



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MARCELA LOPES DE SOUZA

Identificação de alteração da expressão de PODXL e TRPC6 após retirada do overload de albumina, em cultura de podócitos com e sem dano

CAMPINAS

2024

MARCELA LOPES DE SOUZA

Identificação de alteração da expressão de PODXL e TRPC6 após retirada do overload de albumina, em cultura de podócitos com e sem dano

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências na Área de Concentração de Genética Médica.

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARA SANCHES GUARAGNA

COORIENTADORA: Profa. Dra. MARICILDA PALANDI DE MELLO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
MARCELA LOPES DE SOUZA E ORIENTADA PELA
PROFESSORA DRA. MARA SANGUES GUARAGNA

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

So89i Souza, Marcela Lopes de, 1993-
Identificação de alteração da expressão de PODXL e TRPC6 após retirada do overload de albumina, em cultura de podócitos com e sem dano / Marcela Lopes de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Mara Sanches Guaragna.
Coorientador: Marcilda Palandi de Mello.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas.

1. Albumina. 2. Podócitos. 3. Cultura de células. 4. Canal de cátion TRPC6. 5. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Guaragna, Mara Sanches, 1971-. II. Mello, Marcilda Palandi de, 1954-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Identification of PODXL and TRPC6 expression changes following albumin overload removal in cultured podocytes with and without damage

Palavras-chave em inglês:

Albumin
Podocytes
Cell culture
TRPC6 cation channel
Real-time polymerase chain reaction

Área de concentração: Genética Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mara Sanches Guaragna [Orientador]
Cláudia Vianna Maurer Morelli
Paulo César Koch Nogueira
Precil Diego Miranda de Menezes Neves
Táris Antônio Paiva Vieira

Data de defesa: 23-05-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-6055-0683>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9661815838029431>

**BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
MARCELA LOPES DE SOUZA**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARA SANCHES GUARAGNA
COORIENTADORA: PROFA. DRA. MARICILDA PALANDI DE MELLO

MEMBROS

1. Profª. Dra. Mara Sanches Guaragna

2. Prof. Dr. Társis Antônio Paiva Vieira

3. Profª. Dra. Cláudia Vianna Maurer Morelli

4. Prof. Dr. Paulo César Koch Nogueira

5. Prof. Dr. Precil Diego Miranda de Menezes Neves

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontram-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data da defesa: 23/05/2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e principalmente, aos meus queridos pais, Carlos e Silvana, que são minhas bases e exemplo na vida, e que sem eles não teria chegado até aqui. Muito obrigada por tudo que fizeram por mim, de coração! Eu não chegaria até aqui sem a ajuda e apoio deles.

Agradeço à minha maravilhosa esposa, Giovanna, que está ao meu lado em todos os momentos, que me incentiva e me ajuda muito a ser sempre melhor, obrigada por todo amor, parceria e paciência. Sem ela, não teria concluído mais essa etapa em minha vida.

À toda minha família que sempre me ajudou e torceu muito por mim. Com toda certeza, vocês me ajudaram muito até aqui!

À querida professora, orientadora, amiga Mara. Muito obrigada por toda confiança desde o começo, por todo ensinamento, por toda parceria nesses anos. Eu não tenho palavras para agradecer todos esses anos como sua aluna e por toda ajuda que me deu durante esse tempo, principalmente nas últimas etapas do trabalho.

À querida professora e coorientadora, Maricilda que foi a primeira a me oferecer uma oportunidade no CBMEG, que sempre confiou em mim, me permitindo participar de diversas linhas de estudo dentro do grupo, sempre pronta a ouvir e ajudar. Muito obrigada por tudo!

À Helena, por todos os momentos no laboratório, pelas ajudas com os experimentos e na vida, por todas nossas conversas e por todo conhecimento que tive oportunidade de aprender com você!

Agradeço a todos os meus queridos amigos do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG). Em especial a Cris, João, Lizandra, Tais, Zé Ronaldo, Bia, Adriana, Rose, Gisele, Felipe, Letícia, Débora, Pamela, Fábio, Jackeline. Muito obrigada por todo convívio, por toda ajuda e por todos os momentos em que estivemos juntos.

Agradeço a todos os professores alunos funcionários do CBMEG que sempre estiveram prontos a me ajudar.

À todos os meus queridos amigos e amigas da vida, por todos os momentos maravilhosos e por toda ajuda nesse período, então o importante pra mim!

Agradeço aos membros da banca de defesa Dr Társis Antônio Paiva Vieira, Dra. Cláudia Maurer Morelli, Dr Paulo Koch Nogueira, Dr. Precil Menezes; Dra. Andréia Watanabe; Dra. Patrícia Varela Calais; Dra. Edi Lúcia Sartorato.

Às agências financiadoras CNPQ (processo n° 142439/2018-5) e FAPESP (processo n°2021/10387-6).

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento da minha tese.

Muito Obrigada!

RESUMO

Proteinúria é um importante marcador prognóstico para desenvolvimento de doença renal crônica (DRC). Os podócitos são células altamente especializadas e diferenciadas que recobrem os capilares glomerulares na face urinária da membrana basal glomerular e são compostos por três segmentos morfológica e funcionalmente diferentes: um corpo celular, processos principais e pedicelos, que são longas projeções citoplasmáticas. Lesão dos podócitos leva a albuminúria progressiva, no entanto, existem controvérsias em relação ao impacto da proteinúria para o agravamento do apagamento nas podocitopatias. Existem poucos estudos sobre as consequências moleculares resultantes da exposição prolongada ao overload de albumina em podócitos humanos in vitro. O objetivo do presente trabalho foi identificar alterações de expressão dos genes *PODXL* e *TRPC6* após retirada do *overload* de albumina em cultura celular de podócitos com e sem dano prévio, em condições de exposição a PAN que apresentaram alteração de expressão prévia, com o intuito de observar potencial recuperação de fenótipo. A retirada foi realizada de forma gradual e abrupta, com avaliação de expressão relativa por PCR quantitativo real-time e expressão das proteínas por Western Blot. Os resultados foram analisados com teste de ANOVA e Tukey, com $p \leq 0,05$. Houve recuperação de fenótipo para o gene *PODXL* exclusivamente na condição de retirada gradual de *overload* de 20 mg/mL tanto a nível de RNA ($p=0,631004$) quanto a nível de proteína ($p=0,237803$), em podócitos previamente expostos a PAN. Nas outras condições ainda permaneceu a diferença de expressão ($p < 0,01$) com superexpressão. Para o gene *TRPC6*, houve recuperação de fenótipo em todas as condições, a nível de RNA e de proteína ($p > 0,05$). Observou-se ainda, indicativos iniciais de possível associação entre aumento de proliferação celular nas condições de superexpressão de *PODXL* analisadas, sendo um passo inicial para uma possível relação causal entre a exposição excessiva de albumina nos podócitos, aumento de expressão de podocalixina e malignização de tecidos adjacentes.

Palavras-chave: Podocitopatias; overload de albumina; podócitos in vitro; *PODXL*, *TRPC6*, tumorigênese.

ABSTRACT

Proteinuria is characterized by increased urinary excretion of protein, which can be persistent, even in significantly reduced amounts. However, when above normal threshold, proteinuria is indicative of primary or secondary glomerular disease and of development of chronic kidney disease (CKD), consisting in a significant prognostic marker for this condition. Podocytes are highly specialized and differentiated cells that cover glomerular capillaries on the outer (urinary) side of the glomerular basement membrane. It is already known that podocyte injury leads to progressive albuminuria; however, there are controversies regarding the impact of proteinuria on the worsening of foot process effacement in podocytopathies. The aim of the present work was to identify changes in the expression of *PODXL* and *TRPC6* genes after removal of albumin overload in podocytes cell-culture with and without PAN exposure that previously have induced expression changes, to evaluate potential phenotype recovery. The withdrawal was performed both gradually and abruptly, with evaluation of relative expression by quantitative real-time PCR and protein expression by Western Blot. The results were analyzed with ANOVA and Turkey test, with $p \leq 0.05$. There was phenotype recovery for the *PODXL* gene exclusively in the condition of gradual withdrawal of 20 mg/mL overload, both at the RNA level ($p = 0.631004$) and at the protein level ($p = 0.2378032243$), in podocytes previously exposed to PAN. In the other conditions, the difference in expression ($p < 0.01$) with overexpression persisted. Furthermore, a possible association between increased cell proliferation in the conditions of *PODXL* overexpression was observed, suggesting an initial step toward a potential causal relationship between excessive albumin exposure in podocytes, increased podocalyxin expression, and malignancy of adjacent tissues.

Keywords: Podocytopathies; albumin overload; podocytes in vitro; *PODXL*, *TRPC6*, tumorigenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura da barreira de filtração e dos podócitos normais... ..	15
Figura 2: Capilar glomerular com podócitos.....	16
Figura 3: Modelo funcional da barreira de filtração glomerular.....	18
Figura 4: Abertura polimodal dos canais TRPC6 em podócitos... ..	22
Figura 5: Mecanismos de sinalização em estados de doença que podem levar ao excesso de sinalização por meio de canais TRPC6 em podócitos... ..	24
Figura 6: Estrutura da barreira de filtração glomerular (BFG) e dos podócitos com padrão característico da síndrome nefrótica (SN).....	28
Figura 7: Desenho Experimental do trabalho.....	36
Figura 8: Ciclo da reação de PCR Real Time.....	45
Figura 9: Recuperação fenotípica da expressão de transcrito de PODXL e proteína podocalixina após retirada gradual de albumina sem e com PAN.	55
Figura 10: Recuperação fenotípica da expressão de PODXL e podocalixina após remoção abrupta de albumina sem e com PAN.	56
Figura 11: Recuperação do fenótipo da expressão do gene TRPC6 e da proteína do canal do potencial receptor transitório canônico 6 (TRPC6) após retirada gradual de albumina sem e com PAN... ..	62
Figura 12: Recuperação do fenótipo da expressão do gene TRPC6 e da proteína do canal do potencial receptor transitório canônico 6 (TRPC6) após retirada abrupta de albumina sem e com PAN.	63
Figura 13: Avaliação de crescimento celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina.	67
Figura 14: Ensaio de Cristal Violeta - Avaliação de proliferação celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina.....	69
Figura 15: Ensaio de Migração.....	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Concentrações de exposição à albumina, com e sem PAN, para as quais houve alteração da taxa de transcrição dos genes <i>PODXL</i> e <i>TRPC6</i>	39
Quadro 2: Condições de exposição à albumina e a PAN para ensaio de recuperação de fenótipo, em condição de retirada gradual de albumina.....	40
Quadro 3: Condições de exposição à albumina e a PAN para ensaio de recuperação de fenótipo, em condição de retirada de albumina abrupta.....	41
Quadro 4: Preparo de Master Mix para <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher)</i>	43
Quadro 5: Programa utilizado no termociclador para PCR transcriptase reversa...	43
Quadro 6: Mix utilizado na reação de <i>Real Time – PCR</i>	45
Quadro 7: Condições utilizadas para cada proteína no gel de SDS - PAGE.	46
Quadro 8: Expressão relativa de <i>PODXL</i> após retirada gradual ou abrupta de albumina.....	53
Quadro 9: Análise de expressão de podocalixina.	54
Quadro 10: Expressão relativa de taxa de transcrito de <i>TRPC6</i>	59
Quadro 11: Análise de expressão de Canal transitório de cálcio... ..	60
Quadro 12: Avaliação de crescimento celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina.	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMD - Domínio Apical da Membrana
BFG - Barreira de Filtração Glomerular
BMD - Domínio Basal da Membrana
DCR - Doença Renal Crônica
DM - Diabetes Mellitus
FE - endotélio Fenestrado
GESF - Glomeruloesclerose segmentar focal
H - Hidrogênio
H0 - Hipótese nula
H1 - Hipótese alternativa
IRC - Insuficiência Renal Crônica
MBG - Membrana basal glomerular
mg/mL - Miligramas por mililitro
Na - Sódio
PAN - Puromicina aminoglicosídeo
SD - Diafragma de fenda
SN - Síndrome Nefrótica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Proteinúria... ..	15
1.2 Podócitos... ..	15
1.2.1. Condições “normais”... ..	15
1.2.1.1. Proteínas e genes envolvidos com a barreira de filtração glomerular (BFG).....	19
1.2.1.1.1. Gene <i>PODXL</i> e a podocalixina.	19
1.2.1.1.1.1. A Podocalixina em doença renal.....	19
1.2.1.1.1.2. A Podocalixina em linhagens celulares malignas e neoplasias.....	20
1.2.1.1.2. Gene <i>TRPC6</i> e o canal de cálcio receptor potencial transitório C... ..	21
1.2.1.1.2. 1. O canal receptor não-seletivo a cátions <i>TRPC6</i> na doença renal... ..	23
1.2.1.1.2.1.1. Variantes no gene <i>TRPC6</i> associados a formas genéticas de doença renal.	24
1.2.1.1.2.2. Formas adquiridas de doença renal associadas à desregulação dos canais <i>TRPC6</i>	26
1.2.1.1.2.3. Vias de sinalização downstream do <i>TRPC6</i> em podócitos.....	27
1.2.2. Condições alteradas nos podócitos - Podócitos e lesão... ..	28
1.3. Efeitos da albumina nos podócitos... ..	29
1.4. Resultados prévios.	30
2. JUSTIFICATIVA... ..	32
3. HIPÓTESE.....	33
3.1. Recuperação de fenótipo.....	33
3.2. Potencial tumorigênico... ..	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1 Objetivo geral... ..	34
4.2 Objetivos Específicos... ..	34
5. MATERIAL E MÉTODOS... ..	35
5.1. Cultivo celular dos podócitos.	37
5.1.1. A cultura celular de podócitos.....	37
5.1.2. Processo de descongelamento e proliferação.....	37
5.1.3. Processo de diferenciação.	38
5.1.3.1. Confirmação de diferenciação dos podócitos.	38

5.1.4. Processo de congelamento.....	38
5.2. Ensaio de recuperação de fenótipo.....	39
5.2.1. Plaqueamento.....	39
5.2.2. Exposição à PAN.	39
5.2.3. Exposição à albumina.....	40
5.2.4. Retirada de albumina.....	40
5.2.4.1. Retirada gradual.	40
5.2.4.2. Retirada abrupta.....	41
5.2.5. Avaliação de expressão relativa por PCR Real Time.....	42
5.2.5.1. Extração de RNA.	42
5.2.5.2. Síntese de cDNA.....	44
5.2.5.3. Análise de expressão relativa por Real Time PCR.....	44
5.2.6. Avaliação da expressão das proteínas por Western Blot... ..	45
5.2.6.1. Extração de proteínas.....	46
5.2.6.2. Quantificação das proteínas totais com kit BCA.	46
5.2.6.3. Ensaio de Western Blot.	46
5.2.6.3.1. SDS-PAGE.	47
5.2.6.3.2. Transferência para a membrana de PVDF.....	47
5.2.6.3.3. Imunorreação e revelação.....	48
5.3. Ensaio de transformação.	48
5.3.1. Caracterização de crescimento celular após diferenciação em temperatura não-permissiva.	49
5.3.1.1. Curva de crescimento.....	49
5.3.1.2. Marcação com cristal violeta.	49
5.3.2. Ensaio clonogênico.	50
5.3.2. Ensaio de migração.	50
5.4. Análise estatística.	50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
6.1. Recuperação de fenótipo.	53
6.1.1. Gene PODXL e proteína podocalixina.	53
6.1.2 Gene TRPC6 e o canal de Cálcio.....	59
6.2. ANÁLISE DE POTENCIAL TUMORIGÊNICO.	67
7. CONCLUSÕES.	74
8. REFERÊNCIAS.....	75

9.ANEXOS.....	90
----------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO

1.1. Proteinúria

A proteinúria é caracterizada pela excreção urinária aumentada de proteína, podendo ser um quadro persistente, mesmo em quantidade bastante reduzida, mas que quando acima do limite considerado normal constitui um importante indicativo de doença glomerular primária ou secundária e de desenvolvimento de doença renal crônica (DRC), além de servir como um importante marcador prognóstico para esta condição (1–3). Em indivíduos saudáveis, uma coleta de urina de 24 horas com mais de 150 mg de proteína é considerada patológica (2).

Na lesão glomerular, a principal proteína presente na urina é a albumina, denominada albuminúria, que decorre do comprometimento da barreira de filtração glomerular (BFG). Nesse cenário, quatro tipos celulares podem estar envolvidos nas doenças glomerulares e que podem apresentar algum dano: células mesangiais, células endoteliais, células epiteliais: podócitos parietais e viscerais. No caso das podocitopatias a lesão encontra-se nos podócitos (3).

As podocitopatias podem ter diversas causas:

1. Genéticas, sendo que nestes casos variantes em mais de 80 genes que codificam proteínas estruturais e funcionais dos podócitos já foram associadas a casos esporádicos, familiares e sindrômicos de SN congênita, infantil, na infância ou juvenil; imunológicas, onde acredita-se que haja a disfunção de células T e B;
2. Fatores circulantes no plasma que levam a um aumento de permeabilidade dos glomérulos com consequente perda de proteínas pela urina. Este último grupo recentemente foi cunhado como doença do fator circulante (CFD, do inglês “circulating factor disease”) (4).

Nesse contexto, os podócitos são células alvo das diversas condições e situações, independente do mecanismo ou causa, que levam a podocitopatias.

1.2 Podócitos

1.2.1. Condições “normais”

Os podócitos são células altamente especializadas e diferenciadas que recobrem os capilares glomerulares na face externa (urinária) da MBG e são compostos por três diferentes segmentos morfológica e funcionalmente diferentes: um corpo celular, processos principais e pedicelos, que são longas projeções citoplasmáticas (Figuras 1 e 2) (5).

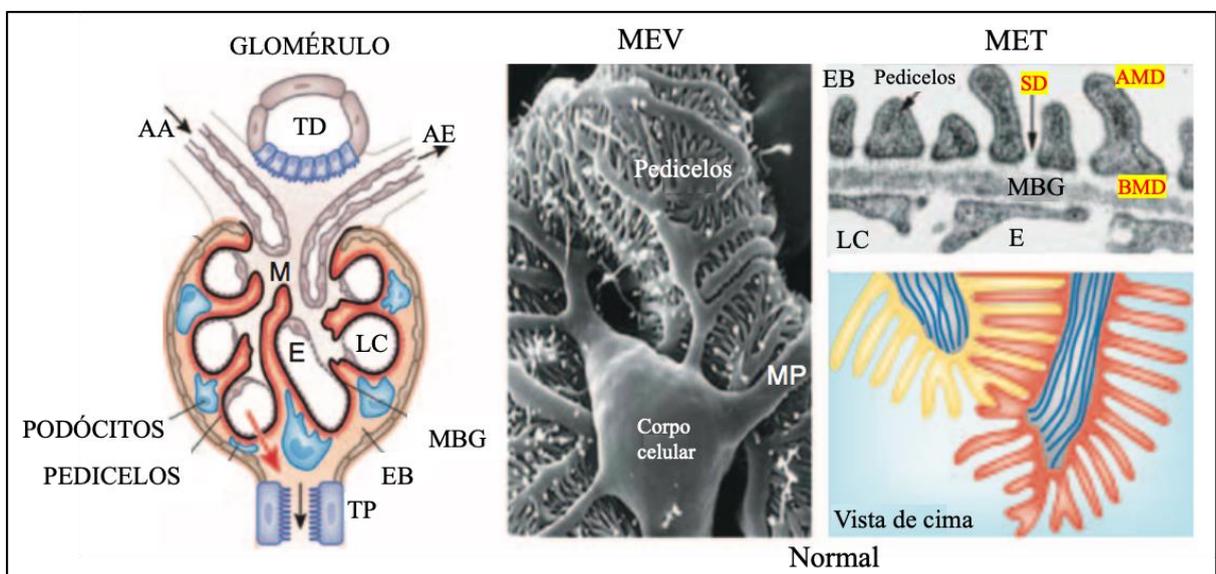


Figura 1. Estrutura da barreira de filtração e dos podócitos normais. À esquerda: tufo de capilares do glomérulo. Do lado sanguíneo da membrana basal glomerular (MBG) estão: células endoteliais glomerulares (E), lúmen capilar (LC) e células mesangiais (M). Os pedicelos recobrem a superfície urinária da MBG. A seta vermelha indica a direção da ultrafiltração do plasma. AA = arteríola aferente; TD = túbulo distal; AE = arteríola eferente; TP = túbulo proximal; EB = espaço de Bowman. **Meio:** microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a morfologia dos podócitos. MP = processos maiores dos podócitos. **À direita (acima):** Vista de cima da BFG com microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observa-se os pedicelos e seus três domínios (ressaltados em amarelo) ABD = domínio apical da membrana; SD = diafragma de fenda; BMD = domínio basal da membrana. **À direita (abaixo):** ilustração vista de cima de pedicelos normais, mostrando os feixes

paralelos de actina de dois podócitos adjacentes (vermelho e amarelo). Os microtúbulos dos MP são visualizados em azul. Adaptado de Mundel; Reiser (6).

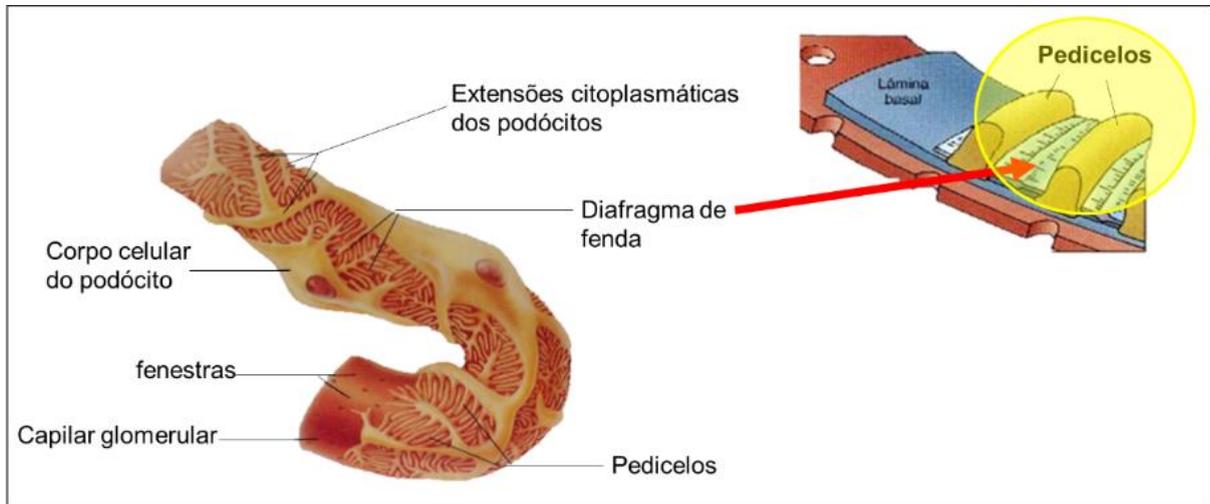


Figura 2. Capilar glomerular com podócitos. À esquerda: imagem de porção de um capilar glomerular recoberto por podócitos e seus pedicelos; à direita: ilustração da barreira de filtração glomerular (BFG), evidenciando seus pedicelos ao longo do capilar, bem como o diafragma de fenda (destaque em amarelo) que se forma entre eles e o endotélio fenestrado. Adaptado de Marieb e Hoehn, 2010 (7).

