Dados como gênero, idade, pressão arterial, tempo decorrido desde a apresentação clínica até a biópsia renal, antecedentes familiares e hábitos, presença de doenças sistêmicas ou infecciosas, medicamentos em uso foram obtidos pelas histórias clínicas de prontuários. Outros exames analisados incluíram: urina tipo 1 (rotina), proteinúria de 24 horas (mg/24h), dosagens séricas de creatinina (mg/dL), albumina (g/dL), colesterol total e frações LDL e HDL e triglicérides. A taxa de filtração glomerular foi estimada (TFGe) a partir da equação CKD-EPI (Levey, ASet al. 2009):

$$TFGe \text{ (mL/min/1,73m}^2\text{)} = 186 \times P_{CR} \text{ (mg/dL)}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203} \times 0,742 \text{ (se mulher)}$$

(P_{cr}: creatinina plasmática; idade: anos)

Quadro1. Fórmula da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) pela equação CDK-EPI (*ChronicKidneyDisease – EpidemiologyCollaboration*).

As apresentações clínicas das glomerulopatias foram classificadas conforme as seguintes definições:

- a) hematúria microscópica ou macroscópica, associada ou não à proteinúria não nefrótica: pacientes com hematúria de origem glomerular (dismorfismo de hemácias urinárias associado a 5% ou mais de acantócitos) e/ou proteinúria inferior a 3,5 g/24h sem associação com edema;
- b) Síndrome nefrótica: proteinúria maior ou igual à 3,5 g/24h e com ou sem edema, hipoalbuminemia, hipoproteinemia e hipercolesterolemia;
- c) Síndrome nefrítica: edema, hipertensão arterial de instalação recente, oligúria, hematúria, redução aguda da taxa de filtração glomerular e proteinúria inferior a 3,5 g/24h;
- d) Glomerulonefrite rapidamente progressiva: pacientes com síndrome nefrítica com piora gradativa da função renal em poucos dias ou semanas;

- e) Glomerulonefrite crônica: pacientes com indícios de doença glomerular, mas com taxa de filtração glomerular inferior a $30 \text{ mL/min/1,73m}^2$ por mais de três meses, sugerindo doença renal crônica avançada.

4.4. Obtenção da urina:

Para a medida da lipidúria, proteinúria e excreção urinária de gordura total, foram coletadas amostras de urina por micção espontânea em frasco plástico limpo descartável. O paciente foi orientado a coletar a urina a partir do jato médio, desprezando diretamente no vaso sanitário o terço inicial do jato urinário. Esta amostra foi devidamente armazenada em caixa térmica sob temperatura ambiente e encaminhada imediatamente ao laboratório. O volume usado para as análises subsequentes foi de no mínimo 75 mL.

4.4.1. Avaliação da lipidúria:

Para a avaliação da lipidúria, 50 mL da amostra de urina foi centrifugada em tubo de específico a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga convencional, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso no volume residual de 1,0 mL. Após homogeneização e utilizando uma pipeta de 100 μL , foi adicionado esse volume no vale da câmara de Neubauer (já com a lamínula posicionado sobre a área de leitura- superfície de leitura da câmara de Neubauer de $1:10 \text{ mm}^3$). Foram quantificados os corpos ovais gordurosos, os cilindros gordurosos, e as gotículas livres em suspensão em microscópio Zeiss Axioscope (Alemanha), equipado com luz polarizada, com objetiva de 40x e ocular de 10x (equipamento disponível no

Laboratório de Patologia Renal do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo). A contagem das estruturas correspondentes à lipidúria foi realizada nos 4 quadrantes dos vértices na câmara de Neubauer e o cálculo do número de células/mL foi realizado pela seguinte equação (técnica de Thomas Addis modificada):

$$\text{N}^\circ \text{ de partículas lipídicas/mL} = \frac{\text{Volume final (mL)}}{\text{Volume inicial (mL)} \times \text{Volume dos quadrantes contabilizados (mL)}} \times \text{número de partículas visualizadas}$$

Quadro 2. Fórmula da quantidade de partículas lipídicas na câmara de Neubauer.

O volume final foi padronizado em 1mL para todas as amostras e o volume inicial em 50 mL (pré centrifugação). O volume dos quadrantes contabilizados foi de 0,0004 mL, o que representa a soma dos quatro quadrantes dos vértices da câmara de Neubauer. Simplificando, a fórmula utilizada para a contagem de partículas lipídicas foi:

$$\text{N}^\circ \text{ de partículas lipídicas/mL} = \frac{1 \text{ (mL)}}{50 \text{ (mL)} \times 0,0004 \text{ (mL)}} \times \text{número de partículas visualizadas}$$

Quadro 3. Fórmula simplificada da quantidade de partículas lipídicas na câmara de Neubauer.

Para cada campo analisado pela microscopia de luz comum, foi analisado sob luz polarizada, e cada estrutura reconhecida como Cruz de Malta foi contabilizada como partícula lipídica.

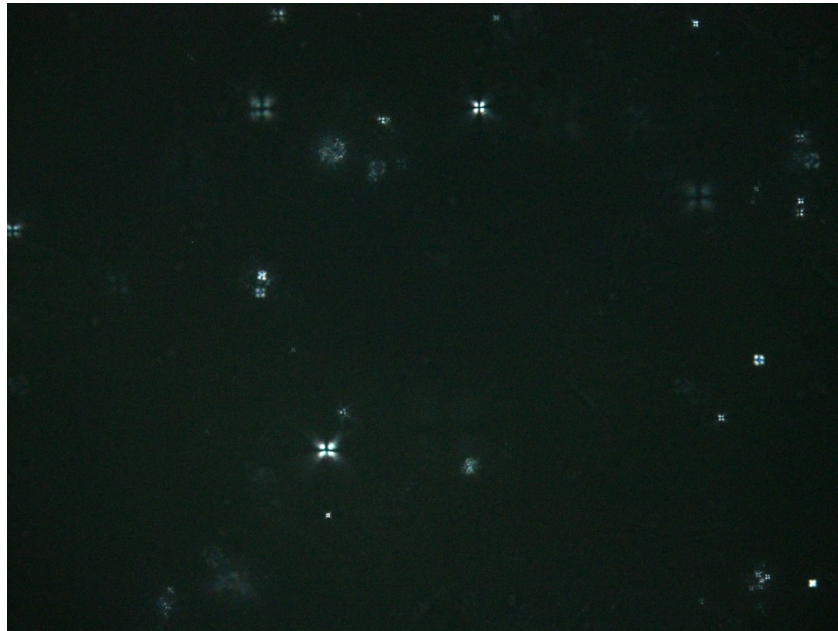


Figura 1: Presença de partículas lipídicas em câmera de Neubauer sob luz polarizada em microscopia óptica (100x) de paciente com síndrome nefrótica.

1.2.1. Mensuração da massa de gordura excretada em amostra de urina:

A dosagem da concentração de gordura urinária foi realizada na mesma amostra de urina obtida para contagem de partículas lipídicas sob luz polarizada, porém as alíquotas foram armazenadas a -80°C (para realização da extração de todas as amostras em um único momento). O método utilizado foi o descrito em 1959 por Bligh-Dyer (Bligh,1959), que consiste nas etapas abaixo:

Descongelamento da amostra foi em banho Maria, e utilizado 2mL da amostra. Adicionado 1mL de clorofórmio (Cloroformio P.A.-A.C.S., 1480g, 100%, *Synth*®) e 1 mL de metanol (Álcool Metílico P.A.-A.C.S., 790g, 100%, *Synth*®), com agitação em vórtex (*Labor Import*®) por 10 minutos. Após agitação, adicionado mais 1mL de clorofórmio e 1 mL de água, seguindo de mais 2 minutos de agitação em vórtex. Os tubos foram centrifugados a 1000rpm por 5 minutos para separação das camadas de clorofórmio (camada inferior) e aquosa (superior). Retirado 2mL de clorofórmio e armazenado em tubo de ensaio contendo 1 grama de Sulfato de sódio anidro (E.D.T.A. Sal dissódico *P.A. Synth*®) para remoção de traços de água. Uma alíquota de 1mL da fase de clorofórmio livre de água foi transferido para um microtubo (*Eppendorf*®) previamente pesado em balança fechada de alta precisão (*Denver Instrument P-214 Analytical Balance*®); as amostras prosseguiram com armazenamento em estufa com circulação de ar a 75°C (*SolidSteel*®) por 24 horas – tempo necessário para evaporação de todo volume de clorofórmio. Após esse período, realizado nova pesagem dos microtubos em mesma balança de alta precisão. O cálculo da diferença entre as pesagens dos microtubos (peso do microtubo (*Eppendorf*®) pós clorofórmio menos o peso de cada microtubo(*Eppendorf*®) pré teste), dividido pelo volume inicial da amostra representa a massa de gordura na urina de cada paciente. Essa etapa foi realizada em duplicata para afastar a possibilidade de erro de mensuração; utilizando a média entre os dois valores de massa de gordura como resultado de cada amostra.

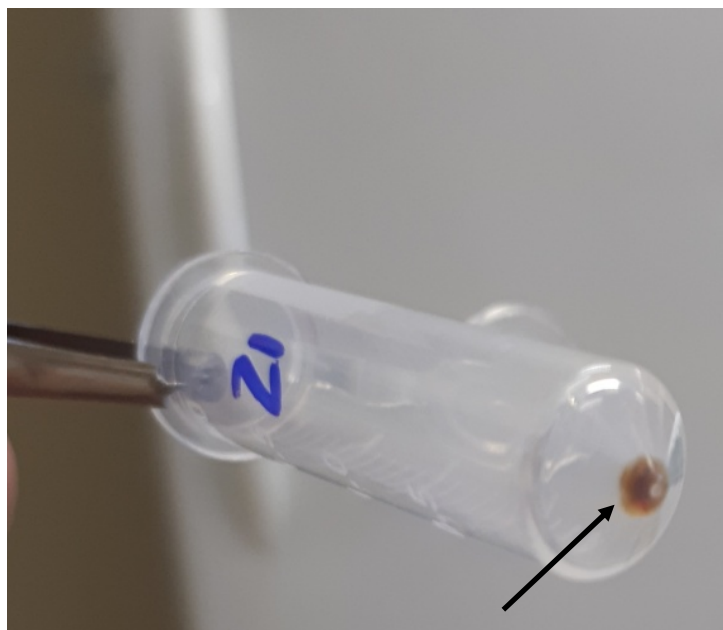


Figura 2: Amostra de paciente com síndrome nefrótica evidenciando presença de massa de gordura em microtubo (*Eppendorf*®) (seta) após método de extração utilizando clorofórmio.

