

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

GIULIANO FERREIRA MORGANTETTI

Associação de imunomarcadores podocitários com a classificação histopatológica Oxford (MEST-C) e proteinúria em pacientes com nefropatia da IgA primária.

Ribeirão Preto

2023

GIULIANO FERREIRA MORGANTETTI

Associação de imunomarcadores podocitários com a classificação histopatológica Oxford (MEST-C) e proteinúria em pacientes com nefropatia da IgA primária.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Morgantetti, Giuliano Ferreira

Associação de imunomarcadores podocitários com a classificação histopatológica Oxford (MEST-C) e proteinúria em pacientes com nefropatia da IgA primária, 2023.

62 p.: il.; 30 cm

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

Orientador: Dantas, Márcio.

1. Nefropatia IgA Primária. 2. Podócito. 3. Classificação de Oxford. 4. Proteinúria. 5. Patologia Digital.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Giuliano Ferreira Morgantetti

Título: "Associação de imunomarcadores podocitários com a classificação histopatológica Oxford (MEST-C) e proteinúria em pacientes com nefropatia da IgA primária"

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

Orientador: Prof. Dr. Márcio Dantas

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese aos meus pais, Fabio Morgantetti e Regina Helena Ferreira Morgantetti, que me ensinaram sobre o poder transformador do conhecimento e sempre lutaram pelo meu aprendizado e desenvolvimento pessoal através de valores de disciplina e persistência.

Dedico também à minha esposa, Fernanda Eugenia Calgaro Morgantetti pelo suporte e confiança incansáveis, mesmo em noites longas de trabalho e estudo, sempre ao meu lado, e a meus filhos Giovanni Calgaro Morgantetti e Rafael Calgaro Morgantetti, por me lembrarem todos os dias da importância de construirmos um mundo melhor para a próxima geração através da ciência. A conclusão deste trabalho é nossa conquista.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu professor de medicina e orientador, Professor Doutor Márcio Dantas, que acreditou em mim e investiu tempo e credibilidade neste trabalho. Médico clínico e pesquisador ímpar, foi capaz de idealizar este projeto e de adaptá-lo a minha área de atuação e experiência, sempre com muita compreensão, flexibilidade e atenção.

Muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Roberto Silva Costa, mais que meu professor de medicina ou chefe no Serviço de Patologia (SERPAT), um mentor e exemplo a seguir em termos de ética profissional e disseminação de conhecimento.

Ao médico patologista e sócio, Guilherme Alencar de Medeiros, pelo companheirismo, desafios superados e bons momentos vividos juntos nesta jornada.

Ao Professor Doutor Gyl Eanes Barros Silva, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal e profissional sempre entrelaçados com a ciência e seus desafios e aprendizados.

Às Professoras Doutoradas Terezila Machado Coimbra e Heloísa Della Coletta Francescato, pela cordialidade em ceder reagentes, assim como pelos ensinamentos e paciência no manejo de anticorpos experimentais em reações imuno-histoquímicas.

A minha irmã Fernanda Ferreira Morgantetti Bem pela amizade e suporte, além do suporte no domínio da língua inglesa, ferramenta importante na divulgação de conhecimento científico.

Ao amigo Doutor Paulo de Moraes Agnolitto, aliado no processo científico através de apoio e conselhos na condução do doutorado direto.

Finalmente, ao colega médico Guilherme Primo Sandri e ao biomédico Antonio Fernandes Serpa Maciel Filho, ambos, além de amigos, companheiros na aquisição e processamento dos dados, sem o qual esta tese não seria possível.

“A ciência não conhece país, pois o conhecimento pertence a toda
humanidade, e é a tocha que ilumina o mundo”.

Louis Pasteur

RESUMO

MORGANTETTI, G. F. **Associação de imunomarcadores podocitários com a classificação histopatológica Oxford (MEST-C) e proteinúria em pacientes com nefropatia da IgA primária**, 2022. 62 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: a nefropatia por IgA (NIgA) primária é uma glomerulonefrite (GN) proliferativa mesangial primeiramente descrita pelos patologistas franceses Berger e Hinglais em 1968, hoje considerada a glomerulopatia primária mais comum no mundo. A NIgA é definida histologicamente através da demonstração pela microscopia de imunofluorescência de depósitos mesangiais de imunoglobulinas, com predomínio de IgA, com manifestações histológicas sob microscopia de luz e evoluções clínicas variáveis. Nela, a proteinúria, um dos principais fatores de risco para a perda da função renal, ocorre principalmente através de lesão podocitária. Apesar de ser doença com manifestações iniciais predominantemente mesangiais, a proteinúria provavelmente é consequência de lesão dos podócitos. **Objetivos:** este estudo tem como objetivo identificar possíveis associações entre a imunoexpressão dos marcadores podocitários CD10, GLEPP-1, synaptopodin e WT1, além dos marcadores de transição epitélio-mesênquima desmin e vimentin com: (1) as diferentes formas de apresentação clínica, níveis de proteinúria e de função renal e (2) as diferentes categorias histopatológicas da Classificação de Oxford para a NIgA. **Metodologia:** 95 pacientes com nefropatia da IgA foram avaliados para a imunoexpressão das proteínas CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin, vimentin e WT1 em suas biópsias renais. A expressão destas proteínas foi mensurada de forma qualitativa e quantitativa, através do software de patologia digital para o cálculo da razão de imunoexpressão (relação de positividade de pixels), em comparação com as alterações histopatológicas pela classificação de Oxford e com a apresentação clínica, níveis de proteinúria e de função renal. A análise estatística entre os diferentes grupos foi realizada através do Teste de Spearman para as análises entre variáveis contínuas não paramétricas e Mann-Whitney para as análises entre variáveis contínuas e categóricas. **Resultados:** a média da razão de imunoexpressão de WT1, no grupo com proteinúria menor ou igual que 700mg/24 h foi de 18% ± 9,58% e no grupo com proteinúria maior que 700 mg/24 h foi de 8% ±5,87% (p<0,01). A média da razão de imunoexpressão de synaptopodin em amostras sem a formação de crescentes celulares e/ou fibrocelulares (padrão Oxford C0) foi de 22,06% ±7,81% e em amostras com a formação de crescentes (padrão Oxford C1 ou C2) foi de 35,5% ±7,94% (p<0,01). **Conclusão:** a avaliação por métodos digitais da imunoexpressão de WT1 identificou uma redução da imunoexpressão em pacientes com piores níveis de proteinúria. Além disso, encontramos correlação entre a imunoexpressão de synaptopodin e o desenvolvimento de crescentes celulares e/ou fibrocelulares.

Palavras-chave: Nefropatia IgA Primária; Podócito; Classificação de Oxford; Proteinúria; Patologia Digital.

ABSTRACT

MORGANTETTI, G. F. **IgA Nephropathy podocyte immunohistochemical expression in different forms of clinical evolution and histological tissue reaction patterns**, 2022. 62 p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introduction: primary IgA nephropathy (IgA) is a mesangial proliferative glomerulonephritis (GN), first described by the French pathologists Berger and Hinglais in 1968 and is now considered the most common primary glomerulopathy in the world. IgAN is defined histologically through the demonstration by immunofluorescence microscopy of mesangial deposits of immunoglobulins, with a predominance of IgA, with histological manifestations under light microscopy and variable clinical evolution. In it, proteinuria, one of the main risk factors for renal function decline, occurs mainly through podocyte injury. Despite being a disease with predominantly mesangial initial manifestations, proteinuria is probably a consequence of podocyte injury. **Methodology:** samples of kidney biopsies from 95 patients with IgA nephropathy were submitted to CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin, vimentin, and WT1 immunohistochemical expression evaluation. The intensity of expression of these proteins, qualitatively and quantitatively, using the digital pathology software to calculate the immunoexpression ratio (pixel positivity ratio), was compared with the histopathological alterations using the Oxford classification and with the clinical presentation, levels of proteinuria, and renal function. Statistical analysis between the different groups used the Spearman test for analysis between non-parametric continuous variables and the Mann-Whitney test for analysis between continuous and categorical variables. **Results:** the average WT1 immunoexpression ratio in the group with proteinuria less than or equal to 700mg/24 h was $18\% \pm 9.58\%$, and in the group with proteinuria greater than 700 mg/24h was $8\% \pm 5.87\%$ ($p < 0.01$). The mean immunoexpression ratio of synaptopodin in samples without the formation of cellular or fibrocellular crescents (Oxford C0) was $22.06\% \pm 7.81\%$, and in samples with crescent formation (Oxford C1 or C2) was $35.5\% \pm 7.94\%$ ($p < 0.01$). **Conclusion:** WT1 analysis by digital pathology identified a reduction in the level of expression in patients with worse levels of proteinuria. In addition, we found a strong correlation between the level of expression of synaptopodin and cellular or fibrocellular crescent formation in kidney tissue.

Keywords: Primary IgA Nephropathy; Podocyte; Oxford Classification; Proteinuria; Digital Pathology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** representação das etapas das reações de imuno-histoquímica, de (1) recuperação antigênica; (2) incubação com anticorpos primários e secundários; (3) revelação do sinal com DAB.28
- Figura 2:** avaliação morfométrica qualitativa, através da graduação da imunoexpressão dos diferentes marcadores podocitários.28
- Figura 3:** análise pelo plugin IHC Profiler, através do aplicativo de código aberto Image J (NIH).29
- Figura 4:** representação das etapas de avaliação glomerular qualitativa (graduação) e quantitativa (razão de positividade de pixels, RPP), pelo plugin IHC Profiler, através do aplicativo de código aberto Image J (NIH).....30
- Figura 5:** curvas *ROC* utilizando como controle o método de análise qualitativa, em comparação com a análise quantitativa (RPP) (p-valor menor que 0,01).35
- Figura 6:** exemplos de glomérulos e seus perfis de imunoexpressão, em grupos de proteinúria de baixo grau (menor ou igual a 700 mg / 24h) e proteinúria de alto grau (maior que 700 mg / 24 h). Med = mediana; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; Des = desmin; Syn = synaptopodin; Vim = vimentin.....36
- Figura 7:** gráfico de dispersão entre os dados proteinúria e razão de imunoexpressão de WT1.....37
- Figura 8:** *box plot* (mediana central, com *whisker* máximo e mínimo) demonstrando a comparação entre grupos de proteinúria de baixo grau (PBG, menor ou igual a 700 mg / 24 h) e proteinúria de alto grau (PAG, maior que 700 mg / 24 h) (p=0,01).....38
- Figura 9:** *box plot* (mediana central, com *whisker* máximo e mínimo) demonstrando a comparação entre grupos sem a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C0 de Oxford) e com a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C1 e C2 de Oxford), em relação a seus valores de razão de imunoexpressão (p=0,01).39