Referindo-se especificamente aos pedicelos, eles são funcionalmente divididos em três domínios: domínio apical da membrana (AMD), diafragma de fenda (do inglês, *slit diaphragm* - SD) e domínio basal da membrana (BMD), o último associado à MBG (Figura 3A). Os três domínios estão física e funcionalmente ligados entre si e ao citoesqueleto de actina dos pedicelos (8,9) (Figura 3B). Destaca-se especialmente o SD, que representa uma plataforma de sinalização que contribui para a regulação da função dos podócitos. Devido às suas posições específicas dentro das fendas de filtração, várias moléculas do domínio SD têm sido designadas como receptores de sinalização. Diversas e distintas vias de sinalização intracelular integram estes sinais de chegada dentro dos diafragmas de fenda propriamente ditos, incluindo sensação mecânica, sinalização de cálcio, sobrevivência celular, transcrição, modulação do citoesqueleto de actina, polaridade celular e endocitose (Figura 3B).

Danos em qualquer um dos três domínios dos pedicelos alteram os feixes contráteis de actina, normalmente paralelos, promovendo reorganização ativa

desses filamentos, perda do padrão normal de interdigitações causando o espessamento dos pedicelos e a consequente perda de proteína pela urina (proteinúria). Desde o início dos anos 90 até hoje foram identificadas mutações em diversos genes que codificam as proteínas importantes na manutenção da estrutura e da função do complexo de filtração glomerular (10). Estas proteínas são expressas principalmente nos podócitos e estão envolvidas direta ou indiretamente na organização dos diafragmas de fenda e do citoesqueleto de actina (Figuras 3).

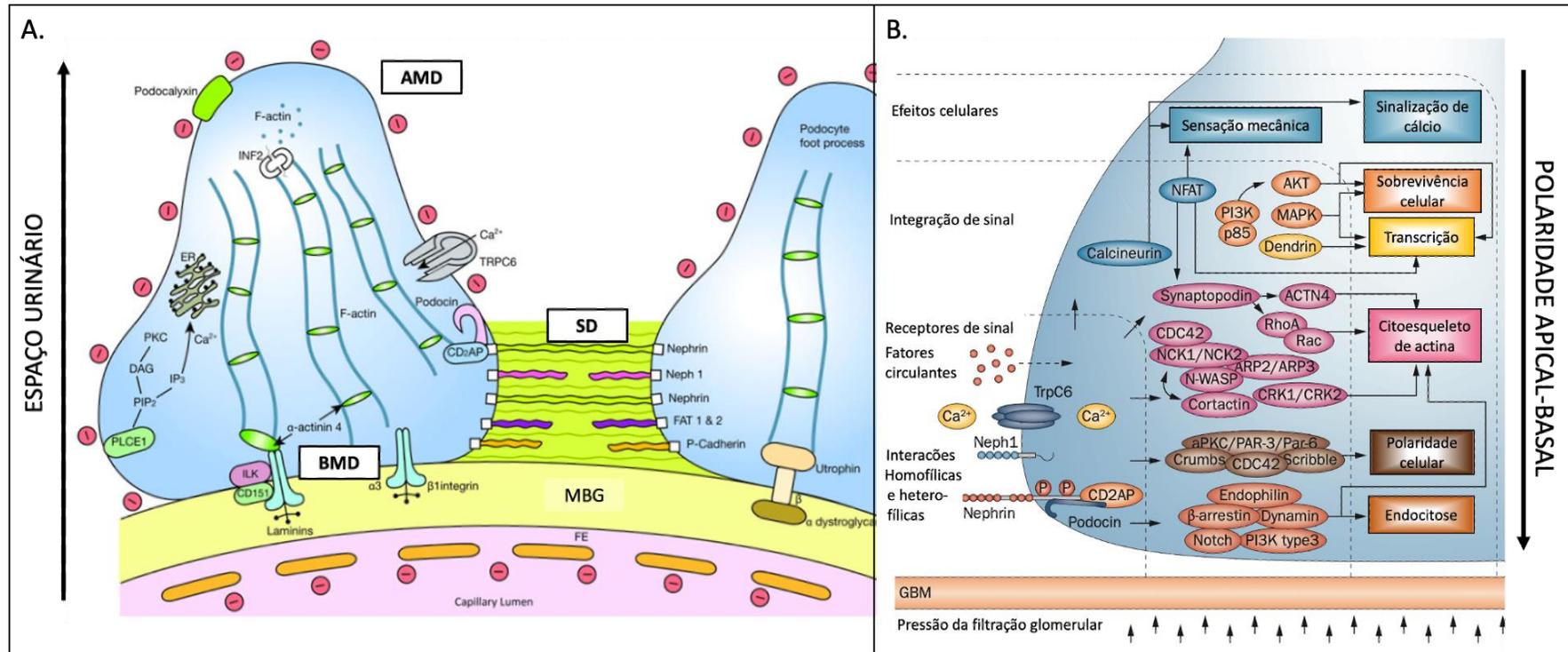


Figura 3. Modelo funcional da barreira de filtração glomerular. **A.** Na ilustração observa-se os pedicelos e seus três domínios ABD = domínio apical da membrana; SD = diafragma de fenda; BMD = domínio basal da membrana; GBM = membrana basal glomerular; MBG: membrana basal glomerular; FE: endotélio fenestrado. Adaptado de Joshi *et al.* (5). **B.** Complexidade das moléculas presentes nos três domínios dos pedicelos. Adaptado de Grahammer *et al.*(11).

Diversas proteínas estão envolvidas na manutenção da estrutura e da função do podócito e podem afetar direta ou indiretamente o rearranjo do citoesqueleto de actina. Entre elas, alguns exemplos são: nefrina (*NPHS1*), proteína associada a CD2 (*CD2AP*), proteína receptora de canal de cálcio potencial transitório 6 (*TRPC6*), α -actinina-4 (*ACTN4*), formina invertida-2 (*INF2*), podocalixina (*PODXL*), entre tantas outras, que de alguma forma estão relacionadas à manutenção da estrutura e função do citoesqueleto dos podócitos (12-14).

1.2.1.1. Proteínas e genes envolvidos com a barreira de filtração glomerular (BFG)

1.2.1.1.1. Gene *PODXL* e a podocalixina

O gene *PODXL* localiza-se no cromossomo 7q32-q33 e codifica a podocalixina, uma proteína importante no revestimento celular, situada no glicocálix responsável pela regulação da adesão e da morfologia dos podócitos e essencial para a manutenção dos diafragmas de fenda (15). A podocalixina é, também, um indicador de diversas doenças renais e ainda marcador de podócitos na urina, quando aumentado (16).

Essa proteína é uma glicoproteína transmembrana sulfatada, com domínio extracelular rico em serina, treonina e prolina, fornecendo muitos sítios potenciais de glicosilação (17). Está possivelmente envolvida, também, com o processo de impedimento de adesão dos podócitos às células parietais da cápsula de Bowman (18). Desta forma, ao atuar como anti-adesina, a podocalixina mantém a permeabilidade dos diafragmas de fenda dos pedicelos adjacentes por meio do fenômeno de repulsão de cargas (19, 20).

1.2.1.1.1.1. A Podocalixina em doença renal

No contexto da doença renal, estudos com neutralização da carga dessa proteína nos podócitos demonstraram quadro de lesão podocitária, nefrose e proteinúria maciça em camundongos, e no caso de humanos, a expressão dessa

proteína está diminuída em pacientes com diversos tipos de glomerulopatias (21, 22). Logo, os diversos estudos na área sugerem que a alteração da expressão do gene *PODXL* pode representar um mecanismo comum a diversas podocitopatias, tendo em vista a importância desse gene para a fisiologia e morfologia dos podócitos.

A porção intracelular da podocalixina interage com a proteína Ezrin e com fatores regulatórios, promovendo tráfego de proteínas, além de transporte de íons e promovendo sinalização celular. Essa interação entre essas proteínas contribui para a integridade dos podócitos, ao passo que ruptura e/ou comprometimento nessa interação podem estar envolvidos com casos de podocitopatias (23, 24). Estudos demonstram que o domínio citoplasmático da podocalixina está conectado ao citoesqueleto de actina sendo que em modelos animais com nefrose induzida por PAN esta interação da podocalixina com o citoesqueleto de actina é interrompida. A avaliação de podócitos de pacientes com doença renal, indicaram diminuição de expressão de podocalixina, podendo levar ao evento de *effacement* dos pedicelos e consequente proteinúria. No entanto, estudos avaliam a associação de alterações genéticas no *PODXL*, com danos renais, no entanto ele já foi proposto como um gene candidato a GESF, mas poucos estudos inviabilizam a análise sobre o real efeito dessa alteração na função da proteína. (25).

1.2.1.1.1.2. A Podocalixina em linhagens celulares malignas e neoplasias

Ainda, a podocalixina é expressa em diversos tipos de tecidos e alguns estudos a detectaram em linhagens celulares malignas e neoplasias (26-29). Estudo com foco em câncer gástrico, associado com expressão de *PODXL*, indicou que há correlação positiva de aumento nos níveis de mRNA em tecidos e soros de pacientes com essa condição, comparando-se os níveis de expressão do gene em tecidos normais e voluntários saudáveis (30).

Estes estudos descreveram que os pacientes com os níveis mais elevados de *PODXL* apresentaram piora em um período de 5 anos, sendo que os estudos *in vitro* indicaram que essa expressão aumentada se relacionou a progressão do tumor, uma vez que levou à proliferação celular, capacidade de formar colônias, além de permitir a cicatrização de feridas, apresentar potencial de invasão e migração (31). A

expressão alterada da podocalixina já foi relacionada, também, à leucemia mielóide aguda (LMA), em diferentes subtipos dessa condição (32). Ainda, essa correlação também já foi descrita em câncer colorretal, sobretudo ao que se refere a um indicativo de mau prognóstico de condição (33).

Um estudo de silenciamento do *PODXL*, por meio de superexpressão de miR-5100, indicou que com esse protocolo houve diminuição da migração celular e da capacidade de invasão, quando estudado câncer pancreático humano e metástase hepática, descrevendo, não apenas a relação entre a superexpressão de *PODXL* com a tumorigênese, mas também indicando que pacientes com menores taxas de transcrito apresentaram maior sobrevida pós-operatória (33). Deste modo, observa-se que há forte associação de alteração de expressão do *PODXL* com tumorigênese, seja no processo de malignização celular, como no potencial metastático, em diversos tecidos humanos.

1.2.1.1.2. Gene *TRPC6* e canal receptor não-seletivo a cátions *TRPC6* em podócitos

O gene *TRPC6*, localizado em 11q22.1, codifica a proteína canônica receptora potencial de canais de cálcio, com 105 kDa, que é membro da superfamília de receptores potenciais transitórios (TRP) de canais iônicos não-seletivos a cátions em mamíferos, sendo a subfamília TRPC (*TRPC1-TRPC7*) um grupo de canais iônicos permeáveis ao cálcio (Ca^{2+}) que são importantes para o aumento intracelular de Ca^{2+} (34-35).

O influxo de Ca^{2+} nesses canais pode ser estimulado após a ativação da fosfolipase C induzida por um receptor de tirosina quinase e receptores acoplados à proteína G (36, 37). Ainda, alguns membros dessa família, os canais *TRPC1*, *TRPC3*, *TRPC5* e *TRPC6*, podem sofrer ativação por mecanismos adicionais, tais como estresse mecânico (38-41) e oxidativo (42-45). Os vários tipos de canais TRPC possuem distribuição em diversos tecidos e funcionam como heterotetrâmeros, o que aumenta a heterogeneidade dessa família de canais sendo que já foi demonstrada a interação entre *TRPC3* e *TRPC6* no córtex renal (46). Nos rins os canais *TRPC6* já foram detectados nos glomérulos e nos ductos coletores (47). Nos podócitos estão presentes tanto nos pedicelos como no corpo celular e

parecem ter funções distintas dependendo da sub localização celular. Por exemplo, a presença de TRPC6 nos pedicelos parece ser mais relevante para regular o citoesqueleto local, enquanto a função dos canais TRPC6 no corpo celular parece ser mais crítica para a regulação da expressão gênica (48).

Em relação ao canal de Ca^{2+} TRPC6 nos podócitos, sua ativação nos domínios SD leva ao aumento de Ca^{2+} citoplasmático, o que leva à fosforilação de proteínas, tais como a nefrina, e, por sua vez, leva à transdução de sinal e ativação de fatores de transcrição e consequente regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina (49-51). A proteína TRPC6 já foi identificada interagindo fisicamente com a podocina, em complexos de sinalização nos diafragmas de fenda. Esta interação se dá entre as caudas citosólicas C-terminais da podocina e do TRPC6 e é fundamental para a ativação/"abertura" dos canais e consequente influxo de Ca^{2+} (52).

Uma propriedade importante dos canais da superfamília TRP é que quando expressos nas células, eles geralmente são multimodais, ou seja, podem se tornar ativos em resposta a vários estímulos (53) Essa ativação multimodal vem sendo amplamente estudada no caso dos canais TRPC6 em podócitos (Figura 4).

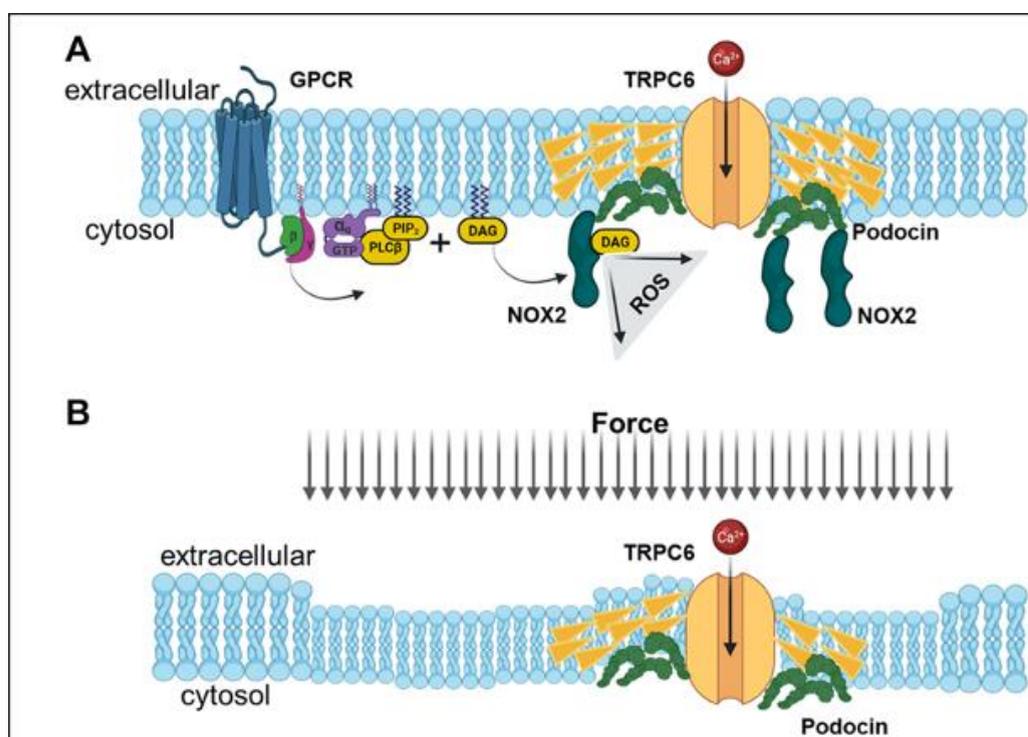


Figura 4. Abertura polimodal dos canais TRPC6 em podócitos. A. Ativação dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) levam a ativação da fosfolipase C, gerando diacilglicerol, ativação dependente de Rac-1 da NADPH oxidase NOX2, levando ao aumento localizado de espécies reativas de oxigênio (ROS) ao redor de

TRPC6. As subunidades catalíticas de NOX2 formam um complexo com a podocina e o TRPC6. Estas interações com a podocina são essenciais para a ativação do TRPC6 pelas GPCRs. **B.** Ativação dos canais TRPC6 em podócitos por estímulo mecânico, que não requer ativação de qualquer GTPase celular ou geração de ROS. A podocina funciona para suprimir a ativação dos canais TRPC6 dos podócitos por estímulo mecânico, possivelmente pela regulação da rigidez da membrana ou pela modulação das interações do complexo do canal com os elementos do citoesqueleto. A podocina possui um domínio de ligação ao colesterol e funciona como um arcabouço para manter seus parceiros de ligação dentro dos domínios “lipid-rafts” nos pedicelos. Figura retirada de Anderson et al., 2013 (52)

1.2.1.1.2. 1. O canal receptor não-seletivo a cátions TRPC6 na doença renal.

Existem múltiplos mecanismos de sinalização que controlam os níveis intracelulares de Ca^{2+} nos podócitos e que convergem para canais iônicos expressos nos podócitos. Os canais TRPC6 são os mais bem estudados no contexto de sinalização de Ca^{2+} podócitos. A Figura 5 mostra algumas das vias de sinalização que controlam a expressão e atividade do TRPC6 nos podócitos. Muitos destes fatores têm sido implicados a formas genéticas e/ou adquiridas de doenças glomerulares.

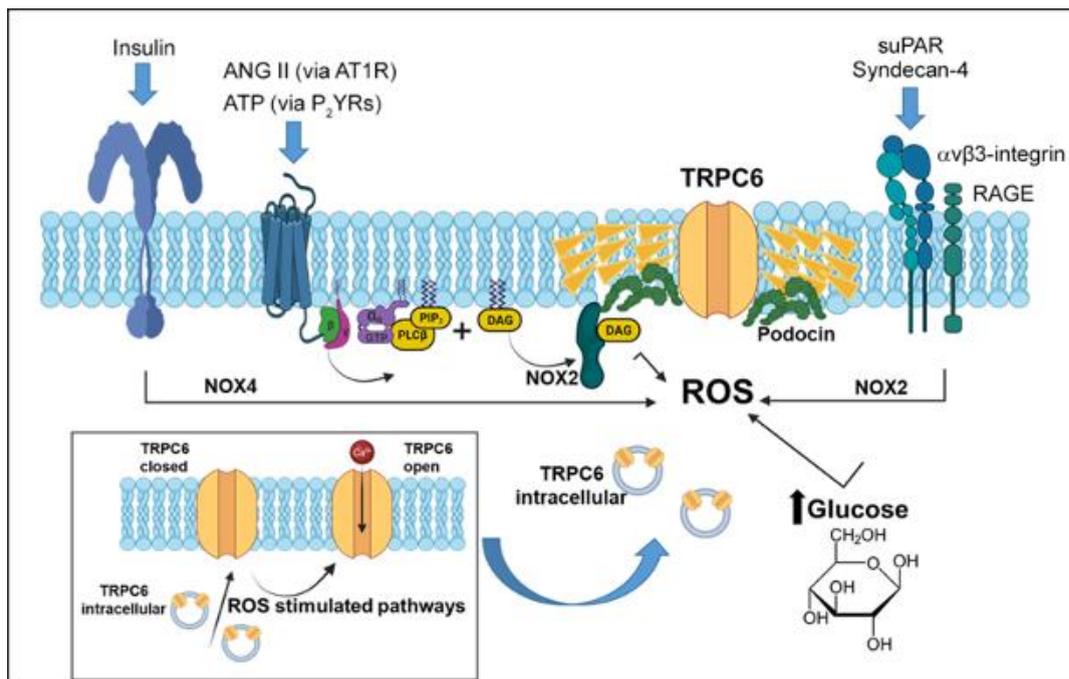


Figura 5. Mecanismos de sinalização em estados de doença que podem levar ao excesso de sinalização por meio de canais TRPC6 em podócitos. Fatores de permeabilidade circulantes tais como o suPAR podem se ligar a integrina $\alpha\beta3$, acionando a geração de aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e estimulando o tráfego de canais TRPC6 para a superfície celular. Esse efeito ocorre dentro de 6 a 24 horas. Um efeito similar pode ser observado em podócitos expostos a concentrações elevadas de glicose. A elevação constante por meio de uma via metabotrópica (não-iônica, por neurotransmissores) por meio de receptores de angiotensina II (ANG II), os receptores AT1 ou P2Y, também pode causar hiperativação crônica de TRPC6. As ROS possuem papel crítico na ativação de TRPC6 por meio dos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) e estimulam tanto o tráfego como a abertura dos canais TRPC6, como pode ser visualizado no aumento abaixo à esquerda. Figura retirada de Anderson et al., 2013 (52)

1.2.1.1.2.1.1. Variantes no gene *TRPC6* associados a formas genéticas de doença renal

Em 2005 foram publicados os primeiros trabalhos associando a variante de ganho de função p.Pro112Gln, identificada em heterozigose no gene *TRPC6* com desenvolvimento tardio de SN e GESF (55,56). Variantes patogênicas no gene *TRPC6* podem suprimir as interações entre as proteínas TRPC6 e outras proteínas

do domínio SD, incluindo a nefrina (57) e a podocina (58). Em sua maioria correspondem a variantes de ganho de função, sendo associadas com SN de início na adolescência ou fase adulta, com manifestação dos sintomas variando entre os 17 e os 52 anos de idade (59,60,61) e foi sugerido um mecanismo do tipo “*second hit*” para o desenvolvimento da SN na fase adulta (62). A maioria dos indivíduos com variantes no *TRPC6* progride para insuficiência renal e transplante, sem recidiva pós-transplante. Estas variantes afetam geralmente os domínios intracelulares N e C-terminais.

Nesses casos de variantes de ganho de função existem hipóteses sobre o mecanismo fisiológico e patofisiológico nos podócitos, sendo que alguns mecanismos de como a desregulação do *TRPC6* possa causar GESF já foram propostos, apesar de ainda não estarem completamente compreendidos. Supõe-se que o aumento de íons Ca^{2+} parece modificar e interferir na modulação do citoesqueleto de actina dos pedicelos o que pode alterar a atividade dos podócitos ainda, esse aumento também foi associado a apoptose dos podócitos, desprendimento ou falta de proliferação o que resultaria em GESF (56).

Embora os estudos iniciais descreveram variantes que causavam início na idade adulta da doença, agora já se sabe que pelo menos algumas variantes causam início precoce, sendo algumas variantes de perda de função (51, 69-71). A maioria dessas variantes são missense em heterozigose descritas em crianças em casos esporádicos de síndrome nefrótica córticoresistente (72) o que indica que ao menos um nível basal de atividade do *TRPC6* pode ser necessário para manter a função glomerular normal, sendo especificamente importante na primeira infância.

No caso das variantes de perda de função o mecanismo não é bem compreendido, mas pode ser o bloqueio do tráfego dos canais para a superfície celular ou a sinalização dos canais para vias de degradação. A variante p.Gli757Asp, por exemplo, é capaz de suprimir a formação de canais ativos quando co-expressa de forma heteróloga com canais *TRPC6* selvagens, o que sugere um efeito dominante-negativo (73).

Em casos de diminuição de expressão, existem relatos que essa redução estaria associada com um mecanismo de defesa e recuperação do podócito, mecanismo muito utilizado por medicamentos (74), sendo que a inibição do *TRPC6*

poderia ser um fator de proteção dos podócitos a afecções renais, como por exemplo, a doença renal diabética (74).

