

Denise Maria do Nascimento Costa

Polimorfismos do gene *MBL2* e percentual de IgG4 sérica em
glomerulopatia membranosa

Recife – PE

2016

Denise Maria do Nascimento Costa

Polimorfismos do gene *MBL2* e percentual de IgG4 sérica em
glomerulopatia membranosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucila Maria Valente

Recife – PE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C837p Costa, Denise Maria do Nascimento.
Polimorfismos do gene *MBL2* e percentual de IgG4 sérica em
glomerulopatia membranosa / Denise Maria do Nascimento Costa. –
2016.
111 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Ativação do complemento. 2. Glomerulonefrite membranosa. 3.
Imunoglobulina G. 4. Lectina de ligação a manose. 5. Polimorfismo
genético. I. Sarinho, Emanuel Sávio Cavalcanti (Orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-218)

DENISE MARIA DO NASCIMENTO COSTA

**POLIMORFISMOS DO GENE MBL2 E PERCENTUAL IGG4 SÉRICA EM
GLOMERULOPATIA MEMBRANOSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE.

Aprovada em: 21/07/2016

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Lucila Maria Valente (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^o. José Antônio Rocha Gontijo (Examinador Externo)
Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Gisélia Alves Pontes da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof^ª. Dr.^a. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

COORDENADOR

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

VICE- COORDENADOR

Prof. Dr. Brivaldo Markman Filho

CORPO DOCENTE

Prof ^a . Ana Lúcia Coutinho Domingues	Prof. Hilton Justino de Oliveira
Prof ^a . Ângela Luiza Branco Pinto Duarte	Prof. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Prof. Ary Gomes Filho	Prof ^a . Lucila Maria Valente
Prof. Brivaldo Markman Filho	Prof. José Ângelo Rizzo
Prof. Bruno Severo Gomes	Prof. Lucio Villar Rabelo Filho
Prof ^a . Cláudia Diniz Lopes Marques	Prof. Marcelo Renato Gruerino
Prof. Décio Medeiros Peixoto	Prof. Marcelo Tavares Viana
Prof. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira	Prof. Paulo Sérgio Ramos Araújo
Prof. Edgar Guimarães Victor	Prof ^a . Patrícia Érika de Melo Marinho
Prof. Edmundo Pessoa de A. Lopes Neto	Prof ^a . Romualda Castro do Rêgo Barros
Prof. Emanuel Sávio de C. Sarinho	Prof. Sandro Gonçalves de Lima
Prof ^a . Emília Chagas Costa	Prof ^a . Simone Cristina Soares Brandão
Prof ^a . Heloísa Ramos Lacerda de Melo	

Dedico esta dissertação aos meus filhos Hugo e Luísa, fontes de aprendizado diário, para que possa servir de estímulo para a busca de novos conhecimentos no futuro. E a toda a minha família e professores que tornaram este trabalho possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho Hugo, tão pequeno, mas com seu coração imenso é uma lição de vida. À minha filha Luísa, presente que chegou durante o mestrado, cujo sorriso é uma fonte de inspiração. Razões da minha vida e motivos para buscar sempre o melhor de mim.

Aos meus pais, Marilene e Firmino, pelos exemplos e esforços em proporcionar sempre a melhor educação possível.

Ao meu marido Pedro, e sua (minha) família, pelo incentivo, pelos muitos momentos de ajuda e por trazerem sempre carinho e conforto.

Ao meu irmão Pedro, amigo de todas as etapas da minha vida, e minha cunhada Carolina, por me darem a sobrinha querida, Letícia.

Ao Dr. Emanuel Sarinho, por ter me acolhido desde os meus primeiros passos acadêmicos até os dias de hoje, com sabedoria, rigidez e, ao mesmo tempo, com imenso carinho.

À Dra Lucila Valente, pelo exemplo de conhecimento e dedicação ao trabalho, pela ajuda em todas as etapas desta pesquisa e pela confiança em mim depositada.

À Dra Paula Sandrin, pela disposição em ajudar e por todo o conhecimento acrescentado.

A todo o grupo de glomerulopatias do Hospital das Clínicas e IMIP, Dra Alina Cavalcante, Dra Gisele Vajgel, Dra Camila Lyra e Dra Carolina Jordão, por todo o conhecimento compartilhado, pela ajuda e pelo acolhimento; e ao Dr Luis Sette pelas opiniões dadas.

À Dra Ana Paula Gueiros, Dr Ericson Gouveia, Dr Amaro Medeiros, Dr Ruy Lima, pela confiança depositada para a continuidade do ambulatório de glomerulopatias do IMIP, gatilho inicial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais amigos da Nefrologia do HC, Nefrologia do IMIP e UTI do HBL pela ajuda diária e pelo incentivo.

Aos funcionários do serviço de Nefrologia do HC, que contribuem para o funcionamento do serviço.

Ao LIKA, pela realização dos exames laboratoriais, e Henrique Santana pela ajuda na coleta das amostras e desenvolvimento do trabalho, e pelos diversos esclarecimentos prestados.

A todos os pacientes e voluntários que participaram do estudo, pela disponibilidade e colaboração, sem os quais seria impossível a realização do projeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização do estudo.

"Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado."