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: definição e escore associado à Classificação de Oxford da NIgA (MEST-C) <i>Lv et al</i> , 2013..... | 26 |
| Tabela 2: características clínicas dos pacientes com nefropatia da IgA na ocasião da biópsia renal (média ± desvio padrão)..... | 33 |
| Tabela 3: proporção de resultados da classificação histológica através do Sistema Oxford (MEST-C). | 33 |
| Tabela 4: caracterização da intensidade da classificação Oxford conforme a intensidade da proteinúria – mediana (mínimo; máximo)..... | 34 |
| Tabela 5: proporção de resultados da avaliação morfológica de imunoexpressão (graduação de imunoexpressão, análise subjetiva) | 34 |
| Tabela 6: resultados da avaliação da RPP dos grupos PBG (proteinúria de baixo grau, menor que 700 mg / 24 h) e PAG (proteinúria de alto grau, maior que 700 mg / 24 h). | 37 |
| Tabela 7: resultados da avaliação quantitativa de imunoexpressão dos grupos sem a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C0 de Oxford) e com a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C1 e C2 de Oxford), em relação a seus valores de razão de imunoexpressão. | 39 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------|--------------------------------------|
| DP | Desvio Padrão |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidina |
| GESF | Glomeruloesclerose Segmentar e Focal |
| IgA | Imunoglobulina A |
| NIgA | Nefropatia IgA |
| PAMS | Prata metenamina ou Prata de Jones |
| PAS | Ácido Periódico de Schiff |
| RPP | Razão de Positividade de Pixels |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Nefropatia por IgA..... | 17 |
| 1.2 Podócitos e proteinúria..... | 18 |
| 1.3 Avaliação de imunoexpressão podocitária..... | 19 |
| 1.4 Estudo imuno-histoquímico e patologia digital..... | 21 |
| 1.5 Hipótese..... | 21 |
| 2 OBJETIVOS..... | 22 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 23 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 23 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 3.1 Pacientes..... | 25 |
| 3.2 Critérios de exclusão..... | 25 |
| 3.3 Microscopia de luz..... | 26 |
| 3.4 Estudo imuno-histoquímico..... | 27 |
| 3.5 Avaliação qualitativa dos marcadores podocitário..... | 28 |
| 3.6 Patologia digital..... | 29 |
| 3.7 Análise estatística..... | 30 |
| 4 RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1 Avaliação dos dados clínicos..... | 32 |
| 4.2 Avaliação de representatividade amostral morfológica microscópica (Sistema Oxford)..... | 33 |
| 4.3 Graduação qualitativa de imunoexpressão e sua relação com os parâmetros proteinúria e doença renal crônica..... | 34 |
| 4.4 Comparação entre métodos de análise qualitativa e quantitativa..... | 35 |
| 4.5 Análise quantitativa de imunoexpressão e sua relação com o parâmetro proteinúria..... | 36 |
| 4.6 Análise quantitativa de imunoexpressão e sua relação com os parâmetros morfológicos do Sistema Oxford (MEST-C)..... | 38 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 40 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 45 |
| 7 FINANCIAMENTOS..... | 47 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 9 ANEXOS..... | 56 |
| ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética..... | 57 |
| ANEXO B. Apresentação oral do trabalho no evento XXXI Congresso Brasileiro de Nefrologia..... | 59 |
| ANEXO C. Tabela com dados completos da razão de imunoexpressão de WT1 em relação com os valores de proteinúria..... | 60 |
| ANEXO D. Tabela com dados completos da razão de imunoexpressão de synaptopodin em relação com a classificação C de Oxford..... | 61 |
| ANEXO E. Artigo com os resultados finais dos experimentos desta tese, submetido para publicação na revista <i>Clinical Kidney Journal</i> | 62 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nefropatia por IgA

A Nefropatia por IgA primária (NIgA), primeiramente descrita por Berger e Hinglais, em 1968, caracterizada pela demonstração imuno-histoquímica de depósitos de imunoglobulinas mesangiais glomerulares com predomínio da forma IgA, é a glomerulopatia mais comum do mundo, com evolução clínica e alterações histológicas variáveis, desde casos de bom prognóstico, com hematúria microscópica e alterações histológicas mínimas, até casos com evolução rápida para a doença renal crônica (BERGER et al, 1968). Na doença, isotipos IgA1 de imunoglobulina formam depósitos de imunocomplexos nefritogênicos mesangiais glomerulares, podendo ocorrer de forma isolada na NIgA ou associadas a vasculite sistêmica em pacientes com Púrpura de Henoch-Schonlein (HUSSAIN et al, 2017; SAULSBURY, FT. 1999).

NIgA é doença responsável hoje por até 40% das biópsias de rim nativo no Japão, 25% na Europa, 12% nos Estados Unidos, porém menos de 5% na América Central e é uma das principais causas de doença renal crônica do mundo (WOO et al, 2010). Sua maior prevalência em países asiáticos pode estar associada a políticas de rastreamento mais rigorosas nestes países, com maiores taxa de biópsias de pacientes oligossintomáticos, com a possibilidade de subdiagnóstico em países ocidentais (SCHENA et al, 2018; YAMAGATA et al, 2002).

A patogênese da entidade envolve o achado consistente da presença de complexos imunes circulantes e glomerulares, compostos por IgA1 deficiente em galactose, IgG e C3, com a hipótese da confluência de múltiplos fatores genéticos e ambientais para sua manifestação (RODRIGUES et al, 2017).

A avaliação histológica da doença demonstrou utilidade na previsão do comportamento clínico da doença, sendo consagrada a Classificação de Oxford, após diversos estudos multicêntricos que avaliaram a correlação direta entre perda progressiva de néfrons e progressão para doença renal crônica de acordo com a análise de quatro componentes histológicos: (1) hiper celularidade mesangial, (2) hiper celularidade endocapilar, (3) esclerose segmentar e (4) fibrose intersticial e atrofia tubular (CATTRAN et al, 2009). Desde o surgimento da Classificação de Oxford, diversos estudos propõem a sua atualização, com a adição de outros elementos morfológicos na análise, como por exemplo a presença de crescentes celulares (BARBOUR et al, 2016; HAAS et al, 2017; TRIMARCHI et al, 2017).

Algumas outras ferramentas para análise prognóstica de pacientes com NlgA já foram propostas, sem ampla adesão no meio científico (BARBOUR et al, 2018; MARTÍN-PENAGOS et al, 2019).

Apesar da doença ser amplamente estudada em relação aos seus componentes fisiopatológicos, genéticos, moleculares e vasculares, há relativamente poucos estudos que avaliam a relação dos podócitos com a progressão da doença.

1.2 Podócitos e proteinúria

Os podócitos representam um componente essencial da barreira de filtração glomerular renal. Eles permanecem ligados à membrana basal glomerular por meio de interações de integrinas que sustentam a parede capilar para suportar a pressão arteriolar da fenda de filtração. A estrutura do podócito é mantida por um citoesqueleto dinâmico de actina, mitoticamente inativo (estado pós-mitótico). Os podócitos pós-mitóticos não têm um tempo de vida infinito e sua perda fisiológica na urina está documentada (KOPP et al, 2020; LASAGNI et al, 2013). A proteinúria é uma das principais consequências de dano podocitário, acarretando no processo de morte celular devido a fenômeno nomeado de “catástrofe mitótica” onde o citoesqueleto não é capaz de coordenar os fusos mitóticos sem desencadear perda celular por apoptose (KOPP et al, 2020; LIAPIS et al, 2013).

A avaliação ultraestrutural de casos de NlgA com apresentação clínica de síndrome nefrótica exclusiva demonstra correlação entre o grau de apagamento dos pedicelos podocitários e o nível de proteinúria, mesmo em casos sem qualquer outra alteração morfológica glomerular (CHOI et al, 2010; HISHIKI et al, 2001; LEMLEY et al, 2002; TEWARI et al, 2015).

Fatores previamente demonstrados como fortemente associados à evolução clínica desfavorável de NlgA são alteração de função renal, proteinúria e hipertensão arterial, sendo a intensidade da proteinúria um preditor sensível e específico de pior desfecho clínico (D’AMICO et al, 2004).

Proteinúria é recorrentemente demonstrada como um fator prognóstico adverso para NlgA. Em estudo de análise multivariada, em pacientes com proteinúria menor que 1 g/ 24 h, a perda de função renal foi 25 vezes mais lenta do que em pacientes com proteinúria maior que 3 g/ 24 h (REICH et al, 2007).

1.3 Avaliação de imunoexpressão podocitária

A perda quantitativa podocitária é marcador associado a progressão de injúrias renais para doença renal crônica. A densidade podocitária, razão obtida pelo número podocitário absoluto por glomérulo dividido pelo volume glomerular, se correlaciona diretamente com os níveis de proteinúria e fibrose glomerular (NAGATA M. 2016; WHARRAM et al, 2005; XU et al, 2010).

Diversas proteínas são fundamentais para o pleno funcionamento dos podócitos e manutenção da fenda de filtração (WELSH et al, 2011). As expressões de proteínas podocitárias tais como nefrina, Bcl-2 e podocalixina têm sido estudadas como marcadoras de lesão podocitária e associadas com proteinúria, perda dos processos podais e lesão histopatológica em pacientes com NlgA e em outras glomerulopatias (GAGLIARDINI et al, 2003; QIU et al, 2004; WAGROWSKA-DANILEWICZ et al, 2006). No entanto, outro estudo não encontrou alterações na expressão de nefrin, podocin e CD2-AP em pacientes com NlgA (KOOP et al, 2003) Assim, a caracterização precisa do fenótipo podocitário na NlgA ainda necessita de melhor caracterização.

A proteína CD10 (Neprilisina) é uma metalopeptidase zinco-dependente envolvida no metabolismo de diversos peptídeos regulatórios, inativando a sinalização proteica na superfície celular, estando presentes na membrana plasmática de podócitos (KUBIAK-WLEKLY et al, 2009).

desmin e vimentin são proteínas que passam por processo de *upregulation* em modelos murinos de dano podocitário, sendo estudados como marcadores de transição epitélio-mesênquima, fenômeno em pesquisa como sendo uma das possíveis vias de origem dos fibroblastos que causam a fibrose associada à doença renal crônica (LIU et al, 2006)

GLEPP1 é uma proteína tirosino-fosfatase associada à manutenção estrutural dos pedicelos e processos de fosforilação do diafragma em fenda (THOMAS et al, 1994). A redução da expressão e redistribuição de GLEPP1 glomerular pode representar um marcador fenotípico adequado de lesão podocitária na doença de lesões mínimas, na síndrome nefrótica congênita do tipo finlandesa e na glomeruloesclerose segmentar e focal (SHARIF et al, 1998).

A proteína synaptopodin está envolvida em processos de remodelamento podocitário, associados a alfa-actina. A expressão dessa molécula se associa com

desenvolvimento avançado do citoesqueleto, sendo assim considerada um marcador importante de maturidade fenotípica dos podócitos (MUNDEL et al, 1997). Em modelos murinos geneticamente deficientes, sem a presença da proteína, não foi observado o surgimento de doença renal, porém quando estes animais mutados foram submetidos a modelos de dano renal, a perda da função renal foi acelerada, sugerindo possível função de proteção renal da molécula (ASANUMA et al, 2005; NING et al, 2020).

A proteína WT1, de expressão nuclear constitucional em podócitos, é extensamente envolvida com a embriologia e desenvolvimento renal. Modelos de estudo de injúria renal murinos e em organoides renais humanos demonstraram a função de regulação gênica da proteína WT1 durante o dano renal (ETTOU et al, 2020) e a associação da ausência ou redução da expressão da proteína com nefropatia (GUO et al, 2002), assim como redução dos seus níveis de expressão sendo associados com glomerulonefrite crescêntica e esclerose mesangial (GUO et al, 2002). Estudo de biópsia renal de pacientes com NlgA demonstrou 11,2% de casos imunoexpressão citoplasmática aberrante de WT1 em podócitos, sendo marcador de pior prognóstico da doença quando comparado com amostras com expressão nuclear apenas (TASAR et al, 2023).