Concomitantemente, foi realizada dosagem de creatinina urinária em cada amostra utilizando kit específico da Labtest® (Creatinina, Ref.35, Labtest®), pelo método de Jaffé.

O índice usado para expressar a excreção urinária de gordura (gordura total urinária (GTU)) foi:

- *Concentração urinária de gordura (g/mL)/ concentração urinária de creatinina (g/mL);*

Quadro 4. Fórmula para expressar a excreção de gordura total urinária (GTU)

1.3. Biópsia Renal

O diagnóstico das glomerulopatias seguiu a rotina do Laboratório de Patologia Renal do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP-USP. Os fragmentos de tecido renal obtidos por biópsia percutânea foram processados para microscopia de luz comum (fixação em Bouin alcoólico), para microscopia de imunofluorescência (material de congelação) e, se necessário, para microscopia eletrônica (fixação em glutaraldeído), conforme métodos rotineiros previamente descritos (Ravinal, Costa et al. 2002). Resumidamente, estes protocolos são realizados da seguinte maneira:

1.3.1. Microscopia de luz comum

Logo após a biópsia renal, o fragmento de tecido renal é fixado em Bouin alcoólico durante um período mínimo de 5 horas, seguido por desidratação em álcool com concentrações crescentes, diafanizado em xilol e embebido em parafina. A partir dos blocos com tecido renal em parafina, secções seriadas com 3 μm de espessura foram obtidas em micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson, e à impregnação com prata metenamina. Estas secções de tecido renal foram então examinadas em microscópio óptico de luz comum.

1.3.2. Microscopia de imunofluorescência

Para a análise por microscopia de imunofluorescência, um segundo fragmento da biópsia renal foi mantido em gaze embebida com solução salina, imediatamente após a realização da biópsia. No Laboratório, ele foi incluído em

meio de “tissuetek” (*Miles Inc., Diagnostic Division, Elkart, IN, USA*) e a seguir congelado em nitrogênio líquido. A partir deste bloco sólido foram obtidas em criostato secções com 2 a 3 μm de espessura que posteriormente foram aderidos em lâminas histológicas. Após 60 minutos de repouso, foram incubados em câmara úmida protegida da luz, sob temperatura ambiente, com os seguintes anti-sorospoliclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína, conforme técnica de imunofluorescência direta: anti-IgA, anti-IgG, anti-IgM, anti-C3, antifibrinogênio, anti-kappa, anti-lambda e anti-C1q (*Dako, Glostrup, Denmark*). Após a incubação, as lâminas foram montadas em glicerina tamponada pH 8,5 e examinadas em microscópio universal equipado com sistema para imunofluorescência.

1.4. Medida da intensidade de fibrose intersticial no córtex renal

A medida da intensidade da fibrose intersticial (FI) no córtex renal foi realizada por escore em campos microscópicos com aumento de 400x, nos cortes de tecido renal corados por tricrômico de Masson, conforme definido a seguir:

- Escore 0: ausência de fibrose intersticial (FI);
- Escore 1: FI discreta, com achados focais e de leve intensidade (até 5% do campo);
- Escore 2: FI moderada, com achados focais e de moderada intensidade (até 25% do campo);
- Escore 3: FI intensa, com achados focais e de forte intensidade ou achados difusos de moderada intensidade (25% a 75% do campo);

- Escore 4: FI muito intensa, com achados difusos e de forte intensidade (acima de 75% do campo);

1.5. Imuno-histoquímica

Foram utilizados cortes histológicos de biópsia renal dos pacientes com proteinúria e material de biópsia renal armazenada no laboratório de Patologia da FMRP descritos como sem alterações histológicas (material controle). Os cortes histológicos foram colocados em três banhos consecutivos de xilol para eliminação da parafina, seguido de hidratação com três banhos de álcool em concentrações decrescentes. As lâminas foram então incubadas por dez minutos em solução contendo azida sódica à 10% e água oxigenada à 30% para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. Na seqüência foram lavadas em PBS (*phosphatebuffered saline*) por 5 minutos e os cortes incubados com os seguintes anticorpos primários:

- Anticubulina (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*): policlonal, incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:1500). A cubulina é um receptor endocítico presente no túbulo proximal e responsável pelo reabsorção de proteínas e outras substâncias.

- Antisinaptopodina (*Santa Cruz Biotechnology, CA, USA*): monoclonal, incubação por 60 minutos em temperatura ambiente (1:1500). A sinaptopodina está presente no podócito e é uma das substâncias responsáveis pela arquitetura da fenda podocitária.

Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados por 30 minutos em temperatura ambiente com anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina (IgG) produzido em cabra (1:400) (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*) para cubulina e para sinpatopodina. O produto de reação foi detectado usando um complexo de avidina-biotina-peroxidase (*Vector Laboratories, Burlingame, USA*) e a cor foi revelada com DAB [3,3'-diaminobenzidina (*Sigma Chemical Company, St Louis, USA*)] e cloreto de níquel, na presença de peróxido de hidrogênio. A contra-coloração foi realizada com *methylgreen*. O material foi desidratado e montado em nova lâmina. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pela diluição dos anticorpos primários e secundários em uma solução de PBS contendo BSA 1% [*Bovineserumalbumin (Sigma Chemical Company, St Louis, USA)*].

A reação para cubulina foi avaliada pela contagem do número de túbulos com bordadura em escova marcada com cubulina no córtex renal. Foram avaliados todos os campos de córtex renal de cada biópsia, contabilizando os túbulos proximais que tiveram marcação em bordadura em escova, dividido pelo número total de túbulos proximais da amostra, e esta razão foi dividida pelo número total de campos corticais.

$\text{Reação para cubulina} = \frac{\text{número de túbulos proximais marcados}}{\text{número total de túbulos proximais}} \div \frac{\text{número de campos corticais}}{\text{número total de campos corticais}}$

Quadro 5. Fórmula de quantificação de reação para cubulina por Imunohistoquímica.

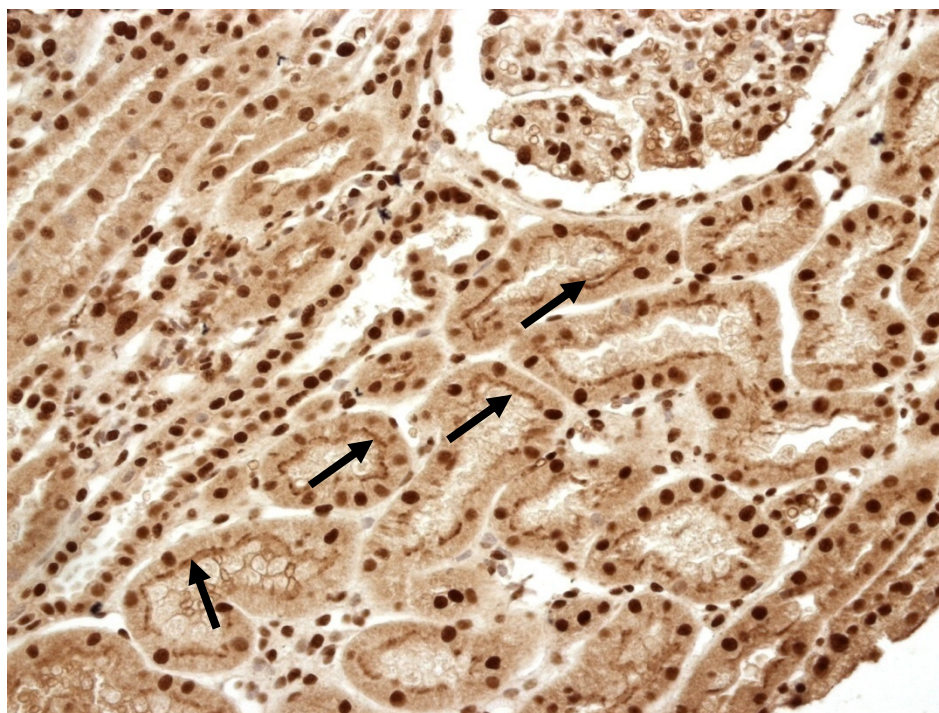


Figura 03: Marcação positiva da bordadura em escova de túbulos proximais com soro anti-cubulina (setas) (x630).

A marcação para sinaptopodina ocorre em alças capilares glomerulares. A marcação foi estratificada em 4 graus de intensidade, sendo o grau 1 o de menor intensidade (menos de 25%), evidenciando pouca reação com o anticorpo e assim maior comprometimento da fenda podocitária, e grau 4 evidencia marcação de alta intensidade (marcação com mais de 75%), justificada pela maior quantidade de sinaptopodina e integridade da fenda podocitária. Os graus 2 (25-50%) e 3 (51-75%) são marcações intermediárias a este anticorpo, como apresentado na figura 4.