Isaac Newton

RESUMO

Introdução: Glomerulopatia membranosa (GM) é uma causa de síndrome nefrótica cuja etiologia pode ser primária (GMP) ou secundária, dentre estas é frequente o Lúpus eritematoso sistêmico (LES). Trata-se de uma doença imunologicamente mediada, caracterizada pela deposição de imunocomplexos no espaço subepitelial glomerular. A maioria dos antígenos envolvidos identificados são alvos da imunoglobulina G4 (IgG4), subclasse predominante em imunofluorescências renais na GMP, em contraste com a GM secundária a LES (GMS) na qual IgG1, IgG2 e IgG3 prevalecem. Apesar da IgG4 ser um subtipo de imunoglobulina com baixa capacidade de ativação do complemento, há várias evidências deste envolvimento na GMP. Esses dados, em conjunto com achados de depósitos glomerulares de lectina ligadora de manose (MBL), um dos principais componentes da via das lectinas do complemento, podem sugerir que tanto a via da lectina como a IgG4 estão envolvidas nesta patologia. Sabe-se ainda que o desenvolvimento de GMP também está associado a alterações genéticas. Entretanto, a etiopatogenia da GMP ainda não é totalmente conhecida e estudos para avaliação gênica do *MBL2* e dosagem sérica de IgG em GM são escassos. Assim, foi realizado este estudo com o objetivo de avaliar a frequência de polimorfismos do gene *MBL2* em portadores de GM, comparados a indivíduos saudáveis. Um segundo objetivo foi comparar pacientes com GMP e GMS quanto a diferenças do percentual de IgG4 sérico em relação a IgG (%IgG4) e da frequência de polimorfismos do *MBL2*.

Métodos: Estudo realizado entre 2014 e 2015, em Pernambuco - Brasil. A amostra incluiu 60 pacientes adultos com diagnóstico histopatológico de GMP ou GMS. Outras causas de GM secundárias foram excluídas. Foram avaliados 35 pacientes com GMP e 24 com GMS, e um grupo controle (GC), formado por 101 indivíduos saudáveis. **Resultados:** O alelo mutante O do gene *MBL2* foi mais frequente no grupo com GM comparados aos GC (42% x 22%; $p < 0,001$). A heterozigose A/O, em relação ao genótipo A/A, predominou entre os pacientes comparados ao GC, associando-se a GM com OR = 11,16 (95% IC = 4,77 - 28,41). À análise comparativa entre os pacientes com GMP e GMS, não houve diferença das frequências dos polimorfismos genéticos entre os grupos. O grupo GMP apresentou menor mediana de IgG sérica total ($p = 0,008$) e maior %IgG4 ($p = 0,016$), comparado ao grupo GMS. Nível sérico de IgG4 não diferiu significativamente entre os grupos GMP e GMS ($p = 0,289$).

Conclusão: O polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* associou-se à GM, comparado a indivíduos saudáveis, porém sem diferença entre as etiologias avaliadas. Já o %IgG4 sérico foi maior na GMP em relação a GMS. Estes resultados sugerem que esta mutação genética possa conferir maior vulnerabilidade a GMP e que o %IgG4 sérico possa ser utilizado como marcador adicional para diagnóstico diferencial entre as duas etiologias da GM.

Palavras-chave: Ativação do complemento. Glomerulonefrite membranosa. Imunoglobulina G. Lectina de ligação a manose. Polimorfismo genético.

ABSTRACT

Introduction: Membranous glomerulopathy (MG) is a cause of nephrotic syndrome whose etiology may be primary (PMG) or secondary, which is frequent systemic lupus erythematosus (SLE). It is an immune-mediated disease characterized by the deposition of immune complexes in the glomerular subepithelial space. Most of the identified antigens are targets to immunoglobulin IgG4, most common subclass in renal immunofluorescence in GMP, in contrast to the SLE secondary MG (SMG) in which IgG1, IgG2 and IgG3 prevail. Although IgG4 is an immunoglobulin subtype with low complement activation capacity, there is abundant evidence of this involvement in PMG. These data, together with glomerular deposits of mannose-binding lectin (MBL), a major component of the lectin pathway of complement, may suggest that both the lectin pathway and IgG4 are involved in this pathology. It is also known that the development of PMG is associated with genetic alterations. As the pathogenesis of PMG is not yet fully known, and studies for genetic evaluation of *MBL2* and serum IgG in MG are scarce, this study was conducted to evaluate the frequency of *MBL2* gene polymorphisms in patients with MG, compared to healthy subjects. A second objective was to compare patients with PMG and SMG with respect to the percentage of serum IgG4 (IgG4%) and frequency *MBL2* polymorphisms. **Methods:** This study was conducted between 2014 and 2015 in Pernambuco - Brazil. The sample included 60 adult patients with histopathologic diagnosis of PMG or SMG. Other causes of secondary MG were excluded. Thirty-five patients with PMG and 24 with SMG were evaluated, compared to a control group (CG) of 101 healthy subjects. **Results:** The mutant allele O was more frequent in the MG population compared to CG (42% vs. 22%; $p < 0.001$). The heterozygous A/O, compared to genotype A/A, predominated among patients compared to the control group, and was associated with MG (OR = 11.16; 95% CI = 4.77 to 28.41). In the comparative analysis between patients with PMG and SMG, there was no difference in the frequency of genetic polymorphisms between groups. The PMG group had lower median total serum IgG ($p = 0.008$) and higher IgG4% ($p = 0.016$) compared to the SMG group. Serum IgG4 did not differ significantly between the groups PMG and SMG ($p = 0.289$).

Conclusion: The polymorphism of exon 1 *MBL2* gene was associated with MG, compared to healthy subjects, but no difference between the assessed etiologies. Serum IgG4% was higher in PMG relative to SMG. These results suggest that this gene mutation can confer increased vulnerability to PMG and the serum IgG4% may be used as an additional marker for the differential diagnosis between the two etiologies MG.