O estudo imuno-histoquímico de marcadores podocitários em glomeruloesclerose segmentar focal (GESF) identificou perfil de imunoexpressão característico na forma colapsante da doença, mais agressiva (TESTAGROSSA et al, 2013).

1.4 Avaliação do estudo imuno-histoquímico por ferramentas de patologia digital

Estudos em modelos murinos de doença renal aguda e crônica, utilizando os imunomarcadores desmin, vimentin, podocin, synaptopodin e WT1 através de análise quantitativa semiautomatizada demonstraram alterações significativas na expressão das proteínas, correlacionada com a perda podocitária associada à progressão da doença renal (FUNK et al, 2016).

Para a padronização, replicabilidade e aquisição de métricas quantitativas contínuas, o uso do software de código aberto ImageJ trouxe acessibilidade e

qualidade científica para pesquisas científicas que requerem análises morfométricas microscópicas (SCHROEDER et al, 2020).

O desenvolvimento do *plugin* de código aberto *IHC profiler* permitiu a padronização da avaliação de estudos de imuno-histoquímica através de escore automatizado padronizado para reações da imunoperoxidase com 3,3' - Diaminobenzidina (DAB) (VARGHESE et al, 2014).

Com o desenvolvimento de ferramentas de escaneamento de lâminas histológicas e algoritmos de *machine learning* e inteligência artificial para o diagnóstico histopatológico, surgem inúmeras oportunidades de aquisição de dados com relevância clínica diagnóstica, prognóstica e terapêutica, mudando os paradigmas para o tratamento e prevenção de doenças renais (BARISONI et al, 2020).

1.5 Hipótese

Este estudo tem a hipótese de que pacientes com NIgA com proteinúria mais elevada e lesão histopatológica mais grave apresentam alteração da expressão de marcadores podocitários devido à perda de podócitos ou pela perda da estrutura do citoesqueleto e do diafragma da fenda glomerular nessa condição.

Outra hipótese é que há correlação entre as medidas da expressão de marcadores podocitários pela leitura convencional comparada com a análise quantitativa semiautomatizada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar alterações podocitárias em amostras de biópsias renais de pacientes com o diagnóstico de NIgA as diferentes categorias da Classificação de Oxford e suas respectivas correlações com a apresentação clínica, a proteinúria e a filtração glomerular.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1) Verificar a correlação entre formas de medida qualitativas (subjetivas) de imunoexpressão com formas de medida objetivas (quantitativas) de imunoexpressão na NIgA.

2.2.2) Verificar a associação entre a intensidade de imunoexpressão glomerular (qualitativa e quantitativa) nas biópsias renais de pacientes com NIgA, dos marcadores podocitários CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin, vimentin e WT1 e os níveis de proteinúria.

2.2.3) Verificar a associação entre a intensidade de imunoexpressão glomerular (qualitativa e quantitativa) nas biópsias renais de pacientes com NIgA, dos marcadores podocitários CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin, vimentin e WT1 e as diferentes categorias do Sistema Oxford (MEST-C).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo retrospectivo é baseado em revisão dos prontuários médicos e de análises das biópsias renais, através de microscopia de luz e análise imuno-histoquímica. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob o Número 2.664.499 (ANEXO A).

3.1 Pacientes

Entre 2011 e 2016 foram incluídos todos os 95 pacientes diagnosticados com NIgA por biópsia renal, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP). Os seguintes dados clínicos dos pacientes foram registrados através de revisão de prontuário:

- Sexo
- Idade
- Data das biópsias
- Proteinúria de 24 horas
- Clearance de creatinina
- Graduação de doença renal crônica
- Antecedentes pessoais
- Medicamentos em uso
- Exames laboratoriais (urina rotina, hemograma, FAN, sorologias para HIV, Hepatite B e Hepatite C, Proteínas totais, dentre outros de relevância).

Os dados clínicos foram registrados em três períodos: (1) mês de admissão / início de seguimento do paciente; (2) mês da biópsia; (3) último registro (mais recente) de prontuário.

3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com biópsias renais não representativas (amostras com menos de três glomérulos viáveis, não globalmente esclerosados, com toda cápsula de Bowman visualizável, para análise), com biópsias renais sem tecido renal suficiente para análises imuno-histoquímicas, pacientes sob tratamento imunossupressor ou com corticosteroide no momento da biópsia, com diabetes mellitus, com alcoolismo grave bem caracterizado com ou sem hepatopatia, com sorologias positivas para vírus B ou C da hepatite ou para HIV, com sorologias

positivas para doença autoimune como FAN, anticorpo anti-DNA nativo, anticorpo anti-Sm, com níveis reduzidos de C3 ou de C4 séricos, com presença de outras doenças renais, urológicas, neoplásicas, com infecções sistêmicas ou qualquer outra doença que possa interferir de forma independente com os resultados da expressão de marcadores podocitários. Pacientes com diagnóstico de doença renal crônica ao momento da biópsia também foram excluídos do estudo.

3.3 Microscopia de luz

As lâminas histológicas coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), Tricrômico de Masson, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Prata Metenamina / Prata de Jones (PAMS) dos pacientes do estudo foram analisadas e o resultado da avaliação comparado com a descrição diagnóstica original feita por patologista renal especialista do HCFMRP-USP.

As amostras foram então classificadas utilizando a Classificação Oxford MEST-C (CATTRAN et al, 2009; LV et al, 2013), ferramenta de estratificação prognóstica consagrada na condução dos casos de NIgA (Tabela 1).

Tabela 1 - Definição e escore associado à Classificação de Oxford da NIgA (MEST-C) *Lv et al, 2013*.

| Características histológicas | Escore designado |
|--|---|
| M: hiper celularidade mesangial (porcentagem dos glomérulos com mais de 3 células mesangiais) | M0: menos de 50% dos glomérulos M1: mais de 50% dos glomérulos |
| E: hiper celularidade endocapilar (redução luminal vascular devido à presença de células endocapilares) | E0: ausente E1: presente |
| S: esclerose segmentar (qualquer quantidade de esclerose ou aderência à cápsula de Bowman) | S0: ausente S1: presente |
| T: atrofia tubular e fibrose intersticial (porcentagem do tubulointerstício com presença de atrofia tubular e/ou fibrose intersticial) | T0: 0% a 25% T1: 26% a 50% T2: mais de 50% |
| C: formação de crescentes celulares / fibrocelulares (frequência da formação de crescentes) | C0: ausente C1: presente, em menos de 25% dos glomérulos C2: presente em mais de 25% dos glomérulos |

3.4 Estudo imuno-histoquímico

Para as reações imuno-histoquímicas, lâminas histológicas foram confeccionadas a partir dos blocos de parafina dos casos avaliados em microscopia de luz, em paralelo com amostras de controle (casos de nefrectomia por neoplasia renal, sem evidências de doença renal crônica).

A análise imuno-histoquímica foi realizada com anticorpos direcionados às proteínas CD10 (clone 56C6 Dako Omins / Agilent), desmin (clone D33 Dako Omins / Agilent), GLEPP1 (policlonal, AbCAM), synaptopodin (policlonal, AbCAM), vimentin (clone V9 Dako Omins / Agilent) e WT1 (clone 6F-H2 Dako Omins / Agilent) utilizando protocolos laboratoriais padronizados (Figura 1). As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas por meio de álcoois em graduações decrescentes, seguindo para solução salina tamponada com Tris (TBS). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela incubação dos cortes em 1,0% de H₂O₂ em TBS por 10 minutos. Para recuperação antigênica, as amostras foram transferidas para Solução de Recuperação Antigênica Dako Target pH 9,0 e submetidas ao calor usando a Dako Medical Decloaking Chamber (Dako / Agilent, EUA). Após a recuperação antigênica, as lâminas foram retiradas e resfriadas por 20 minutos antes de serem transferidas de volta para TBS para lavagem. O Biocare Medical Background Sniper (Dako / Agilent, EUA) foi usado por 20 minutos para bloquear a ligação de anticorpos não específicos. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários por 60 minutos. Os sinais das lâminas de caso e controle foram revelados em 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com H₂O₂ como substrato por 5 minutos. Se os sinais fossem suficientes, as lâminas de teste restantes eram desenvolvidas com DAB. As lâminas foram lavadas em água destilada, contracoradas com hematoxilina de Mayer, desidratadas e montadas com meio de montagem Depex.

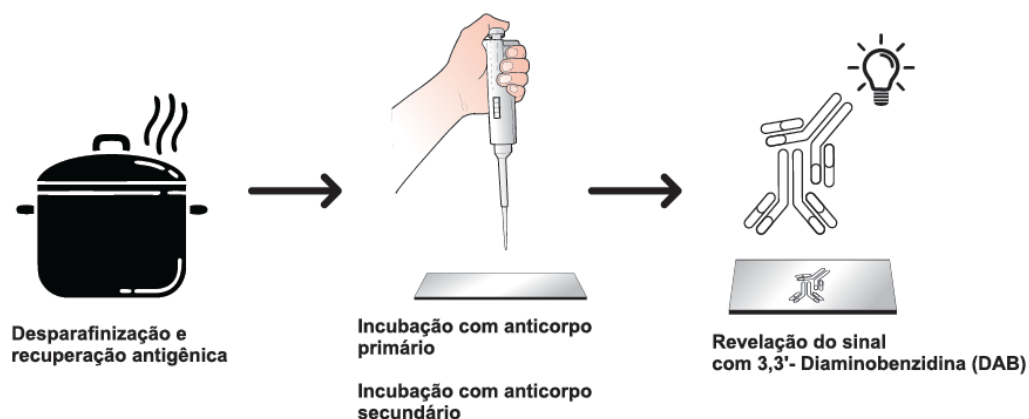


Figura 1 – Representação das etapas das reações de imuno-histoquímica, de (1) recuperação antigênica; (2) incubação com anticorpos primários e secundários; (3) revelação do sinal com DAB.

O anticorpo vimentina, por ser um dos mais sensíveis anticorpos utilizados em patologia cirúrgica, é comumente utilizado na prática clínica como ferramenta para avaliação da antigenicidade tecidual (BATTIFORA H, 1991). Foram consideradas amostras adequadas para análise apenas as que tiveram imunoposição forte e difusa de vimentina.

3.5 Avaliação qualitativa da expressão dos marcadores podocitários

A avaliação da expressão de cada marcador podocitário foi realizada pela escala (Figura 2):

0: ausência de marcação

1: marcação leve e segmentar

2: marcação moderada e segmentar intercalada com moderada e global ou intensa e global

3: marcação intensa, global e difusa

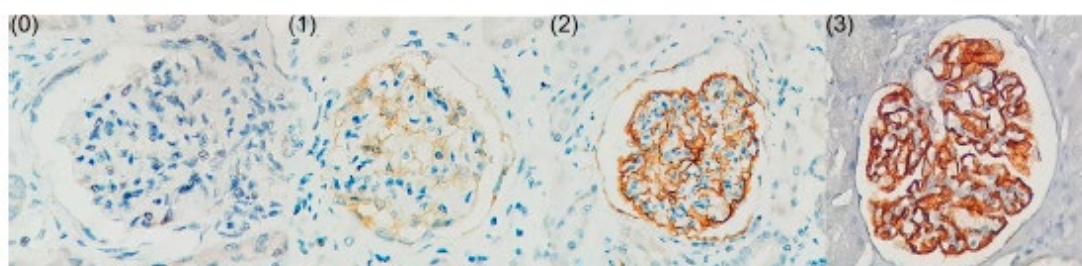


Figura 2 – Avaliação morfométrica qualitativa, através da graduação da imunoposição dos diferentes marcadores podocitários.