1.2.1.1.2.2. Formas adquiridas de doença renal associadas à desregulação dos canais TRPC6

Existem diversas evidências de que os canais TRPC6 estejam envolvidas nos mecanismos patofisiológicos das formas adquiridas de GESF (75-77) Pacientes com doenças glomerulares adquiridas, tais como GESF e glomerulonefrite membranosa apresentam aumento na taxa de transcrito e nas proteínas de TRPC6 dentro dos glomérulos (75.). No modelo animal de ratos com GESF por PAN, também há aumento glomerular de TRPC6 (76, 78).

Existem evidências de experimentos *in vitro* de que fatores de permeabilidade circulantes possam ativar e desregular os canais TRPC6, sendo como causa de GESF adquirida. Desta forma, amostras de plasma coletadas de pacientes com GESF foram expostas em podócitos imortalizados *in vitro*, e foi demonstrada a ativação de vias de sinalização por integrina, bem como a alteração dinâmica e da motilidade do citoesqueleto, além de alterarem profundamente o tráfego de proteínas dos diafragmas de fenda (79-81).

Além disto, após exposição de podócitos *in vitro* a amostras de plasma e soro de pacientes com GESF e com recidiva pós-transplante, houve aumento marcante da expressão dos canais de TRPC6 na superfície dos podócitos. Na maioria das amostras testadas, esse aumento de expressão de TRPC6 foi acompanhada de diminuição de expressão da podocina, que é inicialmente internalizada e degradada nestas condições. (76).

Outro mecanismo de lesão renal é causado pela desregulação dos canais TRPC na Diabetes Mellitus e hiperglicemia. Nestes casos, o efeito da glicose elevada em podócitos demonstrou aumento da atividade dos canais TRPC6 por meio de aumento de produção de ROS (76, 82).

Parte do efeito da hiperglicemia na expressão dos canais TRPC6 *in vivo* é causada pela angiotensina II (ANG II), que causa ativação de TRPC6 dependente de

ROS e que, por sua vez, aumenta a expressão de TRPC6 por meio de cascatas de calcineurina-NFAT (do inglês, “Nuclear factor of activated T cell”) (82).

1.2.1.1.2.3. Vias de sinalização *downstream* do TRPC6 em podócitos

A ativação excessiva dos canais TRPC6 parece sinalizar para a patologia dos podócitos por múltiplas vias *downstream* em diferentes compartimentos intracelulares, sendo que a maioria parece ocorrer de forma secundária ao aumento de influxo de Ca^{2+} . Os mecanismos *downstream* da ativação do TRPC6 nos corpos celulares são diferentes daqueles que ocorrem nos pedicelos. A via mais bem estudada é aquela que ativa a calcineurina, que, por sua vez, ativa os fatores de transcrição NFAT e as vias MAP/ERK quinases nos corpos celulares dos podócitos (83-85). Essa via leva a alteração da expressão gênica, incluindo a do próprio TRPC6 (86). Já nos pedicelos, os efeitos da ativação da calcineurina podem levar a modulação no citoesqueleto de actina por meio de efeitos na sinaptopodina, o que leva a modulação das Rho-GTPases (87-89).

1.2.2. Condições alteradas nos podócitos - Podócitos e lesão

Os podócitos são células terminalmente diferenciadas, ou seja, pós mitóticas, sendo a que a essas células respondem ao estresse modificando morfologicamente, com perda de interdigitação dos pedicelos, conhecido como *effacement*, sendo esse um resultado de disfunção na ligação entre a MBG e os pedicelos, que promove rearranjo do citoesqueleto de actina (62). Esse processo ocorre em dois momentos (63):

- 1) Perda do padrão interdigitado, com retração de projeções e substituição do SD por junções ocludentes, entre os pedicelos.
- 2) Apagamento com maior retração dos pedicelos, o que forma projeções achatadas em forma de disco recobrimdo a MBG. (Figura 6).

Com relação a possíveis causas dessa lesão, Okamura *et al*, 2013 (64) demonstraram que podócitos expostos a níveis de albumina similares ao do ultrafiltrado de pacientes com proteinúria, em decorrência de síndrome nefrótica (SN), apresentaram aumento da morte celular, com regulação positiva das vias pró

apoptóticas e das citocinas inflamatórias. Ainda, glomérulos isolados de camundongos com SN também apresentaram aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias, demonstrando que a exposição prolongada à albumina é prejudicial aos podócitos, contribuindo para a perda progressiva de podócitos observada na doença renal.

Já se sabe que lesão podocitária contribui para albuminúria progressiva e que, inclusive, a lesão pode ser quantificada pela albuminúria (65,66). No entanto, ainda permanece obscuro se a albuminúria é uma consequência do dano ou se é um agravante em potencial da podocitopatia.

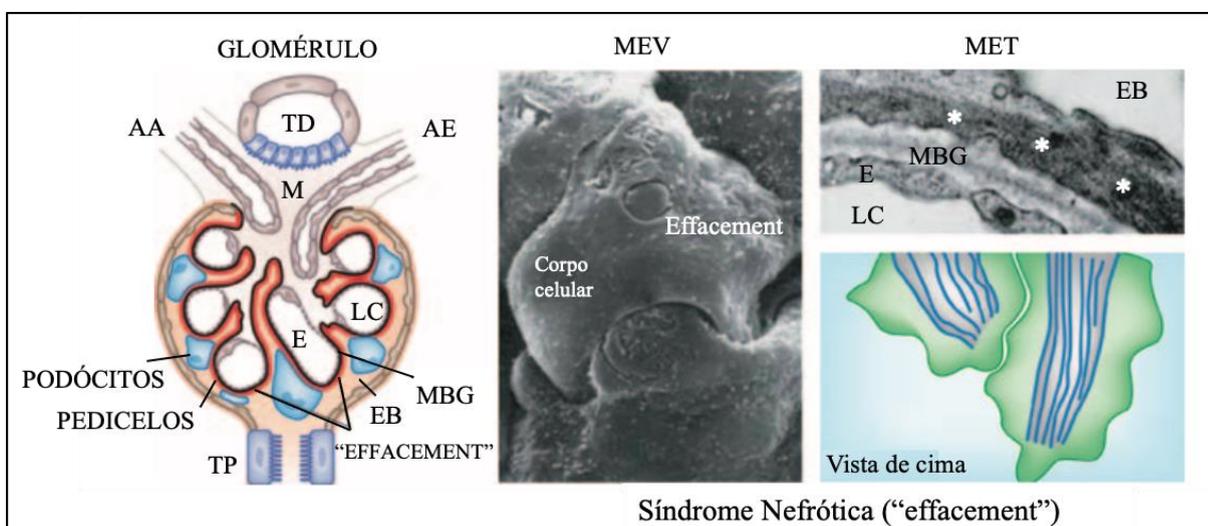


Figura 6. Estrutura da barreira de filtração glomerular (BFG) e dos podócitos com padrão característico da síndrome nefrótica (SN). À esquerda: Na SN, os pedicelos perdem seu padrão de interdigitações e mostram-se com *effacement*. MBG = membrana basal glomerular; E = células endoteliais; LC = lúmen capilar; M = células mesangiais; AA = arteríola aferente; TD = túbulo distal; AE = arteríola eferente; TP = túbulo proximal; EB = espaço de Bowman. **Meio:** Perda da citoarquitetura normal e bordas celulares com *effacement* (MEV = microscopia eletrônica de varredura). **À direita (acima):** *effacement* com uma banda contínua de citoplasma e banda densa de filamentos de actina curtos identificados pelos asteriscos (*) (MET). **À direita (abaixo):** vista de cima evidenciando *effacement*, i.e., perda do padrão de interdigitação dos pedicelos. Banda contínua de citoplasma, preenchida com filamentos de actina reorganizados (verde). Adaptado de Mundel, Reiser (6).

No desenvolvimento normal dos podócitos, estes passam por um processo de transição mesênquima-epitélio (do inglês, MET), o que permite que eles apresentem sua estrutura e função na filtração glomerular (67). No entanto, já é conhecido que eventos diversos, como estresse podem levar esse processo ocorrer de maneira reversa, ou seja, podócitos maduros se desdiferenciar, levando a formação de uma transição epitélio mesênquima (do inglês, EMT), com perda de características funcionais e estruturais dessas células, além de alteração de expressão de proteínas e do diafragma de fenda, sendo que essa transição reversa pode ser caracterizada em 3 tipos, sendo um deles associados à metástase e/ou progressão do câncer (63).

1.3. Efeitos da albumina nos podócitos

A albumina corresponde a 50 % da proteína presente no soro e é essencial para manter a pressão osmótica do plasma, sendo que quando ocorre alguma ruptura ou alteração no mecanismo de filtração glomerular, ocorre perda de proteína na urina, levando ao quadro de proteinúria, afetando podócitos, seus pedicelos e o diafragma de fenda. Nesse contexto, a endocitose podocitária de proteínas presentes no filtrado glomerular é um mecanismo presente em pacientes com proteinúria (69), podendo levar a um acúmulo de albumina desencadeando uma possível disfunção podocitária por meio de via dependente de TGF-B1 (70,71).

Logo, a relação entre podócitos, podocitopatias e albumina ainda parece um processo que necessita de estudos e maiores conhecimentos; no que se refere a diabetes, por exemplo, existem diversos fatores associados nesse processo, que ainda não tem compreensão clara em nível molecular, mas indica um processo degenerativo no diafragma de fenda, que leva a um escape de albumina, levando a lesão nos podócitos, e ocasionando a perda dessas células como um evento secundário (72).

Níveis elevados de albumina na urina são descritos como fatores de sobrecarga para absorção e metabolização que ocorrem nos túbulos renais, o que pode ocasionar diversas condições com processos inflamatórios, glomeruloesclerose, fibrose e atrofia tubular, sendo que a albuminúria, é descrita, também como reflexo dessa disfunção, ou seja, podendo ser causa ou consequência da lesão renal (74).

Entre os estudos realizados com *overload* de albumina em cultura celular de podócitos *in vitro*, destacam-se estudos com achados de alteração em vias relacionadas à inflamação, estresse de retículo, apoptose, proliferação, diferenciação celular e rearranjo do citoesqueleto (46, 50, 101, 106, 113). Abbate *et al.* (2002)(70) observaram aumento de expressão do fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e interrupção da expressão da proteína de diferenciação, sinaptopodina, após *overload* de 10 mg/mL por até 48 horas de albumina em podócitos de camundongos *in vitro*; Morigi *et al.* (2005)(102), por sua vez, expuseram o mesmo tipo de cultura celular de podócitos à concentração de 10 mg/mL por até 24 horas, e mostraram ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e consequente redistribuição das fibras de F-actina; Yoshida *et al.* (2008)(71), após exposição à 10 mg/mL por até 24 horas de albumina, observaram ativação da cascata de fosforilação TGF- $\beta 1$ /p38 MAPK e consequente apoptose. He *et al.* (2011)(100,101) observaram que, após *overload* de albumina em diversas concentrações 0, 5, 10, 20, 40 mg/mL e em diversos tempos, 24h, 48h, 72h e 96h, induziram o estresse de retículo endoplasmático e apoptose, por meio da possível entrada de cálcio via *TRPC6* (maior efeito com 20 mg/mL após 48 e 72 h) e da regulação da proteína *CD2AP* (maior efeito com 40 mg/mL por 24 h), respectivamente. Okamura *et al.* (2013) (64) avaliou aumento de moléculas inflamatórias tais como interleucina-1 (IL-1), NF- κ B, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6, além das moléculas pró-apoptóticas caspase 3/7, após exposição de podócitos HUPECS (células epiteliais tipo podócito derivadas de urina humana) a 5 e 10 mg por 24 e 48 horas. Mais recentemente, Gonçalves *et al.* (2018) (102) avançaram no conhecimento da via intracelular de indução de injúria mediada pelo estresse de retículo após *overload* de 1, 5 e 10 mg de albumina em podócitos *in vitro* por 24 horas e demonstraram aumento da regulação da via da proteína delta quinase C (PKC- δ), p38 MAPK e caspase 12.

1.4. Resultados prévios

Anteriormente, foi realizado estudo com avaliação de alteração de expressão de *PODXL* e *TRPC6*, em cultura de podócitos *in vitro*, com exposição prévia a *overload* de albumina e com exposição ou não a PAN.

Os podócitos utilizados, foram os imortalizados e condicionalmente por Saleem et al, 2002 (112), de modo que a expressão de proteínas e características de podócitos maduros ocorre em exposição de 10 dias a 37° C, sendo comprovado com IC com marcação de proteínas como Sinaptopodina, Nefrina e Podocina. As exposições foram feitas utilizando concentrações de albumina e 0,03,6,9,12,15,18,20,30 e 40 mg/mL de albumina, por 24 horas, seguindo com avaliação de IC, Expressão relativa por PCR - *Real Time*, e *Western Blot*.

As avaliações indicaram que, após *overload* progressivo de albumina em podócitos *in vitro*, com e sem exposição prévia à droga nefrotóxica puromicina aminoglicosídeo (PAN), os resultados indicaram aumento significativo da taxa de transcrito do gene *PODXL* na concentração de 40 mg/mL de albumina sem PAN, e nas condições de 20 e 40 mg/mL com PAN; no caso do gene *TRPC6*, os dados foram conflitantes, já que no grupo sem dano (sem PAN) houve redução significativa do conteúdo de transcrito (em todas as condições com albumina, de 3 a 40 mg/mL), sendo que no grupo com dano (PAN) houve aumento na concentração de 20 e 40 mg/mL de albumina. Neste estudo anterior, no entanto, não foi avaliado se houve recuperação do dano após retirada do *overload* excessivo de albumina, o que seria importante para observar se os danos são irreversíveis ou se há possibilidade de recuperação e reversão do dano. Desta forma, neste trabalho foi realizada a retirada da albumina, tanto abrupta, quanto gradual, com o objetivo de observação da recuperação do fenótipo.

2. JUSTIFICATIVA

A proteinúria persistente, não responsiva às medidas terapêuticas da doença de base ou de medicações antiproteinúricas corresponde ao principal fator de associação a DRC (65), e como os mecanismos que levam a essa doença podem depender, tanto dos processos patogênicos da doença de base que não puderam ser revertidos pela terapêutica, como possivelmente acrescidos dos efeitos deletérios da própria proteinúria (90), avaliações associadas a este cenário são de grande valia para pacientes, médicos e comunidade científica.

Ainda, considerando as controvérsias existentes na literatura com relação ao impacto da proteinúria como fator de agravamento do “apagamento” dos pedicelos que é, inclusive, considerado por alguns pesquisadores como uma adaptação morfológica dos podócitos, um mecanismo para aumentar a sua adesão à MBG e evitar o destacamento destas células da MBG, observado nas doenças glomerulares (17,90), e que estudos existentes, no entanto, não esclareceram de forma definitiva as consequências moleculares do *overload* de albumina em podócitos humanos *in vitro*, bem como, estes não avaliaram proteínas expressas nos domínios apical e basal da membrana, nem o efeito da regressão do *overload* de albumina e reversão do fenótipo para algumas vias já analisadas, há necessidade de avaliações como a estabelecida neste trabalho, como forma de iniciar esclarecimentos sobre o tema.

Com relação à podocalixina, além do seu papel nos podócitos, esta proteína é expressa em diversos tipos de tecidos e alguns estudos a detectaram em linhagens celulares malignas e neoplasias, desde linhagens celulares de câncer de cólon, mama e próstata, como carcinomas de mama, fígado, pâncreas, tireoide, em leucemia aguda e, inclusive, em tumores renais (46, 94-96), Desta forma, nesse projeto foi incluída a análise do potencial de invasivo e migratório dos podócitos para investigação da transformação e malignização dos podócitos, que eventualmente poderiam ser causados em decorrência do aumento do conteúdo de transcrito do gene *PODXL* após suplementação de albumina.

3. HIPÓTESE

3.1. Recuperação de fenótipo

Adotou-se como hipótese que após a retirada das concentrações de albumina nos podócitos, será possível observar recuperação de fenótipo dos podócitos. Sendo assim consideramos:

- 1) Hipótese nula (H0) – sem diferença de fenótipo.
- 2) Hipótese alternativa (H1) – com diferença de fenótipo.

3.2. Potencial tumorigênico

Adotou-se como hipótese que, após o overload de albumina nas condições de 20 e 40 mg em grupo de podócitos sem dano e em grupo de dano com puromicina aminoglicosídeo (PAN), as células devem apresentar alteração de padrão celular, com indicativos de transformação e potencial tumorigênico.

Sendo assim consideramos:

- 1) Hipótese nula (H0) – sem potencial tumorigênico, sem transformação
- 2) Hipótese alternativa (H1) – com potencial tumorigênico, com transformação

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi avaliar alterações de expressão dos genes *PODXL* e *TRPC6* após retirada do *overload* de albumina em cultura celular de podócitos com e sem dano prévio. E avaliar aspectos de transformação maligna de podócitos em condições de aumento de expressão de *PODXL* associada a *overload* de albumina.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a expressão do gene *PODXL* após retirada do *overload* de albumina em cultura celular de podócitos, na concentração de 40 mg/mL sem dano prévio, e nas concentrações de 20 e 40 mg/mL com dano prévio.
2. Avaliar a expressão do gene *TRPC6* após retirada do *overload* de albumina em cultura celular de podócitos, nas concentrações de 3, 20 e 40 mg/mL sem dano prévio, e nas concentrações de 20 e 40 mg/mL com dano prévio.
3. Avaliar o potencial tumorigênico de alteração de expressão de *PODXL*, frente ao *overload* de 40 mg de albumina sem dano e de 0, 20 e 40 mg/mL com dano.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos e análises realizados neste estudo, tiveram como base os resultados obtidos durante o mestrado (108), sendo uma sequência das análises e observações realizadas. Sendo assim, o desenho experimental adotado segue com duas análises, conforme figura 7:

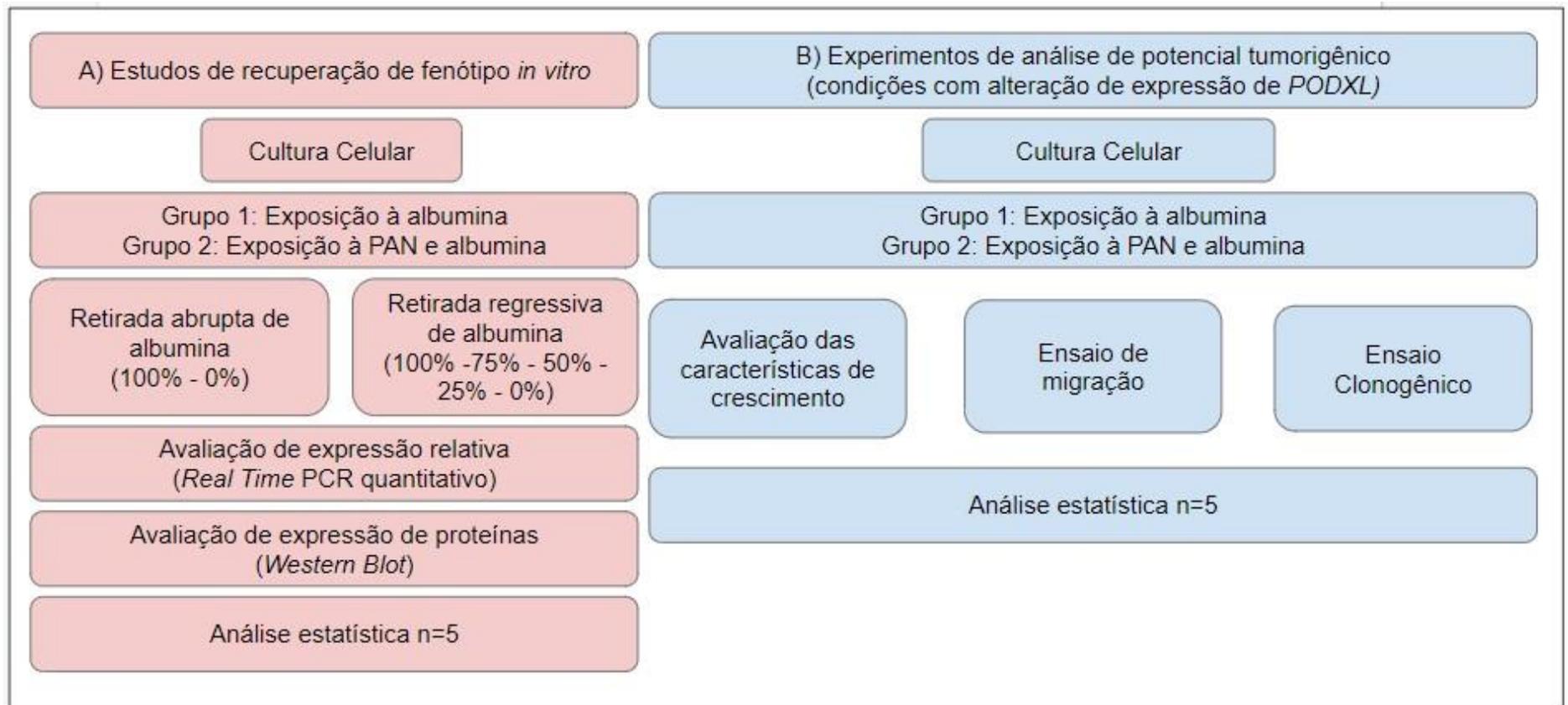


Figura 7. Desenho Experimental do trabalho. A. Estudos para a avaliação da possibilidade de recuperação de fenótipo *in vitro* em condições de overload de albumina e exposição a PAN. B. Estudos para avaliação de possibilidade de transformação maligna dos podócitos em condições de alteração de expressão de *PODXL*, previamente avaliados em estudo do mestrado (108).

5.1. Cultivo celular dos podócitos

5.1.1. A cultura celular de podócitos

Podócitos condicionalmente imortalizados por Saleem et al, 2002 (112), foram utilizados em cultivo. Os podócitos *in vivo* são células terminalmente diferenciadas, ou seja, não se dividem, portanto, não sofrem mitose (91). Portanto, para o cultivo *in vitro* dos podócitos, foi necessária a imortalização dessa linhagem celular, um protocolo que utilizou a transfecção de um gene promotor SV-40 sensível à temperatura, de forma que os podócitos *in vitro* proliferam à 33°C (temperatura permissiva), quando assumem um formato de poliedro ("*cobblestone*"), e estão na fase "indiferenciada". Já, quando expostos à temperatura de 37°C (temperatura não-permissiva), os podócitos passam para um estado de quiescência e se diferenciam, projetando seus longos prolongamentos e expressando proteínas tais como a nefrina, podocina, sinaptopodina, que estão presentes em podócitos maduros *in vivo*.

Esse padrão de diferenciação foi evidenciado e comprovado em estudo prévio, com marcação dessas proteínas de podócitos maduros, como confirmação da finalização do processo de diferenciação celular (108).

No presente estudo, foi utilizada linhagem celular de podócitos condicionais imortalizados AB8/13, doados pelo Professor *Dr. Moin Saleem, Bristol University, UK* (AB - anonimato do paciente; 8 - construção tsSV40; 13 - gene da enzima transcriptase reversa da telomerase hTERT). Foram utilizados podócitos armazenados em nitrogênio líquido, em tubos criogênicos, devidamente identificados, com passagens entre 14 a 23.