Keywords: Complement activation. Membranous glomerulonephritis. Immunoglobulin G. Mannose binding lectin. Genetic polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1	- Formação de complexos imunes em GM	21
Figura 2	- IgG4 e a capacidade de heterobivalência	23
Figura 3	- Vias de complemento	25
Figura 4	- Formação genética e funcional da MBL	28

CAPÍTULO III

Figura 5	- Box-plot de níveis séricos de IgG (a), IgG4 (b) e %IgG4 (c), segundo os grupos GMP e GMS	43
Figura 6	- Comparação dos grupos GMP e GMS quanto ao genótipo A/O e ao %IgG4 sérico	44
Figura 7	- Modelo hipotético dos mecanismos etiopatogênicos da GMP	48

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1 -	Características clínicas dos pacientes com GMP, GMS e GC	39
Tabela 2 -	Polimorfismos do éxon 1 do <i>MBL2</i> em pacientes com GM e GC	40
Tabela 3 -	Polimorfismos do éxon 1 do <i>MBL2</i> em GMP × controle, GMS × controle e GMP × GMS	41
Tabela 4 -	Características clínicas dos pacientes com GMP e GMS com dosagem sérica de IgG e IgG4	42

LISTA DE ABREVIATURAS

GM	- Glomerulopatia membranosa
LES	- Lúpus eritematoso sistêmico
GMS	- Glomerulopatia membranosa secundária a Lúpus eritematoso sistêmico
GMP	- Glomerulopatia membranosa primária
Ig	- Imunoglobulina
MBL	- Lectina ligadora de manose
%IgG4	- percentual de IgG4 em relação a IgG sérica
NEP	- Endopeptidase neutra
<i>PLA2R1</i>	- Receptor transmembrana tipo 1 de fosfolipase A2 do tipo M
IgG4-G0	- IgG4 pobre em galactose terminal
HC-UFPE	- Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
IMIP	- Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
GC	- Grupo controle

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	16
2. CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Revisão da literatura	18
2.1.1. Introdução	18
2.1.2. A Glomerulopatia membranosa	18
2.1.3. Envolvimento de imunocomplexos na fisiopatogenia da GM	20
2.1.4. Envolvimento das vias do complemento na fisiopatogenia da GM	24
2.1.5. Envolvimento de polimorfismos genéticos na etiopatogenia da GM	27
2.1.6. Considerações finais	29
2.2. Justificativa	30
2.3. Objetivos	31
3. CAPÍTULO II: MÉTODOS	32
3.1. Delineamento do estudo	32
3.2. Local de realização do estudo	32
3.3. Casuística	32
3.3.1. Critérios de inclusão	33
3.3.2. Critérios de exclusão	33
3.3.3. Amostra	33
3.4. Definição e categorização das variáveis	34
3.5. Operacionalização da pesquisa	35
3.5.1. Coleta de dados	35
3.5.2. Extração do DNA	36
3.5.3. Genotipagem dos polimorfismos no éxon 1 do gene <i>MBL2</i>	36
3.5.4. Dosagem sérica da IgG e subclasse IgG4	36
3.6. Análise estatística	37
3.7. Aspectos éticos	37

4. CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1. Resultados	39
4.1.1. Polimorfismo do gene <i>MBL2</i> e GM	39
4.1.2. Percentual sérico de IgG4 em GMP e GMS	40
4.2. Discussão	44
 5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	49
5.1. Considerações finais	49
5.2. Conclusões	49
 REFERÊNCIAS	50
 APÊNDICES	60
Apêndice A - Ficha de coleta de dados	60
Apêndice B - Termo de consentimento livre e esclarecido	62
Apêndice C - Artigo Original 1 - Polimorfismos do gene <i>MBL2</i> e percentual sérico de IgG4 em GM	64
Apêndice D - Artigo original 2 - Glomerulopatias primárias e secundárias no nordeste do Brasil: dados do Registro Pernambucano de Glomerulopatias - REPEG	83
 ANEXOS	106
Anexo A - Instruções aos autores para publicação: <i>Journal of the American Society of Nephrology</i>	106
Anexo B - Instruções aos autores para publicação: <i>Nephrology, Dialysis, Transplantation</i>	108
Anexo C - Critérios diagnósticos para Lúpus Eritematoso Sistêmico pelo SLICC	110
Anexo D - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	111

1. APRESENTAÇÃO

Glomerulopatia membranosa (GM) é uma causa frequente de síndrome nefrótica cuja etiologia pode ser primária ou secundária. Dentre as causas secundárias, é comum o Lúpus eritematoso sistêmico (LES), o qual possui mecanismos de lesão renal bem estabelecidos. A nefrite lúpica classe V ou glomerulopatia membranosa secundária ao LES (GMS) decorre da formação sistêmica de imunocomplexos com posterior deposição na região podocitária glomerular. Já os mecanismos etiopatogênicos da glomerulopatia membranosa primária (GMP) não estão completamente esclarecidos. É uma doença imunologicamente mediada, caracterizada por lesão podocitária. Entretanto, ao contrário da GMS, a deposição de imunocomplexos na doença primária parece decorrer da reação antígeno-anticorpo *in situ*, no espaço subepitelial glomerular (RONCO; DEBIEC, 2012). Alguns dos antígenos que participam destes imunocomplexos vêm sendo identificados nos últimos anos, sendo o achado em comum, que a maioria deles são alvos de imunoglobulinas (Ig) do subtipo IgG4 (STONE, 2013). Esta é a subclasse de IgG mais frequente à imunofluorescência renal de pacientes com GMP. Em contraste, na GMS predominam IgG1, IgG2 e IgG3 (SEGAWA et al. 2010).