É realizada a foto digital dos três glomérulos mais representativos de cada amostra, sendo as imagens identificadas por códigos numéricos a realização de análise cegada (sem a ciência do marcador utilizado pelo médico patologista). Após cada imagem ser graduada, é selecionada a graduação de maior intensidade para cada amostra.

3.6 Patologia digital

A imagem de cada glomérulo selecionado para a avaliação qualitativa é utilizada para a análise morfométrica quantitativa.

A avaliação da expressão de cada marcador podocitário foi realizada através do software *ImageJ*, do *National Institute of Health (NIH)*, software de código aberto que integra algoritmos para análise morfométrica microscópica (ARENA et al, 2017).

Cada captura de imagem foi analisada através de algoritmo *IHC profiler* para avaliação de pixels positivos. Estes pixels são separados em pixels positivos fortes, pixels positivos intermediários, pixels positivos fracos e pixels negativos, após seleção da área circular do glomérulo, contendo a cápsula de Bowman, excluindo o compartimento tubulointersticial (Figura 3).

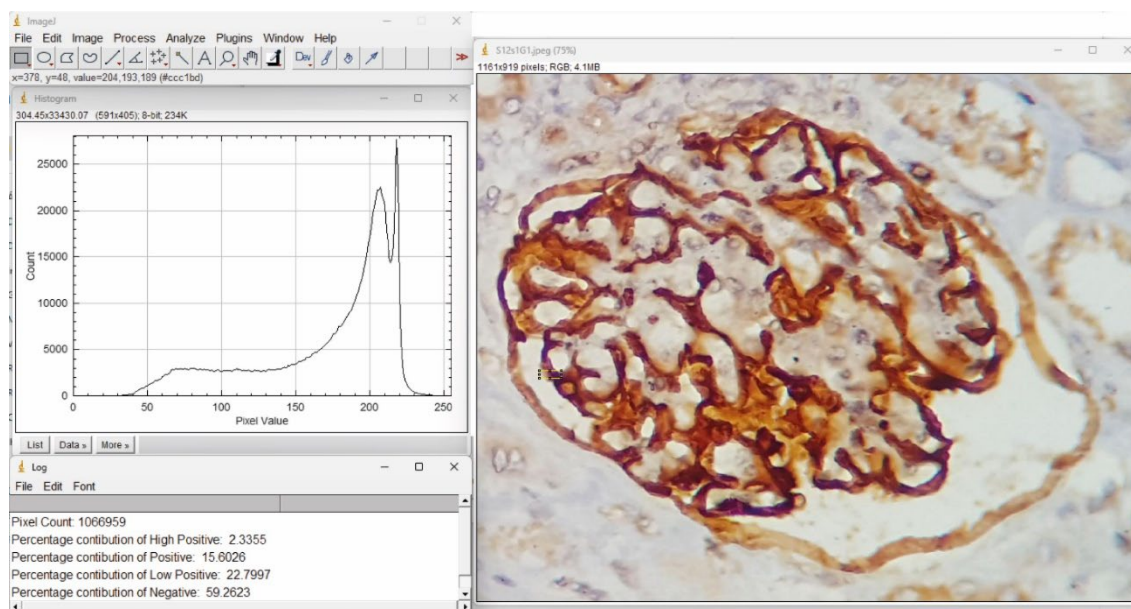


Figura 3 – Análise pelo *plugin IHC Profiler*, através do aplicativo de código aberto *Image J (NIH)*.

A somatória de todos os pixels positivos é dividida então pelo número total de pixels (somatória de todos os pixels positivos e pixels negativos),

obtendo assim a razão de positividade de pixels (RPP), medida em porcentagem que gradua a imunopressão de cada anticorpo no campo avaliado.

É calculada então a média dos RPP das três imagens glomerulares de cada amostra.

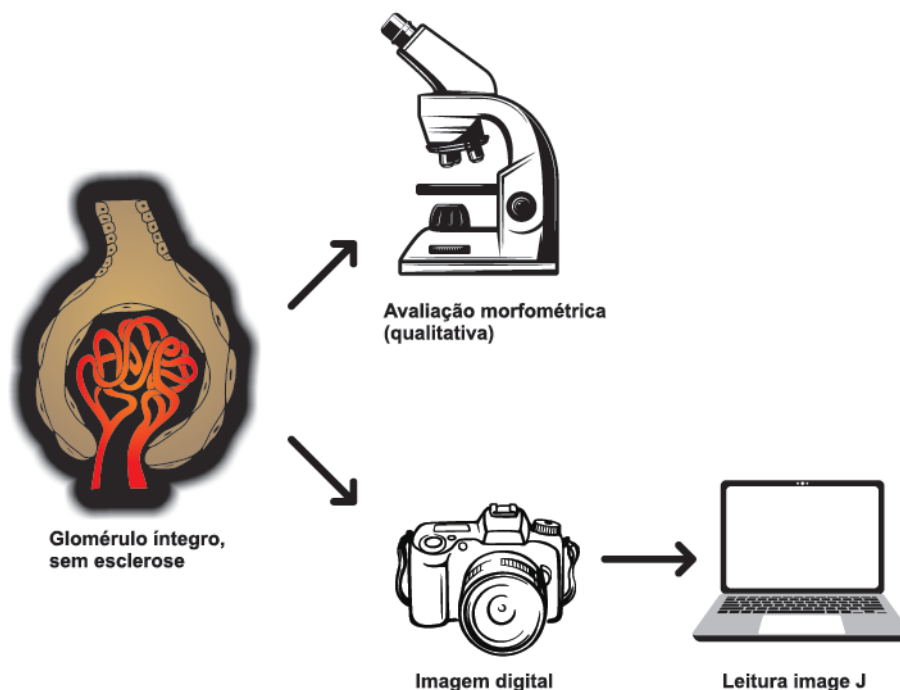


Figura 4 – Representação das etapas de avaliação glomerular qualitativa (gradação) e quantitativa (razão de positividade de pixels, RPP), pelo *plugin IHC Profiler*, através do aplicativo de código aberto *Image J* (NIH).

3.7 Análise Estatística

Os dados estão apresentados como média e desvio padrão para apresentações com distribuição normal ou como mediana e máximo e mínimo para medidas não paramétricas. A comparação entre testes utilizou a análise *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*). A análise estatística foi realizada através da análise da correlação de Spearman entre variáveis contínuas, e teste de Mann-Whitney nas avaliações entre variáveis categóricas e contínuas. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos dados clínicos

Dentre os pacientes selecionados para o estudo, 48 eram mulheres e 47 homens, com média de idade de 37,4 anos. As características clínicas dos pacientes estão apresentadas na Tabela 2.

Dos 95 pacientes selecionados para o estudo, um total de 21 pacientes foram removidos a partir dos critérios de exclusão clínicos, sendo realizado um total de 444 reações de imuno-histoquímica para a avaliação de todos os marcadores. Após critérios de exclusão morfológicos microscópicos um total de 228 reações estava disponível para a análise do estudo.

Dentre os pacientes efetivamente estudados, em seu primeiro atendimento, 32 apresentaram como alteração inicial hematuria microscópica isolada, 18 hematuria macroscópica isolada, 7 com síndrome nefrítica, 15 com síndrome nefrótica e 24 com manifestações de doença renal crônica.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com nefropatia da IgA na ocasião da biópsia renal (média \pm desvio padrão).

| | Masculino | Feminino | Total |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Gênero | 47 (49,5%) | 48 (50,5%) | 95 (100%) |
| Idade (anos) | 37 \pm 13,9 | 36 \pm 13,8 | 36 \pm 13,8 |
| Creatinina sérica (mg/dl) | 2,4 \pm 2,0 | 2,8 \pm 3,4 | 2,6 \pm 2,8 |
| Proteinúria (mg/24 h) | 1205,9 \pm 1526,4 | 1171,2 \pm 1209,6 | 1187,9 \pm 1362,3 |

4.2 Avaliação de representatividade amostral morfológica microscópica (Sistema Oxford)

Das lâminas com reações avaliáveis, um total de 48 são classificadas como M0 e 19 como M1; 64 são classificadas como E0 e 3 como E1; 12 são classificadas como S0 e 55 como S1; 18 são classificadas como T0, 31 como T1, 18 como T2; 52 são classificadas como C0, 13 como C1 e 2 como C2. As frequências de cada escore da classificação de Oxford estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Proporção de resultados da classificação histológica através do Sistema Oxford (MEST-C).

| Classificação Oxford | 0 | 1 | 2 |
|-----------------------------|----------|----------|----------|
| M | 71,6% | 28,4% | |
| E | 95,5% | 4,5% | |
| S | 17,9% | 82,1% | |
| T | 26,9% | 46,2% | 26,9% |
| C | 77,6% | 19,4% | 3,0% |

A relação da classificação de Oxford com a intensidade da proteinúria pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 - caracterização da intensidade da classificação Oxford conforme a intensidade da proteinúria – mediana (mínimo; máximo).

| Classificação Oxford | Proteinúria (mg / 24h) | Casos com proteinúria ≤ 700 mg / 24 h | Casos com proteinúria > 700 mg / 24 h |
|----------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| M0 | 740 (58,3; 4995,9) | 25 | 26 |
| M1 | 1210,7 (56,5; 4705,4) | 6 | 11 |
| E0 | 789,6 (56,5; 4995,9) | 31 | 34 |
| E1 | 1116,7 (1871,1; 2530) | 0 | 3 |
| S0 | 933,1 (130,6; 2530) | 5 | 6 |
| S1 | 792,3 (56,5 4995,9) | 26 | 31 |
| T0 | 397,7 (57,7; 2530) | 13 | 6 |
| T1 | 795 (58,3; 4537) | 13 | 17 |
| T2 | 1458,2 (56,5; 4995,9) | 5 | 14 |
| C0 | 807,65 (56,5; 4705,4) | 23 | 30 |
| C1 | 1256,2 (72,7; 4995,9) | 7 | 8 |
| C2 | 4107,8 (3551; 4664,6) | 0 | 2 |

4.3 Graduação qualitativa de imunoexpressão e sua relação com os parâmetros proteinúria e doença renal crônica

O resultado da avaliação morfométrica da intensidade de imunoexpressão dos diferentes marcadores pode ser observada na Tabela 5.

A imunoexpressão difusa de vimentina corroborou a imunogenicidade preservada de todas as amostras.

Tabela 5 - Proporção de resultados da avaliação morfométrica de imunoexpressão (graduação de imunoexpressão, qualitativa).

| Marcador | 0+ | 1+ | 2+ | 3+ |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|
| CD10 | 0% | 0% | 7,6% | 92,4% |
| desmin | 70,3% | 28,1% | 1,6% | 0% |
| GLEPP1 | 21,3% | 45,9% | 24,6% | 8,2% |
| synaptopodin | 1,8% | 1,8% | 5,5% | 90,9% |
| vimentin | 0% | 0% | 2,08% | 97,92% |
| WT1 | 0% | 49,1% | 1,8% | 49,1% |

4.4 Comparação entre métodos de análise qualitativa e quantitativa

Os métodos de análise qualitativa (gradação) e quantitativa (avaliação da razão de pixels positivos através de patologia digital) foram comparados através da curva ROC (*Receptor Operator Curve*, ou, *Característica de Operação do Receptor*).