5.1.2. Processo de descongelamento e proliferação

No processo de descongelamento dos podócitos, eles foram retirados do nitrogênio líquido, e ficaram 2 minutos em TA, sendo posteriormente centrifugados por 5 minutos a TA em 1200 rpm, para retirada de meio de congelamento. Por fim foram acondicionados em garrafa de cultura celular contendo meio RPMI 1640 +10% de soro fetal bovino (FBS) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) e incubados em estufa com temperatura de 33°C e 5% de CO₂, por 48 horas.

A cada 48 horas o meio foi trocado até o momento que as células atingissem 90% de confluência na garrafa, sendo então transferidas para uma maior (repique/passagem). Nesse processo, as células foram desprendidas do fundo da garrafa em que estavam aderidas, com auxílio da enzima tripsina (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*), com ação durante 5 minutos a 33°C, sendo sua inativação realizada com o dobro do volume de enzima utilizado, de meio RPMI 1640 + 10% de FBS. Posteriormente foi realizada a centrifugação da solução durante 5 minutos a TA em 1200 rpm. O meio foi retirado e o pellet de células ressuspendido em meio 5 minutos a TA em 1200 rpm, com o volume da nova garrafa, sendo então as células repassadas para a nova garrafa.

Esse processo sucedeu-se até que o número desejado de células fosse obtido, sendo possível congelar parte das células e seguir com os experimentos.

5.1.3. Processo de diferenciação

Após a etapa de proliferação as células foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂, de modo a iniciar o processo de diferenciação dessa linhagem celular, que se completou de 10 a 14 dias, sendo o momento de início dos experimentos de recuperação de fenótipo e de potencial tumorigênico.

5.1.3.1. Confirmação de diferenciação dos podócitos

A confirmação do processo de diferenciação dos podócitos diante do protocolo proposto, foi realizado em experimentos de padronização prévios, realizados durante o mestrado (114), havendo a confirmação de diferenciação após incubação em temperatura de 37°C durante o período mínimo de 10 dias.

5.1.4. Processo de congelamento

A parte de células que não foi utilizada em cada passagem ou experimento, foi congelada após o processo de tripsinização e contagem, em meio de congelamento com RPMI 1640 + 10% FBS + 10% DMSO, em tubo criogênico com 1 mL de volume, sendo inicialmente armazenadas à -80°C e após 24 horas foram armazenados em nitrogênio líquido.

5.2. Ensaio de recuperação de fenótipo

5.2.1. Plaqueamento

Os podócitos indiferenciados, foram plaqueados em placas contendo de 12 ou 24 poços, sendo sempre plaqueadas 5×10^4 células/mL. A contagem das células foi realizada após a tripsinização e centrifugação, sendo os podócitos ressuspensos em 1 mL de meio RPMI 1640 + 10% FBS. Foi realizada a diluição de 1:10, totalizando 20 μ L de solução de contagem, preparadas em câmara de *Neubauer*, com contagem de 4 quadrantes e realizada média e determinação do número de células (N):

$$N = \text{contagem dos 4 quadrantes} / 4 \times \text{fator de diluição (10)} \times 10000$$

Foram então plaqueadas as células de acordo com a contagem, sendo realizada a troca de meio a cada 48 horas. Após o plaqueamento com o número estabelecido, assim que as células atingiram a confluência de 40% por well (aproximadamente de 36 a 48 horas), a temperatura da estufa foi alterada para 37°C (não-permissiva) iniciando o processo de diferenciação de 10 a 14 dias.

5.2.2. Exposição à PAN

A droga puromicina aminoglicosídeo (PAN) foi utilizada como agente de lesão podocitária, um modelo já bem estabelecido de SN em roedores (72–81). PAN induz proteinúria maciça em roedores alguns dias pós-injeção, associada a alterações ultraestruturais similares às descritas em SN (92–94). Em podócitos *in vitro*, exposição a PAN fosforila e ativa a ERK, induzindo podócitos à apoptose (95,96).

Desta forma, PAN induz proteinúria maciça e mimetiza doença de lesões mínimas após uma única injeção em ratos, e GESF após múltiplas injeções (97). Achados patológicos semelhantes foram identificados em condições *in vitro*, apoiando o uso do modelo de cultura celular com PAN como estratégia para estudo de proteinúria (103). Utilizamos concentração e tempo de exposição à PAN pré-estabelecidos para simular dano nos podócitos *in vitro* (95,96).

Após 10 dias de diferenciação a 37°C, os podócitos que compuseram o grupo de tratamento prévio com PAN, foram expostos a 10 μ M/mL de inibidor da via ERK

(U0126) por 30 minutos e à 24 µg/mL PAN por 12 horas, promovendo o processo de dano, valores estabelecidos em estudo prévio (98) e com base nos experimentos de Rigother *et al.*, 2016 (85).

5.2.3. Exposição à albumina

Os podócitos foram expostos inicialmente por 24 horas à diferentes concentrações de albumina, concentrações essas estabelecidas de acordo com os resultados prévios encontrados durante a realização do mestrado (114) conforme Quadro 1.

Quadro 1: Concentrações de exposição à albumina, com e sem PAN, para as quais houve alteração da taxa de transcrito dos genes *PODXL* e *TRPC6*.

Gene	PAN	Concentração de exposição
<i>PODXL</i>	NÃO	0 e 40 mg de albumina a cada mL
<i>PODXL</i>	SIM	0, 20 e 40 mg de albumina a cada mL
<i>TRPC6</i>	NÃO	0,3, 20 e 40 mg de albumina a cada mL
<i>TRPC6</i>	SIM	0, 20 e 40 mg de albumina a cada mL

5.2.4. Retirada de albumina

Com a finalidade de analisar a possibilidade de recuperar o fenótipo frente às alterações de expressão identificadas após exposição à albumina, foi elaborado um processo de retirada das concentrações de albumina em dois processos, um deles, retirada parcial gradual e retirada abrupta.

5.2.4.1. Retirada gradual

A retirada de albumina na condição de recuperação gradual, foi realizada de modo que a cada 24 horas foi retirado 25% do valor inicial de albumina adicionado em cada condição, conforme Quadro 2.

Quadro 2: Condições de exposição à albumina e a PAN para ensaio de recuperação de fenótipo, em condição de retirada gradual de albumina.

Condição da amostra		Concentração de albumina mg/ml				
Gene	PAN	Início	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<i>PODXL</i>	Não	0	0	0	0	0
<i>PODXL</i>	Não	40	30	20	10	0
<i>PODXL</i>	Sim	0	0	0	0	0
<i>PODXL</i>	Sim	20	15	10	5	0
<i>PODXL</i>	Sim	40	30	20	10	0
<i>TRPC6</i>	Não	0	0	0	0	0
<i>TRPC6</i>	Não	3	2,25	1,5	0,75	0
<i>TRPC6</i>	Não	20	15	10	5	0
<i>TRPC6</i>	Não	40	30	20	10	0
<i>TRPC6</i>	Sim	0	0	0	0	0
<i>TRPC6</i>	Sim	20	15	10	5	0
<i>TRPC6</i>	Sim	40	30	20	10	0

Ao final desse processo foi realizada a extração de RNA total.

5.2.4.2. Retirada abrupta

A retirada de albumina na condição de recuperação abrupta foi realizada de modo que após 24 horas de exposição às condições estabelecidas no Quadro 3, foi realizada a retirada total da albumina, ficando todos os poços com células expostos a 0 mg/mL de albumina por 24 horas seguida de extração de RNA total.

Quadro 3: Condições de exposição à albumina e a PAN para ensaio de recuperação de fenótipo, em condição de retirada de albumina abrupta

Condição da amostra		Concentração de albumina mg/ml	
Gene	PAN	Início	24 horas
<i>PODXL</i>	Não	0	0
<i>PODXL</i>	Não	40	0
<i>PODXL</i>	Sim	0	0
<i>PODXL</i>	Sim	20	0
<i>PODXL</i>	Sim	40	0
<i>TRPC6</i>	Não	0	0
<i>TRPC6</i>	Não	3	0
<i>TRPC6</i>	Não	20	0
<i>TRPC6</i>	Não	40	0
<i>TRPC6</i>	Sim	0	0
<i>TRPC6</i>	Sim	20	0
<i>TRPC6</i>	Sim	40	0

5.2.5. Avaliação de expressão relativa por *PCR Real Time*

Para a avaliação da taxa de expressão relativa de RNA, diante das condições de exposição à albumina, os podócitos com e sem tratamento com PAN, foram submetidos a extração de RNA total e quantificação com utilização de Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Electron, WI, USA), síntese de cDNA e *PCR Real Time* de acordo com protocolos descritos nos itens abaixo.

Foram utilizados os primers/probes:

1. *RPLP0* (Hs. PT. 39a22214824 - IDT); - INDICAR O CONTROLE
2. *TRPC6* (Hs00988479_m1 - ThermoFisher);
3. *PODXL* (Hs. PT.58.2409981 - IDT).

5.2.5.1. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo Trizol:

1. Após o cultivo e as exposições descritas acima, o meio dos wells com os podócitos foi retirado, seguindo com 3 lavagens com PBS 1X gelado.
2. Após a retirada e descarte do PBS, realizou-se a lise das células diretamente em cada well, em gelo, com a adição de 500 μ L de trizol em cada duplicada, resultando em 1 ml de trizol por condição;
3. Realizou-se a raspagem das células para promover lise mais eficientes, além de passagens pela ponteira, evitando espuma;
4. O lisado de podócitos com trizol foi incubado, ainda no well, por 5 minutos em TA, sendo posteriormente adicionado 200 μ L de clorofórmio. Homogeneizou-se a solução e à transferiu para um eppendorf identificado, sendo agitado por 30 segundos e novamente incubados a TA, por 3 minutos;
5. As amostras de lisado celular de podócitos foram centrifugadas a 12000 G por 20 minutos a 4°C.
6. Nessa etapa foram formadas 3 fases, sendo a primeira a que continha o RNA, a qual foi transferida para um novo eppendorf identificado;
7. Realizou-se a precipitação do RNA com adição de 500 μ L de álcool isopropílico gelado com 10 minutos de incubação a TA;
8. Nova centrifugação a 12000 G por 20 minutos a 4°C. Nessa etapa ocorre a precipitação do RNA e o sobrenadante deve ser descartado por inversão;
9. Lavagem do RNA com 1 mL de etanol 75% gelado e nova centrifugação a 7500 G por 5 minutos à 4°C.
10. Descarte do sobrenadante por inversão;
11. Secagem da amostra à TA por 15 minutos.
12. O RNA foi ressuspendido em 20 μ L de H₂O DEPC autoclavada, ficando armazenado 30 minutos no gelo.
13. As amostras foram quantificadas em nanodrop, analisando o comprimento de onda de 260 nm e a pureza do RNA nas razões de 260/280 > 1,8 e 260/230 > 2,00.
14. Foi realizada eletroforese com gel de agarose 1% corado com brometo dietídeo.
15. As amostras foram armazenadas à -80°C

Foram realizadas 5 extrações de replicatas biológicas totalizando uma amostra com n=05.

5.2.5.2. Síntese de cDNA

A reação de síntese de cDNA por processo de transcrição reversa foi realizada com o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher)*, de acordo com as indicações do fabricante (Quadro 4).

Quadro 4: Preparo de Master Mix para *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher)*.

Reagente	Volume (uL)
10X RT tampão	2
25X dNTP MIX (100mM)	0,8
10X RT Random Primers	2
MultiScribe RT	1
H2O livre de nuclease	4,2
Total	10

Após o preparo do MIX, é adicionado 10uL de amostra de RNA para realização da reação de Transcriptase Reversa, seguindo ciclo indicado pelo fabricante (Quadro 5).

Quadro 5: Programa utilizado no termociclador para PCR transcriptase reversa.

Condição/ Etapa	Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3	Etapa 4
Temperatura (C°)	25	37	85	4
Tempo (min)	10	120	5	∞

5.2.5.3. Análise de expressão relativa por Real Time PCR

Foi realizada a reação de quantificação do RNA por PCR Real Time utilizando 4 µL das amostras de cDNA obtidas anteriormente, com concentração de 20 ng (5ng/µL), com adição de 6 µL do mix da reação, previamente preparado.

A reação foi realizada em placa apropriada, de 96 poços, seguindo o protocolo do reagente *TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG (Applied*

Biosystems™). Foram utilizadas placas de 96 poços, específicas para o equipamento utilizado (ABI 7500 Real Time PCR System - Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) (Quadro 6 e Figura 8).

Quadro 6: Mix utilizado na reação de *Real Time – PCR*

MIX PCR Real Time *	
Master Mix	3 μ L
Primer 10X	0,25 μ L
H ₂ O	2,75 μ L

*valores para cada poço de uma placa de 96.

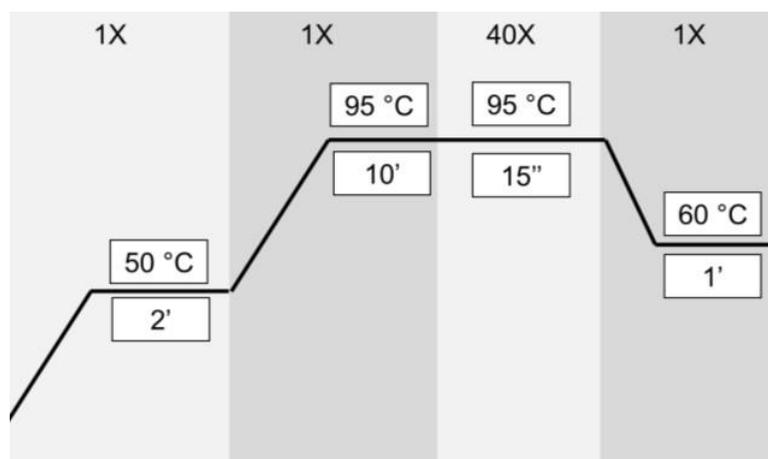


Figura 8: Ciclo da reação de PCR Real Time, utilizados nas reações desse estudo, no equipamento ABI 7500 Real Time PCR System - Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA

5.2.6. Avaliação da expressão das proteínas por *Western Blot*

Com a finalidade de avaliar a expressão das proteínas correspondentes aos genes analisados, frente às diferentes condições de exposição à albumina em podócitos com e sem tratamento com PAN, realizou-se a extração de proteínas totais, quantificação com kit BCA e análise por Western Blot com SDS-PAGE utilizando anticorpos primários (Podocalixina - ThermoFisher; Canal de Cálcio Receptor de Potencial Transitório C - ThermoFisher; RPLP0 (controle endógeno) - ThermoFisher) para as proteínas de interesse e para o controle endógeno, além de anticorpos secundários LI-COR (IRDye 800CW e IRDye 680RD).

5.2.6.1. Extração de proteínas

A extração das proteínas totais foi realizada com base no protocolo e utilização do tampão RIPA (Merck):

1. Após o cultivo e as exposições descritas acima, o meio dos poços com os podócitos foi retirado, seguindo com 3 lavagens com PBS 1X gelado;
2. Adicionou-se 500 μ L do tampão RIPA em cada poço de duplicata, o que resultou em 1 mL de tampão por condição.
3. As células foram raspadas com a utilização de ponteira, e toda a solução de lisado celular foi transferida para tubo eppendorf.
4. Realizou-se agitação em vórtex e posterior centrifugação por 10 minutos à 1200 G em 4°C;
5. Nessa etapa, formou-se um pellet e uma porção do sobrenadante, contendo as proteínas totais celulares. Desta forma, o sobrenadante foi transferido para novo tubo do tipo eppendorf identificado e o restante (pellet) foi descartado;
6. O material obtido foi armazenado em biofreezer a -80°C.

5.2.6.2. Quantificação das proteínas totais com kit BCA

Realizou-se a quantificação da concentração das proteínas totais extraídas, com a utilização do Kit BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific), conforme protocolo indicado pelo fabricante, sendo a leitura das amostras realizada no equipamento Nanodrop 8000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

5.2.6.3. Ensaio de *Western Blot*

Com a finalidade de avaliar e analisar as proteínas correspondentes aos genes estudados, empregou-se a técnica de Western Blot, para possibilitar a quantificação e comparação do tamanho e intensidade das proteínas de interesse nas diversas condições de estudo.

5.2.6.3.1. SDS-PAGE

As amostras de proteínas totais extraídas e quantificadas, foram diluídas em tampão RIPA, atingindo a concentração estabelecida para o experimento conforme tabela X, sendo aplicada 20 μL da amostra + tampão de amostra no gel (10 μL da amostra e 10 μL do tampão de amostra 2X). O protocolo seguiu conforme estabelecido por Laemmli (1970) (117) (Quadro 7).

Como marcador, foi utilizado o Ladder Odyssey One-Color Protein Molecular Weight Marker, para a verificação do tamanho das proteínas de estudo. A corrida do gel foi realizada a 50 V até que as amostras chegassem próximas ao final do gel (4 horas aproximadamente).

Quadro 7: Condições utilizadas para cada proteína no gel de SDS - PAGE.

Condições para o SDS-PAGE			
Proteína	Concentração mg/μL	Resolving gel (%)	Stacking gel (%)
Canal de cálcio receptor de potencial transitório C	30	15	5
Podocalixina	30	15	5

5.2.6.3.2. Transferência para a membrana de PVDF

A transferência das proteínas do gel para a membrana, foi realizada em membrana de PVDF, que teve preparação conforme protocolo:

1. 15 segundos em metanol 100%;
2. 2 minutos em H₂O destilada;
3. 2 minutos no tampão de transferência.

Para cada par de membrana + gel foi realizada a montagem com aparato de transferência umedecidos com o tampão, e após essa etapa a transferência foi realizada durante 2 horas, a 200mA em cuba adequada para o processo, sob suporte de gelo.

5.2.6.3.3. Imunorreação e revelação

Após o processo de transferência das proteínas do gel de corrida para a membrana de PVDF, foi realizado o processo de imunorreação para posterior revelação.

1. O aparato de transferência foi desmontado, descartando o gel e retirando a membrana.
2. Lavagem da membrana de PVDF, 5 vezes com TBS - T, com agitação durante 5 minutos cada uma;
3. Bloqueio da membrana com solução de TBS-T + BSA 6% por 2 horas, com agitação;
4. Lavagem da membrana de PVDF, 5 vezes com TBS - T, com agitação durante 5 minutos cada uma;
5. Incubação com o anticorpo primário diluído 1:1000 em solução de TBS-T + BSA 3%, sob agitação, em baixas temperaturas, overnight;
6. Lavagem da membrana de PVDF, 5 vezes com TBS - T, com agitação durante 5 minutos cada uma;
7. Incubação com o anticorpo secundário o diluído 1:1000 em solução de TBS-T + BSA 3%, sob agitação, em baixas temperaturas, durante 3 horas, no escuro;
8. Lavagem da membrana de PVDF, 5 vezes com TBS - T, com agitação durante 5 minutos cada uma;
9. Revelação da membrana de PVDF com equipamento *Odyssey CLX Li-Cor* e análise das imagens com auxílio do programa *ImageJ*.

5.3. Ensaio de transformação

Para todos os ensaios (exceto o de migração) de potencial de transformação os podócitos foram cultivados a 33°C e diferenciados a 37°C nas garrafas de cultura, e somente após o processo de diferenciação (10 a 14 dias), houve a contagem e plaqueamento das células, de modo a garantir que não houvesse diferença no número inicial de células por poço em decorrência dos dias iniciais a 37°C em que é possível que ainda haja alguma divisão celular, até que as células estivessem completamente maduras.

Para todas as condições, foram feitas exposições dos podócitos a concentrações de albumina estabelecidas de acordo com as alterações encontradas para o gene *PODXL* durante estudos no mestrado (108). Logo, as condições de exposição foram de 0 e 40 mg/mL de albumina em podócitos sem exposição prévia a PAN e 0,20 e 40 mg/mL de albumina para os com exposição prévia a PAN. Para os ensaios de migração, devido a necessidade de confluência das células, adotou-se a confluência de 60% de podócitos diferenciados à 37° C, com exposição às mesmas condições de albumina e PAN.

5.3.1. Caracterização de crescimento celular após diferenciação em temperatura não-permissiva

5.3.1.1. Curva de crescimento

Após o processo de proliferação a 33°C, diferenciação à 37°C, exposição à PAN e à albumina, as células foram contadas e plaqueadas, sendo umplaqueamento inicial de 50000 células/ poço/ mL . Foram coletadas amostras das células com 0, 24, 48 e 72 horas, correspondendo a 4 pontos de contagem. As células foram tripsinizadas e armazenadas em solução com paraformaldeído 3,5%.

As contagens foram todas realizadas no mesmo dia, de forma aleatória, ou seja, sem que durante a contagem houvesse indicação de qual a amostra correspondia a qual alíquota. Após essa etapa, foi realizada a análise dos dados.

5.3.1.2. Marcação com cristal violeta

Essa etapa foi realizada utilizando as mesmas condições de plaqueamento e concentrações de albumina do item anterior, sendo que após as exposições foi realizada marcação das células com cristal violeta e registro das imagens de cada poço de cultivo.

Para a marcação com Cristal Violeta seguiu-se o seguinte protocolo:

1. Remoção e descarte do meio de cultura;
2. Fixação dos podócitos em formaldeído 3,7% durante 5 minutos em temperatura ambiente.
3. Descarte do formaldeído;
4. Corou-se, então, as células com cristal violeta 0,5%.
5. Retirada e descarte do excesso de reagente da etapa anterior.

5.3.2. Ensaio clonogênico

Após o processo de proliferação a 33°C, diferenciação à 37°C, exposição à PAN e à albumina, as células foram contadas e plaqueadas, sendo umplaqueamento inicial de 50 e outro de 150 células por poço em placas de 12 poços. Posteriormente, foi realizado o acompanhamento das células durante 2 semanas, com trocas de meio a cada 48 horas (meio RMPI + albumina de acordo com a concentração de cada exposição). Por fim, as células foram fixadas, lavadas com PBS 1X, coradas com cristal violeta, conforme descrito na etapa 5.3.1.2. A contagem das colônias ocorreu com auxílio do programa *ImageJ*, com posterior análise dos dados.

5.3.2. Ensaio de migração

Nessa avaliação, por necessidade técnica do ensaio, as células foram plaqueadas em placas com 12 poços anteriormente ao processo de diferenciação, para que cada um deles tivesse uma confluência entre 80% a 90%, e após essa etapa, as células foram expostas a temperatura não-permissiva de 37°C, iniciando o processo de diferenciação.

Após os 10 dias dessa etapa, as células foram expostas às condições de PAN e albumina pré-determinadas e em seguida foi realizada uma ferida com auxílio de uma ponteira de 10µL.

O meio foi retirado e um meio novo, livre de FBS foi adicionado a cada poço. As células foram então submetidas a microscópio invertido de fluorescência com APOTOME para time-lapse, com controle de temperatura e CO₂, disponível no INFABIC (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular), da UNICAMP, por 48 horas, sendo realizadas imagens a cada 1 hora.

Por fim, as imagens obtidas foram analisadas para verificar a migração das células ao longo do tempo, com auxílio do programa *ImageJ*.