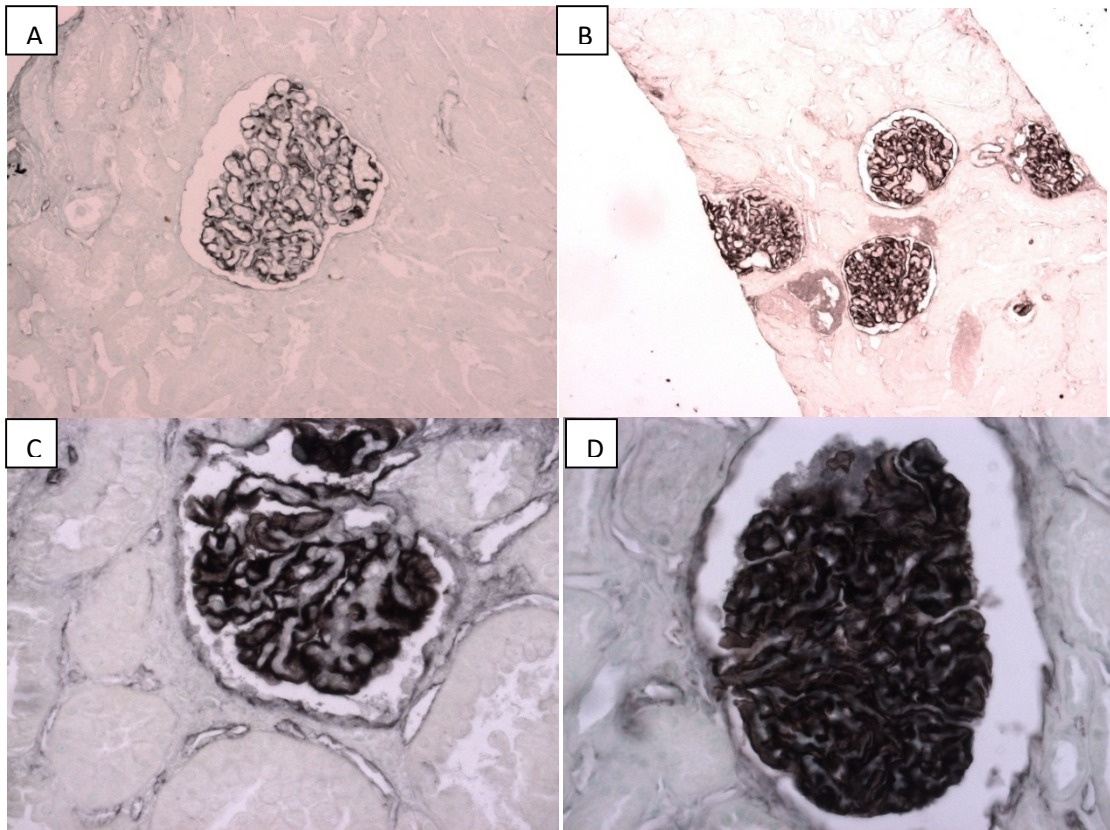


Figura 4: Marcação glomerular com soro anti-sinaptopodina de acordo com a intensidade: Grau 1 evidenciado em A (400x); Grau 2 em B (400x); Grau 3 em C (630x); e Grau 4 em D (630x).

Para avaliar a marcação para sinaptopodina, utilizamos a soma do grau de marcação de cada glomérulo dividido pela quantidade de glomérulos na amostra de cada paciente.

Reação para sinaptopodina = somatória das intensidades de marcação glomerular para anticorpo anti-sinaptopodina / número de glomérulos da amostra

Quadro 6. Fórmula de quantificação de reação para sinaptopodina por Imunohistoquímica.

1.6. Análise estatística

Para análise estatística foi elaborado uma planilha eletrônica (*Microsoft Excel*) e a análise de dados foi realizada no programa *GraphPadPrism* versão 6.0 para Windows (*GraphPad Software, La Jolla, USA*). Para análise de grupos independentes com distribuição paramétrica e não paramétrica foram utilizados testes *t student* ou de Mann-Whitney, respectivamente. A análise entre múltiplos grupos independentes com amostras não paramétricas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (comparação de lipidúria entre as diferentes síndromes clínicas e entre as diferentes glomerulopatias). Para o estudo das correlações entre lipidúria e proteinúria, eTFG, escore de vacuolização tubular, escore de gordura cortical, e escore de fibrose intersticial, foi utilizado o teste não paramétrico de Spearman. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. Resultados

- Características clínicas e demográficas dos pacientes

Dentro do cronograma do projeto, 158 pacientes foram atendidos no ambulatório de glomerulopatias. Cento e vinte e cinco pacientes foram excluídos por não apresentarem proteinúria sendo, portanto selecionados 33 pacientes inicialmente para o estudo. Vinte quatro pacientes foram incluídos no estudo (quatro excluídos por não coletarem volume suficiente de urina para análise, 2 por ausência de material histológico, 2 não coletaram urina de 24 horas e 1 por ausência de proteinúria no momento da avaliação).

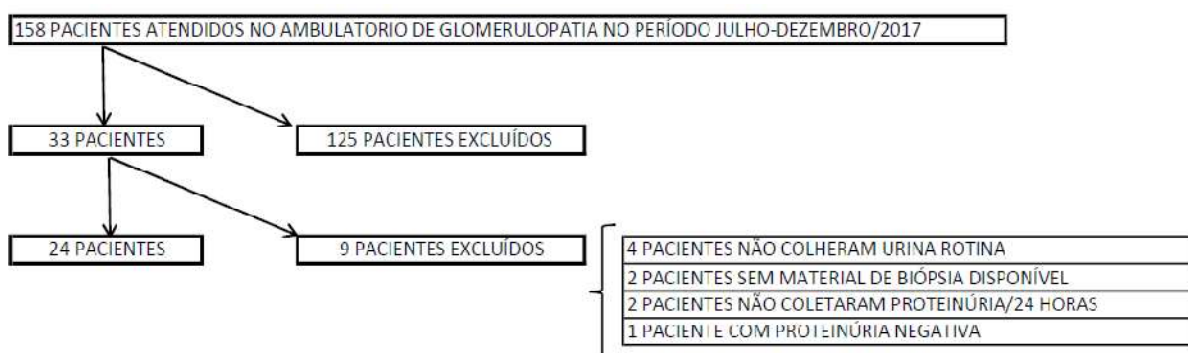


Figura 05: Fluxograma de inclusão e exclusão dos pacientes.

Os pacientes selecionados foram divididos em dois grupos: não nefróticos (proteinúria menor que 3500mg/24 horas), com 11 pacientes, e o grupo nefróticos (proteinúria maior ou igual a 3500mg/24 horas), com 13 pacientes.

No grupo não nefróticos a média de idade foi de 39 anos (24-65 anos), sendo 5 (45%) pacientes homens, e à análise laboratorial apresentava média de proteinúria de 24 horas de 1467mg (200-3200mg/24 hs), creatinina sérica de 1,78 mg/dL (0,6 – 3,18mg/dL) e albumina sérica de 3,97 (2,6-4,63 mg/dL). No grupo nefróticos, a idade média foi de 39 anos (13-60 anos), 8 (53%) pacientes masculinos e análise laboratorial com média de proteinúria de 24 horas de 5838mg (3635-8758 mg/24hs), creatinina sérica de 1,64 (0,58-6,1mg/dL) e albumina sérica de 3,01 (1,59-4mg/dL). As diferenças estatísticas dessas variáveis se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes com proteinúria não nefrótica e proteinúria nefrótica

Variáveis	Não nefróticos (n11)	Nefróticos (n13)	Valor de p
Idade (anos)	39.45 ± 11.45	39.08 ± 16.9	
Sexo (masculino),%	5 (45%)	7 (53%)	0.9490
Proteinúria (mg/24 horas)	1467 (200-3200)	5838 (3635-8758)	< 0.0001
Creatinina (mg/dL)	1,78 (0,6-3,18)	1,64 (0,58-6,1)	n.s.
TFG CKD-EPI (ml/min/1,73m ²)	52 (17-111)	79 (9-118)	n.s.
Albumina (mg/dL)	3,97 (2,6-4,63)	3,01 (1,59-4)	< 0.005
Colesterol total (mg/dL)	207 (98-296)	259 (151-434)	n.s.
Triglicerídeos (mg/dL)	267 (135-537)	173 (52-504)	n.s.
HDL-C (mg/dL)	41 (14-68)	52 (33-80)	0.0961
LDL-C (mg/dL)	113 (47-158)	168 (89-321)	0.0574

TFG CKD-EPI: taxa de filtração glomerular por *ChronicKidneyDiseaseEpidemiologyCollaboration*; HDL-C: *high densitylipoprotein cholesterol*; LDL-C: *lowdensitylipoprotein cholesterol*; n.s.: não significativo.

- Diagnósticos histológicos e avaliação de fibrose intersticial

Os diagnósticos histológicos por biópsia renal no grupo de pacientes com síndrome nefrótica foram de 4 casos de Nefrite Lúpica (NL), 3 casos de

glomerulopatia membranosa (GM), 2 casos de GESF (glomeruloesclerose focal segmentar), 2 casos de Glomerulonefrite crônica, um caso de Lesões Mínimas e outro de Amiloidose. No grupo não nefróticos, seis pacientes apresentaram o diagnóstico de GESF, três casos de NL e dois de Nefropatia por Imunoglobulina A (IgA).

- Quantificação de partículas lipídicas e gordura total urinária (GTU):

A contagem de partículas lipídicas e a quantificação de massa de gordura ajustada para a creatinina urinária estão apresentadas na Tabela 2. A quantidade de partículas lipídicas pela câmara de Neubauer no grupo não nefróticos, em comparação aos pacientes nefróticos, apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) quando avaliado a mediana (1º e 3º quartis). Já a avaliação do índice de gordura total urinária (GTU) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nefróticos e não nefróticos ($p 0.33$).

Tabela 2 Contagem de partículas lipídicas e do índice de concentração de gordura total urinária (GTU) em pacientes com proteinúria não nefrótica e proteinúria nefrótica.

	Não nefróticos	Nefróticos	p
Partículas lipídicas (partículas/mL)	400 (250; 850)	3500 (1763; 21550)	< 0.005
Índice GTU (g/mL / g/mL)	19.68 (10.52; 45.70)	14.29 (8.86; 38.20)	n.s.

GTU= gordura total urinária; n.s.= não significativo

A avaliação da correlação entre as contagens de partículas lipídicas urinárias e das medidas bioquímicas (proteinúria, dosagens séricas de creatinina, albumina, colesterol total, HDL, LDL e triglicérides) e a taxa de filtração glomerular estimada estão apresentadas na Tabela 3 e na Figura 6.