Utilizando como base (controle) a avaliação qualitativa de gradação de intensidade de imunoposição foi realizada a comparação com a avaliação quantitativa pela RPP (Figura 5). Foram considerados negativos os testes com graus 0 e 1 de expressão qualitativa e positivos os testes com graus 2 e 3 de expressão qualitativa.

Os seis anticorpos utilizados demonstraram acurácia comparável dos métodos quantitativo e qualitativo na análise da área sob a curva ($p < 0,01$).

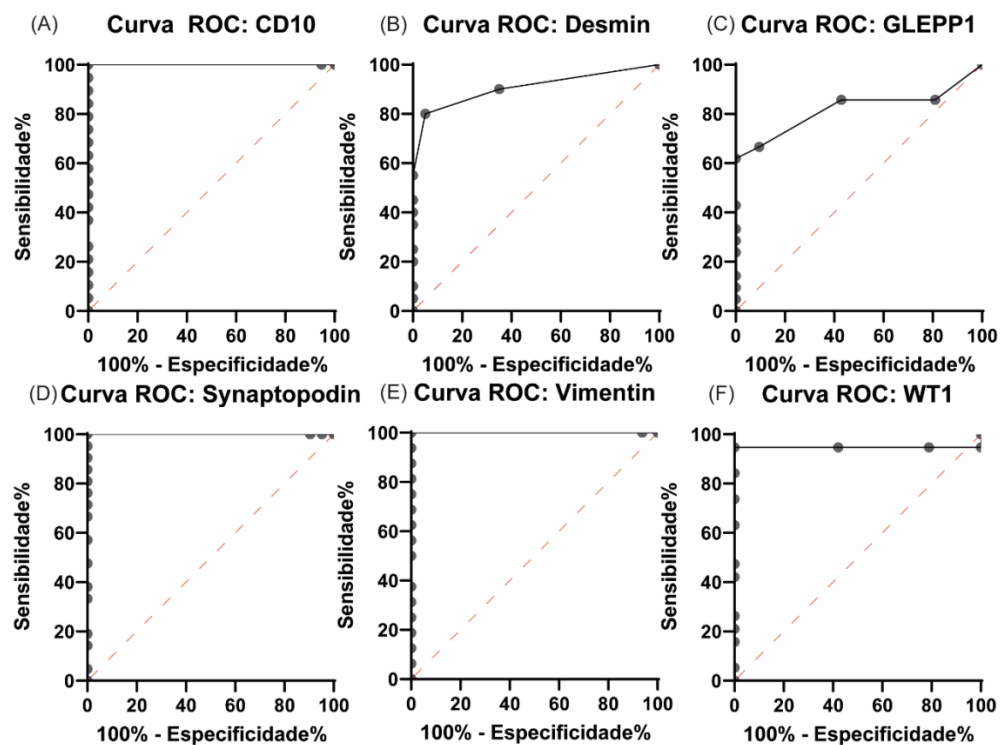


Figura 5 – Curvas ROC utilizando como controle o método de análise qualitativa, em comparação com a análise quantitativa (RPP) (p -valor menor que 0,01).

4.5 Análise quantitativa de imunoexpressão e sua relação com o parâmetro proteinúria

Com a separação dos casos em grupo de proteinúria de baixo grau (menor ou igual que 700 mg em 24 h) e grupo de proteinúria de alto grau (maior que 700 mg em 24 h), exemplos da comparação de RPP podem ser observados na figura 6 e tabela 6.

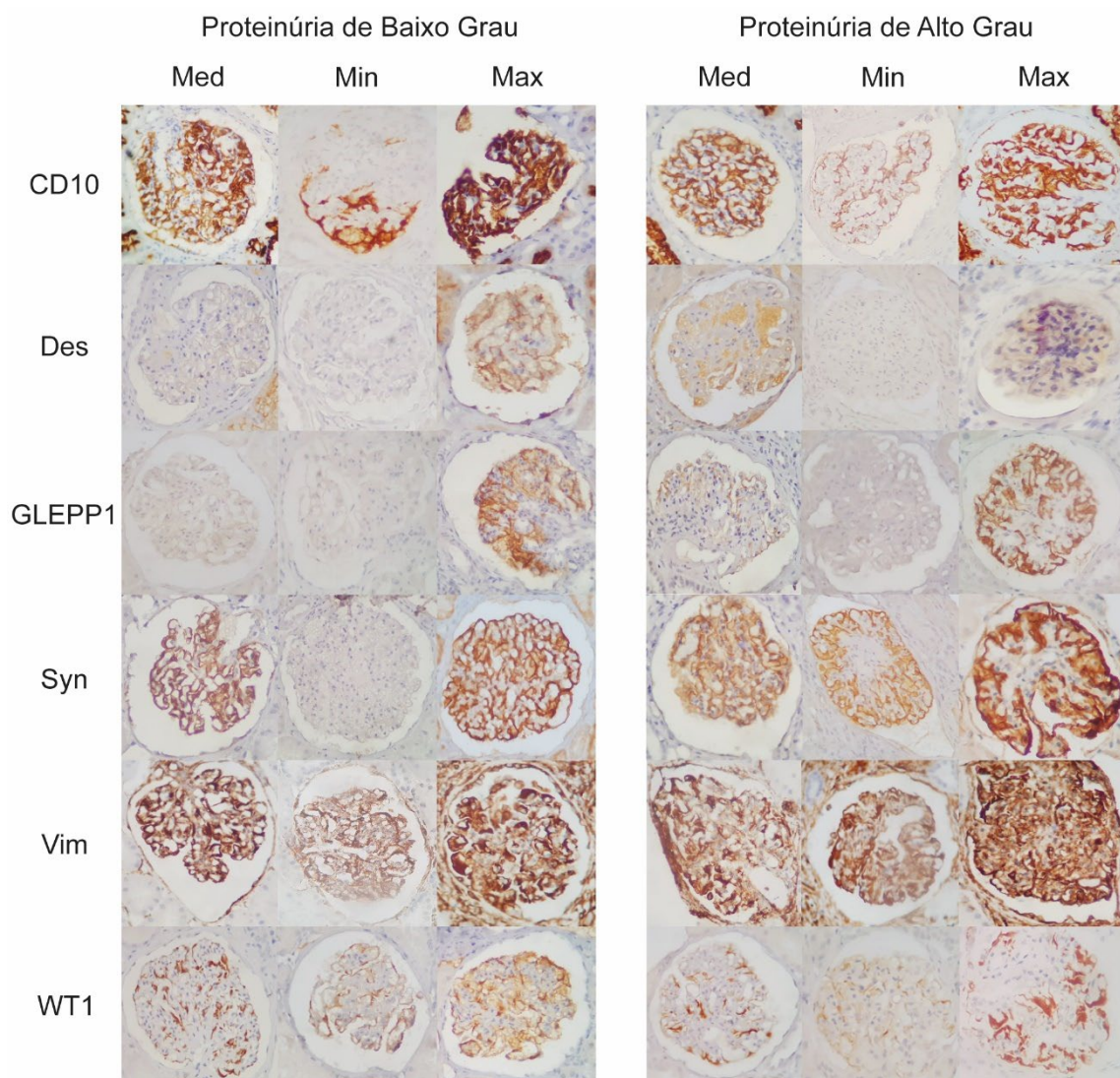


Figura 6 - Exemplos de glomérulos e seus perfis de imunoexpressão, em grupos de proteinúria de baixo grau (menor ou igual a 700 mg / 24h) e proteinúria de alto grau (maior que 700 mg / 24 h). Med = mediana; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; Des = desmin; Syn = synaptopodin; Vim = vimentin.

A análise de Spearman demonstra redução da expressão de WT1 em casos com pior proteinúria (Figura 7; $r=-0,41$; $p < 0,01$). Os resultados evidenciam diferença estatística na imunoposição de WT1 em grupo de proteinúria de baixo grau (menor que 700 mg / 24 h), reduzida no grupo de proteinúria de alto grau (maior que 700 mg / 24 h), com diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$). Os demais marcadores não demonstram diferenças significantes entre os grupos avaliados.

Tabela 6 - Resultados da avaliação quantitativa de imunoposição dos grupos PBG (proteinúria de baixo grau, menor que 700 mg / 24 h) e PAG (proteinúria de alto grau, maior que 700 mg / 24 h), com mediana, máximo (max) e mínimo (min).

| Marcador | PBG (mediana) | PBG (max) | PBG (min) | PAG (mediana) | PAG (max) | PAG (min) | P-valor |
|--------------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|---------|
| CD10 | 30% | 54% | 23% | 32% | 47% | 12% | 0,8314 |
| desmin | 4% | 19% | 0% | 3% | 17% | 0% | 0,9469 |
| GLEPP1 | 7% | 16 % | 2% | 3% | 24% | 0% | 0,9069 |
| synaptopodin | 27% | 44% | 23% | 25% | 49% | 7% | 0,3633 |
| vimentin | 51% | 67% | 21% | 46% | 66% | 23% | 0,4459 |
| WT1 | 17% | 38% | 4% | 9% | 19% | 0% | 0,0118 |

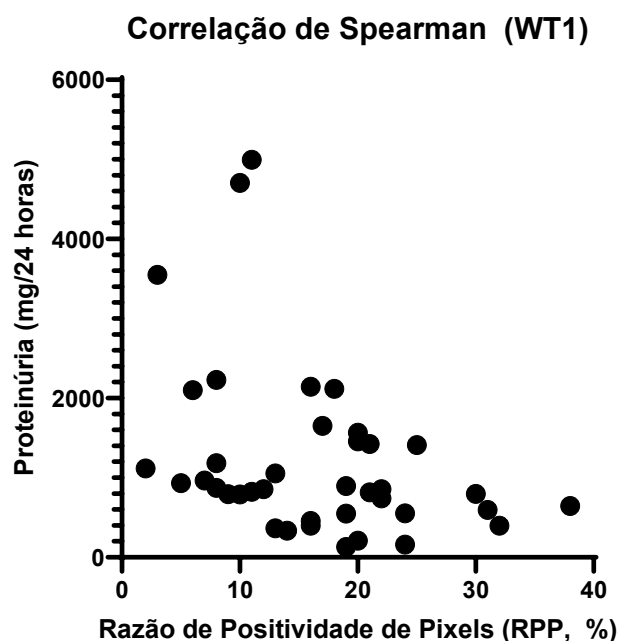


Figura 7 – Gráfico de dispersão entre os dados proteinúria e razão de imunoposição de WT1 ($r=-0,41$; $p < 0,01$)

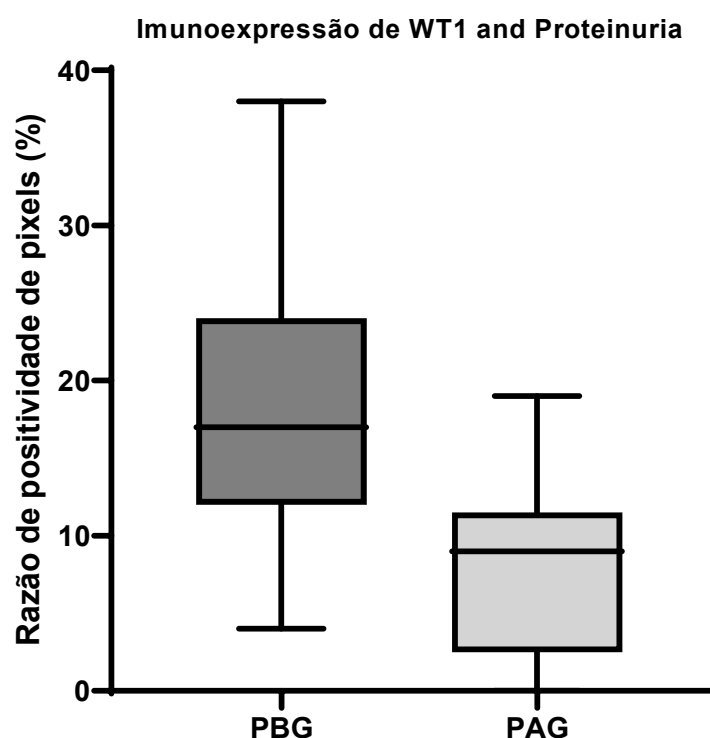


Figura 8 – *Box plot* (mediana central, com whisker máximo e mínimo) demonstrando a comparação entre grupos de proteinúria de baixo grau (PBG, menor ou igual a 700 mg / 24 h) e proteinúria de alto grau (PAG, maior que 700 mg / 24 h) ($p=0,01$).