5.4. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média. Quando necessário comparar mais de dois grupos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e teste *a posteriori de Tukey* para comparação múltipla de médias. Em todos os casos o nível de significância para rejeição da hipótese nula foi de 5%

($p < 0,05$). Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Foram realizadas 5 replicatas biológicas por experimento ($n=5$) e uma réplica técnica para cada uma das biológicas, totalizando 10 valores de análise para cada experimento.

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Numerosos estudos já perseguiram o objetivo de avaliar o impacto do overload de albumina, cada um com metodologias e objetivos de investigação distintos. Abbate et al. (73) testaram a hipótese de que o TGF-1 poderia ser positivamente regulado em podócitos alterados devido à passagem aumentada de proteínas plasmáticas através da BFG, ativando assim uma reação que contribui para a glomeruloesclerose. Eles conduziram estudos *in vivo* e *in vitro* e demonstraram com sucesso que a exposição de podócitos de camundongos a 10 mg/mL de albumina sérica humana (HSA) por 6, 24 e 48 horas levou ao aumento da expressão de TGF- β 1 e perda da proteína sinaptopodina, um marcador de diferenciação dos podócitos, o que poderia indicar que o overload de albumina seria um gatilho para a desdiferenciação podocitária, fenômeno já descrito *in vivo* na glomeruloesclerose segmentar e focal (GESF) (144).

Morigi et al. (2005) (102), verificaram que 10 mg/mL de HSA por 6 e 24 horas em podócitos de camundongos diferenciados imortalizados *in vitro* induziram o rearranjo do citoesqueleto de actina F dependente de Rho quinase, levando a uma possível desdiferenciação celular, consequência do aumento da expressão de agentes inflamatórios e vasoativos, moléculas como NF-kB, AP-1 e endotelina-1 (ET-1) (145). Yoshida et al. (145) examinaram o efeito de 10 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) por 48 horas em podócitos *in vitro* e verificaram que os podócitos exibiam arranjo desordenado de microfilamentos de actina e sofreram apoptose de maneira dependente do tempo e da dose. A lesão podocitária foi precedida pela captação de albumina, indução de TGF-1 e fosforilação de Smad 2/3 e p38 MAPK (144)..

Chen et al. (146) exploraram o papel do *TRPC6* nas alterações funcionais e estruturais induzidas pela albumina em podócitos. Em seu estudo, eles mostraram que a exposição prolongada (48 horas) à albumina de 20 mg/mL causou uma regulação positiva da expressão de *TRPC6*. Eles também demonstraram que a concentração de 20 mg/mL de albumina desencadeou o aumento do cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) através de mecanismos que envolvem a liberação do estoque de cálcio intracelular e o influxo de cálcio extracelular em podócitos condicionalmente imortalizados. Além disso, o *overload* de albumina induziu a

expressão da proteína GRP78 do retículo endoplasmático (ER), levou à ativação da caspase-12 e, finalmente, à apoptose dos podócitos. Eles sugeriram que a entrada induzida de cálcio e o estresse do RE nos podócitos são, pelo menos parcialmente, mediados pelo TRPC6. Além disso, este grupo também demonstrou que, após bloqueio de TRPC6 com siRNA de TRPC6, houve melhora da lesão podocitária em podócitos que haviam sido expostos ao overload de albumina (146). Mais recentemente, Gonçalves et al. (105) mostraram que podócitos de camundongos imortalizados tratados com 1, 5 e 10 mg / mL de albumina por 24 horas e com consequente *overload* de albumina intracelular, provocam estresse de ER e ativação da via PKC-delta / p38 MAPK para induzir a apoptose de podócitos [25-122].

1.1. Recuperação de fenótipo

As análises referentes aos ensaios de recuperação de fenótipo foram realizadas com base em concentrações de exposição de albumina que previamente haviam indicado alteração de taxa de transcrito.

1.1.1. Gene *PODXL* e proteína podocalixina

Com relação à taxa de transcrito do gene *PODXL*, após retirada da albumina e análises realizadas pela técnica de PCR Real Time, obteve-se os dados presentes no Quadro 8.

Quadro 8: Expressão relativa de *PODXL* após retirada gradual ou abrupta de albumina

Albumina mg/ml	PAN	Condição	Gene	MÉDIA 2Δ CT	Fold change	p-valor
0	Não	Gradual	<i>PODXL</i>	0,003215812347	1	
40	Não	Gradual	<i>PODXL</i>	0,0125946909	3,916488135	0,000041 *
0	Sim	Gradual	<i>PODXL</i>	0,002174176647	1	
20	Sim	Gradual	<i>PODXL</i>	0,003092629603	1,422437136	0,631004
40	Sim	Gradual	<i>PODXL</i>	0,007197794129	3,310583866	0,000078 *
0	Não	Abrupta	<i>PODXL</i>	0,003334887968	1	
40	Não	Abrupta	<i>PODXL</i>	0,01376158951	4,126552269	0,020351 *
0	Sim	Abrupta	<i>PODXL</i>	0,002245065633	1	
20	Sim	Abrupta	<i>PODXL</i>	0,01073398958	4,78114734	0,010317 *

40	Sim	Abrupta	PODXL	0,01190203065	5,301417685	0,00349 *
----	-----	---------	-------	---------------	-------------	-----------

*p<0,05; n=05;

Desta forma, observando os resultados do *fold-change*, a única condição na qual não houve diferença estatística foi na retirada gradual de albumina, na concentração de 20 mg/mL de albumina com PAN (p=0,631004), o que significa que houve recuperação do fenótipo, já que na exposição progressiva esta condição tinha dado diferença estatística. Em todas as outras condições tanto de retirada abrupta quanto gradual, nas condições sem e com PAN, a diferença de expressão foi mantida com diferença significativa, o que mostra que nestas condições não houve recuperação de fenótipo (Figuras 9 e 10).

No caso da análise da expressão da proteína podocalixina por meio da técnica de Western Blot, assim como encontrado nos resultados de análise da taxa de transcrito do gene *PODXL*, apenas na condição de 20mg/mL de albumina com PAN, em condição de retirada gradual de albumina, houve recuperação de fenótipo (p=0,237803), sendo que nas demais condições a diferença de expressão da proteína associada ao *overload* de albumina manteve-se significativa (Quadro 9 e figuras 9 e 10).

Quadro 9: Análise de expressão de podocalixina.

Albumina mg/ml	PAN	Condição	Gene	Média	Fold change	p-valor
0	Não	Gradual	PODXL	100	1	
40	Não	Gradual	PODXL	159,9685417	1,599685417	0,00001053922941*
0	Sim	Gradual	PODXL	100	1	
20	Sim	Gradual	PODXL	103,7758878	1,037758878	0,2378032243
40	Sim	Gradual	PODXL	128,8901817	1,288901817	0,000000000267896091*
0	Não	Abrupta	PODXL	100	1	
40	Não	Abrupta	PODXL	127,4934588	1,274934588	0,0000003045288709*
0	Sim	Abrupta	PODXL	100	1	
20	Sim	Abrupta	PODXL	127,8898205	1,278898205	0,00000003108429667*
40	Sim	Abrupta	PODXL	135,1954155	1,351954155	0,000000001233868431*

*p<0,05; n=05;

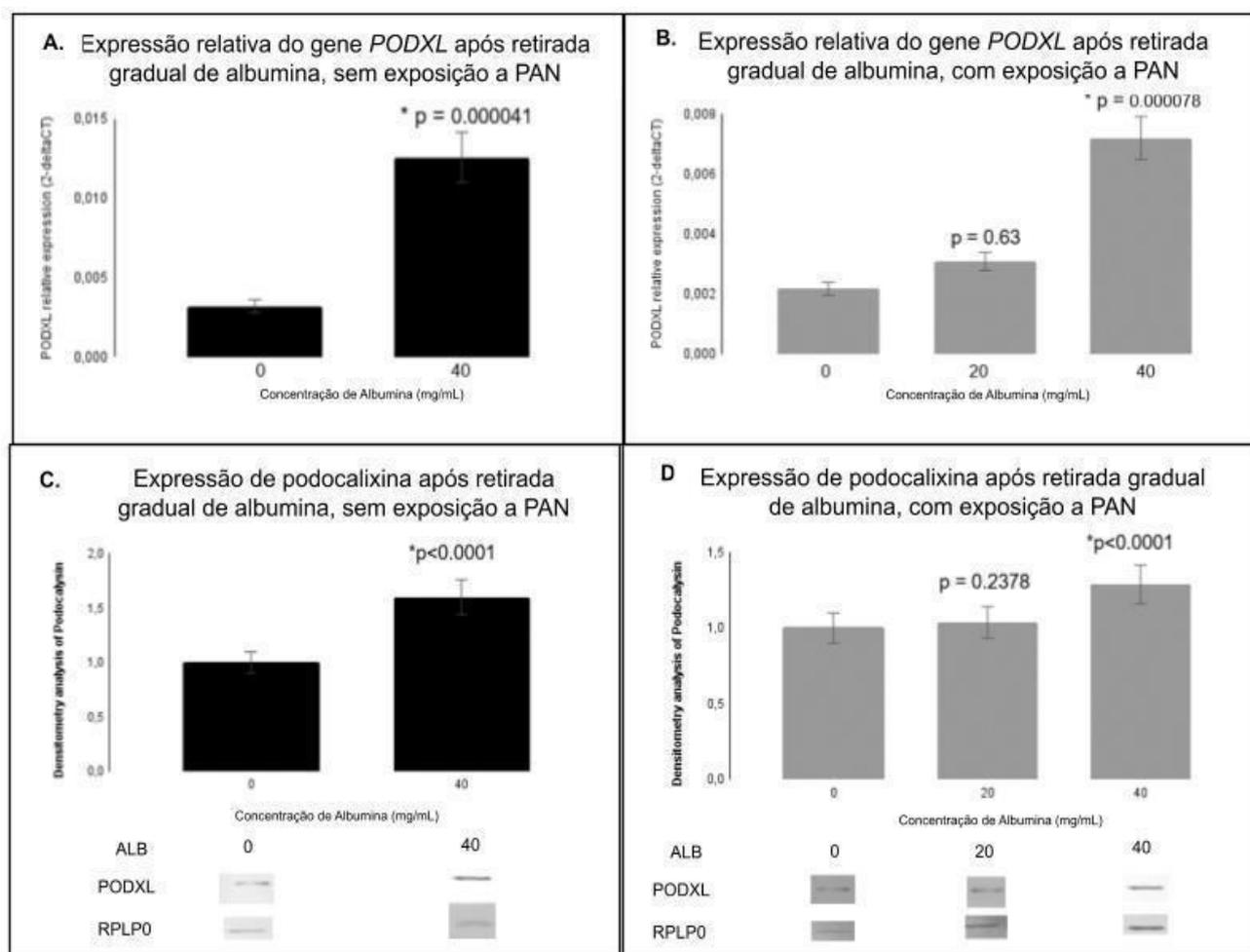


Figura 9: Recuperação fenotípica da expressão de transcrito de *PODXL* e proteína podocalixina após retirada gradual de albumina sem e com PAN. **A:** O aumento significativo dos níveis de transcritos do *PODXL* ainda foi observado na concentração de 40 mg/mL de albumina sem PAN ($p=0,000041$), significando que não houve recuperação do fenótipo. **B.** No grupo com exposição à PAN, foi observada recuperação do fenótipo apenas na dose de 20 mg/mL ($p=0,63$), mas não na dose de 40 mg/mL ($p=0,000078$). **C.** O aumento significativo da expressão da proteína podocalixina ainda foi observado na concentração de 40 mg/mL de albumina sem PAN ($p<0,0001$) significando sem recuperação do fenótipo. **D.** No grupo com exposição à PAN, foi observada recuperação do fenótipo apenas na concentração de 20 mg/mL ($p=0,2378$), mas não na concentração de 40 mg/mL ($p<0,0001$). *RPLP0* foi utilizado como controle endógeno. Os valores são média \pm SE, $n = 5$. Os valores são média \pm SE, $n = 5$. Nas condições destacadas (*) uma diferença estatística de * $p<0,01$,

** $p < 0,001$ ou *** $p < 0,0001$ foi observada (teste ANOVA no software IBM SPSS Statistic).

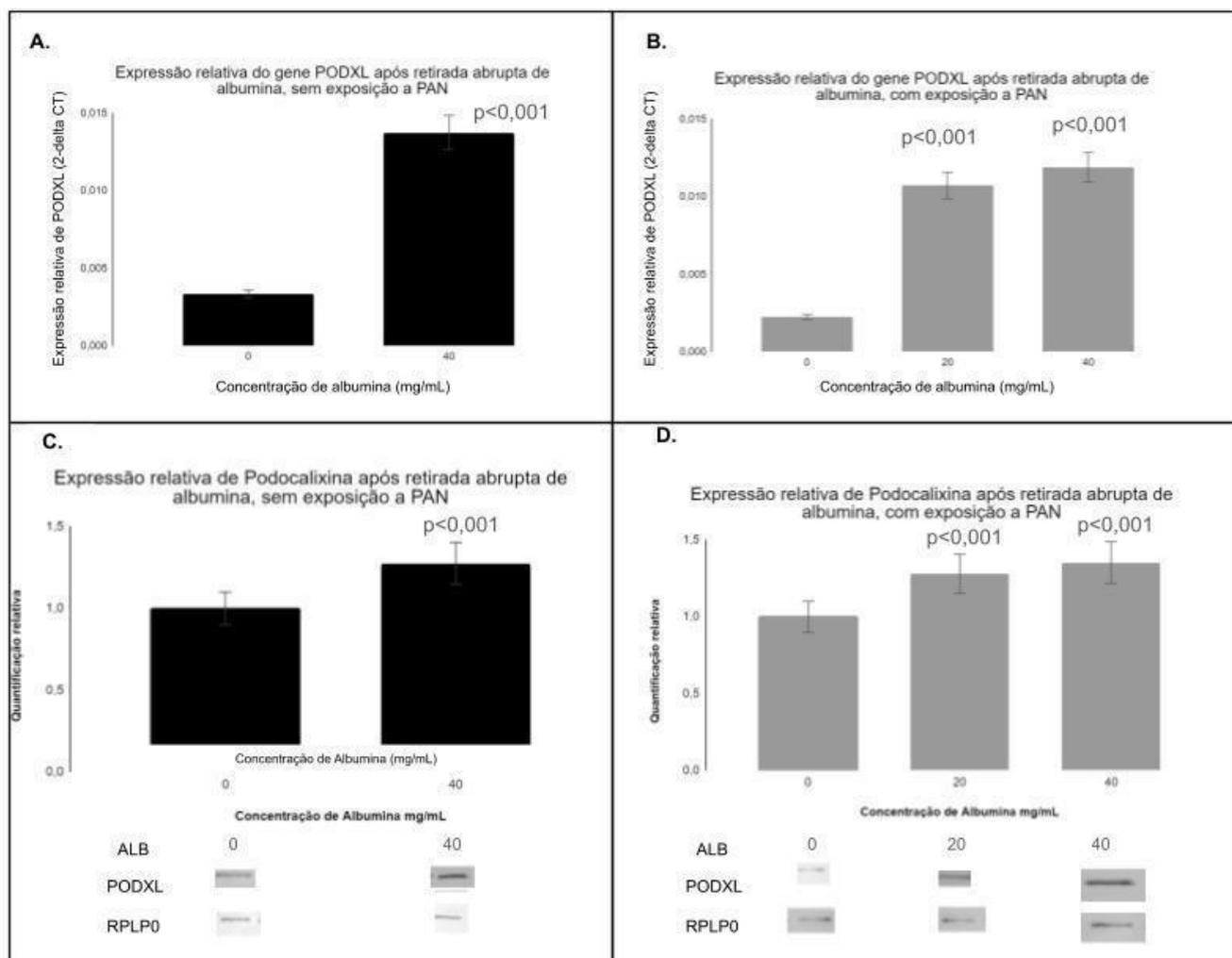


Figura 10: Recuperação fenotípica da expressão de PODXL e podocalixina após remoção abrupta de albumina sem e com PAN. Não houve recuperação de fenótipo em nenhuma das condições, tanto a nível de RNA sem e com exposição à PAN (A e B, respectivamente), quanto a nível de proteína sem e com exposição à PAN (C e D, respectivamente), para as condições de retirada abrupta do overload de albumina. *RPLP0* foi utilizado como controle endógeno. Os valores são média \pm SE, n = 5. Os valores são média \pm SE, n = 5. Nas condições destacadas (*) uma diferença estatística de * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ ou *** $p < 0,0001$ (teste ANOVA no software IBM SPSS Statistic).

A recuperação do fenótipo, tanto da taxa de transcrito de *PODXL*, como da proteína podocalixina, após retirada gradual de albumina, na condição de 20 mg/mL de albumina em podócitos com dano por PAN, sugere que o impacto causado por concentrações menores possa ser revertido de forma gradual. No entanto, mesmo com retirada gradual, as demais condições não foram suficientes para a recuperação do fenótipo.

Em estudo anterior (108) foi observado o aumento de expressão de *PODXL* e podocalixina em função do aumento de albumina. A hipótese levantada para tal aumento de expressão foi a de uma possível resposta adaptativa dos podócitos ao insulto, de forma a compensar a agressão, um mecanismo de escape ao dano (114). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram o resultado do mestrado, uma vez que após a retirada do estresse gerado pelo *overload* de albumina essa alteração pode ser revertida, pelo menos na condição de 20 mg/mL com dano.

No entanto, nas demais condições de podócitos com dano, bem como em todas as condições de exposição sem dano com PAN, essa reversão de fenótipo não foi observada, o que indica um dano de longa duração e/ou permanente. A lesão podocitária em pacientes com diabetes tipo 2, leva a liberação da podocalixina em vesículas ou microvilosidades, sendo então excretada na urina, tornando a proteína um marcador precoce de nefropatia diabética e biomarcador de doença glomerular (117,118).

Ainda, o aumento desta proteína na urina indica o grau de proteinúria (119-123). Desta forma, uma hipótese para a falta de recuperação do fenótipo em condições de maior exposição a albumina (40 mg/mL sem e com PAN), é a de que nestas condições mais extremas os podócitos estariam sofrendo uma lesão permanente, que levaria à eliminação da proteína podocalixina por meio de vesículas, e conseqüentemente estas condições não puderam ser recuperadas ao fenótipo inicial. Extrapolando para o modelo *in vivo*, o dano causado pela albumina poderia estar associado ao apagamento dos pedicelos e à progressão de doença renal de forma irreversível.

A podocalixina é uma sialoproteína normalmente localizada na superfície apical dos pedicelos, e promove o espaçamento entre os pedicelos nos diafragmas de fenda por repulsão de carga (38-115, 125). Ainda, a podocalixina tem um papel importante na manutenção da arquitetura do citoesqueleto de actina podócita pela

mediação das proteínas adaptadoras fator regulador 2 do trocador Na/H (NHERF2) e ezrina [39-126]. A ausência desta proteína ou alterações na sua organização espacial tem um efeito prejudicial sobre a BFG, uma vez que os ratos *knockout* para *Podxl* apresentam defeitos graves no desenvolvimento renal e morrem dentro de 24 horas após o nascimento com insuficiência renal anúrica (116; 147).

A podocalixina interage com a proteína de suporte IQGAP1 e com componentes do complexo SD, como a nefrina (107; 148). Em estudo anterior, Rigother et al. (107) demonstraram que, após exposição de podócitos *in vitro* à droga PAN, a proteína IQGAP1 foi “translocada” do citoplasma, local onde é expressa, para o núcleo. Rigother et al. (107) utilizaram um inibidor de ERK (U0126) e houve bloqueio da translocação de IQGAP1 para o núcleo, demonstrando que a ativação da via ERK por meio do PAN está envolvida nesta translocação. A IQGAP1 é, por sua vez, uma das proteínas que conecta o citoesqueleto de actina dos pedicelos às proteínas dos diafragmas de fenda e que está envolvida na mobilidade e permeabilidade celular, interagindo, ainda, diretamente com as proteínas nefrina e podocalixina. Nesse contexto, tanto Lehtonen et al (120-124), como Rigother et al (107) demonstraram que, aliada à translocação da IQGAP1 para o núcleo houve também redução significativa da sua interação com nefrina e podocalixina, apesar de que a droga PAN não alterou a expressão destas proteínas.

No atual estudo foi utilizado o inibidor da via ERK U0126 para inibir a apoptose por meio da fosforilação de ERK causada por PAN. Desta forma, o *overload* de albumina nas condições de 20 e 40 mg/mL, levou ao aumento de expressão de podocalixina, mostrando que o insulto de albumina é o responsável pelo aumento da expressão de podocalixina, e não a droga PAN. Com isso, e diante do que foi evidenciado nos estudos de Lehtonen et al (120-124) e Rigother et al (107), é possível se pensar em uma possível relação do insulto de albumina e alteração de expressão da proteína IQGAP1, já que estas proteínas possuem forte interação. Nosso estudo prévio ilustrou que a albumina induziu lesão podocitária de maneira dependente da concentração, afetando tanto os podócitos não danificados quanto aqueles previamente expostos à PAN. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que avaliou os insultos à albumina e ao PAN ao mesmo tempo. Este estudo também é o primeiro que avaliou a expressão do PODXL no contexto de *overload* progressivo de albumina.

Recentemente Chen et al. (146) realizaram uma bioinformática integrada e análise de correlação clínica dos principais genes, vias e potenciais agentes terapêuticos relacionados à nefropatia diabética e o *PODXL* estava entre os seis genes identificados significativamente regulados negativamente e associados ao desenvolvimento e progressão da DN no nível molecular e clínico.

Desta forma, considerando exposto acima, sugere-se que o *overload* de albumina seja um fator de estresse e lesão aos podócitos e ainda, esse estresse associado a outros insultos, tais como os fatores circulantes, podem agravar o processo de lesão podocitária. O processo envolvido na lesão podocitária é complexo e não dependente de um único fator, o que dificulta a identificação do evento inicial para a condição.

6.1.2 Gene *TRPC6* e canal receptor não-seletivo a cátions *TRPC6*

Durante o mestrado (108), podócitos sem exposição a PAN apresentaram redução da taxa de transcrito de *TRPC6* dependente de *overload* de albumina nas condições de 3, 20 e 40 mg/mL. Inversamente, no que se refere às condições de exposição prévia ao PAN, houve o aumento da taxa de transcrito de *TRPC6* nas condições de 20 e 40 mg/mL.

No presente estudo foi realizada a retirada de albumina com o objetivo de se avaliar a recuperação de fenótipo, que foi observada em todas as condições (Quadro 10), tanto sem exposição prévia a PAN, bem como com exposição a PAN (Figuras 11 e 12), já que não há mais diferença de taxa de transcrito em relação ao controle.

Quadro 10: Expressão relativa de taxa de transcrito de *TRPC6*

Albumina mg/ml	PAN	Condição	Gene	MÉDIA 2 Δ CT	Fold change	p-valor
0	Não	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00007920457584	1	
3	Não	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00008536273236	1,077750009	0,998
20	Não	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00008026732555	1,013417782	1
40	Não	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00008301228745	1,048074389	0,88
0	Sim	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00008580589206	1	
20	Sim	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,00009750288604	1,13631924	0,903
40	Sim	Gradual	<i>TRPC6</i>	0,0001228394918	1,431597398	0,373
0	Não	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0007015539051	1	
3	Não	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0007350459782	1,047739843	0,997
20	Não	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0007829351155	1,116001365	0,96
40	Não	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0009304601314	1,326284587	0,511
0	Sim	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0007116218643	1	
20	Sim	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0007972637602	1,120347477	0,901
40	Sim	Abrupta	<i>TRPC6</i>	0,0008236348836	1,157405253	0,838

*p<0,05; n=05;

Nas análises referentes à expressão proteica do canal transitório de cálcio, também foi observada recuperação de fenótipo em todas as condições, independentemente do tipo de retirada de albumina, conforme descrito no Quadro 11.