Tabela 3: A avaliação da correlação entre as contagens de partículas lipídicas urinárias e das dosagens de gordura urinária versus as dosagens bioquímicas dos pacientes com proteinúrianefrótica e não nefrótica

Variável	Partículas lipídicas	RLCu
Proteinúria (mg/24h) vs	<i>r</i> : 0,5202; <i>p</i> : 0,0092	<i>r</i> : - 0,1017; <i>p</i> : 0,6362
Creatinina sérica vs	<i>r</i> : - 0,2875; <i>p</i> : 0,1731	<i>r</i> : 0,2861; <i>p</i> : 0,1753
Filtração glomerular vs	<i>r</i> : 0,3497; <i>p</i> : 0,0939	<i>r</i> : - 0,3411; <i>p</i> : 0,1029
Albumina sérica vs	<i>r</i> : - 0,4554; <i>p</i> : 0,0253	<i>r</i> : 0,1487; <i>p</i> : 0,4880
Colesterol total vs	<i>r</i> : 0,1667; <i>p</i> : 0,4363	<i>r</i> : 0,1962; <i>p</i> : 0,3582
HDL-colesterol vs	<i>r</i> : 0,2585; <i>p</i> : 0,2225	<i>r</i> : 0,1009; <i>p</i> : 0,6389
LDL-colesterol vs	<i>r</i> : 0,2075; <i>p</i> : 0,3800	<i>r</i> : 0,2797; <i>p</i> : 0,2323
Triglicérides vs	<i>r</i> : - 0,06046; <i>p</i> : 0,7790	<i>r</i> : - 0,02609; <i>p</i> : 0,9037

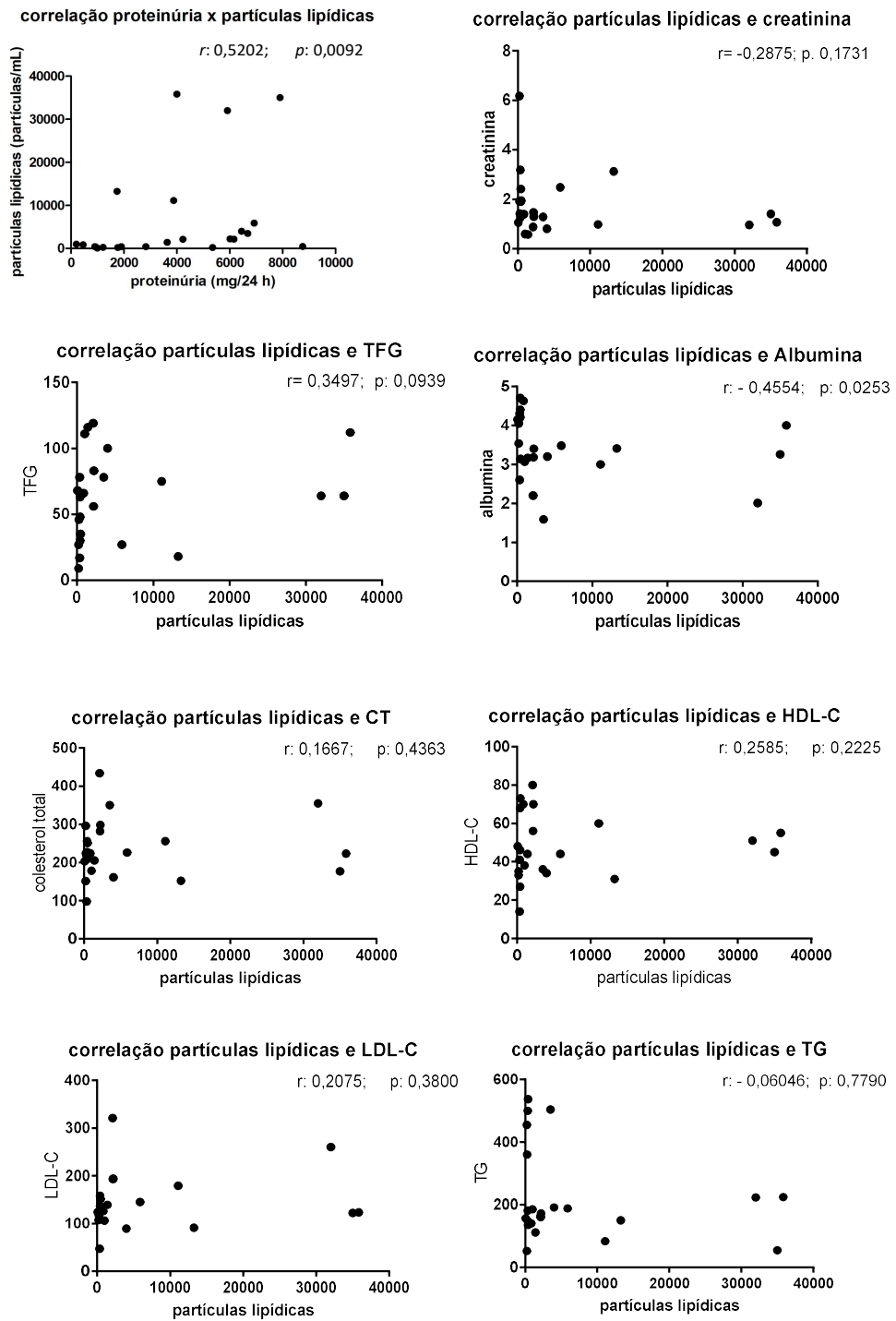


Figura 6: Gráficos apresentam a correlação entre as contagens de partículas lipídicas urinárias versus as dosagens bioquímicas dos pacientes com proteinúria nefrótica e não nefrótica.

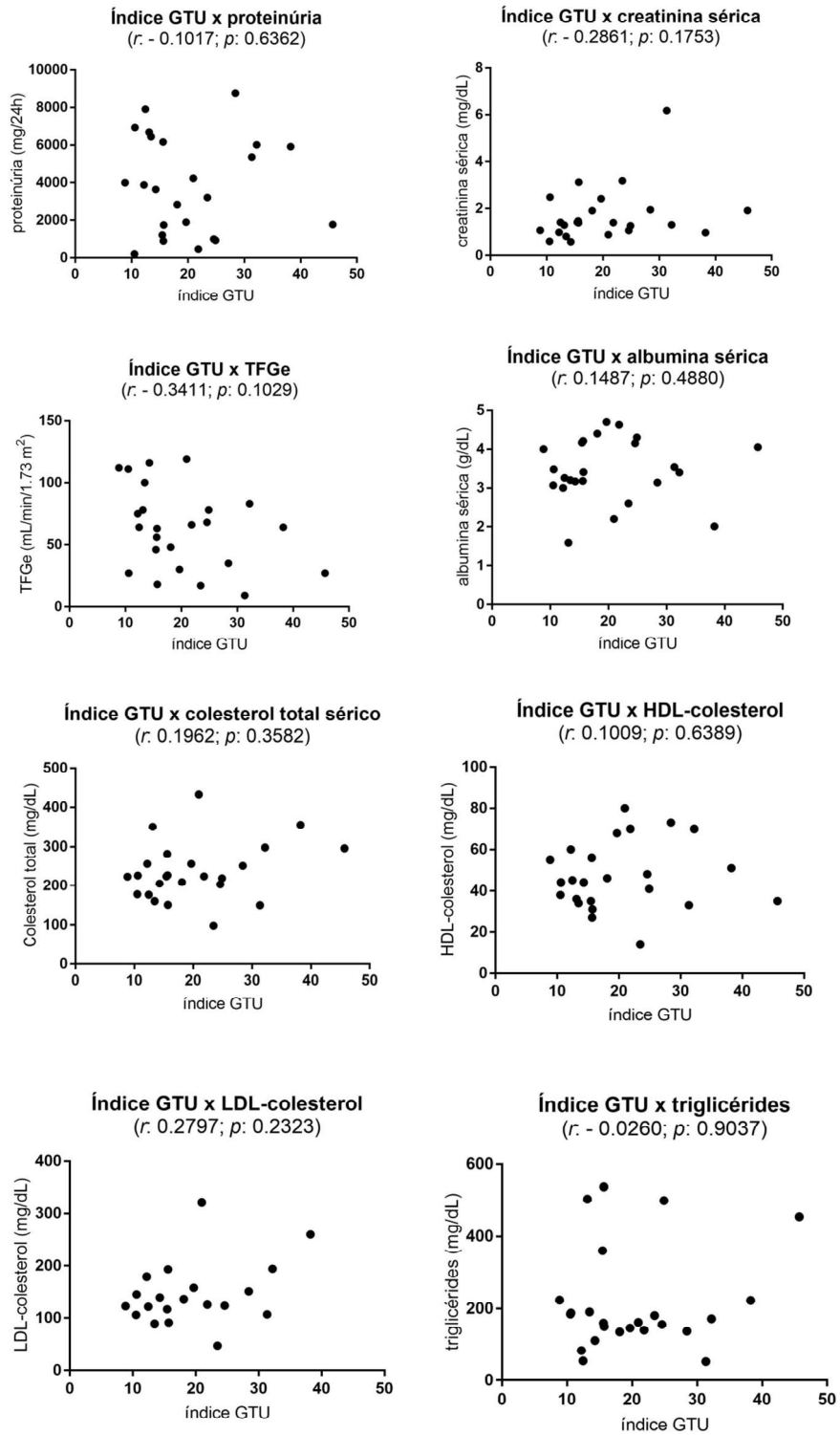


Figura 7: Gráficos apresentam a correlação entre gordura total urinária (GTU) versus as dosagens bioquímicas dos pacientes com proteinúrianefrótica e não nefrótica.

Em relação à presença de fibrose intersticial e atrofia tubular, assim como a análise da expressão glomerular de sinaptopodina e tubular de cubulina, entre os paciente nefróticos e não nefróticos, não houve diferença estatisticamente significativa (tabela 4).

Tabela 4. Avaliação da fibrose intersticial e atrofia tubular, da expressão de sinaptopodina glomerular e de cubulina em túbulo proximal nos grupos de pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.

Variável	Não nefrótico (n = 11)	Nefrótico (n = 13)	p
Sinaptopodina (escore)	3.145 (2.928; 3.533)	3.465 (2.415; 3.905)	n.s.
Cubulina(escore)	20.66 (12.84; 25.1)	23.55 (17.1; 33.38)	n.s.
Fibrose intersticial (escore)	3 (2; 4)	2 (1; 3)	n.s.