4.6 Análise quantitativa de imunoexpressão e sua relação com os parâmetros morfológicos do Sistema Oxford (MEST-C).

Quando contrastados os critérios morfológicos da classificação de Oxford e as diferentes intensidades de imunoexpressão, foi evidenciada maior expressão de synaptopodin, estatisticamente significativa, no grupo com a formação de crescentes celulares e/ou fibrocelulares (grupos C1 e C2) em comparação com o grupo sem a formação de crescentes (C0), alteração morfológica importante associada a forma de glomerulonefrite rapidamente progressiva.

Tabela 7 - Resultados da avaliação quantitativa de imunoposição dos grupos sem a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C0 de Oxford) e com a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C1 e C2 de Oxford), em relação a seus valores de razão de imunoposição.

| MEST-C | CD10 | Des | GLEPP1 | Syn | WT1 | Vim |
|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|
| C0 | 32% (45%;12%) | 2% (19%;0%) | 5% (24%;0%) | 23% (49%;7%) | 13% (38%;0%) | 48% (67%;21%) |
| C1-2 | 39% (54%;24%) | 8% (9%;0%) | 2% (16%;0%) | 35% (44%;17%) | 17% (24%;7%) | 47% (59%;53%) |
| p-valor | 0,7084 | 0,8718 | 0,3841 | 0,0129 | 0,6141 | 0,1513 |

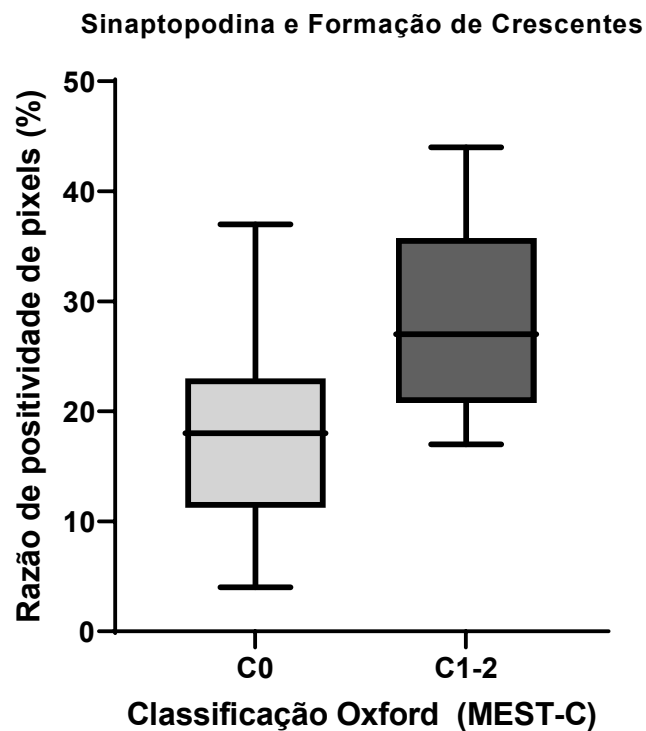


Figura 9 – *Box plot* (mediana central, com *whisker* máximo e mínimo) demonstrando a comparação entre grupos sem a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C0 de Oxford) e com a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares (classificação C1 e C2 de Oxford), em relação a seus valores de razão de imunoposição (p=0,01).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo podem ser agrupados em duas abordagens: 1) a comparação das medidas das intensidades das imunomarcações de cada anticorpo podocitário (CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin, vimentin e WT1 entre os métodos de avaliação qualitativa *versus* a avaliação quantitativa, e 2) a associação da intensidade de cada marcador podocitário com a proteinúria e com a classificação histopatológica Oxford MEST-C.

A primeira abordagem demonstrou resultados comparáveis entre os métodos qualitativo e quantitativo de imunexpressão de marcadores podocitários, através da curva ROC, pela análise da razão de positividade de pixels (RPP), para os seis anticorpos utilizados ($p < 0,01$). O método qualitativo, mais usual, envolve sistema de escore e inclui uma avaliação subjetiva de cada observador. Já o método quantitativo, que se baseia na leitura digitalizada da imunomarcção (razão de pixels positivos), elimina o componente subjetivo da análise. No entanto, uma vantagem do método qualitativo é a delimitação do local de expressão no glomérulo, o que é mais difícil de estabelecer com a avaliação meramente quantitativa. Por exemplo, a expressão reduzida apenas em área com esclerose segmentar é mais bem identificada pelo método qualitativo.

Múltiplos estudos recentes buscam a aplicação de ferramentas de patologia digital e morfometria, com auxílio de *deep learning* (HOLSCHER et al, 2023; JAUGEY et al, 2023; KONIECZNY et al 2021; TESTA et al, 2022) para auxiliar no diagnóstico e estratificação prognóstica de NlgA, porém este é o primeiro estudo que temos conhecimento que utilizou anticorpos e ferramentas de patologia digital de baixo custo para avaliações prognósticas em NlgA em humanos.

O uso do método quantitativo já é largamente utilizado. A avaliação da expressão glomerular de GLEPP-1 foi quantificada com sucesso em 51 pacientes com NlgA utilizando-se um programa de análise de imagem computadorizado (TIAN et al, 2007) Neste estudo houve redução da expressão glomerular de GLEPP-1 quanto maior a intensidade da proteinúria e quanto mais grave a lesão histopatológica. Além disso, a lesão podocitária caracterizada por perda dos processos podais avaliada por microscopia eletrônica foi maior quanto menor a expressão podocitária de GLEPP-1. Esses resultados são divergentes em relação ao nosso estudo e não encontramos explicação clara para a discrepância.

O presente estudo demonstrou que a imunexpressão de WT1 está reduzida no grupo de pacientes com proteinúria de alto grau, em comparação com o grupo de

pacientes com proteinúria de baixo grau, em avaliação quantitativa ($r = -0,42$; $p = 0,01$).

A redução da expressão de WT1 pode estar associada com a diminuição quantitativa do número de podócitos no néfron com dano, visto que se trata de marcador nuclear podocitário, característica esta já observada em estudos prévios que utilizaram WT1 para contagem / quantificação podocitária (VENKATAREDDY et al, 2014).

No entanto, outro estudo com 128 pacientes com NlgA em foi usada a classificação Oxford MEST-C encontrou correlação de marcação citoplasmática de WT1 com marcação mesangial/paramesangial de C4d e também com progressão para doença renal crônica terminal. Os autores sugeriram que a maior expressão citoplasmática em glomerulos de pacientes com NlgA poderia ser variável independente para pior prognóstico (TASAR et al, 2023).

A participação de WT1 na NlgA pode ser interpretada como real, ao menos em alguma extensão a partir da demonstração de ocorrência dessa doença em forma genética com variante *missense* (c.1397C>T; p.Ser466Phe) do WT1, levando à proteinúria e progressão para perda renal (LI et al, 2021).

Mais estudos são necessários para avaliar se a redução de WT1 em casos com pior proteinúria é causa de um pior prognóstico da NlgA ou se corresponde a uma consequência inevitável da perda quantitativa glomerular

Houve também um aumento da imunoexpressão de synaptopodin em amostras com a presença de crescentes celulares e/ou fibrocelulares (classificação de Oxford, $U=7,5$; $p=0,01$). Trabalhos prévios identificaram uma função protetora de synaptopodin no contexto de dano podocitário (NING et al, 2020), podendo este aumento de expressão estar associado a atividade de manutenção da função / integridade podocitária. No entanto, um estudo mostrou que pacientes com glomerulonefrite proliferativa e não proliferativa apresentaram redução na expressão podocitária de neprilysin (CD10), synaptopodin e de CR1 (KUBIAK-WLEKLY et al, 2009). Além disso, nesse estudo foi observado que a glomerulonefrite proliferativa mesangial associada à IgA apresentaram menor a expressão de sinaptopodin podocitária em comparação com este tipo de glomerulonefrite não associada à IgA, além de ter ocorrido correlação positiva entre neprilysin e sinaptopodin.

Um outro estudo avaliou a expressão de diversos marcadores em várias glomerulopatias e verificou expressão preservada de synaptopodin nessas doenças, incluindo a NlgA (HARA et al, 1998).

Em um modelo experimental de NlgA em ratos, expressão aumentada de RNA mensageiro para podocin, nefrin e desmin foi verificada. Curiosamente, a expressão das proteínas nefrin, podocin e desmin, bem como a expressão de RNA mensageiro de podocin e de desmin precederam o aparecimento da proteinúria. Os autores concluíram que a distribuição destas proteínas precede e pode estar relacionada à perda dos processos podais dos podócitos (LU et al, 2013). Outro estudo, também experimental, com NlgA encontrou associação da proteína de classe II phosphoinositide 3-kinase C2 α (PI3KC2 α), que é expressa em podócitos e tem participação fundamental na manutenção da homeostase renal normal, se associou com a expressão glomerular alterada de nephrin, synaptopodin, WT-1 e desmin (HARRIS et al, 2011).

Analisando o conjunto dos nossos resultados de synaptopodin na NlgA com outros estudos, interpretamos que não é possível estabelecer um padrão para a expressão dessa molécula nessa glomerulopatia mesangial.

Em um estudo com 30 biópsias de pacientes com nefropatia da IgA que foram comparadas com 12 biópsias de pacientes com anormalidades menores e 5 de rins controles normais, foi verificado que a expressão renal de CD10 foi significativamente menor na NlgA do que nas outras biópsias (SASAKA et al, 2003). Estas associações ocorreram com a disfunção renal, com a intensidade da lesão histopatológica e com o pior prognóstico.

No nosso estudo, não foram encontradas correlações entre proteinúria, alterações morfológicas ou evolução para doença renal crônica quando avaliamos a imunoexpressão de CD10, desmin, GLEPP1, synaptopodin e vimentin de forma qualitativa ou quantitativa. Uma observação interessante presente na discussão de um estudo foi de que a intensidade reduzida da expressão de algumas proteínas podocitárias poderia ser resultado de perda excessiva de podócitos, ao invés de menor concentração celular das proteínas.