Quadro 11: Análise de expressão de Canal transitório de cálcio

Albumina mg/ml	PAN	Condição	Gene	Média	Fold change	p-valor
0	Não	Gradual	TRPC6	100		
3	Não	Gradual	TRPC6	101,9619606	1,019619606	0,4414302467
20	Não	Gradual	TRPC6	102,055685	1,02055685	0,4410365878
40	Não	Gradual	TRPC6	101,0988312	1,010988312	0,6792953331
0	Sim	Gradual	TRPC6	100		
20	Sim	Gradual	TRPC6	100,7214811	1,007214811	0,2701912499
40	Sim	Gradual	TRPC6	100,6761806	1,006761806	0,4506116324
0	Não	Abrupta	TRPC6	100		
3	Não	Abrupta	TRPC6	101,8510556	1,018510556	0,8142304396
20	Não	Abrupta	TRPC6	101,240626	1,01240626	0,89160975
40	Não	Abrupta	TRPC6	101,4734337	1,014734337	0,782702356
0	Sim	Abrupta	TRPC6	100		
20	Sim	Abrupta	TRPC6	99,77368209	0,9977368209	0,8539381074
40	Sim	Abrupta	TRPC6	98,25795236	0,9825795236	0,8259458762

*p<0,05; n=05;

Como pode ser observado nas figuras 11 e 12, o mesmo padrão encontrado na análise de expressão relativa da taxa de transcrito do gene *TRPC6* foi identificado na análise da expressão proteica por gel SDS-PAGE e *Western Blot*.

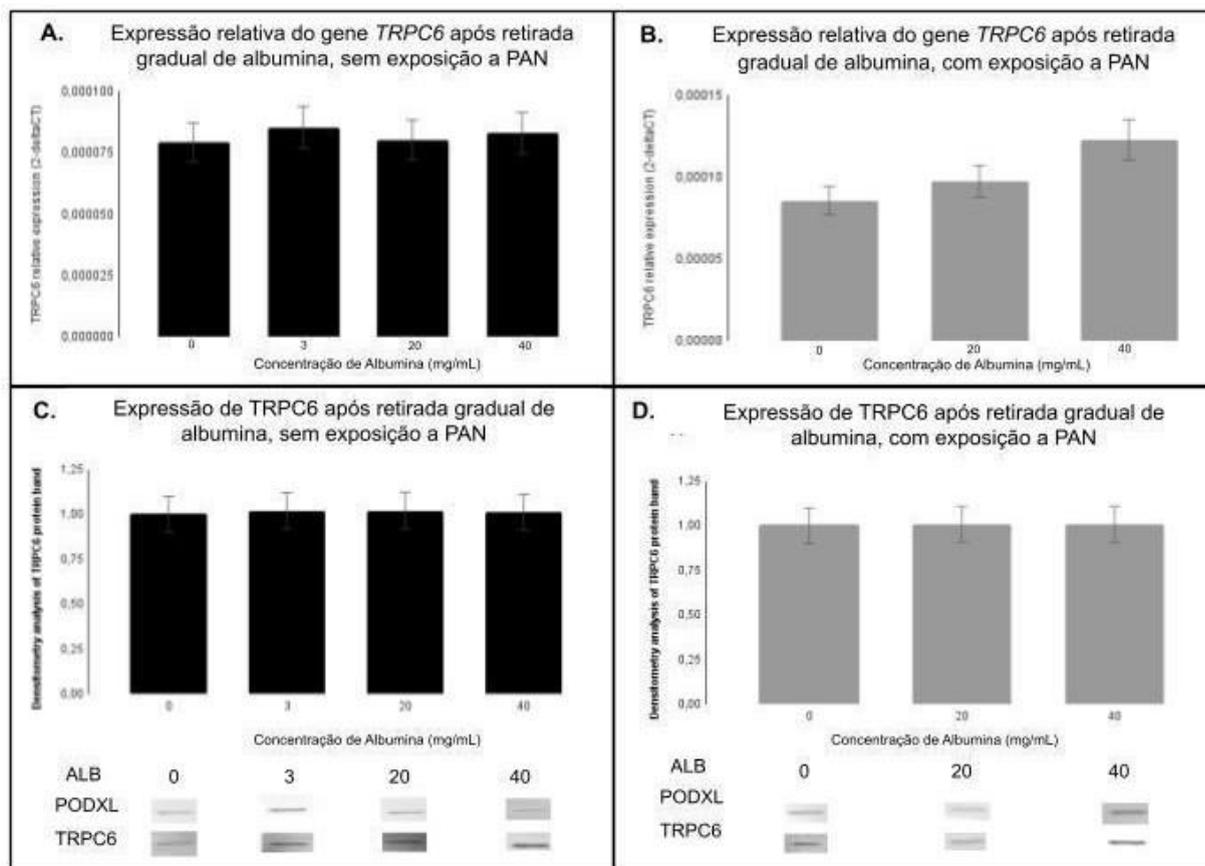


Figura 11: Recuperação do fenótipo da expressão do gene *TRPC6* e da proteína do canal do potencial receptor transitório canônico 6 (TRPC6) após retirada gradual de albumina sem e com PAN. Em ambos os grupos, sem exposição a PAN e com exposição a PAN, os níveis de transcritos *TRPC6* (A e B) e os níveis de proteína TRPC6 (C e D) recuperaram o fenótipo após a retirada gradual de todas as concentrações de albumina. *RPLP0* foi utilizado como controle endógeno. Os valores são média \pm SE, n = 5. Nas condições destacadas (*) foi observada diferença estatística de * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ ou *** $p < 0,0001$ (teste ANOVA no software IBM SPSS Statistic).

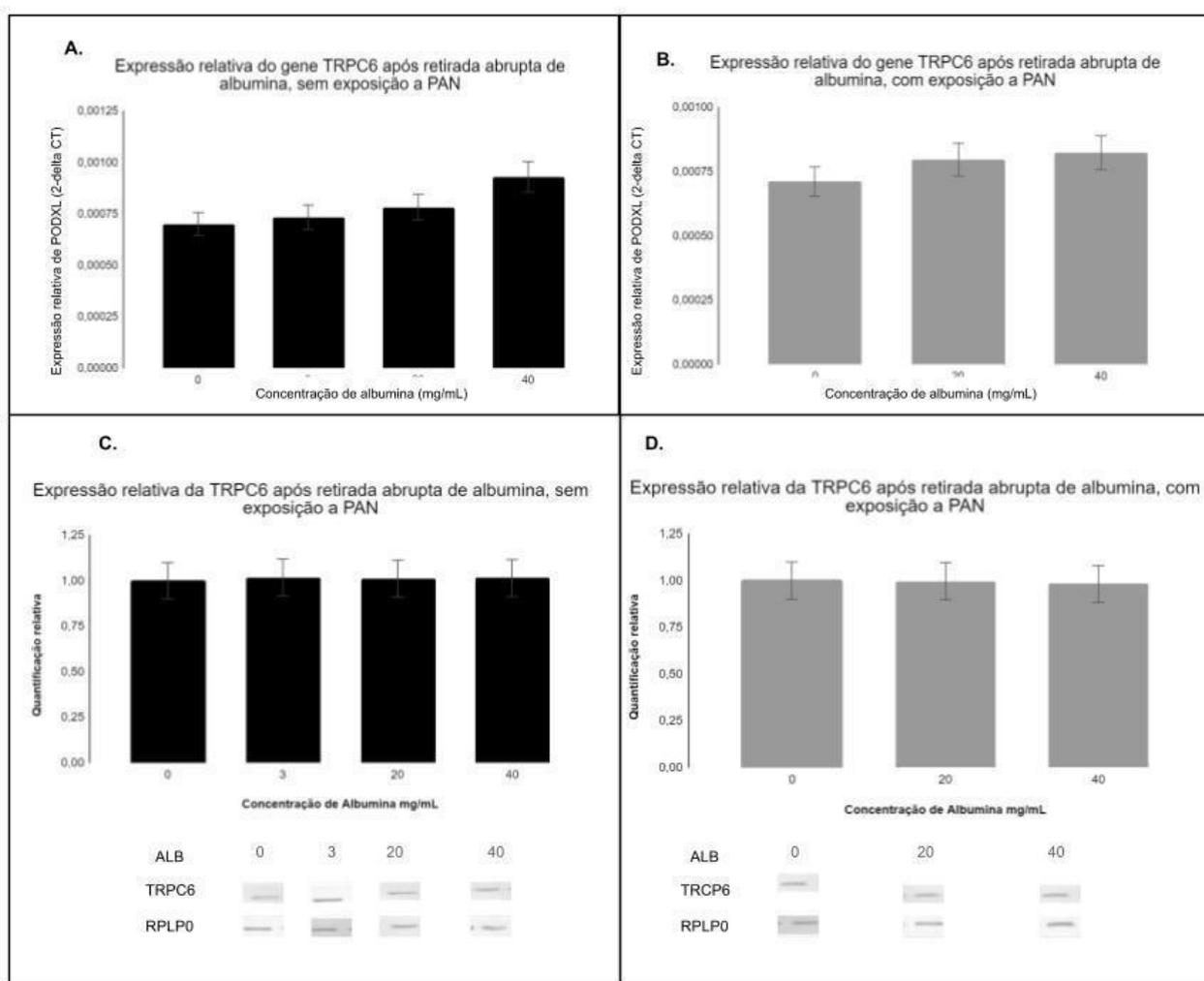


Figura 12: Recuperação do fenótipo da expressão do gene *TRPC6* e da proteína do canal do potencial receptor transitório canônico 6 (*TRPC6*) após retirada abrupta de albumina sem e com PAN. Em ambos os grupos, sem exposição a PAN e com exposição a PAN, os níveis de transcritos *TRPC6* (**A** e **B**) e os níveis de proteína *TRPC6* (**C** e **D**) recuperaram após a retirada abrupta de todas as concentrações de albumina. *RPLP0* foi utilizado como controle endógeno. Os valores são média \pm SE, $n = 5$. Nas condições destacadas (*) foi observada diferença estatística de $*p < 0,01$, $**p < 0,001$ ou $***p < 0,0001$ (teste ANOVA no software IBM SPSS Statistic).

Diante dos resultados obtidos, com a retirada de albumina, ou seja, a retirada do insulto, e conseqüentemente do estresse gerado, houve recuperação do fenótipo, sem diferença no método de retirada, tanto nas condições de retirada abrupta, como na gradual. Esses resultados corroboram os achados do estudo anterior (111) bem como os estudos da literatura que mostram modulação da expressão do *TRPC6* frente ao *overload* de albumina (122), e foram além, pois foi possível demonstrar a recuperação do fenótipo.

Nas condições de *overload* de albumina com PAN, onde houve aumento de expressão de *TRPC6*, o que deve levar ao maior influxo de Ca^{+2} intracelular e conseqüente reorganização do citoesqueleto (122). Com a retirada de albumina ocorreu recuperação da expressão do *TRPC6*. Isso pode significar recuperação do insulto no citoesqueleto dos podócitos, permitindo que estes voltem a organização inicial, sem necessidade de alteração de expressão de *TRPC6*, o que promoveria maior estabilidade ao citoesqueleto dos pedicelos, mantendo assim a estrutura destes, mesmo frente aos insultos. Neste caso destaca-se a possibilidade de estudos com influxo de Ca^{+2} marcado, para verificação das alterações de funcionamento e atividade deste canal.

Essa modulação com a sensibilização dos canais de íons de Ca^{+2} é descrita por Moller, Flesch e Reiser (123), em seu estudo de co-expressão de *TRPC6*, nefrina, podocina e CD2AP em células HEK293, indicando interação da proteína expressa por esse gene com as demais, exceto a CD2AP. Os autores (123) descreveram que a nefrina atuou como sinalizadora da sobrevivência dos podócitos, sendo reconhecida como reguladora da abertura do canal do *TRPC6*, por fosforilação da tirosina, mediando assim efeitos da modulação de fluxo de Ca^{+2} . Comisso, eles demonstraram que esse fluxo de cálcio é um processo central da capacidade de podócitos em regular o comportamento intracelular e do citoesqueleto. O mesmo processo possivelmente ocorre frente ao *overload* de albumina, levando a uma sensibilização deste canal, como forma de reorganização primária, para sobrevivência e manutenção de funcionalidade dos podócitos.

Outros mecanismos podem interferir na expressão do *TRPC6*, podendo justificar os achados deste estudo. O aumento da expressão do *TRPC6* já foi descrito como uma resposta ao estresse em cardiomiócitos, sendo que o aumento de expressão se associa a maior sensibilidade ao insulto em questão, com conseqüente aumento de Ca^{+2} intracelular (124). Esse mecanismo indica o

importante papel do *TRPC6* como gene alvo da calcineurina, e presente em via de sinalização de doenças renais, tais como GESF e doença renal diabética (125), associando-se, também, a processos de ativação de apoptose (126). Essa ativação, pode ocorrer também por mecanismos independentes da ativação de calcineurina, com o influxo de cálcio induzido por *TRPC6* ativando a cisteína protease calpaína (127), o que indica uma associação entre o aumento de expressão do *TRPC6* com o influxo de cálcio e progressão da doença renal.

A inativação do gene *TRPC6*, por meio de método CRISPR-Cas9 em ratos Sprague-Dawley, reduziu a albuminúria e glomeruloesclerose em modelos com PAN, sendo que em fase aguda essa inativação não se mostrou protetora (108).

Esses achados corroboram com o presente estudo uma vez que o aumento de expressão de *TRPC6* foi observado em podócitos com PAN e a redução de sua expressão esteve associada tanto a um fator protetor ao insulto, como a uma retirada dele, restabelecendo a expressão inicial. Outro estudo que avaliou essa situação de *knockout* foi o de Wang & Staruschenko (129,130), referente a modelode diabetes tipo 1, indicando que a redução da albuminúria nesse processo foi temporária e o efeito protetor desapareceu com o envelhecimento do animal, promovendo ainda resistência à insulina nos glomérulos e podócitos isolados.

Esses achados anteriores, bem como o deste estudo, indicam que o *TRPC6* pode ser explorado como um alvo terapêutico em algumas doenças glomerulares, sobretudo nas formas familiares e adquiridas de GESF, podendo desenvolver agentes que bloqueiam ou inibem diretamente os canais de *TRPC6* (130).

Está bem estabelecido que variantes patogênicas de ganho de função no *TRPC6* causam formas hereditárias de GESF e que a superexpressão de *TRPC6* está ligada a doenças glomerulares adquiridas (149-151) Além disso, o nocaute de *TRPC6* em camundongos ou ratos confere proteção ao desenvolvimento de nefropatia diabética experimental, nefrose induzida por PAN e hiperfiltração glomerular induzida por angiotensina II (151). Neste estudo, nos podócitos sem exposição ao PAN, houve uma redução dramática na transcrição de *TRPC6* e na taxa de proteína podocalixina em todas as concentrações de albumina. Nossos achados contradizem os relatados por Chen et al. (146), onde observaram um aumento de 3,2 vezes no nível da proteína *TRPC6* após 48 horas de exposição a 20 mg/ml de BSA quando comparado ao grupo controle. Além disso, seu estudo revelou que a exposição prolongada à mesma concentração de albumina (20 mg/ml) por 72

horas levou a uma diminuição na densidade das fibras de estresse, induziu uma redistribuição de actina para a periferia celular, desencadeou estresse no retículo endoplasmático (RE) e finalmente resultou em apoptose.

Nas nossas análises expusemos as células à albumina durante 24 horas. Notavelmente, mesmo neste curto período de exposição, houve uma redução drástica nos níveis de TRPC6. Uma limitação do nosso estudo é que não investigamos os níveis de cálcio celular, o que teria sido valioso para avaliar a atividade do TRPC6.

Nesse contexto, cinco variantes patogênicas no gene *TRPC6* foram relatadas por Riehle et al. (63) revelando que a perda da função de variantes no *TRPC6* como um conceito adicional de GESF hereditária. Eles mostraram um efeito dominante negativo da variante p.G757D, localizada no domínio formando uma interface TRPC6-TRPC6 e prevista para causar impedimento estérico local e ruptura do complexo de canal tetramérico, afetando a atividade geral do TRPC6. Existem alguns estudos na literatura mostrando que a diminuição da expressão de *TRPC6* se correlaciona com a redução da lesão e a melhora da proteinúria [52,53].

Sonneveld et al. (125) demonstraram que a 1,25-di-hidroxitamina D3 (1,25-D3) regulou negativamente a expressão de *TRPC6* em podócitos lesionados e em modelos animais para GESF e deficiência de 1,25-D3, possivelmente através de um efeito direto na atividade do promotor de *TRPC6*. Mais recentemente, o mesmo grupo demonstrou uma via glomerular (e) NOS-NO-sGC-cGMP-TRPC6 que previne a lesão podocitária. Em seu eixo parácrino proposto, este grupo demonstrou que o óxido nítrico (NO) produzido pelas células endoteliais glomerulares ativou a guanilatociclase solúvel (sGC), levando ao aumento do monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), que preveniu a lesão podocitária mediada por influxo de *TRPC6* e Ca^{+2} .

No grupo com exposição ao PAN, os níveis de TRPC6 aumentaram nas concentrações mais elevadas de albumina e atingiram níveis significativamente aumentados nas concentrações de 30 e 40 mg/mL de albumina. Esses resultados corroboram com Möller et al. (149) onde encontraram níveis aumentados de TRPC6 nos glomérulos de ratos injetados com PAN 4 dias após o tratamento. Eles também mostraram níveis regulados positivamente de TRPC6 em podócitos cultivados após lesão com PAN e que essa regulação positiva se correlacionou com o aumento dos níveis de Ca^{+2} e com a reorganização do citoesqueleto de actina do podócito.

Vale ressaltar que após a retirada da albumina por 24 horas, tanto em condição gradual como abrupta, a recuperação do fenótipo foi observada em todas as condições, tanto sem quanto com exposição ao PAN, o que indica que a expressão de *TRPC6* induzida pelo insulto à albumina é passível de tratamento, como ocorre com diferentes drogas já testadas, como FK506 (tacrolimus), que melhorou a lesão podocitária na nefropatia diabética tipo 2, regulando negativamente a expressão de *TRPC6* e *NFAT* (54).

1.2. ANÁLISE DE POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Nos ensaios referentes a processos de tumorigênese, foram avaliadas apenas algumas linhas e possibilidades de transformação maligna das células, como um estudo inicial das alterações que o aumento de expressão de *PODXL*, associado ao overload de albumina, podem gerar.

Com isso, partindo do conceito que células terminalmente diferenciadas, como os podócitos, bem como culturas imortalizadas como as células aqui utilizadas, não apresentam proliferação após seu processo de diferenciação, foi levantada a possibilidade de crescimento celular de podócitos diferenciados nas condições em que anteriormente havia sido observado aumento de expressão. Os resultados podem ser observados no Quadro 12.

Quadro 13: Avaliação de crescimento celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina.

DIAS	0 albumina sem PAN	40 albumina sem PAN	0 albumina com PAN	20 albumina com PAN	40 albumina com PAN
0	5000	5000	5000	5000	5000
1	4975	5400	4975	5400	6425
2	4925	7325	5050	7450	7275
3	5000	9175	5000	9900	14025
Coefficiente de crescimento	-	0,251	-	0,286	0,417
Tempo para dobrar (dias)	-	3,984063745	-	3,496503497	2,398081535

Os valores são média \pm EP, n= 05.

No quadro 12, estão indicados os dias de coleta e contagem das células (0, como número de células plaqueadas, 1, 2 e 3, os dias consecutivos de retirada das células para contagem). O coeficiente de crescimento indica a taxa da velocidade de proliferação (dobra do número de células iniciais), e com isso obtém-se o tempo para que o valor inicialmente plaqueado seja dobrado no cultivo.

A tabela acima indica aumento de densidade celular nas condições com presença de albumina, independente da concentração e da presença ou ausência de exposição prévia a PAN, o que corresponde a proliferação celular nas condições estudadas, sendo que com o aumento de albumina ocorre diminuição do tempo de dobra da cultura, indicando maior rapidez (coeficiente de crescimento) deste processo, logo, com maior concentração de albumina (em condições que alterem a expressão de PODXL) menor o tempo necessário para a proliferação celular, e com maior rapidez ela vai ocorrer, conforme observado na figura 17, e com as curvas correspondentes às condições de estudo.

Curva de crescimento celular após overload de albumina em condições com aumento de PODXL

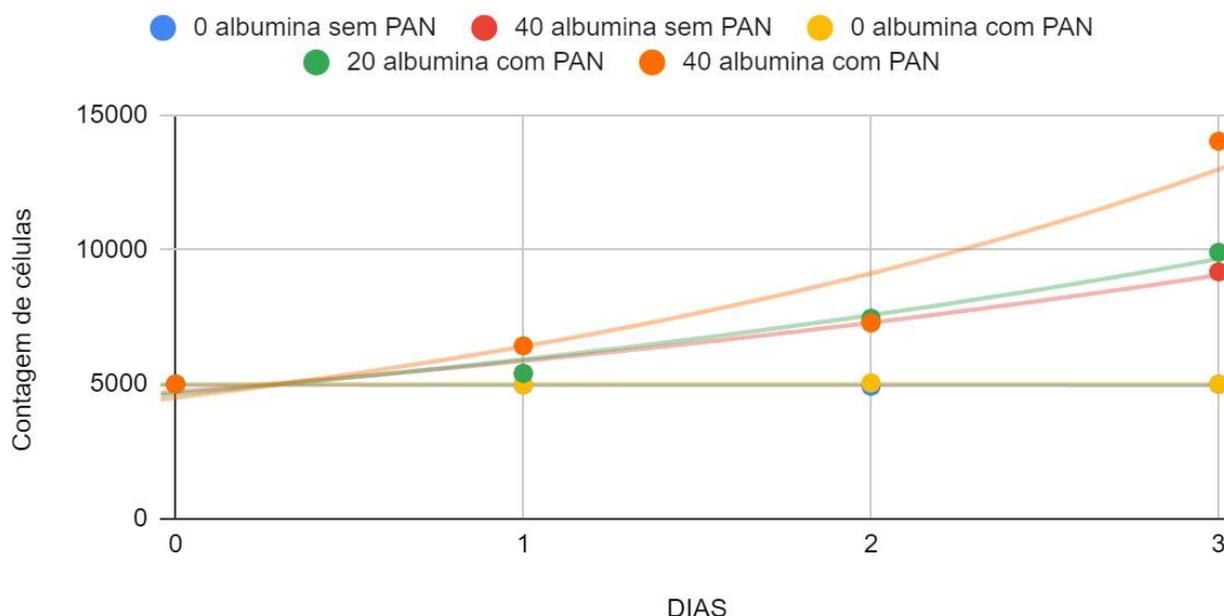


Figura 13: Avaliação de crescimento celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina. Os valores são média \pm EP, n= 05.