A avaliação da correlação entre os marcadores de lesão renal (fibrose intersticial atrofia tubular) com expressão glomerular de sinaptopodina e de cubulina em túbulo proximal versus a contagem de partículas lipídicas urinárias e a concentração de gordura urinária dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica estão apresentadas naTabela 5 e Figuras8 e 9. Não houve correlação estatisticamente significativa entre cada variável avaliada no tecido renal, fibrose intersticial, sinaptopodina e cubulina versus partículas lipídicas e a dosagem da gordura total urinária.

Tabela 5. Correlação entre a expressão glomerular de sinaptopodina, a expressão de cubulina em túbulo proximal e presença de fibrose intersticial atrofia tubular versus a contagem de partículas lipídicas urinárias e a gordura total urinária (GTU) dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.

Variável	Partículas lipídicas	GTU (gordura total urinária)
Sinaptopodina renal vs	$r: 0,2804; p: 0,2063$	$r: - 0,2882; p: 0,1933$
Cubulina renal vs	$r: - 0,1929; p: 0,4021$	$r: 0,313; p: 0,1671$
Fibrose intersticial vs	$r: -0,002831; p: 0,9898$	$r: 0,1256; p: 0,5681$

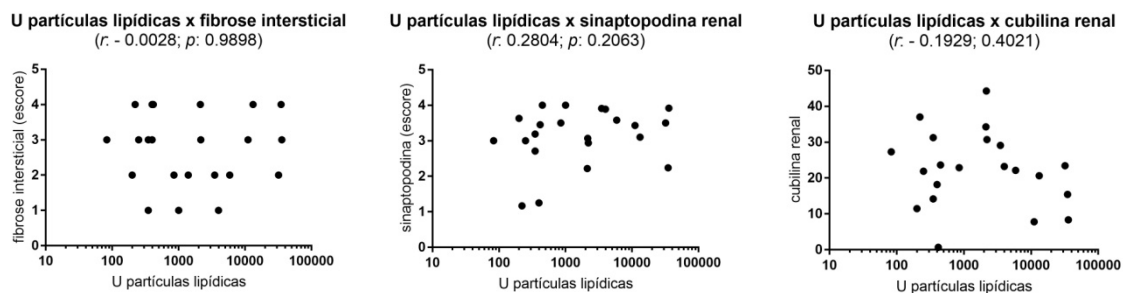


Figura 8: Gráficos de correlações entre a contagem de partículas lipídicas urinárias versus escores de fibrose intersticial, da expressão glomerular de sinaptopodina e da expressão de cubulina em túbulo proximal dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.

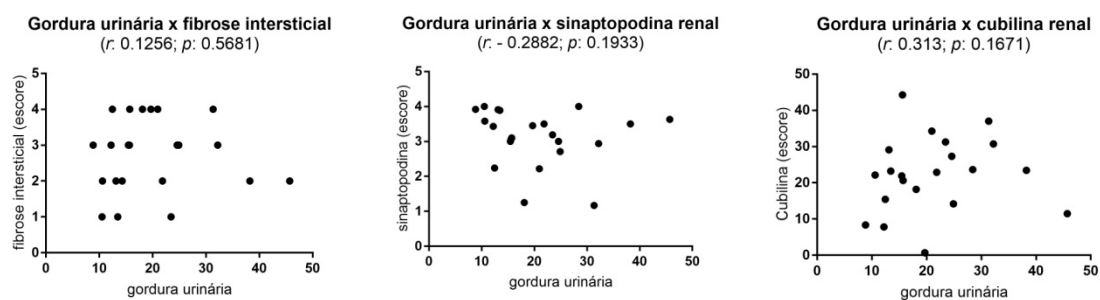


Figura 9: Gráficos mostram as correlações entre a concentração de gordura total urinária (GTU) *versus* escores de fibrose intersticial, da expressão glomerular de sinaptopodina e da expressão de cubulina em túbulo proximal dos pacientes com síndrome nefrótica e proteinúria não nefrótica.

6.Discussão

No presente estudo, consideradas as duas medidas de gordura urinária, apenas a contagem das partículas lipídicas, identificadas como a cruz de Malta em microscópio com luz polarizada, mostrou associação com a intensidade da proteinúria e com a albumina sérica. Estes resultados confirmam uma das hipóteses desta investigação. No entanto, a medida da concentração total de gordura urinária não teve associação com essas variáveis. Esta interpretação deriva dos seguintes achados: 1) a proteinúria e a albumina sérica mostraram correlação estatisticamente significativa apenas com a contagem das partículas lipídicas, mas não com a concentração de gordura urinária; 2) não houve associação entre a contagem das partículas lipídicas com o índice GTU; 3) houve tendência de correlação estatisticamente significativa apenas entre a taxa de filtração glomerular com a contagem das partículas lipídicas urinárias, mas não com o índice GTU, que reflete toda a gordura excretada na urina. Estes resultados reforçam a idéia de que a lipidúria associada à síndrome nefrótica corresponde a uma fração dos lípidos presentes na urina, mas não com a gordura total da urina. Em outras palavras, a lipidúria das glomerulopatias proteinúricas identificada como cruz de Malta em microscópio de luz polarizada não tem o mesmo significado da gordura total urinária. A identificação dos componentes da gordura urinária não foi realizada no presente estudo porque o que de fato é reconhecido na prática clínica como lipidúria são as partículas lipídicas e, portanto, o alvo desta investigação.

Os corpos anisotrópicos e birrefringentes com a aparência de Cruz de Malta pela microscopia com luz polarizada foram descritos por Zimmer et al. em 1961, sendo os ésteres de colesterol um dos principais componentes (Zimmer, Dewey et al. 1961). Alguns anos após, Klahr, Tripathy et al (1967)

demonstraram que houve maior excreção urinária de lípidos apenas na síndrome nefrótica, mas não nos pacientes com doença renal crônica não glomerulares ou com hiperlipidemia de diferentes etiologias. A concentração urinária de colesterol teve correlação estatisticamente significativa com a “permeabilidade glomerular”, sendo que esta foi calculada pelo clearance fracional de albumina. Além disso, estes autores também demonstraram que estes lípidos tem como componentes o colesterol livre, ésteres de colesterol, triglicérides, ácidos graxos livres e fosfolípidos (Klahr, Tripathy et al. 1967). A separação destes lípidos urinários por cromatografia identificou os ésteres de colesterol como sendo constituído pelos seguintes componentes: palmitato, oleato, linoleato e araquidonato. Já os fosfolípidos continham fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. Finalmente, estes autores deram suporte à hipótese de que os lípidos que ganham acesso ao espaço de Bowman por filtração glomerular são lipoproteínas (Klahr, Tripathy et al. 1967). Além disso, este estudo também mostrou que em quatro pacientes com síndrome nefrótica com remissão com córtico-terapia apresentaram redução importante da concentração do colesterol urinário.

Em 1990, também foi demonstrada correlação estatisticamente significativa entre a lipidúria e a proteinúria (Joven, Villabona et al. 1990). Estes autores sugeriram que na síndrome nefrótica os lípidos alcançam o espaço urinário pela maior permeabilidade do capilar glomerular à filtração de macromoléculas. Eles verificaram que a lipidúria, presente em todos os pacientes nefróticos estudados, tinha como componentes o colesterol, os triglicérides e os fosfolípidos. Neste estudo foi considerado que a lipidúria seria resultado da excreção de HDL-colesterol. Já a *apoprotein-A-I*, que seria o

suposto maior componente da lipidúria, não mostrou reatividade apesar de ter sido identificada banda com peso molecular aproximado de 27.000 Daltons pela eletroforese, sugestiva de se tratar de uma apoproteína-A-I-like (Joven, Villabona et al. 1990).

Outra hipótese do nosso estudo era que a lipidúria teria associação com a lesão túbulo-intersticial, avaliada através da intensidade dos marcadores fibrose intersticial e expressão de cubulina em túbulo proximal nas biópsias renais. No entanto, esta hipótese não se confirmou. A sugestão de que lípidos poderiam ser nefrotóxicos passou a ganhar corpo há cerca de 40 anos. Em 1982, Moorhead et al, usaram o termo “nefroxicidade lipídica” e discutiram o potencial nefrotóxico dos lípidos nas doenças glomerulares crônicas e sua participação na doença túbulo-intersticial que acompanha estas glomerulopatias (Moorhead, Chan et al. 1982). Nesta discussão os autores propuseram mecanismos patogênicos tanto associados à hiperlipidemia quanto à toxicidade tubular das proteínas filtradas.

A progressão da doença renal crônica é provavelmente multifatorial e a associação da proteinúria com a lesão túbulo-intersticial está bem estabelecida há muitos anos. Os principais mecanismos envolvidos com a lesão túbulo-intersticial decorrentes da proteinúria foram discutidos em revisões publicadas anteriormente (Eddy 2004, Erkan 2013). No caso das glomerulopatias proteinúricas crônicas, a proteinúria, a atrofia tubular e a fibrose intersticial são importantes fatores de risco independente que acelera a perda da função renal (Risdon, Sloper et al. 1968, Schainuck, Striker et al. 1970, Peterson, Adler et al. 1995, Bohle, Muller et al. 1996, de Zeeuw, Remuzzi et al. 2004). Duas teorias são consideradas para esclarecer o mecanismo patogênico predominante para

a geração da fibrose intersticial: a hipótese glomerular e a hipótese tubular (Christensen and Verroust 2008). A hipótese glomerular se baseia na suposição de que crescentes celulares e sinéquias do tufo capilar glomerular com a cápsula de Bowman permitem a passagem direta do ultrafiltrado para o interstício e para a junção glomerular-tubular com inflamação tubular e fibrose intersticial. Já pela hipótese tubular, o ultrafiltrado contendo grande concentração de proteínas filtradas e outras substâncias potencialmente nefrotóxicas alcançaria a luz tubular causando apoptose ou necrose à célula epitelial tubular e inflamação e fibrose intersticial.