Dessa forma, esse conjunto de dados clínicos e experimentais dão suporte à participação dessas proteínas podocitárias na manutenção da forma e função do podócito em restringir a filtração de macromoléculas e na geração de lesão

glomerular progressiva. No entanto, os mecanismos detalhados ainda necessitam de mais pesquisas para serem totalmente compreendidos.

Nosso estudo apresenta algumas limitações dignas de nota. A padronização utilizada no serviço de Patologia Renal do HCFMRP-USP de fixação com Solução de Bouin, apesar de oferecer vantagens na avaliação morfológica pela microscopia de luz, pode prejudicar o estudo imuno-histoquímico, acarretando em potencial redução de intensidade de imunexpressão em estudos prévios (GAGNON et al, 2011). A não utilização de lâminas com carga positiva nas reações imuno-histoquímicas, acarretou na perda tecidual durante a recuperação antigênica em alguns casos, com potencial diminuição do número de glomérulos avaliáveis no estudo imuno-histoquímico, reduzindo o tamanho amostral do estudo. Nosso grupo está trabalhando para ampliar o número amostral, com inclusão de pacientes mais recentes em acompanhamento, assim como avaliação de pacientes com vasculite da IgA (púrpura de Henoch Schonlein), pelos mesmos métodos, para maior representatividade amostral. Contudo, nossos resultados incentivam novos trabalhos para investigar o potencial uso de ferramentas imuno-histoquímicas e de patologia digital na definição de prognóstico em pacientes com NIgA.

6 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstra que a imunexpressão de WT1 é reduzida em amostra de pacientes com NlgA sem doença renal crônica, com índices elevados de proteinúria, quando comparados com doentes sem níveis elevados de proteinúria. Estes diferentes perfis de imunexpressão podem estar associados a alterações de expressão ou função da proteína reguladora WT1 na manutenção da barreira de filtração glomerular.

Casos que apresentaram a formação de crescentes celulares ou fibrocelulares sob microscopia de luz apresentaram aumento de imunexpressão de synaptopodin.

Estes resultados podem auxiliar no desenvolvimento de novos estudos que podem integrar patologia digital, técnicas imuno-histoquímicas e prognosticação de pacientes com NlgA.

7 FINANCIAMENTOS

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

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL HUSSAIN T, et al. Pathophysiology of IgA Nephropathy. **Adv Anat Pathol**. v. 24, n.1, p.56-62. Jan 2017.

ARENA ET, et al. Quantitating the cell: turning images into numbers with ImageJ. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**. v. 6, n. 2. Mar 2017.

ASANUMA K, et al. synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. **J Clin Invest**. v. 115, p. 1188–1198, 2005.

BARBOUR SJ, et al. The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. **Kidney Int**. v. 89, n. 1, p. 167-175. Jan 2016.

BARBOUR S, REICH H. An update on predicting renal progression in IgA nephropathy. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. v. 27, n. 3, p. 214-220. Mai 2018.

BARISONI L, et al. Digital pathology and computational image analysis in nephropathology. **Nat Rev Nephrol**. v. 16, n. 11, p. 669-685. Nov 2020.

BATTIFORA H, Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. **Am J Clin Pathol**. v. 96, n. 5, p. 669-671. Nov 1991.

BERGER J, HINGLAIS N. Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG. **Journal of Urology and Nephrology**, n. 74: p. 694-695, 1968.

CATTRAN DC, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. **Kidney Int** v. 76, p. 534-545. 2009.

CHOI SY, et al. Morphometric analysis of podocyte foot process effacement in IgA nephropathy and its association with proteinuria. **Ultrastruct Pathol**. v. 34, n. 4, p. 195-198. Ago 2010.

D'AMICO G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. **Semin Nephrol**. v. 24, n. 3, p. 179-96. Mai 2020.

ETTOU S, et al. Epigenetic transcriptional reprogramming by WT1 mediates a repair response during podocyte injury. **Sci Adv**. v. 6, n. 30. 2020.

FUNK J, et al. Semiautomated quantitative image analysis of glomerular immunohistochemistry markers desmin, vimentin, podocin, synaptopodin and WT-1 in acute and chronic rat kidney disease models. **Histochem Cell Biol**. v. 145, n. 3, p.

315-26, Mar 2016.

GAGNON JF, et al. Immunohistochemistry of breast tumor markers on archived bouin-fixed paraffin-embedded tissues. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** v. 19, n. 2, p. 168-72, Mar 2011.

GAGLIARDINI E, et al. Targeted downregulation of extracellular nephrin in human IgA nephropathy. **Am J Nephrol.** v. 23, n. 4, p. 277-286. Jul 2003.

GUO JK, et al. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. **Hum Mol Genet.** v. 15, n. 11, p. 651-659. Mar 2002.

HAAS M, et al. A Multicenter Study of the Predictive Value of Crescents in IgA Nephropathy. **J Am Soc Nephrol.** v. 28, n. 2, p. 691-701. Feb 2017.

HARA M, et al. Immunohistochemical and urinary markers of podocyte injury. **Pediatr Nephrol.** v. 12, n. 1, p. 43-48. Jan 1998.

HARRIS DP, et al. Requirement for class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha in maintenance of glomerular structure and function. **Mol Cell Biol.** v. 31, n. 1, p. 63-80. Jan 2011.

HISHIKI T, et al. Podocyte injury predicts prognosis in patients with IgA nephropathy using a small amount of renal biopsy tissue. **Kidney Blood Press Res.** v. 24, n. 2, p.99-104. 2001.

HOLSCHER DL, et al, Next-Generation Morphometry for pathomics-data mining in histopathology. **Nat Commun.** v. 14, n. 1, p. 470. Jan 2023.

JAUGEY A, et al. Deep learning automation of MEST-C classification in IgA nephropathy. **Nephrol Dial Transplant.** Epub ahead of print. Feb 2023.

KONIECZNY A, et al. Machine Learning in Prediction of IgA Nephropathy Outcome: A Comparative Approach. **J Pers Med.** v. 11, n. 4, p. 312. Abr 2021.

KOOP K, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. **J Am Soc Nephrol.** v. 14, n. 8, p. 2063-2071. Ago 2003.

KOPP JB, et al. Podocytopathies. **Nat Rev Dis Primers.** v. 6, n. 68. Ago 2020.

KUBIAK-WLEKLY A, et al. Neprilysin--structure of the gene and protein product and the localization of expression. **Pol Merkur Lekarski**. v. 27, n.157, p. 48-50. Jul 2009.

KUBIAK-WLEKLY A, et al. The Comparison of the Podocyte Expression of synaptopodin, CR1 and Neprilysin in Human Glomerulonephritis: Could the Expression of CR1 be Clinically Relevant? **Int J Biomed Sci**. v. 5, n. 1, p. 28-36. Mar 2009.

LASAGNI L, et al. Podocyte mitosis - a catastrophe. **Curr Mol Med**. v. 13, n. 1, p 13-23. Jan 2013.

LEMLEI KV, et. al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. **Kidney Int**. v. 61, n. 4, p.1475-1485. Abr 2002.

LIAPIS H, ROMAGNANI P, ANDERS HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe. **Am J Pathol**. v. 183, n. 5, p. 1364-1374. Nov 2013.

LI Q, et al. Case Report: A Pathogenic Missense Variant of WT1 Cosegregates With Proteinuria in a Six-Generation Chinese Family With IgA Nephropathy. **Front Med (Lausanne)**. v. 31, n. 8. Jan 2022.

LIU Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. **J Am Soc Nephrol**. v. 21, n. 2, p. 212-222, 2010.

LV JC, et al. Evaluation of the oxford classification of IgA nephropathy: a systematic review and meta-analysis. **Am J Kidney Dis**. v. 62, n. 5, p. 891–899, 2013.

LU H, et al. Temporal and spatial expression of podocyte-associated molecules are accompanied by proteinuria in IgA nephropathy rat model. **Physiol Res**. v. 62, n. 1, p. 35-45. 2013.

MARTÍN-PENAGOS L, et al. Is it possible to predict the evolution of IgAN? Validation of the IgA nephropathy progression calculator and its relationship with MEST-C score in our population. **Nefrologia (Engl Ed)**. v. 39, n. 5, p. 523-530. Set 2019.

MUNDEL P, et al. synaptopodin: na actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. **J Cell Biol**. v. 139, n. 1, p. 193-204. Out 1997.

NAGATA M. Podocyte injury and its consequences. **Kidney Int**. v. 89, n. 6, p. 1221-30. Jun 2016.

NING L, et al. synaptopodin Is Dispensable for Normal Podocyte Homeostasis but Is Protective in the Context of Acute Podocyte Injury. **JASN**. v. 31, n. 12, p. 2815-2832. Dez 2020.

QIU LQ, SINNIH R, I-HONG HSU S. Downregulation of Bcl-2 by podocytes is associated with progressive glomerular injury and clinical indices of poor renal prognosis in human IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* v.15, n. 1, p. 79-90. Jan 2004.

REICH HN, et al. Remission of proteinuria improves prognosis in IgA nephropathy. **J Am Soc Nephrol**; v. 18, p. 3177–3183. Dez. 2007.

RODRIGUES JC, HAAS M, REICH HN. IgA Nephropathy. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 677-686 Abr. 2017.

SASAKA A, et al. The number of CD10-positive glomerular epithelial cells reflects renal prognosis in IgA nephropathy patients. **Clin Nephrol**. v. 60, n. 5, p. 305-314. Nov 2003.

SAULSBURY FT. Henoch-Schonlein purpura in children: report of 100 patients and review of the literature. **Medicine**, v. 78; p. 395-408. 1999.

SCHENA FP, et. al. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. *Semin Nephrol*. 2018 Sep;38(5):435-442.

SCHROEDER AB, et al. The ImageJ ecosystem: Open-source software for image visualization, processing, and analysis. **Protein Sci**. v. 30, n. 1, p. 234-249. Jan 2021.

SHARIF K, et al. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. **Exp Nephrol**. v. 6, n 3, p. 234-244. Mai 1998.

TASAR GE, et al. Cytoplasmic WT1 in IgA nephropathy, an indicator of poor prognosis associated with mesangial/peri-mesangial C4d. **Int Urol Nephrol**. v. 55, n. 3, p. 661-669. Mar 2023.

TESTA F, et al. Automated Prediction of Kidney Failure in IgA Nephropathy with Deep Learning from Biopsy Images. **Clin J Am Soc Nephrol**. v. 17, n. 9, p. 1316-1324. Set 2022.

TESTAGROSSA L, et al. Immunohistochemical expression of podocyte markers in the variants of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrol Dial Transplant**. v. 28, n. 1, p. 91-98, Jan 2013.

TEWARI R, et al. Correlation of proteinuria with podocyte foot process effacement in IgA nephropathy: an ultrastructural study. **Ultrastruct Pathol**. v. 39, n. 2, p. 147-151. Abr 2015.

TIAN J, et al. Reduced Glomerular Epithelial Protein 1 Expression and Podocyte Injury in Immunoglobulin A Nephropathy. **The Journal of International Medical Research**. v. 35, n. 3, p. 338 – 345. Mai 2007.

THOMAS PE, et al. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. **J Biol Chem**. v. 269, n. 31, p. 19953-62. Ago 1994.