Com o mesmo objetivo de avaliar a proliferação por meio de densidade de podócitos frente às mesmas condições de exposição, foi realizado o ensaio com cristal violeta, como forma de análise corroborar visualmente os achados anteriores referentes a contagem de células e avaliação da curva de proliferação celular (Figura 18).

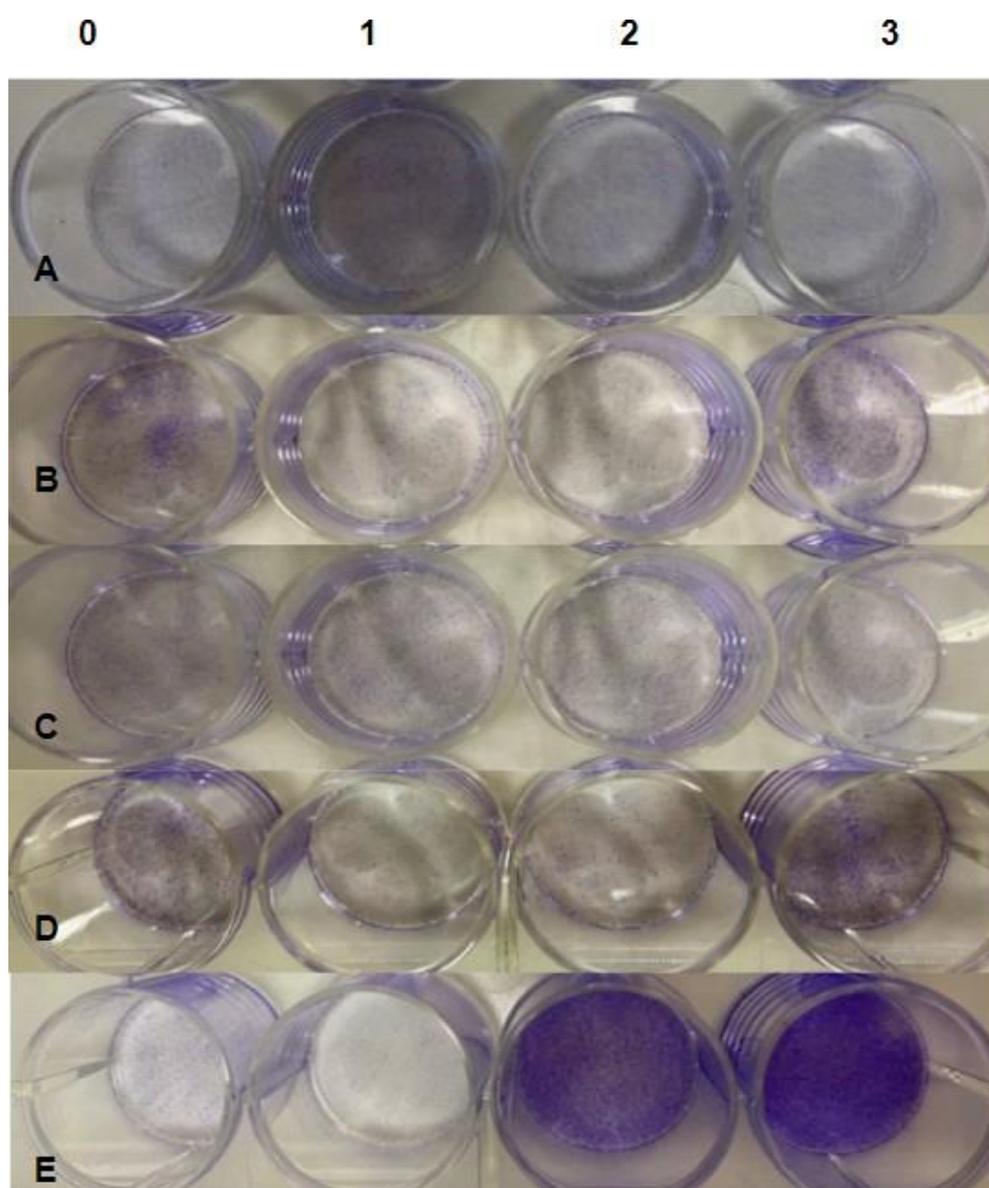


Figura 14: Ensaio de Cristal Violeta - Avaliação de proliferação celular de podócitos diferenciados após exposição à albumina. A- 0 mg/mL de albumina sem PAN; B- 40 mg/mL de albumina sem PAN; C- 0 mg/mL de albumina, com PAN; D- 20 mg/mL de albumina, com PAN; E- 40 mg/mL de albumina, com PAN. As colinas de 0 a 3 indicam o tempo de exposição à albumina: 0 - sem exposição; 1 - 24 horas; 2 - 48 horas; e 3 - 72 horas. n=05.

Com a finalidade de avaliar a capacidade de migração dos podócitos após esse processo de exposição a albumina, desencadeando aumento de expressão de PODXL, realizou-se o ensaio de migração, em que as células após diferenciadas e expostas às condições previamente descritas sofreram um rompimento em sua monocamada de células aderidas, causando assim uma “ferida” que pode ser acompanhada no período de 48 horas para avaliar o deslocamento das células e a recomposição da monocamada intacta.

Na figura 19, é possível observar um comparativo da ferida existente nos poços de cultivo dos podócitos, entre as condições: sem PAN 0 e 40 mg/mL de albumina; com PAN: 0, 20 e 40 mg/mL de albumina, nas condições intermediárias de 0, 12, 24, 36 e 48 horas de experimento.

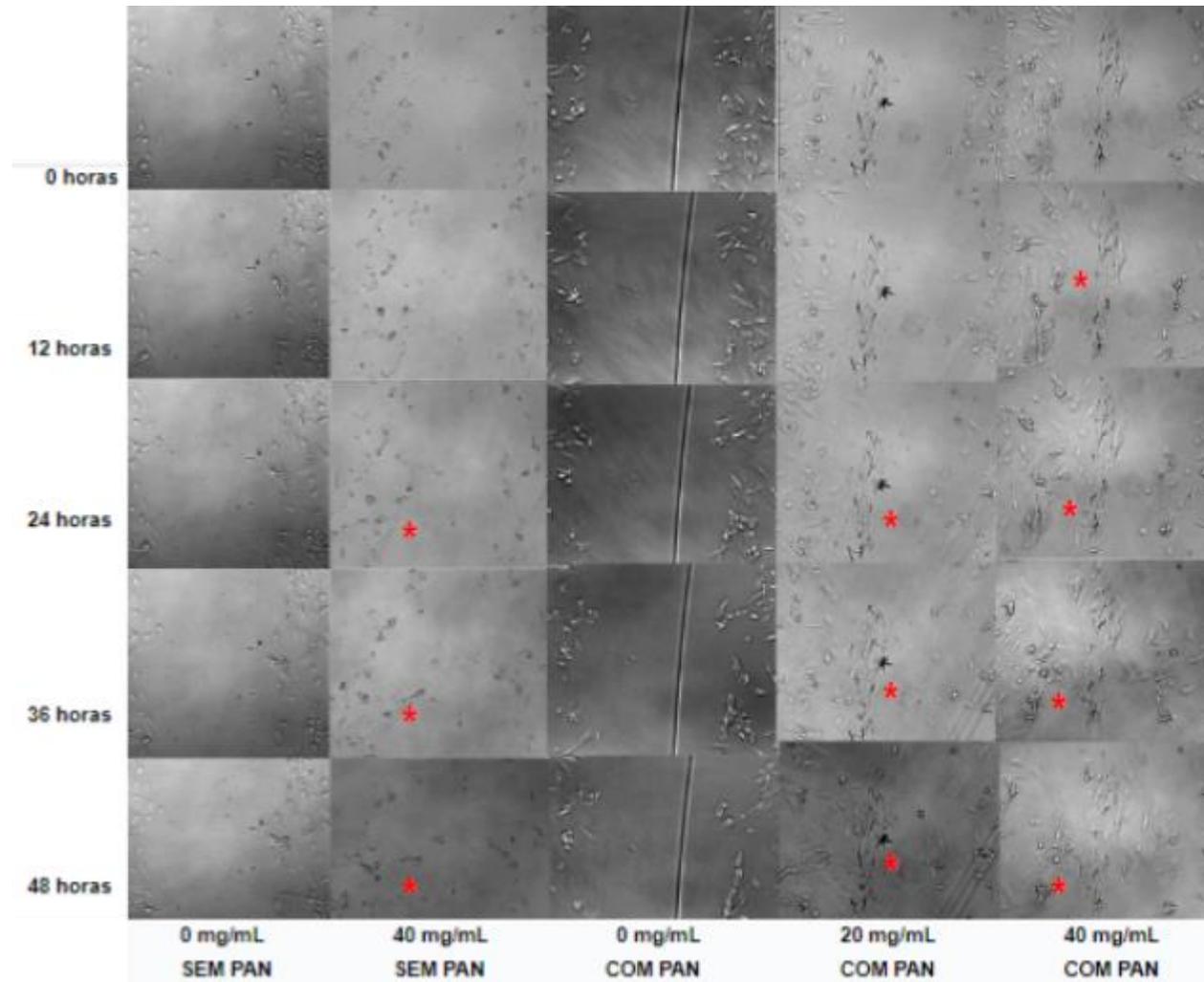


Figura 15: Ensaio de Migração. A figura representa o ensaio de migração, comparando os períodos de 0, 12, 24, 36 e 48 horas, nas concentrações de 0 e 40 mg/mL de albumina nas condições sem PAN, e 0, 20 e 40 mg/mL de albumina nas em condições com PAN. Os destaques em vermelho indicam pontos de migração celular observado.

Conforme apresentado na figura 19, é possível ver processo de migração celular nas condições com albumina, tanto em podócitos tratados com ou sem PAN, sendo que na condição de 40 mg/mL de albumina com PAN, é possível observar tal evento já nas primeiras horas de observação. Essa característica corresponde a processo desempenhado por células transformadas malignamente, ou seja, observa-se podócitos indiferenciados com capacidade de migração.

O ensaio clonogênico ocorreu em dois protocolos, sendo um de plaqueamento inicial de 50 podócitos por poço e outro com 150 por poço, para que fosse possível avaliar se baixa densidade de células permitiria o processo de proliferação por clones das células. Em ambos os casos, após o período de 2 semanas não foi possível observar colônias isoladas, de modo a indicar resultado negativo neste ensaio.

Sendo que uma análise isolada deste resultado indicaria ausência de potencial de clonalidade de células, característica comum a células tumorigênicas, no entanto, pode ser um resultado com interferência técnica, com necessidade de adequações em futuros estudos com o mesmo foco.

No entanto, observando e comparando os resultados obtidos dos ensaios de avaliação de potencial tumorigênico, é possível notar a presença de capacidade de proliferação celular e migração, sendo estas duas importantes características de células tumorigênicas, necessitando de maiores estudos.

Os podócitos são células epiteliais glomerulares terminalmente diferenciadas, e em seu desenvolvimento, suas precursoras migram para aglomerados de capilares glomerulares iniciando o processo de diferenciação, com modificações na regulação do ciclo celular. Ocorrendo a redução de ciclinas e aumento de inibidores do ciclo celular, resultando na interrupção do ciclo, processo essencial para a manutenção da estrutura e função dos podócitos maduros normais (131). Nesse contexto, níveis de p21, p57 e p27 impedem que os podócitos passem da fase G1/S (132).

Durante a nefrogênese, os podócitos se desenvolvem a partir de células mesenquimais, estas inicialmente se condensam em torno do broto ureteral e, então, em torno das pontas formando ramificações. Eventualmente elas, se tornam células epiteliais que se arranjam em forma vesículas. Em fases posteriores as vesículas assumem a forma de uma vírgula (do inglês “comma”) e, logo após, assumem a forma da letra S, o precursor do túbulo simples, mantendo assim o lúmen. No

processo final, ocorre a formação do túbulo proximal e na extremidade mais proximal, um sulco se desenvolve e é invadido por células endoteliais para formar os glomérulos (132,133).

Os progenitores dos podócitos perdem as ligações célula-célula e passam a migrar, formando também os pedicelos, com expressão de outras proteínas presentes no diafragma de fenda, como nefrina, CD2AP e podocina (133 - 135). Nos processos EMT (ao contrário da maturação dos podócitos) as células epiteliais perdem suas características, adquirindo as de células mesenquimais (136, 137).

Logo, os podócitos perdem a polaridade epitelial, e o diafragma de fenda será alterado, levando a rearranjo do citoesqueleto (138). Posteriormente, ocorre a perda de expressão da nefrina e ZO-1, sendo prejudicial à essas células, diminuindo a expressão de importantes proteínas e aumentando as características mesenquimais (139).

Esse evento de perda de características de podócitos maduros, com desdiferenciação, pode ocorrer por: cicatrização, fibrose, regeneração e metástase/tumorigênese. (140). O presente estudo indicou uma possibilidade de associação de alteração de expressão com perda de características de podócitos maduros, neste caso, correspondendo com eventos de proliferação celular, potenciação de migração celular, corroborando os indicativos de associação de aumento de expressão de *PODXL* e tecido tumorigênico.

Em resumo, o presente estudo demonstra que o *overload* de albumina na cultura de células podocitárias, com ou sem dano induzido por PAN, provoca diferentes respostas nos níveis de expressão de *PODXL* e *TRPC6*. Enquanto a expressão de *PODXL* aumentou após *overload* de albumina sem e com exposição a PAN, a expressão de *TRPC6* diminuiu drasticamente sem PAN e aumentou com PAN. Além disso, quando a albumina foi removida, a recuperação do fenótipo *PODXL* ocorreu apenas sob a condição de 20 mg/mL com PAN e a recuperação do fenótipo *TRPC6* ocorreu em todas as concentrações de albumina sem e com PAN.

2. CONCLUSÕES

1. Para o gene *PODXL* houve recuperação de fenótipo somente na condição de retirada gradual do *overload* de 20 mg/mL tanto a nível de RNA ($p = 0,631004$) quanto a nível de proteína ($p=0,2378032243$) em podócitos previamente expostos a PAN. Nas outras condições ainda permaneceu a diferença de expressão ($p<0.01$) com superexpressão, logo, sem recuperação do fenótipo, tanto a nível de RNA quanto proteico.
2. Para o gene *TRPC6*, houve recuperação de fenótipo em todas as condições, a nível de RNA e de proteína ($p>0,05$).
3. Houve aumento de proliferação celular nas condições de superexpressão de *PODXL* analisadas.
4. Em ambos os focos de estudo, destaca-se que há a necessidade de ampliar as avaliações para modelos *in vivo*, para melhor compreensão das alterações observadas.

3. REFERÊNCIAS

1. Kerjaschki D. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*. 2001 Dec;108(11):1583–7.
2. Joshi S, Andersen R, Jespersen B, Rittig S. Genetics of steroid-resistant nephrotic syndrome: a review of mutation spectrum and suggested approach for genetic testing. *Acta Paediatr (Oslo, Norw)*. 2013 Jun 16;102(9):549–56.
3. Grahammer F. New structural insights into podocyte biology. *Cell Tissue Res*. 2017;369(1):5–10.
4. Podocytopathies. Kopp JB, Anders HJ, Susztak K, Podestà MA, Remuzzi G, Hildebrandt F, Romagnani P. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Aug 13;6(1):68. doi: 10.1038/s41572-020-0196-7).
5. Ballermann BJ, Stan R V. Resolved: capillary endothelium is a major contributor to the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Sep;18(9):2432–8.
6. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney Int*. 2010;77(7):571–80
7. Marieb EN, Hoehn K. *Human Anatomy & Physiology*. 8th ed. 2010.
8. Ballermann BJ, Stan R V. Resolved: capillary endothelium is a major contributor to the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Sep;18(9):2432–8
9. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Nov;192(5):385–97.
10. George B, Holzman LB. Signaling from the podocyte intercellular junction to the actin cytoskeleton. *Semin Nephrol*. 2012 Jul;32(4):307–18
11. Grahammer F, Schell C, Huber TB. The podocyte slit-diaphragm - from a thin grey line to a complex signalling hub. *Nat Rev Nephrol*. 2013. Sep; 9(10): 587-98
12. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia L a, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*. 2000;24(3):251–6

13. Ross MJ, Klotman PE. Recent progress in HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(12):2997–3004.
14. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest.* 1997 Jan;99(2):342–8.
15. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 1984;98(4):1591–6.
16. Garovic VD, Wagner SJ, Turner ST, Rosenthal DW, Watson WJ, Brost BC, et al. Urinary podocyte excretion as a marker for preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2007
17. Takeda T, Go WY, Orlando RA, Farquhar MG. Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in MadinDarby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2000;11(9):3219–32.
18. Matsui K, Breitender-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 1999;1
19. Schnabel E, Dekan G, Miettinen A, et ai. Biogênese da podocalixina - a principal sialoglicoproteína glomerular - no rim de rato recém-nascido. *Eur J Cell Biol.* 1989; 48 :313-326.
20. Nielsen JS, McNagny KM. O papel da podocalixina na saúde e na doença. *Jornal da Sociedade Americana de Nefrologia: JASN.* 2009; 20 :1669-1676.
21. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identificação e caracterização da podocalixina - a principal sialoproteína da célula epitelial glomerular renal. *O Jornal de Biologia Celular.* 1984; 98 :1591-1596
22. Kavoura E, Gakiopoulou H, Paraskevakou H, et al. Avaliação imuno-histoquímica da expressão de podocalixina em glomerulopatias associadas à síndrome nefrótica. *Hum Pathol.* 2011; 42 :227-235
23. Takeda, T., McQuistan, T., Orlando, RA, & Farquhar, MG.. A perda dos processos glomerulares do pé está associada ao desacoplamento da podocalixina do

citoesqueleto de actina . Journal of Clinical Investigation. 2001

24. Schmieder, S. , Nagai, M. , Orlando, RA , Takeda, T. , & Farquhar, MG.. A podocalixina ativa RhoA e induz a reorganização da actina através de NHERF1 e Ezrin em células MDCK . *Jornal da Sociedade Americana de Nefrologia* , 15 (9) , 2289–2298. 2004
25. Barua M, Shieh E, Schlondorff J, Genovese G, Kaplan BS, Pollak MR. Exome sequencing and in vitro studies identified podocalyxin as a candidate gene for focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2014;85(1):124–33.
26. Sizemore S, Cicek M, Sizemore N, Kwok PN, Casey G. Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin. *Cancer Res.* 2007;67(13):6183–91
27. Casey G, Neville PJ, Liu X, Plummer SJ, Cicek MS, Krumroy LM, et al. Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet.* 2006;15(5):735–41.
28. Kelley TW, Huntsman D, McNagny KM, Roskelley CD, Hsueh ED. Podocalyxin. *Am J Clin Pathol [Internet].* 2005;124(1):134–42. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/articlelookup/doi/10.1309/7BHLAHHU0N4MHT7Q>
29. Yasuoka H, Tsujimoto M, Hirokawa M, Tori M, Nakahara M, Miyauchi A, et al. Podocalyxin expression in undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Pathol.* 2008;61(11):1228–9.
30. Zhi Q, Chen H, Liu F, Han Y, Wan D, Xu Z, Kuang Y, Zhou J. Podocalyxin-like protein promotes gastric cancer progression through interacting with RUN and FYVE domain containing 1 protein. *Cancer Sci.* 2019 Jan;110(1):118-134. doi: 10.1111/cas.13864. Epub 2018.
31. Favreau AJ, Cross EL, Sathyanarayana P. miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 2012.
32. Kaprio T, Hagström J, Fermér C, Mustonen H, Böckelman C, Nilsson O, Haglund C. A comparative study of two PODXL antibodies in 840 colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2014.

33. Chijiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M. Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. *Int J Oncol.* 2016.
34. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE [Internet].* 2005; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728426/>
35. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters JA Transient receptor potenciais canais de catião na doença. *Fisiol. Rev.* 2007; 87 :165-217. doi: 10.1152/physrev.00021.2006
36. Nishizuka Y. Sinalização intracelular por hidrólise de fosfolipídios e ativação da proteína quinase C. *Science.* 1992; 258 :607-614. doi: 10.1126/science.1411571
37. Maroto R., Raso A., Wood TG, Kurosky A., Martinac B., Hamill OP TRPC1 forma o canal de cátions ativado por estiramento em células de vertebrados. *Nat. Cell Biol.* 2005; 7 :179-185. doi: 10.1038/ncb1218
38. Gomis A., Soriano S., Belmonte C., Viana F. O estiramento de membrana hipoosmótico e induzido por pressão ativa os canais TRPC5. *J. Fisiol.* 2008; 586 :5633-5649. doi: 10.1113/jphysiol.2008.161257. ,
39. Yamaguchi Y., Iribe G., Nishida M., Naruse K. Papel dos canais TRPC3 e TRPC6 na resposta miocárdica ao estiramento: Vinculando fisiologia e fisiopatologia. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2017; 130 :264-272. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.06.010
40. Dryer SE, Roshanravan H., canais Kim EY TRPC: Regulação, desregulação e contribuições para a doença renal crônica. *Bioquim. Biophys. Acta Mol. Base. Des.* 2019; 1865 :1041-1066. doi: 10.1016/j.bbadis.2019.04.001
41. Yoshida T., Inoue R., Morii T., Takahashi N., Yamamoto S., Hara Y., Tominaga M., Shimizu S., Sato Y., Mori Y. O óxido nítrico ativa os canais TRP pela cisteína S-nitrosilação. *Nat. Química Biol.* 2006; 2 :596-607. doi: 10.1038/nchembio821.
42. Yamamoto S., Takahashi N., Mori Y. Fisiologia química dos canais TRPM2 e TRPC5 ativados por estresse oxidativo. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2010; 103 :18-27. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2010.05.005.
43. Anderson M., Kim EY, Hagmann H., Benzing T., Dryer SE Opposing effects of podocin

on the gating of podocyte TRPC6 channels evocados por estiramento de membrana ou diacilglicerol. *Sou. J. Fisiol. Cell Physiol.* 2013; 305 :C276–C289. doi: 10.1152/ajpccell.00095.2013.