Apesar do efeito da proteinúria na progressão das nefropatias ser bem conhecido e estabelecido, ainda não está claro se a albumina isoladamente é o principal agente da proteinúria ou se outras substâncias também filtradas poderiam exercer ou potencializar esta ação. Alguns trabalhos têm relacionados a filtração de ácidos graxos ligados à albumina filtrada com a toxicidade da proteinúria. Um primeiro estudo realizado *in vivo* avaliou em camundongos os efeitos renais da injeção intraperitoneal de albumina sérica bovina (ASB) ligada ou não a ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) após 7 e 14 dias. Os resultados mostraram que, apesar de alterações renais de menor intensidade terem ocorrido nos animais tratados a ASB depletada de AGCL, os camundongos que receberam a ASB ligada a AGCL apresentaram maiores intensidades de albuminúria, de dilatação tubular proximal, de formação de cilindros hialinos tubulares e de infiltração de macrófagos (Kamijo, Kimura et al. 2002). No entanto, a quantidade de ASB reabsorvida pelos túbulos proximais foi semelhante em ambos os grupos de animais. Estes resultados são

sugestivos de que os AGCL ligados à ASB possuem maior toxicidade ao túbulo proximal do que a albumina *per se*.

A participação dos lípidos intratubulares como agentes nefrotóxicos das nefropatias proteinúricas vem sendo reforçada por outros estudos. Uma investigação "*in vitro*" realizou culturas de células epiteliais de túbulo proximal humanas (CTP) com albumina sérica humana recombinante (rASH) pura ou com rASH ligada a diferentes componentes lipídicos (palmitato, estearato, oleato e linoleato). Foi verificado que a rASH teve efeito mitogênico sobre as CTP. No entanto, apenas a rASH ligada ao componente oleato foi capaz de induzir secreção de fibronectina, um componente de matriz extracelular que está presente na fibrose renal (Arici, Brown et al. 2002). Este efeito foi mediado pela ativação de proteína quinase C, um marcador de transdução de sinal. Este mesmo grupo de pesquisadores também mostrou em outro estudo "*in vitro*" que células epiteliais proximais humanas expostas à albumina ligada a ácidos graxos desenvolvem apoptose (Arici, Chana et al. 2003). Estas células também apresentavam hiperexpressão de *peroxomeproliferator-activated receptor-γ* (PPAR γ), que foi considerado como um provável mediador de apoptose neste estudo.

Mais recentemente Khan et al (2014) investigaram a hipótese de que o acúmulo do metabólito acyl-coenzima A de cadeia longa (LC-CoA) estimula a apoptose causada por lípidos por competir com o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato [PI(4,5)P2], com o qual é estruturalmente similar, para ligação com o trocador Na⁺/H⁺ NHE1. Este trocador regula a sobrevivência da célula epitelial do túbulo proximal através da interação com o PI(4,5)P2. Nesse estudo com camundongos db/db geneticamente modificados para desenvolver nefropatia

proteinúrica progressiva, ocorreu apoptose de túbulo proximal dependente de caspase-2 com níveis elevados de ácidos graxos e de LC-CoA. Os autores concluíram que o complexo albumina/lípidos no túbulo proximal aumenta a oferta de lipotoxinas e que o acúmulo de LC-CoA contribui para a atrofia tubular por intensificar a interação do trocador NHE1 com o PI(4,5)P2, interação esta que reduz o limiar apoptótico. Assim, o trocador NHE1 pode agir como um sensor metabólico para a lipotoxicidade(Khan, Abu Jawdeh et al. 2014).

Uma questão que permanece não esclarecida é se a proteinúria seletiva que ocorre na síndrome nefrótica da glomerulopatia de lesões mínimas é menos nefrotóxica em relação às outras glomerulopatias com proteinúria na mesma intensidade. Talvez os pacientes com lesões mínimas raramente progridam para a perda renal porque esta doença tem boa resposta terapêutica aos corticosteroides e, portanto, menor tempo de exposição à toxicidade da proteinúria. Entretanto, Ghiggeriet al (1987) avaliaram em nove pacientes com glomerulopatia de lesões mínimas quatro frações de albumina urinária classificadas pelos seus pontos isoelétricos decrescentes de 5,8 a 4,0. Foi verificado que a fração de albumina menos aniônica era a que apresentava taxa menor de gordura ligada a essa proteína, em paralelo às maiores taxas de ligação de gordura nas frações com albumina mais aniônicas. Além disso, a albumina urinária de crianças com glomerulopatia de lesões mínimas apresentam maiores concentrações da fração de isoalbumina com baixas taxas de ligação a ácidos graxos. Sendo assim, este efeito poderia explicar, ao menos parcialmente, o menor potencial nefrotóxico da proteinúria na glomerulopatia de lesões mínimas (Ghiggeri, Ginevri et al. 1987).

A hipótese do presente estudo se encaixaria na teoria da lesão por mecanismo tubular porque foi considerado que as concentrações das partículas lipídicas urinárias teriam correlação positiva com a intensidade dos marcadores da lesão túbulo-intersticial. Consideramos que estas correlações não ocorreram no presente estudo devido ao tamanho insuficiente da amostra estudada e pela heterogeneidade das glomerulopatias.

Hiperlipidemia é achado freqüente na síndrome nefrótica e níveis muito elevados não são incomuns nos pacientes com esta enfermidade (Joven, Villabona et al. 1990, Wheeler and Bernard 1994, Vaziri 2016, Agrawal, Zaritsky et al. 2018). Em 1982, Moorhead et al. apresentaram sua hipótese de nefrotoxicidade lipídica, consideraram também ação nefrotóxica da hiperlipidemia, além da lipidúria. Posteriormente outras revisões discutiram estes mecanismos em profundidade (Weinberg 2006, Ruan, Varghese et al. 2009, Vaziri 2016, Agrawal, Zaritsky et al. 2018).

Assim, seria esperada alguma associação entre a contagem das partículas lipídicas com concentrações sanguíneas de lípidos. No entanto, no presente estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações séricas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e de triglicérides entre os grupos de pacientes nefróticos e não nefróticos. Houve apenas tendência de maiores concentrações de HDL-colesterol e de LDL-colesterol sem atingir diferença estatística. Estes resultados poderiam ter influenciado a ausência de correlação estatisticamente significativa entre as concentrações destes lípidos séricos com a contagem das partículas lipídicas urinárias e com a concentração de gordura total urinária. No entanto, esta correlação também não foi verificada no estudo de Klahr e cols (Klahr, Tripathy

et al. 1967). Estas ausências de correlações podem ser devido à composição das partículas lipídicas urinárias que não são discriminadas nas dosagens séricas (Klahr, Tripathy et al. 1967). Outro estudo também não encontrou associação estatisticamente significativa entre albumina urinária ligada a ácidos graxos e esta fração da gordura sanguínea em pacientes com glomerulopatia de lesões mínimas (Ghiggeri, Ginevri et al. 1987).

Este estudo tem como pontos fortes a investigação de mecanismo nefrotóxico pouco explorado até o momento. São poucos os estudos neste campo e, em pacientes, são raros, como é o caso do presente estudo. Quantificação da lipidúria não é rotina na imensa maioria dos laboratórios em todo o mundo. A avaliação da lipidúria com a intensidade da expressão de cubulina em túbulo proximal é uma abordagem original. Cubulina está expressa normalmente apenas na bordadura em escova do túbulo proximal e a redução deste marcador poderia ser um sinal precoce da lesão deste segmento do néfron, pois seria a primeira estrutura a ter contato com os lípidos filtrados.

Como pontos fracos, consideramos que este estudo teve amostra com pequeno número de casos e não foi calculado o tamanho amostral. Outro ponto fraco é a heterogeneidade das glomerulopatias e dos estágios de função renal. Apesar de essa pesquisa ter sido realizada em hospital de referência para diagnóstico e tratamento de glomerulopatias, este grupo de doença não é frequente e, portanto, dificulta obter número expressivo de casos.

Em resumo, esta investigação avaliou a gordura urinária de pacientes com síndrome nefrótica através de dois métodos: a quantificação de partículas lipídicas e a dosagem de gordura urinária total. Não houve correlação estatisticamente significativa entre estas duas medidas. Todavia, apenas a

quantificação de partículas mostrou correlação estatisticamente significativa com a proteinúria e com a albumina plasmática. Entretanto, nenhuma das duas medidas de gordura urinária teve correlação com a função renal (creatinina sérica e taxa de filtração glomerular estimada), nem com a fibrose intersticial, com a expressão tubular de cubulina e com a expressão glomerular de sinaptopodina. Também não houve correlação com as medidas séricas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides. A hipótese de que a quantificação de partículas lipídicas teria associação com pior prognóstico da doença renal crônica não foi confirmada.

7. Conclusão

Este estudo permite concluir que a avaliação da lipidúria de pacientes com síndrome nefrótica pode ser feita pela quantificação urinária das partículas lipídicas, mas não pela dosagem da gordura total urinária. A quantificação das partículas lipídicas tem associação com a intensidade da proteinúria e da albuminemia, entretanto, este estudo não comprovou a hipótese de que as partículas lipídicas teriam participação na patogênese da progressão da doença renal crônica em pacientes com síndrome nefrótica, mas limitações metodológicas podem ter interferido nestes resultados.

8. Referências Bibliográficas

AGRAWAL, S.; ZARITSKY, J.J.; FORNONI, A. et al. Dyslipidemia in nephritic syndrome: mechanisms and treatment. **Nat Rev Nephrol**, v.14(1):57-70, 2018.

ALSHARHAN, L.; BECK JT, H. Membranous Nephropathy: Core Curriculum. **Am J Kidney Dis**, 77(3):440-453, 2021.

ARICI, M.; BROWN, J.; WILLIAMS, M. et al. Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase C. **Nephrol Dial Transpl**, 17(10):1751-57, 2002.

ARICI, M.; CHANNA, R.; LEWINGTON, A. et al. Stimulation of proximal tubular cell apoptosis by albumin-bound fatty acids mediated by peroxisome proliferator activated receptor- γ . **JASN** 14(1):17-27, 2003.