A IgG4 é a subclasse de IgG menos abundante no organismo e com reconhecida baixa capacidade de ativação das vias do complemento (AALBERSE; SCHUURMAN, 2002). Ainda assim, sabe-se que depósitos glomerulares de C3, C4d (VAL-BERNAL, 2011) e do complexo de ataque à membrana C5b-9 estão presentes e levam à lesão podocitária nesta glomerulopatia, comprovando o envolvimento do sistema complemento na GMP (CUNNINGHAM; QUIGG, 2005). Ao contrário da GMS entretanto, não há depósito renal de C1q na GMP, indicando que a presença de C4d neste caso não decorre da ativação da via clássica do complemento, mas possivelmente da via das lectinas. Em conjunto com a demonstração de depósitos renais da proteína lectina ligadora de manose (MBL) (SEGAWA et al. 2010), esses dados sugerem que a via das lectinas e a IgG4 possam estar envolvidas na fisiopatogenia da doença.

Os motivos que desencadeiam a formação dos imunocomplexos e a ativação das vias do complemento na GMP são incertos. Estudos recentes sugerem que a GMP decorre do conjunto de três condições: presença de proteínas com conformações alteradas, passando a atuar como auto antígenos, anticorpos do tipo IgG4 contra estes antígenos e susceptibilidade genética (SALANT, 2013). Algumas mutações genéticas têm sido identificadas como possíveis fatores relacionados ao aumento de vulnerabilidade para o desenvolvimento de

GMP (STANESCU et al. 2011). Em LES, estudos têm demonstrado associação de variantes genéticas do *MBL2*, gene responsável pela produção da MBL, com o desenvolvimento de nefrite (SANDRIN-GARCIA et al. 2011). Entretanto, estudos a respeito de polimorfismos do gene *MBL2* e GM, bem como de níveis séricos de IgG4 nesta glomerulopatia, são escassos.

Por estes motivos, realizou-se esta pesquisa para avaliar a hipótese de que a presença de polimorfismos do gene *MBL2*, bem como a elevação do nível sérico da IgG4 estivessem associadas a GMP. Assim, o estudo teve o objetivo de verificar a existência de polimorfismos do gene *MBL2* em pacientes portadores de GM comparados a indivíduos saudáveis. Um segundo objetivo do estudo foi analisar se há diferença do percentual sérico de IgG4 em relação a IgG (%IgG4) entre os portadores de GMP e GMS. O objetivo específico foi avaliar se há diferença da frequência do polimorfismo do *MBL2*, comparando-se os pacientes com GMP e GMS.

A presente dissertação tem como tema: “Polimorfismos do gene *MBL2* e percentual de IgG4 sérica em glomerulopatia membranosa” e está composta por artigo original com o mesmo título (apêndice C). Este artigo corresponde a um estudo exploratório, no qual foram incluídos 60 pacientes com GM, com os mesmos objetivos acima descritos. Este artigo será submetido à publicação para a revista *Journal of the American Society of Nephrology* (Online ISSN: 1533-3450 - Print ISSN: 1046-6673), periódico de relevância internacional, catalogado no PubMed, segundo as normas de publicação (anexo A).

Durante o desenvolvimento da dissertação, para melhor conhecimento do perfil das doenças glomerulares dos pacientes atendidos nos dois ambulatorios de referência no estado de Pernambuco, foi desenvolvido o artigo original "Glomerulopatias primárias e secundárias no nordeste do Brasil: dados do Registro Pernambucano de Glomerulopatias - REPEG" (apêndice D). Este é o primeiro registro das glomerulopatias no nordeste do Brasil e estabelece o início do REPEG - Registro Pernambucano de Glomerulopatias. Será submetido à publicação na revista *Nephrology, Dialysis, Transplantation (NDT)* (Online ISSN 1460-2385 - Print ISSN 0931-0509), catalogada no PubMed, segundo as normas de publicação (anexo B).

2. CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

2.1. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1. Introdução

A GM é uma patologia cuja etiologia pode ser idiopática ou ser associada a diversos formas de insultos. Das causas secundárias, uma das mais frequentes e com mecanismos de lesão renal mais bem reconhecidos é o LES. Já a GMP, teve seu modelo experimental inicial estabelecido em 1952 e, apesar dos avanços no seu entendimento, ainda não tem mecanismos etiopatogênicos completamente elucidados. Provavelmente, o desenvolvimento de GMP está relacionado ao conjunto de três fatores: presença de auto antígenos podocitários, anticorpos do tipo IgG4 contra estes antígenos e susceptibilidade genética (SALANT, 2013). Este capítulo de revisão narrativa delimita o conhecimento vigente a respeito dos mecanismos relacionados à lesão glomerular na GMP .

2.1.2. A Glomerulopatia Membranosa

A GM é uma causa de síndrome nefrótica, caracterizada histopatologicamente por espessamento difuso de membrana basal glomerular, decorrente da deposição de complexos imunes na região podocitária. É classificada, de acordo com sua etiologia, como idiopática ou primária em cerca de 70 a 80% dos casos, quando não há patologias subjacentes identificadas, ou secundária, podendo ser associada a causas autoimunes, infecciosas, neoplásicas e

medicamentosas (GLASSOCK, 2010). Dentre as formas secundárias, destaca-se o LES (DIZ; SCHERER; KIRSZTAJN, 2007), sendo a principal etiologia de GM secundária, principalmente em mulheres jovens (ZENG et al. 2008).

Apesar de rara, com incidência mundial de um caso a cada 100.000 indivíduos por ano, a GMP é uma das principais causas de síndrome nefrótica no mundo, responsável por cerca de 20% destes casos (MAISONNEUVE et al. 2000) e é a segunda causa de síndrome nefrótica em adultos no Brasil (MALAFRONTTE et al. 2006). Pode afetar indivíduos de todas as raças, sexos e idades, porém é mais comum em homens do que em mulheres (2:1), com pico de incidência entre os 30 e 50 anos de idade (RONCO; DEBIEC, 2015).