44. Tang et al. Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels *Cell Research* (2018) 28:746–755. 2018
45. Hsu YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ: TRP channels in kidney disease. *Biochim Biophys Acta* 1772: 928–936, 2007
46. Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm associated channel required for normal renal function 2006;37(7):739–44.
47. Alexander Staruschenko, Rong Ma, Oleg Palygin , Stuart E Dryer *Physiol Ver* 2023 Jan 1;103(1):787-854. doi: 10.1152/physrev.00013.2022. Epub 2022 Aug 25 Ion channels and channelopathies in glomeruli).
48. J. Reiser, K.R. Polu, C.C. Möller, P. Kenlan, M.M. Altintas, C. Wei, C. Faul S. Herbert, I. Villegas, C. Avila-Casado, M. McGee, H. Sugimoto, D. Brown, R. Kalluri, P. Mundel, P.L. Smith, D.E. Clapham, M.R. Pollak, TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function, *Nat. Genet.* 37 (7) 2005.
49. T.B. Huber, B. Schermer, R.U. Müller, M. Höhne, M. Bartram, A. Calixto, H. Hagmann, C. Reinhardt, F. Koos, K. Kunzelmann, E. Shirokova, D. Krautwurst, C. Harteneck, M. Simons, H. Pavenstädt, D. Kerjaschki, C. Thiele, G. Walz, M. Chalfie, T. Benzing, Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103. 17079–17086. 2006
50. (M. Anderson, E.Y. Kim, H. Hagmann, T. Benzing, S.E. Dryer, Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol, *Am J Physiol Cell Physiol.* 305 2013
51. S. Kanda, Y. Harita, Y. Shibagaki, T. Sekine, T. Igarashi, T. Inoue, S. Hattori, Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin:

- effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis, *Mol. Biol. Cell* 22. 2011
52. Anderson M, Kim EY, Hagmann H, Benzing T, Dryer SE. Opposing effects of podocin on the gating of podocyte TRPC6 channels evoked by membrane stretch or diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol* 305: C276–C289, 2013.
53. Winn Science. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. Jun 1:1801-4.doi: 10.1126/science.1106215. Epub 2005 May 5. 2005
54. Reiser, J., K.R. Polu, C.C. Moller, P. Kenlan, M.M. Altintas, C. Wei, C. Faul, S. Herbert, I. Villegas, C. Avila-Casado, M. McGee, H. Sugimoto, D. Brown, R. Kalluri, P. Mundel, P.L. Smith, D.E. Clapham, and M.R. Pollak. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nature Genetics* 37: 739–744. 2005
55. Dryer et al. *Molecular Basis of Disease_TRPC6*.2019
56. M.P. Winn, P.J. Conlon, K.L. Lynn, M.K. Farrington, T. Creazzo, A.F. Hawkins, N. Daskalakis, S.Y. Kwan, S. Ebersviller, J.L. Burchette, M.A. Pericak-Vance, D.N. Howell, J.M. Vance, P.B. Rosenberg, A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis, *Science*. 308 2005
57. M.P. Winn, P.J. Conlon, K.L. Lynn, D.N. Howell, B.D. Slotterbeck, A.H. Smith, F.L. Graham, M. Bembe, L.D. Quarles, M.A. Pericak-Vance, J.M. Vance, Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity, *Genomics*. 1999
58. Marc Riehle, Anja K Büscher, Björn-Oliver Gohlke, Mario Kaßmann, Maria Kolatsi-Joannou, Jan H Bräsen, Mato Nagel, Jan U Becker, Paul Winyard, Peter F Hoyer, Robert Preissner, Dietmar Krautwurst, Maik Gollasch, Stefanie Weber, Christian Harteneck. TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS *J Am Soc Nephrol*. 2016 Sep;27(9):2771-83. doi: 10.1681/ASN.2015030318. Epub 2016.
59. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014.

60. El Hindi S., Reiser J. Modulação do canal TRPC em podócitos-inchando em direção a novos tratamentos para doença glomerular. *Pediatra Nefrol.* 2011.
61. SHANKLAND, S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 69, n. 12, p. 2131-2147, Jun 2006.
62. Okamura K, Dummer P, Kopp J, Qiu L, Levi M, Faubel S, et al. Endocytosis of Albumin by Podocytes Elicits an Inflammatory Response and Induces Apoptotic Cell Death. *PLoS One*. 2013.
63. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification *Am J Kidney Dis*, 39 (2002), pp. S1-266
64. Ruggenenti, A. Perna, L. Mosconi, R. Pisoni, G. Remuzzi Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN) *Kidney Int*, 53. 1998
65. Putaala H, Sainio K, Sariola H, Tryggvason K. Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *J Am Soc Nephrol* 2000.
66. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009.
67. N. Yoshikawa , H. Ito , R. Akamatsu , H. Hazikano , S. Okada , T. Matsuo Vacuulação podocitária glomerular na glomeruloesclerose segmentar focal Arco. *Patol. Laboratório. Med.* 1986
68. Abbate , C. Zoja , M. Morigi , D. Rottoli , S. Angioletti , S. Tomasoni , C. Zanchi , L. Longaretti , R. Donadelli , G. Remuzzi O fator de crescimento transformador beta1 é regulado positivamente pelos podócitos em resposta ao excesso de passagem intraglomerular de proteínas: uma via central na glomeruloesclerose progressiva *Sou. J. Pathol.* , 161. 2002
69. Yoshida , M. Nagase , S. Shibata , T. Fujita Lesão de podócitos induzida por sobrecarga de albumina in vivo e in vitro: envolvimento de TGF-beta e p38 MAPK *Néfron. Exp. Nefrol.* , 108. 2008

70. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001.
71. Riehle M, Bu€scher AK, Gohlke BO, Kaßmann M, Kolatsi-Joannou M, Bra€sen JH, Nagel M, Becker JU, Winyard P, Hoyer PF, Preissner R, Krautwurst D, Gollasch M, Weber S, Harteneck C. TRPC6 G757D loss-of-function mutation associates with FSGS. *J Am Soc Nephrol* 27: 2771–2783, 2016.
72. Gruden G, Perin PC, Camussi G. Insight on the pathogenesis of diabetic nephropathy from the study of podocyte and mesangial cell biology. *Curr Diabetes Rev* ;2001
73. Mouller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland SJ, Reiser J. Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18: 29–36, 2007.
74. Kim EY, Roshanravan H, Dryer SE. Changes in podocyte TRPC channels evoked by plasma and sera from patients with recurrent FSGS and by putative glomerular permeability factors. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863.
75. Dryer SE, Roshanravan H, Kim EY. TRPC channels: regulation, dys- regulation and contributions to chronic kidney disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865.
76. WangZ,WeiX,ZhangY,MaX,LiB,ZhangS,DuP,ZhangX,Yi F. NADPH oxidase-derived ROS contributes to upregulation of TRPC6 expression in puromycin aminonucleoside-induced podocyte injury. *Cell Physiol Biochem* 2009.
77. Coward RJ, Foster RR, Patton D, Ni L, Lennon R, Bates DO, Harper SJ, Mathieson PW, Saleem MA. Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephrin, Podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol* 16: 629–637, 2005. doi:10.1681/ASN.2004030172.
78. Kachurina N, Chung CF, Benderoff E, Babayeva S, Bitzan M, Goodyer P, Kitzler T, Matar D, Cybulsky AV, Alachkar N, Torban E. Novel unbiased assay for circulating podocyte-toxic factors associ- ated with recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 310: F1148–F1156, 2016

79. Doublie S, Musante L, Lupia E, Candiano G, Spatola T, Caridi G, Zennaro C, Carraro M, Ghiggeri GM, Camussi G. Direct effect of plasma permeability factors from patients with idiopathic FSGS on nephrin and podocin expression in human podocytes. *Int J Mol Med* 16: 49–58, 2005.
80. Ilatovskaya DV, Blass G, Palygin O, Levchenko V, Pavlov TS, Grzybowski MN, Winsor K, Shuyskiy LS, Geurts AM, Cowley AW Jr, Birnbaumer L, Staruschenko A. A NOX4/TRPC6 pathway in podocyte calcium regulation and renal damage in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 29: 1917–1927, 2018
81. Schlondorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, Lacey V, Pollak MR. TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol* 296: C558–C569, 2009. doi:10.1152/ajpcell.00077.2008.
82. Chiliza D, Krishna S, Schumacher VA, Schlondorff J. Gain-of-function mutations in transient receptor potential C6 (TRPC6) activate extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2). *J Biol Chem* 288: 18407–18420, 2013.
83. Kistler AD, Singh G, Altintas MM, Yu H, Fernandez IC, Gu C, Wilson C, Srivastava SK, Dietrich A, Walz K, Kerjaschki D, Ruiz P, Dryer S, Sever S, Dinda AK, Faul C, Reiser J. Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem* 288: 36598–36609, 2013.
84. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJ, de Boer RA, Moller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JF, Berden JH, Reiser J, Faul C, van der Vlag J. Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am J Pathol* 179: 1719–1732, 2011. doi:10.1016/j.ajpath.2011.
85. Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med* 14: 931–938, 2008.

86. Yu H, Kistler A, Faridi MH, Meyer JO, Trynieszewska B, Mehta D, Yue L, Dryer S, Reiser J. Synaptopodin limits TRPC6 podocyte surface expression and attenuates proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 27: 3308–3319, 2016.
87. Asano-Matsuda K, Ibrahim S, Takano T, Matsuda J. Role of Rho GTPase interacting proteins in subcellular compartments of podocytes. *Int J Mol Sci* 22: 3656, 2021.
88. Ruggenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G. Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESFR in nondiabetic proteinuric chronic nephropathies. “Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia” (GISEN). *Kidney Int* 1998.
89. Spires D, Ilatovskaya D V, Levchenko V, North PE, Geurts AM, Palygin O, et al. The protective role of Trpc6 knockout in the progression of diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2018
90. Prabakaran T., Christense EI., Nielsen R.; Verroust PJ. Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2012 Aug;27(8):3156-9. doi: 10.1093/ndt/gfr794. Epub 2012
91. Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, Paradise S, Milosevic I, Giovedi S, et al. Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *J Clin Invest*. 2012.
92. Dylewski J, Dobrinskikh E, Lewis L, Tonsawan P, Miyazaki M, Jat PS, et al. Differential trafficking of albumin and IgG facilitated by the neonatal Fc receptor in podocytes in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2019.
93. Gianesello L, Priante G, Ceol M, Radu CM, Saleem MA, Simioni P, et al. Albumin uptake in human podocytes: a possible role for the cubilin-amnionless (CUBAM) complex. *Sci Rep*. 2017.
94. Tojo A. Mechanism Underlying Selective Albuminuria in Minimal Change Nephrotic Syndrome;2019.
95. Chung JJ, Huber TB, Gödel M, Jarad G, Hartleben B, Kwoh C, et al. Albumin-associated free fatty acids induce macropinocytosis in podocytes. *J Clin Invest*. 2015.

96. Dobrinskikh E, Okamura K, Kopp JB, Brian Doctor R, Blaine J. Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014.
97. Morigi M.; Buelli S.; Angioletti S.; Mundel P.; Remuzzi G.; Benigni A. In Response to Protein Load Podocytes Reorganize Cytoskeleton and Modulate Endothelin-1 Gene Implication for Permeable Dysfunction of Chronic Nephropathies. *The American Journal of Pathology*. VOLUME 166, ISSUE 5, P1309-1320, MAY 01, 2005
98. He F, Chen S, Wang H, Shao N, Tian X, et al. Regulation of CD2-associated protein influences podocyte endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis induced by albumin overload. 2011
99. He FF, Zhang C, Chen S, Deng BQ, Wang H, et al. Role of CD2-associated protein in albumin overload-induced apoptosis in podocytes. *Cell Biol Int* 35: 827–834. 2011
100. Gonçalves, GL.; Costa-Pessoa JM.; Thieme K.; Lins BB.; Oliveira-Souza M. Intracellular albumin overload elicits endoplasmic reticulum stress and PKC-delta/p38 MAPK pathway activation to induce podocyte apoptosis. *Scientific Reports: Nature research*. 8:18012. 2018
101. J P Caulfield, J J Reid MGF. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment - PubMed. *Lab Invest*. 1976;34(1):43–59.
102. Lowenborg EKM, Jaremko G, Berg UB. Glomerular function and morphology in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2000
103. Guan N, Ding J, Deng J, Zhang J, Yang J. Key molecular events in puromycin aminonucleoside nephrosis rats. *Pathol Int*. 2004.
104. Liu S, Ding J, Fan Q, Zhang H. The activation of extracellular signal-regulated kinase is responsible for podocyte injury. *Mol Biol Rep*. 2010
105. Rigotherier C, Saleem MA, Bourget C, Mathieson PW, Combe C, Welsh GI. Nuclear translocation of IQGAP1 protein upon exposure to puromycin aminonucleoside in cultured human podocytes: ERK pathway involvement. *Cell Signal*. 2016.

106. Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, et al. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* 2001.
107. Kinugasa S, Tojo A, Sakai T, Tsumura H, Takahashi M, Hirata Y, et al. Selective albuminuria via podocyte albumin transport in puromycin nephrotic rats is attenuated by an inhibitor of NADPH oxidase. *Kidney Int* 2011.
108. Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 2006.
109. Souza, Marcela Lopes de, Avaliação das consequências moleculares após overload de albumina em cultura celular de podócitos com e sem dano / Marcela Lopes de Souza. – Campinas, Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas. 2018
110. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(3):630–8. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/content/13/3/630>.
111. Kiapis et al. *New Insights into the Pathology of Podocyte Loss* - 2013.
112. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970.
113. Koop K, Eikmans M, Baelde HJ, Kawachi H, De Heer E, Paul LC, et al. Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2003.
114. Angélica Horrillo, Gracia Porras, Matilde S. Ayuso, Consuelo González-Manchón, Loss of endothelial barrier integrity in mice with conditional ablation of podocalyxin (Podxl) in endothelial cells, *European Journal of Cell Biology*, Volume 95, Issue 8, 2016.
115. Urinary podocalyxin levels were associated with urinary albumin levels among patients with diabetes M. Shoji,K. Kobayashi,M. Takemoto,Y. Sato &K. Yokote Pages

164-167 | Received 08 Aug 2015, Accepted 01 Nov 2015, Published online: 04 Dec 2015

116. Hazem M. EL-Ashmawy, Fayrouz O. Selim, Thoraya A.M. Hosny, Hosam N. Almassry, Association of serum podocalyxin levels with peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes, *Journal of Diabetes and its Complications*, Volume 33, Issue 7, 2019.
117. Kanno K, Kawachi H, Uchida Y, Hara M, Shimizu F, Uchiyama M. Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases. *Nephron Clin Pract.* 2003.
118. Lehtonen, S. et al . Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alfa-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005.
119. Chen S, Chen L, Jiang H. Integrated Bioinformatics and Clinical Correlation Analysis of Key Genes, Pathways, and Potential Therapeutic Agents Related to Diabetic Nephropathy. *Dis Markers.* 2022 May 21;2022.
120. Sonneveld R, Ferrè S, Hoenderop JGJ, Dijkman HB, Berden JHM, Bindels RJM, et al. Vitamin D down-regulates TRPC6 expression in podocyte injury and proteinuric glomerular disease. *Am J Pathol [Internet].* 2013.
121. Kuwahara K., Wang Y., McAnally J., Richardson JA, Bassel-Duby R., Hill JA, Olson EN TRPC6 cumpre um circuito de sinalização de calcineurina durante a remodelação cardíaca patológica. *J. Clin. Investigação* 2006.
122. Ma R., Liu L., Jiang W., Yu Y., Song H. FK506 melhora a lesão de podócitos na nefropatia diabética tipo 2 pela regulação negativa da expressão de TRPC6 e NFAT. *Int. J. Clin. Exp. Patol.* 2015
123. Faul C., Donnelly M., Merscher-Gomez S., Chang YH, Franz S., Delfgaauw J., Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K., et al. O citoesqueleto de actina dos podócitos renais é um alvo direto do efeito antiproteinúrico da ciclosporina A. *Nat. Med.* 2008
124. Shibasaki F., Hallin U., Uchino H. Calcineurin como regulador multifuncional. *J. Biochem.* 2002.
125. Verheijden KAT, Sonneveld R., Bakker-van Bebbber M., Wetzels JFM, van der Vlag J., Nijenhuis T. The Calcium-Dependent Protease Calpain-1 Links TRPC6 Activity to Poocyte Injury. *Geléia. Soc. Nefrol.* 2018.

126. Canales CP, Krall P, Kairath P, Perez IC, Fragoso MA, Carmona-Mora P, Ruiz P, Reiser J, Young JI, Walz K. Characterization of a *Trpc6* transgenic mouse associated with early onset FSGS. *Br J Med Res* 2015.
127. Wang L, Chang JH, Buckley AF, Spurney RF. Knockout of TRPC6 promotes insulin resistance and exacerbates glomerular injury in Akita mice. *Kidney Int* 95: 321–332, 2019.
128. Staruschenko A. TRPC6 in diabetic kidney disease: good guy or bad guy? *Kidney Int* 95: 256–258, 2019.
129. Marshall, CB & Shankland, SJ Proteínas reguladoras do ciclo celular na saúde e doença dos podócitos. *Nephron Exp. Nefrol.* 106 , e51–e59 2007
130. Srivastava, T., Garola, RE & Singh, HK Proteínas reguladoras do ciclo celular no podócito na glomerulopatia colapsante em crianças. *Kidney Int* 70 , 529-535 2006
131. Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, et al. Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 2000
132. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000.
133. Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000
134. Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002.
135. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Padmanabhan S, Yu J, Ailawadhi S, et al. Bortezomib in combination with pegylated liposomal doxorubicin and thalidomide is an effective steroid independent salvage regimen for patients with relapsed or refractory multiple myeloma: results of a phase II clinical trial. *Leuk Lymphoma.* 2009
136. Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, Moustakas A. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell.* 2005.

137. Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, et al. Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *Virchows Arch*. 2006.
138. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009.

9.ANEXOS

Dispensa do comitê de ética

OF. CEP nº 21/2022



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 29 de março de 2022.

SIGAD: Of. CEP nº 021/2022

Prof.^a Dra. Mara Sanches Guaragna
Pesquisadora Responsável

REF.: DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezada Senhora,

Informamos que a pesquisa intitulada "**IDENTIFICAÇÃO DAS CONSEQUÊNCIAS DA ALTERAÇÃO DE PODXL E TRPC6 APÓS OVERLOAD DE ALBUMINA EM CULTURAS DE PODÓCITOS COM E SEM DANO**", para fins de tese de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, cuja aluna é Marcela Lopes de Souza, equipe de pesquisa é composta por Prof.^a Dra. Maricilda Palandi de Mello, Prof.^a Dra. Vera Maria Santoro Belangero, Prof. Dr. Gil Guerra Junior e Prof.^a Dra. Andrea Maciel Guerra, sob a orientação da pesquisadora responsável, propõe identificar as consequências de alterações de expressão nos genes PODXL e TRPC6 após overload de albumina em cultura celular de podócitos com e sem dano.

Deste modo, baseados no resumo anexado ao documento, o referido estudo não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, tendo em vista que será realizada análise de podócitos humanos imortalizados e que foram doadas ao grupo de pesquisa.

Ressaltamos que se houver qualquer alteração no escopo do projeto, na qual envolva seres humanos, o CEP/Unicamp deve ser informado para fins de deliberação sobre essas mudanças.

Atenciosamente,

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
13083-887 Campinas – SP
<http://www.prp.unicamp.br/cep>

Fone: (019) 3521-8936
Fone: (019) 3521-7187
cep@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código DD0BBF13 6BCD4F56 AD473370 4B2E950D

OF. CEP nº 21/2022



Título do Projeto de Doutorado: Identificação das consequências da alteração de expressão de *PODXL* e *TRPC6* após overload de albumina em cultura de podócitos com e sem dano.

Aula: Marcela Lopes de Souza

Orientadora: Mara Sanches Guaragna

Co-orientadora: Maricilda Palandi de Mello

Demais membros:

Vera Maria Santoro Belangero

Gil Guerra-Júnior

Andrea Maciel Guerra

O projeto trata-se de um estudo com finalidade de analisar o efeito de albumina em podócitos humanos imortalizados, que foram doados por um grupo de pesquisa externo ao Brasil (Professor Moin Saleem da Universidade de Bristol - Inglaterra). Todas metodologias serão desenvolvidas no CBMEG - UNICAMP.

Resumo:

A presença de proteinúria persistente, mesmo em quantidades mínimas (microalbuminúria) é o sinal mais sugestivo de doença glomerular primária ou secundária e do desenvolvimento de doença renal crônica (DRC) constituindo também um importante marcador prognóstico para esta condição. A principal proteína plasmática presente na urina é a albumina e em mais de 90% dos casos, a origem da albuminúria é glomerular e decorrente da lesão em um dos quatro tipos celulares que residem nos glomérulos: células mesangiais, endoteliais, epiteliais parietais e epiteliais viscerais (podócitos). Os podócitos, células altamente especializadas e diferenciadas, são compostos por três diferentes segmentos: o

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
13083-887 Campinas – SP
<http://www.prp.unicamp.br/cep>

Fone: (019) 3521-8936
Fone: (019) 3521-7187
cep@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código DD0BBF13 6BCD4F56 AD473370 4B2E950D

OF. CEP nº 21/2022



corpo celular, os processos principais e os pedicelos. Estes últimos, são extremamente importantes no processo de filtração, sobretudo por suas porções funcionais, divididas em três domínios: domínio apical da membrana (AMD), diafragma de fenda (do inglês, slit diaphragm - SD) e domínio basal da membrana (BMD), o último associado à MB. Diversas proteínas estão envolvidas na manutenção da estrutura e da função do podócito e podem afetar direta ou indiretamente o rearranjo do citoesqueleto de actina. No presente estudo focamos em duas proteínas, a podocalixina, codificada pelo gene *PODXL*, e o canal de cálcio receptor potencial transitório C, codificado pelo gene *TRPC6*. Em trabalho prévio foi realizada a exposição dos podócitos a overload de albumina em diversas concentrações (variando entre 3 e 40 mg/mL) sem e com exposição prévia à droga nefrotóxica puromicina aminoglicosídeo (PAN) e avaliação da expressão dos genes *PODXL* e *TRPC6*, obtendo-se os seguintes resultados: em podócitos sem dano (0 ug/mL PAN) houve aumento de expressão do gene *PODXL* nas concentrações de 30 e 40 mg/mL ($p < 0,01$) e diminuição de expressão de *TRPC6* em todas as concentrações ($p < 0,01$); em podócitos com dano (15 ug/mL PAN/12 horas) houve aumento de expressão de ambos os genes, iniciando em 15 mg/mL de albumina para o *PODXL* e somente em 40 mg/mL de albumina no caso do *TRPC6*. Neste estudo anterior não foi avaliado se haveria regressão do fenótipo após retirada da albumina. Ainda, já que a podocalixina possui um papel bem estabelecido na proliferação, migração e diferenciação celular em diversos cânceres, inclusive o renal, levantou-se a hipótese de qual seria o efeito da superexpressão de *PODXL* induzida por excesso de albumina em podócitos. Logo, o presente estudo tem como objetivo geral identificar as consequências de alterações de expressão nos genes *PODXL* e *TRPC6* após overload de albumina em cultura celular de podócitos com e sem dano, sendo os dois objetivos específicos: 1) avaliar a recuperação de fenótipo, identificando e descrevendo as consequências da alteração na expressão dos genes *PODXL* e *TRPC6* após retirada da albumina em excesso, em podócitos com e sem exposição prévia à PAN. Para isso, a exposição de overload de albumina será seguida de processos de retirada, regressiva e abrupta, da albumina, com avaliação de expressão relativa por Real Time Quantitativo e expressão das proteínas, por Western Blot; 2) avaliar o potencial tumorigênico de alteração de expressão de *PODXL*, frente às seguintes condições: sem PAN e com albumina nas concentrações de 0 e 40 mg/mL; com PAN e com albumina nas concentrações de 0,

1

<http://www.prp.unicamp.br/cep>cep@unicamp.br

OF. CEP nº 21/2022



20 e 40 mg/mL. Neste caso, serão empregados experimentos específicos de 3 crescimento celular, ensaio de migração e ensaio clonogênico. Os resultados serão analisados com teste ANOVA e Tukey, com $p \leq 0,05$.

Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
13083-887 Campinas – SP
<http://www.prp.unicamp.br/cep>

Fone: (019) 3521-8936
Fone: (019) 3521-7187
cep@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código DD0BBF13 6BCD4F56 AD473370 4B2E950D