ASHLEY JEFFERSON, J.; NELSON, P.J.; NAJAFIAN, B. et al. Podocyte disorders: Core curriculum. **Am J Kidney Dis**, 58(4):666-667, 2011.

BATISTATOU, A.; KAMINA, S. et al. Analogies in medicine: the rare paradigm of the Maltese (white) cross. **Intern Med J**, 36(9): 620-1, 2006.

BENZING, T.; SALANT, D. Insights into glomerular filtration and albuminuria. **N Engl J Med**, 384:1437-1446, 2021.

BLACKBURN, V.; GRIGNANI, S. et al. Lipiduria as seen by transmission electron microscopy. **Nephrol Dial Transplant**, 13(10): 2682-4, 1998.

BLIGH, E.G.; DYER, W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**. Aug;37(8):911-7, 1959.

BLOMSTRAND, R.; THORN, N.A. et al. The absorption of fats, studied in a patient with chyluria. I. **Clinical investigation Am J Med**, 24(6): 958-66, 1958.

BOHLE, A.; MULLER, G.A.; WEHRMANN, M. et al. Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathy, renal vasculopathies, and chronic interstitial nephritides. **Kidney Int**, 54, S2-S9, 1996.

- CHENG,J.T.; MOHAN,S. et.al. Chyluria presenting as milky urine and nephrotic-range proteinuria.**Kidney Int**70(8): 1518-22,2006.
- CHENGG,H.; HARRIS, R.C. The glomerulus- a view from the outside-the podocyte.**The Int J Bioch e Cell Biol**, 42(9):1380-1387,2010.
- CHRISTENSEN,E.I.;VERROUST,P.J. Interstitial fibrosis: tubular hypothesis versus glomerular hypothesis. **Kidney Int**, 74(10):1233-6,2008.
- CREW, R. J.;RADHAKRISHNAN,J. et al. Complications of the nephrotic syndrome and their treatment. **ClinNephrol**,62(4):245-59,2004.
- DE ZEEUW,D.;REMUZZI,G.;PARVING,H. et al. Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy:lessons from RENAAL. **Kidney Int**, 65(6):2309-20,2004.
- DIAMOND,E.; SCHAPIRA,H.E. Chyluria--a review of the literature.**Urology**26(5): 427-31, 1985.
- DUNCAN,K.A.; CUPPAGE,F.E.et.al. Urinary lipid bodies in polycystic kidney disease.**Am J Kidney Dis**,5(1): 49-53, 1985.
- ERKAN ,E. Proteinuria and progression of glomerular diseases .**Pediatric Nephrol**, 28:1049-1058, 2013.
- EXLEY,C.; HOUSE,E. et al. Spherulites of amyloid-beta42 in vitro and in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**,20(4): 1159-65, 2010.
- GHIGGERI,G.M.; GINEVRI,F.;CANDIANO,G. et.al. Characterization of cationic albumin in minimal change nephropathy.**Kid Intern**,32(4):547-553,1987.
- GRABER, M.; LANE, B. et.al. Bubble cells: renal tubular cells in the urinary sediment with characteristics of viability. **J Am SocNephrol**, 1(7): 999-1004, 1991.
- GRAZIANI, G.; CUCCHIARI,D. et.al.Chyluria associated with nephrotic-range proteinuria: pathophysiology, clinical picture and therapeutic options. **Nephron ClinPract**119(3): c248-53; discussion c254, 2011.

HABER, M.H.; LINDNER, L.E. The surface ultrastructure of urinary casts. **Am J Clin Pathol**, 68(5): 547-52, 1977.

HUDSON, J.B.; DENNIS JR, A.J. et al. Urinary lipid and the Maltese cross. **N Engl J Med**, 299(11): 586, 1978.

JOVEN, J.; VILLABONA, C.; VILELLA, E. et al. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patients with the nephrotic syndrome. **N Engl J Med**, 323:579-584, 1990.

KAMIJO, A.; KIMURA, K.; SUGAYA, T. et al. Urinary free fatty acids bound to albumin aggravate tubulointerstitial damage. **Kidney Int**, 62(5):1628-37, 2002.

KHAN, S.; BASSM, G.A.J.; GOEL, M. et al. Lipotoxic disruption of NHE1 interaction with PI(4,5)P2 expedites proximal tubule apoptosis. **J Clin Invest**, 124(3):1057-68, 2014.

KLAHR, S.; TRIPATHY, K. ET al. Qualitative and quantitative analysis of urinary lipids in the syndrome nephrotic. **J Clin Invest**, 46(9):1475-1481, 1967.

LAI, K.N.; SIU, D. et al. The clinical significance of proteinuria in patients with nonparasitic chyluria. **Am J Kidney Dis**, 7(5): 381-5, 1986.

LENNON, R.; RANGLES, M.J.; HUMPHRIES, M.J. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 5:160, 2014.

LEVEY, A.S.; BOSCH, J.P. et al. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. **Ann Intern Med**, 130(6): 461-70, 1999.

LEVEY, A.S.; STEVENS, L.A.; SCHMID, C.H. et al. A new Equation to estimate glomerular filtration rate. **Ann Intern Med**, 150(9):604-612, 2009.

LEVY, R.I.; TURNER, D.A. et al. Studies in a patient with chyluria. Relationship of dietary lipid to urinary fat excretion. **Am J Clin Nutr**, 18(1): 20-6, 1966.

MARTIN, R.S.; SMALL, D.M. Physicochemical characterization of the urinary lipid from humans with nephrotic syndrome. **J Lab Clin Med**, 103(5): 798-810, 1984.

MOORHEAD, J.F.; EL-NAHAS, M.; CHAN, M.K. et al. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. **The Lancet**, 320(8311):1309-1311, 1982.

ORTH, S.R.; RITZ, E. The nephrotic syndrome. **NEngl J Med** .338(17): 1202-11, 1998.

PETERSON, J.C.; ADLER, S.; BURKART, J.M. et al. Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The modification of diet in renal disease study. **Ann Int Med**, 123(10):754-62, 1995.

PERTESON, D.R.; HJELLE, J.T. et al. Renal handling of plasma high density lipoprotein. **Kidney Int**, 26(4): 411-21, 1984.

RAVINAL, R.C.; COSTA, R.C. et al. Classes, activity and chronicity indices, and alpha-smooth muscle actin expression as prognostic parameters in lupus nephritis outcome. **Lupus** 11(2): 82-7, 2002.

RENNKE, H.G.; VENKATACHALAM, M.A. Structural determinants of glomerular permselectivity. **Fed Proc**, 36(12):25, 19-26, 1977.

REZENDE, GM. **Lesão podocitária na nefrite lúpica membranosa pura e proliferativa: mecanismos distintos de proteinúria?**. 2014. 74f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

RISDON, R.A.; SLOPER, J.C.; DE WARDENER, H.E. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. **The Lancet**, 292(7564):363-366, 1968.

RUAN, X.Z.; VARGHESE, Z. MOORHEAD, J.F. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis. **Nat Rev Nephrol**, 5(12), 2009.

SCHAINUCK, L.I.; STRIKER, G.E.; CUTLER, R.E.; et al. Structural-functional correlations in renal disease: Part II: the correlations. **Hum Pathol**, 1(4):631-641, 1970.

SCOTT, R.P.; QUAGGIN, S.E. Review series: the cell biology of renal filtration. **J Cell Biol**, 209(2):199-210, 2015.

SKU, K.T.; SATA, T. et al. Apolipoproteins in human biopsied nephrotic kidneys. **IntUrolNephrol** 20(4): 429-38, 1988.

YOKOHAMA, N.; BORK, S. et al. Roles of the Maltose cross form in the development of parasitemia and protection against Babesia microti infection in mice. **Infect Immun** 71(1): 411-7, 2003.

WEENING, J.J.; RONCO, P.; REMUZZI, G. Advances in the pathology of glomerular diseases. **ContribNephrol**, 181:12-21, 2013.

WEINBERG, G.L. In defence of lipid resuscitation. **Anaesthesia**, 61: 807-21, 2006.

WELSH, G.I.; SALEEM, M.A. The podocyte cytoskeleton-key to a functioning glomerulus in health and disease. **Nat Rev Nephrol**, 8(11):14-21, 2011.

WHEELER, C.M., BERNARD, H.U.; CHAN, S.Y. et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. **J Infect Dis**, 170(5):1077-85, 1994.

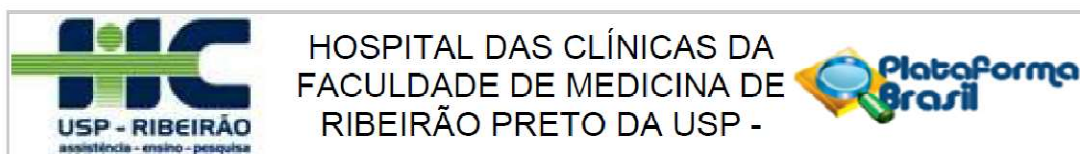
ZATZ, R. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

ZHAO, Y.Y.; CHENG, X.L.; VARIZI, N.D. et al. UPLC-based metabolomic applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. **Clin Biochem**, 47(15):16-26, 2014.

ZIMMER, J.G.; DEWEY, R. et al. The origin and nature of anisotropic urinary lipids in the nephrotic syndrome. **Ann Intern Med**, 54: 205-14, 1961.