A GMP é uma síndrome que pode resultar em grande morbidade e letalidade aos seus portadores. A síndrome nefrótica, presente em 60-80% dos pacientes, leva a aumento de complicações cardiovasculares, incluindo eventos trombóticos (13%) e maior susceptibilidade a infecções (17%) (VAN DEN BRAND et al. 2014). A história natural desta doença é variável e imprevisível. Cerca de 30% dos pacientes apresentam remissão espontânea (POLANCO et al. 2010), outros 30% podem permanecer com proteinúria e com função renal estável. Porém, até 40% dos casos evoluem para doença renal crônica terminal em cinco a 10 anos (GLASSOCK, 2003). Após transplante renal, a GM pode recorrer em cerca de 40% dos casos, reduzindo a sobrevida do enxerto (SPRANGERS et al. 2010).

Sabe-se que a GM pode apresentar-se como uma patologia renal isolada até anos antes de manifestações sistêmicas de uma doença subjacente associada. Eventualmente, os achados clínicos e laboratoriais e histopatológicos renais não são suficientes para identificar a etiologia da doença (SAM et al. 2014; MURTAS; GHIGGERI, 2016). A escassez de marcadores diagnósticos e prognósticos, associados à evolução inconstante da GMP, dificultam a definição de quais pacientes com GMP devem receber tratamento específico, realizado com imunossupressores, podendo ter custo elevado e causar eventos adversos graves (HOFSTRA; FERVENZA; WETZELS, 2013)

2.1.3. Envolvimento de imunocomplexos na fisiopatogenia da GM

A fisiopatogenia da GM não está completamente elucidada, porém sabe-se que a proteinúria ocorre como consequência de depósitos imunes subepiteliais. A formação destes imunocomplexos pode ocorrer na circulação sistêmica, com posterior deposição glomerular, mecanismo principal de lesão renal na GMS. A formação de imunocomplexos pode ainda ocorrer *in situ*, como consequência da reação de anticorpos circulantes contra antígenos podocitários nativos ou exógenos, adquiridos principalmente durante a infância. Este é o mecanismo predominante na GMP (GLASSOCK, 2010; RONCO; DEBIEC, 2012) (figura 1).

Os mecanismos de lesão renal na GMP vêm sendo estudados a partir do modelo experimental da nefrite de Heymann de 1952, responsável pela identificação da megalina podocitária como antígeno alvo para os anticorpos circulantes, levando à formação de imunocomplexos *in situ* (HEYMANN; LUND; HACKEL, 1952). A ausência da megalina em humanos, entretanto, levou à busca por novos antígenos. Os progressos dos estudos em humanos ocorreram quase 50 anos após, quando foram identificados novos antígenos podocitários em portadores de GMP.

Em 2002, Debiec et al. identificaram a endopeptidase neutra (NEP) como auto antígeno alvo em recém-natos portadores de GMP. Estes autores demonstraram a passagem de anticorpos anti-NEP através da placenta de mães deficientes em NEP, previamente sensibilizadas em outras gestações com parceiros NEP-positivos (DEBIEC et al. 2002). Entretanto, por se tratar de uma rara apresentação da doença e devido aos níveis séricos destes anticorpos serem semelhantes em adultos portadores de GMP comparados a indivíduos saudáveis (MURTAS et al. 2012), a NEP isoladamente não é capaz de explicar a fisiopatogenia da doença.