TRIMARCHI H, et al. IgAN Classification Working Group of the International IgA Nephropathy Network and the Renal Pathology Society; Conference Participants. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. **Kidney Int**. v. 91, n. 5, p. 1014-1021. Mai 2017.

VARGHESE F, et al. IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. **PLoS One**. v. 9, n. 5. Mai 2014.

VENKATAREDDY M, et al. Estimating podocyte number and density using a single histologic section. **J Am Soc Nephrol**. v. 25, n.5, p.1118-1129. Mai 2014.

WAGROWSKA-DANILEWICZ M, et al. Immunoexpression of podocyte-associated proteins in acquired human glomerulopathies with nephrotic syndrome. **Pol J Pathol**. v. 57, n. 1, p. 17-21. 2006.

WELSH GI, SALEEM MA. The podocyte cytoskeleton—key to a functioning glomerulus in health and disease. **Nat Rev Nephrol**. v.8, p. 14–21. 2011.

WHARRAM BL, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. **J Am Soc Nephrol**. v. 16, n. 10, p. 2941–2952, 2005.

WOO KT, et al. Global evolutionary trend of the prevalence of primary glomerulonephritis over the past three decades. **Nephron Clin Pract**. v. 116, p. 337–46, 2010.

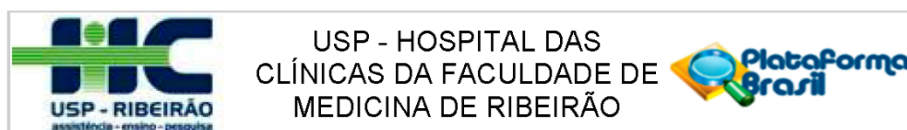
XU L, et al. Podocyte number predicts progression of proteinuria in IgA nephropathy. **Mod Pathol**. v. 23, n. 9, p. 1241-1250. Set 2010.

YAMAGATA K, et al. Prognosis of asymptomatic hematuria and/or proteinuria in men. High prevalence of IgA nephropathy among proteinuric patients found in mass screening. **Nephron**. v. 91, n. 1, p. 34-42. Mai 2002.

ZOU J, et al. Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. **Virchows Arch** v. 448, p. 485-492, 2006

ANEXOS

ANEXO A. Parecer da Comissão de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da expressão de marcadores podocitários na nefropatia por IgA

Pesquisador: Márcio Dantas

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 15905213.9.0000.5440

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.664.499

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 16 de março de 2018.

Objetivo da Pesquisa:

Não modificado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não modificado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Inclusão de 2 pesquisadores colaboradores na pesquisa "Avaliação da expressão de marcadores podocitários na nefropatia por IgA" (CAAE:15905213.9.0000.5440):

1º) Dr. Giuliano Ferreira Morgantetti: médico patologista, aluno de Pós-Graduação do Programa Clínica Médica, nível Doutorado, sob minha orientação;

2º) Guilherme Primo Sandri: aluno do Curso de Medicina da FMRP-USP.

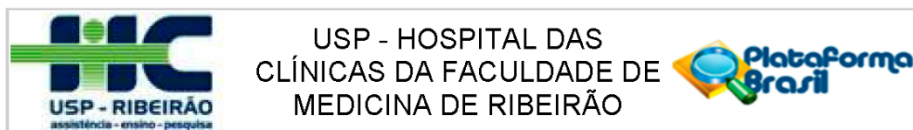
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos da Emenda:

- Projeto.doc;

- Pesquisadores.docx.

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: 2.664.499

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a Emenda referente à inclusão de dois pesquisadores (Dr. Giuliano Ferreira Morgantetti e Guilherme Primo Sandri) bem como o Projeto de pesquisa versão 3-16 maio 2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|---------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1078948_E1.pdf | 16/05/2018 14:38:12 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.doc | 16/05/2018 14:35:16 | Márcio Dantas | Aceito |
| Outros | Pesquisadores.docx | 16/05/2018 14:11:28 | Márcio Dantas | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha de Rosto proteínas podocitárias e NiGA.pdf | 06/05/2013 14:42:44 | | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 21 de Maio de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

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

ANEXO B. Apresentação oral do trabalho no XXXI Congresso Brasileiro de Nefrologia



XXXI CONGRESSO BRASILEIRO DE NEFROLOGIA

XIII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia
XIX Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia
21 A 24 DE SETEMBRO DE 2022 • CENTROSUL • FLORIANÓPOLIS-SC

Certificamos que o trabalho

AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONÃO PODOCITÁRIA DE CD10, CUBILIN, DESMIN, GLEPP1, SYNAPTOPODIN, VIMENTIN E WT1 NA NEFROPATIA POR IGA EM SUAS DIFERENTES FORMAS DE EVOLUÇÃO CLÍNICA E APRESENTAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.

dos autores: GIULIANO FERREIRA MORGANTETTI; GIULIANO FERREIRA MORGANTETTI; GUILHERME PRIMO SANDRI; ROBERTO SILVA COSTA; MARCIO DANTAS, foi apresentado na modalidade Apresentação oral, no evento XXXI Congresso Brasileiro de Nefrologia, XIII Congresso Luso-Brasileiro de Nefrologia e XIX Congresso Brasileiro de Enfermagem em Nefrologia ocorrido de 21 a 24 de setembro de 2022, no Centro de Convenções de Florianópolis (CentroSul) em Florianópolis/SC.

24 de setembro de 2022

Para validar, acesse <http://www.ccmcongressos.com.br/validacao/?cod=53905297>


Dr. Osvaldo Merges Vieira Neto
Presidente da
Sociedade Brasileira de Nefrologia


Dr. José H. Rocco Suassuna
Diretor Científico da
Sociedade Brasileira de Nefrologia


Dr. Roberto Benvenuti
Presidente do XXXI Congresso
Brasileiro de Nefrologia


Dr. Marcelo Mazza do Nascimento
Diretor do Departamento de
Pesquisa, Treinamento e
Educação


Sociedade Brasileira de Nefrologia


CCM
GROUP
20
ANOS

ANEXO C. Tabela com dados completos da razão de imunexpressão de WT1 em relação com os valores de proteinúria

| Corte Histológico | Razão de Positividade de Pixels | Grupo de Graduação (Qualitativa) | Proteinúria Final | Grau de proteinúria |
|--------------------------|--|---|--------------------------|----------------------------|
| S14s3 | 2% | 2 | 1116,7 | Alto |
| S17s3 | 5% | 2 | 933,1 | Alto |
| S20s3 | 7% | 2 | 964,3 | Alto |
| S21s3 | 12% | 2 | 855,6 | Alto |
| S22s3 | 8% | 2 | 2230 | Alto |
| S23s3 | 13% | 2 | 1054,1 | Alto |
| S24s3 | 10% | 3 | 4705,4 | Alto |
| S30s3 | 22% | 3 | 740 | Alto |
| S31s3 | 24% | 2 | 554,2 | Baixo |
| S32s3 | 8% | 2 | 1183 | Alto |
| S34s3 | 8% | 2 | 873,3 | Alto |
| S38s3 | 24% | 1 | 160,2 | Baixo |
| S39s3 | 3% | 3 | 3551 | Baixo |
| S40s3 | 11% | 2 | 823,1 | Alto |
| S42s3 | 6% | 2 | 2100 | Alto |
| S43s3 | 9% | 2 | 792,3 | Alto |
| S45s3 | 16% | 1 | 456,2 | Baixo |
| S49s3 | 10% | 2 | 789,6 | Alto |
| S52s3 | 19% | 2 | 896 | Alto |
| S53s3 | 31% | 2 | 594,2 | Baixo |
| S56s3 | 14% | 1 | 336,3 | Baixo |
| S58s3 | 20% | 2 | 1458,2 | Alto |
| S59s3 | 16% | 2 | 2142,1 | Alto |
| S60s3 | 16% | 1 | 397,7 | Baixo |
| S62s3 | 21% | 2 | 817,6 | Alto |
| S67s3 | 11% | 3 | 4995,9 | Alto |
| S68s3 | 32% | 1 | 397 | Baixo |
| S69s3 | 21% | 2 | 1424,3 | Alto |
| S70s3 | 17% | 2 | 1651,8 | Alto |
| S71s3 | 19% | 1 | 129,4 | Baixo |
| S72s3 | 20% | 2 | 1567,2 | Alto |
| S73s3 | 13% | 1 | 366,3 | Baixo |
| S74s3 | 20% | 1 | 208,2 | Baixo |
| S76s3 | 19% | 2 | 551,1 | Baixo |
| S77s3 | 18% | 2 | 2116,1 | Alto |
| S81s3 | 22% | 2 | 854,9 | Baixo |
| S82s3 | 38% | 2 | 646,6 | Baixo |
| S83s3 | 16% | 1 | 463 | Baixo |
| S86s3 | 25% | 2 | 1412 | Alto |

ANEXO D. Tabela com dados completos da razão de imunoposição de synaptopodin em relação com a classificação C de Oxford

| Corte histológico | Razão de Positividade de Pixels (RPP) | Classificação de Oxford (C) |
|--------------------------|--|------------------------------------|
| S90s3 | 13% | 0 |
| S92s3 | 24% | 1 |
| S93s3 | 26% | 0 |
| S95s3 | 25% | 1 |
| S96s3 | 23% | 0 |
| S102s3 | 37% | 0 |
| S104s3 | 32% | 0 |
| S114s3 | 11% | 0 |
| S115s3 | 14% | 0 |
| S116s3 | 14% | 0 |
| S122s3 | 4% | 0 |
| S124s3 | 23% | 0 |
| S128s3 | 20% | 1 |
| S130s3 | 35% | 1 |
| S131s3 | 23% | 0 |
| S132s3 | 20% | 0 |
| S135s3 | 44% | 1 |
| S136s3 | 17% | 2 |
| S144s3 | 38% | 2 |
| S145s3 | 29% | 1 |
| S146s3 | 5% | 0 |
| S147s3 | 16% | 0 |
| S153s3 | 12% | 0 |
| S154s3 | 21% | 0 |
| S155s3 | 21% | 1 |
| S159s3 | 21% | 0 |
| S161s3 | 35% | 1 |
| S165s3 | 25% | 0 |
| S167s3 | 8% | 0 |
| S168s3 | 7% | 0 |

ANEXO E. Artigo com os resultados finais dos experimentos desta tese, submetido para publicação na revista *Clinical Kidney Journal*

Clinical Kidney Journal - Manuscript CKJ-00229-2023 External Inbox x ↕ 🖨 🔗

Clinical Kidney Journal <onbehalf@manuscriptcentral.com>
to me, giulianomorgan ▾

Sun, Mar 12, 12:43 PM (13 days ago) ☆ ↶ ⋮

CKJ-00229-2023

Evaluation of podocyte immunohistochemical expression according to proteinuria levels and Oxford Classification (MEST-C) in primary IgA nephropathy

12-Mar-2023

Dear Dr. Morgantetti,

Thank you for having submitted the above manuscript to Clinical Kidney Journal. It will be sent out for review, and you should hear from us within 6 weeks as to the outcome of the review process. If you have any questions concerning the paper, please do not hesitate to contact us, quoting your manuscript number.

Yours sincerely,

Prof. Dr. M. Cozzolino
Ad Interim Editor-in-Chief, Clinical Kidney Journal
[Log in to Remove This Account](#)