9. Anexos

9.1. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da lipidúria, proteinúria e alterações histopatológicas de túbulos corticais renais em pacientes com glomerulopatias

Pesquisador: Lázaro Bruno Borges Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43578715.0.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.117.214

Data da Relatoria: 10/06/2015

Apresentação do Projeto:

Avaliar a associação da lipidúria com a proteinúria e com as alterações histopatológicas em túbulos proximais em biópsias de pacientes com glomerulopatias. Material e métodos: Neste estudo transversal observacional, sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica diagnosticadas por biópsia renal será avaliado em câmara de Neubauer para se determinar a intensidade de lipidúria. Esta medida será comparada com a proteinúria, a concentração urinária de colesterol e triglicérides, e com alterações de células do túbulo proximal, incluindo a coloração com Sudam III para marcação de gordura. A hipótese é que a lipidúria apresentará correlação positiva com estas variáveis. Caso esta hipótese se comprove, novos estudos deverão ser realizados para identificar se a lipidúria atua como fator de risco independente na progressão da doença renal crônica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar as características da lipidúria em pacientes com síndrome nefrótica. **Objetivo Secundário:** Avaliar a associação da lipidúria com a proteinúria e com as alterações histopatológicas em túbulos proximais em biópsias de pacientes com glomerulopatias primárias e secundárias.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 1.117.214

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos são mínimos porque não será realizado nenhum procedimento invasivo diretamente para esta pesquisa. O material de biópsia renal a ser utilizado será aquele disponível no laboratório de Patologia renal previamente obtido para o diagnóstico de glomerulopatia conforme a rotina clínica. A obtenção da urina será realizada de modo espontâneo em frasco limpo e descartável. As dosagens bioquímicas sanguíneas serão obtidas do prontuário do paciente. Os dados serão tratados de modo confidencial e codificados para preservar o sigilo e a confidencialidade dos sujeitos da pesquisa.

Benefícios: Esta pesquisa provavelmente não irá trazer benefícios imediatos para o tratamento da doença. Todavia, caso a hipótese se confirme, efeitos da lipidúria como agente nefrotóxico deverão ser avaliados e tratamentos futuros com drogas hipolipemiantes poderão ser testadas para atenuar a lipidúria e reduzir seu potencial nefrotóxico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sedimento urinário de pacientes com glomerulopatias diagnosticadas por biópsia renal será avaliado em câmara de Neubauer para se determinar a intensidade de lipidúria. Esta medida será comparada com a proteinúria, a concentração urinária de colesterol e triglicérides, e com alterações de células do túbulo proximal, incluindo a coloração com Sudam III para marcação de gordura. Para a medida da lipidúria, proteinúria e excreção urinária de colesterol e de triglicéride, a urina deverá ser obtida por micção espontânea em frasco plástico limpo descartável, dentro do prazo máximo de 72 horas que antecede a realização da biópsia renal. O paciente será orientado a coletar a urina a partir do jato médio, devendo ser desprezado diretamente no vaso sanitário o terço inicial do jato urinário. Esta amostra será enviada imediatamente ao laboratório. Para a avaliação da lipidúria, 10 mL da amostra de urina será centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos em centrífuga convencional, em temperatura ambiente. O sobrenadante será desprezado e o sedimento será ressuscitado no volume residual de 1,0 mL. Com uma ponteira para pipeta de 10 L, uma fração deste sedimento será adicionada, por capilaridade, na superfície de leitura da câmara de Neubauer (1:10 mm³) com a laminula já posicionada. Serão contados separadamente os corpos ovais gordurosos, os cilindros gordurosos, e as gotículas livres em suspensão. Esta contagem será feita em microscópio Zeiss Axioscope (Alemanha), equipado com luz polarizada, com objetiva de 40x e ocular de 10x. A contagem das estruturas correspondentes à lipidúria será feita nos 4 quadrantes dos vértices na câmara de Neubauer e o resultado do número de células/mL será feito pela seguinte equação: N^o de estruturas/mL = [somatória do n^o de estruturas dos 4 quadrantes] x 10.000/4. Para

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.117.214

cada campo analisado pela microscopia de luz comum, será feita análise adicional com a mudança para a luz polarizada. Cada estrutura reconhecida como Cruz de Malta será considerada como a confirmação de lipidúria. Para as comparações da lipidúria com alterações histopatológicas, serão utilizados fragmentos de biópsia renal obtidos para a investigação diagnóstica de glomerulopatias conforme rotina da equipe de Nefrologia. Para isso serão utilizados fragmentos corados por tricrômio de Masson e para microscopia de imunofluorescência (material de congelação). Medida da intensidade de células do túbulo proximal com vacuolização, avaliação da reabsorção de gordura em túbulo proximal e a medida da intensidade de fibrose intersticial e atrofia tubular no córtex renal serão quantificadas por escore. As análises estatísticas serão realizadas para amostras pareadas ou não pareadas e análise de variância (ANOVA). Para análise de grupos independentes com distribuição paramétrica e não paramétrica serão utilizados testes t student ou de Mann-Whitney, respectivamente. A análise entre múltiplos grupos independentes com amostras não paramétricas será feita pelo teste de Kruskal-Wallis (comparação de lipidúria entre as diferentes síndromes clínicas e entre as diferentes glomerulopatias). Para o estudo das correlações entre lipidúria e proteinúria, eTFG, escore de vacuolização tubular, escore de gordura cortical, e escore de FIAT, será utilizado o teste não paramétrico de Spearman.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados em novas versões e estão de acordo com as recomendações emitidas no no último parecer consubstanciado do CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2 de 08/06/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 de 08/06/2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2220 Fax: (16)3633 1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 1.117.214

parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 22 de Junho de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

9.2. Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da Pesquisa:

“Avaliação da lipidúria, proteinúria e alterações histopatológicas de túbulos corticais renais em pacientes com glomerulopatias”.

Pesquisadores:

Márcio Dantas; Roberto Silva Costa; Lázaro Bruno Borges Silva

O senhor(a) tem uma doença chamada de nefrite ou, no meio médico, de glomerulonefrite. Esta doença causa perda de proteína e de gordura na urina, faz inchar o corpo e pode aumentar o colesterol no sangue. A gordura que sai na urina por causa da nefrite é chamada pelos médicos de lipidúria.

Estas nefrites podem ser causadas por problemas imunológicos como o lúpus eritematoso sistêmico, infecciosos como hepatites pelo vírus C ou vírus B, e em outros casos, a causa não é descoberta. Para fazer o diagnóstico destas nefrites são necessários exames de sangue, de urina, e de biópsia renal, que é o principal motivo da sua internação neste momento.

Nesta pesquisa pretendemos comparar a quantidade de gordura na urina dos pacientes com nefrites com a proteína da urina e com o tipo de alteração da biópsia renal, tais como as quantidades de proteína e de gordura que se acumulam no rim nessa doença.

Diante disso, nós o convidamos a participar da nossa pesquisa intitulada “Avaliação da associação da lipidúria com proteinúria e alterações histopatológicas em túbulos corticais renais em pacientes com glomerulopatias”, para estudar a quantidade de gordura, que será comparada com a quantidade de proteína também da urina, e com alterações da biópsia do seu rim causada pela nefrite.

O que eu devo fazer se quiser participar do estudo?

Caso o(a) senhor(a) concorde participar da pesquisa, deverá ser incluído nas etapas:

1. Obtenção de uma amostra de urina entre 1 a 3 dias antes da sua biópsia renal, durante a sua internação para realizar esta biópsia. Esta urina será usada para avaliar a quantidade de gordura e de proteína eliminadas.
2. Coleta de informações relacionadas à sua doença, que serão conseguidas pelo seu prontuário médico, tais como: idade, tempo de doença; sintomas do aparecimento da sua doença; resultado da biópsia renal e o diagnóstico da nefrite; dosagens de filtração de seus rins.
3. Concordar que uma porção minúscula da sua biópsia que já está no laboratório seja usada para medir a quantidade de gordura no seu rim. Não haverá qualquer interferência na realização da sua biópsia, que tem o objetivo de fazer o diagnóstico do tipo de nefrite.

Quais são os riscos e os benefícios desta pesquisa?

A única interferência que esta pesquisa causará será a coleta de uma amostra de urina específica para a medida da gordura e da proteína. Esta coleta será feita com o senhor(a) urinando espontaneamente em um frasco padrão para urina rotina. Assim, os riscos são mínimos e incluem ansiedade e desconforto emocional para a coleta da urina. Como o frasco é limpo, de uso único e descartável, não haverá riscos de contaminação ou traumas.

Esta pesquisa provavelmente não irá trazer benefícios imediatos para o tratamento da sua doença, mas caso alguma alteração importante seja detectada na sua urina, o senhor(a) será avisado. O(A) senhor(a) também será avisado se houver alguma possibilidade de tratamento que o(a) ajude.

Por outro lado, esta pesquisa ajudará os médicos e cientistas a conhecerem melhor as consequências da nefrite no próprio rim, e se podem se desenvolver outros métodos de diagnóstico. Esperamos que essa pesquisa facilite o surgimento de novos tratamentos para a proteção dos rins nos casos de nefrite.

E se eu não quiser participar da pesquisa?

A participação neste trabalho é voluntária. Caso o(a) senhor(a) não queira participar desta pesquisa, isto não trará qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. Do mesmo modo, o(a) senhor(a) poderá, a qualquer momento retirar o seu consentimento em participar da pesquisa, sem que isto lhe traga qualquer consequência. Nós asseguramos que não haverá qualquer despesa financeira para o senhor(a).

Caso concorde em participar o(a) senhor(a) terá:

1. A garantia de receber respostas a qualquer pergunta ou a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa;
2. A garantia de que a sua urina será descartada e não será guardada para qualquer pesquisa futura.
3. A liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa, sem que isto traga prejuízo à continuação do seu tratamento médico. A sua participação não trará qualquer interferência, dificuldade ou outro problema no tratamento da sua doença.
4. A segurança de que o senhor(a) não será identificado(a) nesta pesquisa e que será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas à sua privacidade. Todas as informações da sua doença e dos resultados da pesquisa serão tratadas de forma confidencial.
5. O direito de acompanhamento e assistência durante a pesquisa através do contato com os pesquisadores (vide contato telefônico abaixo), assim como o recebimento de informações atualizadas sobre a pesquisa, ainda que isto possa afetar a sua vontade em continuar participando da mesma.
6. O direito de receber uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado e rubricado em todas as páginas pelo pesquisador.

Suas dúvidas poderão ser esclarecidas a qualquer momento com os pesquisadores Dr. Márcio Dantas, Dr. Roberto Silva Costa e Lázaro Bruno Borges Silva pelos telefones: (16) 3602-2543 e (16) 3602-2943.

Em caso de dúvida o(a) Sr(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo telefone (16) 3602-2228.

Nome do Paciente: _____ **Prontuário** _____

Assinatura do Paciente: _____ **Data:** ____/____/____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do Pesquisador: _____ **Data:** ____/____/____