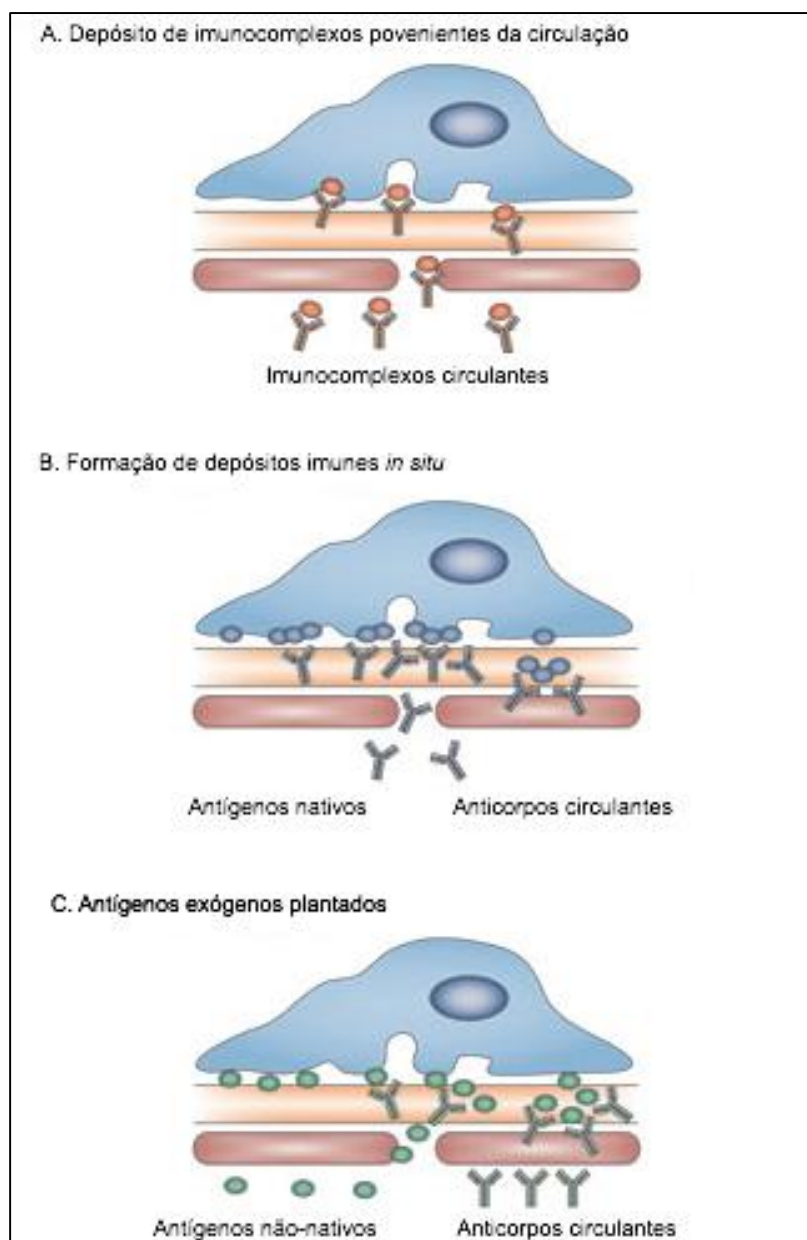


FIGURA 1 - Formação de complexos imunes na GM. A GMS, decorre da deposição local de imunocomplexos circulantes (A). Na GMP, predomina a reação local de anticorpos contra antígenos podocitários nativos (B) ou exógenos (C). (Modificado de Ronco e Debiec, 2012).

Em 2009, Beck et al. localizaram o receptor transmembrana tipo 1 de fosfolipase A2 do tipo M (*PLA2RI*), membro da família dos receptores de manose, nos podócitos de pacientes com GMP. Este antígeno é, até o momento, o que demonstra maior associação com a etiologia primária da GM, presente em 70% dos pacientes. Entretanto, cerca de 30% dos portadores de GMP permaneciam sem antígeno alvo identificado. Dois anos após, a albumina sérica catiônica bovina foi identificada como possível antígeno podocitário exógeno, sendo adquirido e implantado na infância (DEBIEC et al. 2011). Alguns outros possíveis auto antígenos podocitários identificados foram aldolase redutase, superóxido dismutase 2 (PRUNOTTO et al. 2010), alfa-enolase (BRUSCHI et al. 2011) e trombospondina (TOMAS et al. 2014). É possível ainda que a GMP seja resultante da coexistência de mais de um alvo podocitário (MURTAS et al. 2012).

O ponto em comum e intrigante dos antígenos podocitários descritos até o momento é que a maioria deles é alvo da IgG4 (STONE, 2013). Esta Ig tem sua produção regulada pelas células Th2 e está mais comumente associada a exposições crônicas a antígenos (NIRULA et al. 2011). É a subclasse menos abundante, em geral representando menos de 5% das IgG, e possui características peculiares como a heterobivalência (figura 2). Esta propriedade resulta de uma sequência de aminoácidos (Cisteína-Prolina-Serina-Cisteína) mais susceptível a redução, causando a separação das cadeias pesadas do anticorpo e reassociação destas cadeias com outras moléculas de IgG4. Como consequência, formam-se moléculas biespecíficas, porém funcionalmente monovalentes, inibindo a formação de grandes imunocomplexos e reduzindo a capacidade de ativação da via clássica do complemento (AALBERSE; SCHUURMAN, 2002).

Assim, algumas hipóteses buscando explicar a participação da IgG4 na fisiopatogenia da GMP têm sido propostas. Uma delas é a de que a IgG1, encontrada em fases mais precoces da GMP (HUANG et al. 2013), seja a responsável pela ativação da via clássica do complemento e, em seguida, da via alternativa e/ou das lectinas (THURMAN; HOLERS, 2006). Neste caso, a IgG4 surgiria numa fase mais avançada da doença, como reflexo de uma reação crônica. Uma segunda hipótese está relacionada à natureza proinflamatória da IgG4 pobre em galactose terminal (IgG4-G0) e sua associação com o desenvolvimento de doenças

autoimunes (MAVERAKIS et al. 2015). Este anticorpo serviria como epítipo para a ligação da proteína MBL, ativando a via das lectinas (MALHOTRA et al. 1995).

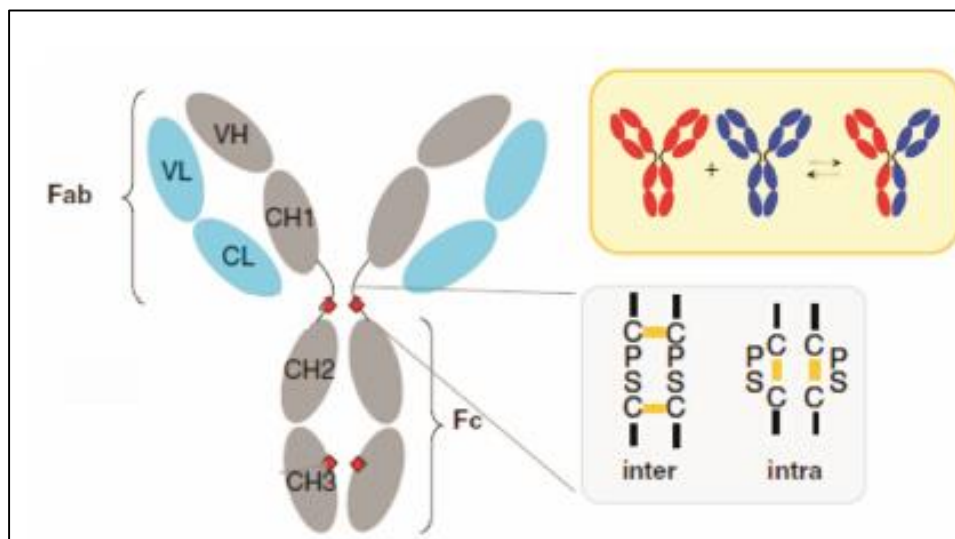


Figura 2 - IgG4 e a capacidade de heterobivalência. Destaque para a separação das cadeias pesadas da IgG4 e reassociação com outras cadeias desta molécula. Esta característica reduz a capacidade de formação de complexos e ativação das vias do complemento por esta subclasse de IgG. (Modificado de Rispens et al. 2013).

Apesar das evidências do envolvimento local da IgG4 no glomérulo, estudos quanto a dosagem sérica das subclasses de IgG em GM são escassos. De fato, Imai et al. (1997) em seu estudo não encontraram diferença entre os níveis séricos das subclasses de IgG em 21 pacientes com GMP comparados a nove pacientes com GMS. Entretanto, Kuroki et al. (2002) encontraram aumento significativo do percentual de IgG4 em relação a IgG sérica (%IgG4) nos pacientes portadores de GMP, comparados a um grupo controle e a portadores de GMS, os quais apresentaram aumento significativo do percentual de IgG1 (KUROKI et al. 2002). Li et al. (2010) demonstraram ainda %IgG4 sérica maior em pacientes com GMP comparados a portadores de doença de lesões mínimas e glomeruloesclerose segmentar e focal.

Apesar da participação do sistema imune na GMP ser cada vez mais evidente na GMP, seu envolvimento não foi completamente elucidado. Nenhum antígeno alvo identificado até o momento é capaz de explicar todos os casos da doença e estudos a respeito da patogênese do complexo antígeno-anticorpo na GMP permanecem necessários. Sabe-se também que a presença destes imunocomplexos é capaz de ativar as vias do complemento, componente igualmente importante na fisiopatogenia da GMP.

2.1.4. Envolvimento das vias do complemento na fisiopatogenia da GM

Desde os estudos iniciais de Heymann, é reconhecida a importância do sistema complemento para o desenvolvimento de GMP, a partir da constatação de que ratos depletados de C3 não apresentavam proteinúria. Posteriormente, estudos demonstraram a presença do complexo de ataque à membrana (C5b-9), via final do complemento (CUNNINGHAM; QUIGG, 2005), bem como de componentes da via alternativa (C3) e clássica (C4d) em depósitos renais (ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2012; VAL-BERNAL, 2011). Entretanto, na GMP habitualmente não há deposição de C1q, componente inicial da via clássica, e a via alternativa é incapaz de gerar C4d sozinha. Assim, a via das lectinas, cujo principal componente é a proteína MBL, parece ser uma potencial explicação para a presença de C4d na GMP, sem que haja ativação da via clássica (SALANT, 2013) (figura 3).

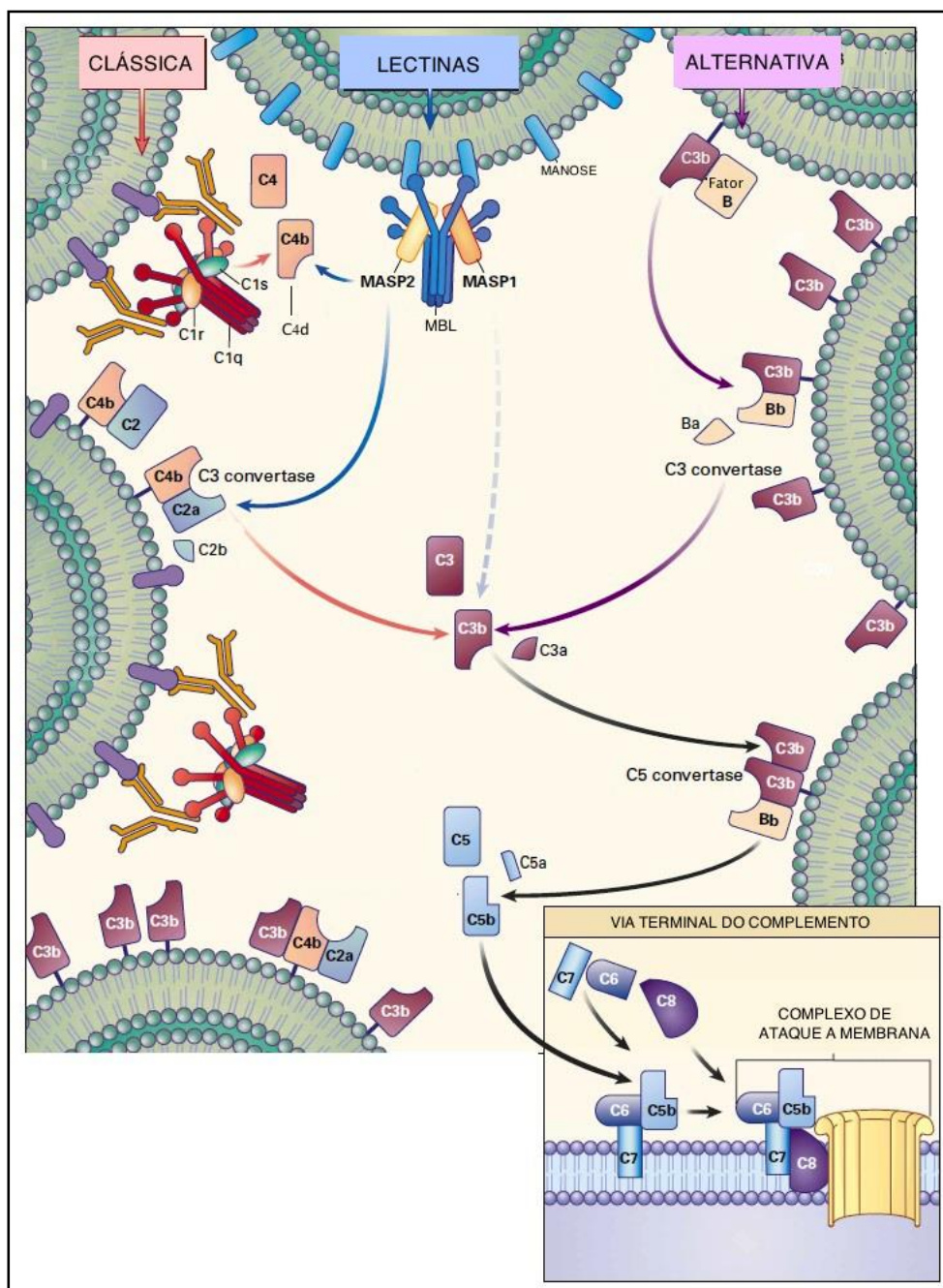


FIGURA 3 - As vias do complemento. Na glomerulopatia membranosa primária observa-se depósitos renais do complexo de ataque à membrana (C5-9), bem como C3 e C4d, com C1q ausente. Assim, a via das lectinas surge como potencial envolvida na fisiopatologia da doença. (Modificado de Walport, 2001).

A MBL (figura 4) é uma proteína de fase aguda produzida primariamente no fígado, com papel importante na imunidade inata (BOUWMAN; ROEP; ROOS, 2006) e no reconhecimento de auto antígenos, como células apoptóticas e necróticas (NAUTA et al. 2003). Circula sob a forma de multímeros, cujas unidades básicas são compostas por uma região N-terminal rica em cisteína, uma região de colágeno e um domínio de reconhecimento de carboidrato, com alta afinidade por moléculas com sacarídeos, como glicose, fucose, manose, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-manosamina, mas não galactose, presentes em diversos patógenos (TURNER, 2003). Esses multímeros são estruturalmente semelhantes à molécula do C1q, sendo capazes de ativar a via clássica do complemento sem necessitar da ligação com anticorpos (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005).

Apesar de não ser uma proteína investigada rotineiramente em glomerulopatias, existem evidências do envolvimento da MBL na GM. Em 1999, Lhotta, Wurzner e Konig, descreveram depósitos glomerulares desta proteína em 10 de 15 pacientes portadores de GMP, mas também em portadores de nefrite lúpica. Nesse estudo não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de MBL entre os grupos avaliados, comparados a controles saudáveis. Posteriormente, Segawa et al. (2010) demonstraram depósitos mesangiais de MBL em oito de 10 pacientes com GMP. Série de casos de Bally et al. (2016) demonstrou baixos níveis séricos de MBL em cinco pacientes com GMP. A nefrite lúpica, a qual inclui a GMS, também foi associada a depósitos glomerulares de MBL (SATO et al. 2011; NISIHARA et al. 2013) e a baixos níveis séricos desta proteína (SANDRIN-GARCIA et al. 2011; TANHA et al. 2014), porém com resultados conflitantes (PANDA et al. 2012).

A possível relação entre a GMP e a MBL não está bem esclarecida. Devido à atração da MBL por carboidratos ligados a IgG4-G0 (MALHOTRA et al. 1995) e a degalactosilação da IgG ocorrer com o envelhecimento (PUCIC et al. 2011), aventa-se a possibilidade de que a produção de anticorpos IgG4-G0 contra o *PLA2R1* possa ser uma explicação para o predomínio da GMP em pacientes mais idosos (SALANT, 2013). Estudo recente sugere que a GMP possa ocorrer em pacientes com deficiência de MBL ou com níveis séricos normais desta proteína. No primeiro caso, a ativação do complemento predominaria através da via alternativa. No segundo, a ativação da via das lectinas aconteceria em concomitadamente à

da via alternativa (BALLY et al. 2016).

2.1.5. Envolvimento de polimorfismos genéticos na etiopatogenia da GM

Na GMP, além das evidências do envolvimento das vias do complemento e formação de imunocomplexos, estudos têm demonstrado a associação da doença a determinadas alterações genéticas. Apesar de casos isolados com acometimento de mais de um membro da família, a doença não possui uma herança tipicamente mendeliana.

A partir de 1970, polimorfismos genéticos do HLA II foram associados ao desenvolvimento de GMP (KLOUDA et al. 1979; VAUGHAN; DEMAINE; WELSH, 1989). Desde então mutações em alguns genes foram descritas como possíveis fatores de vulnerabilidade para a doença. Em 2010, um marco importante a respeito da GMP foi a identificação da relação da doença com presença de variação genética no domínio lectina-like tipo C do *PLA2R1*. Este polimorfismo poderia trazer alterações conformacionais na estrutura do *PLA2R1*, capaz de torná-lo um auto antígeno podocitário (LIU et al. 2010). Em 2011, um estudo multicêntrico europeu reforçou os achados prévios, demonstrando uma maior susceptibilidade para GMP em pacientes com polimorfismos do *PLA2R1*, especialmente quando em conjunto com o HLA-DQA1. Esta associação aumentou em cerca de 80 vezes a chance de GMP nos indivíduos acometidos, comparados a outros sem tais alterações (STANESCU et al. 2011). Posteriormente, após realização de sequenciamento da *PLA2R1*, foram observadas pelo menos seis variações desta proteína que poderiam estar relacionadas à GMP (COENEN et al. 2013).

Contudo, como os mecanismos genéticos da doença ainda não estão completamente elucidados, deve-se atentar para novas possibilidades, tais como alterações genéticas de proteínas do complemento ou fatores ambientais que resultem em aumento da susceptibilidade para o desenvolvimento de GMP (SALANT, 2013). Devido às evidências do envolvimento da via das lectinas na fisiopatogenia da doença, aventou-se a possibilidade de

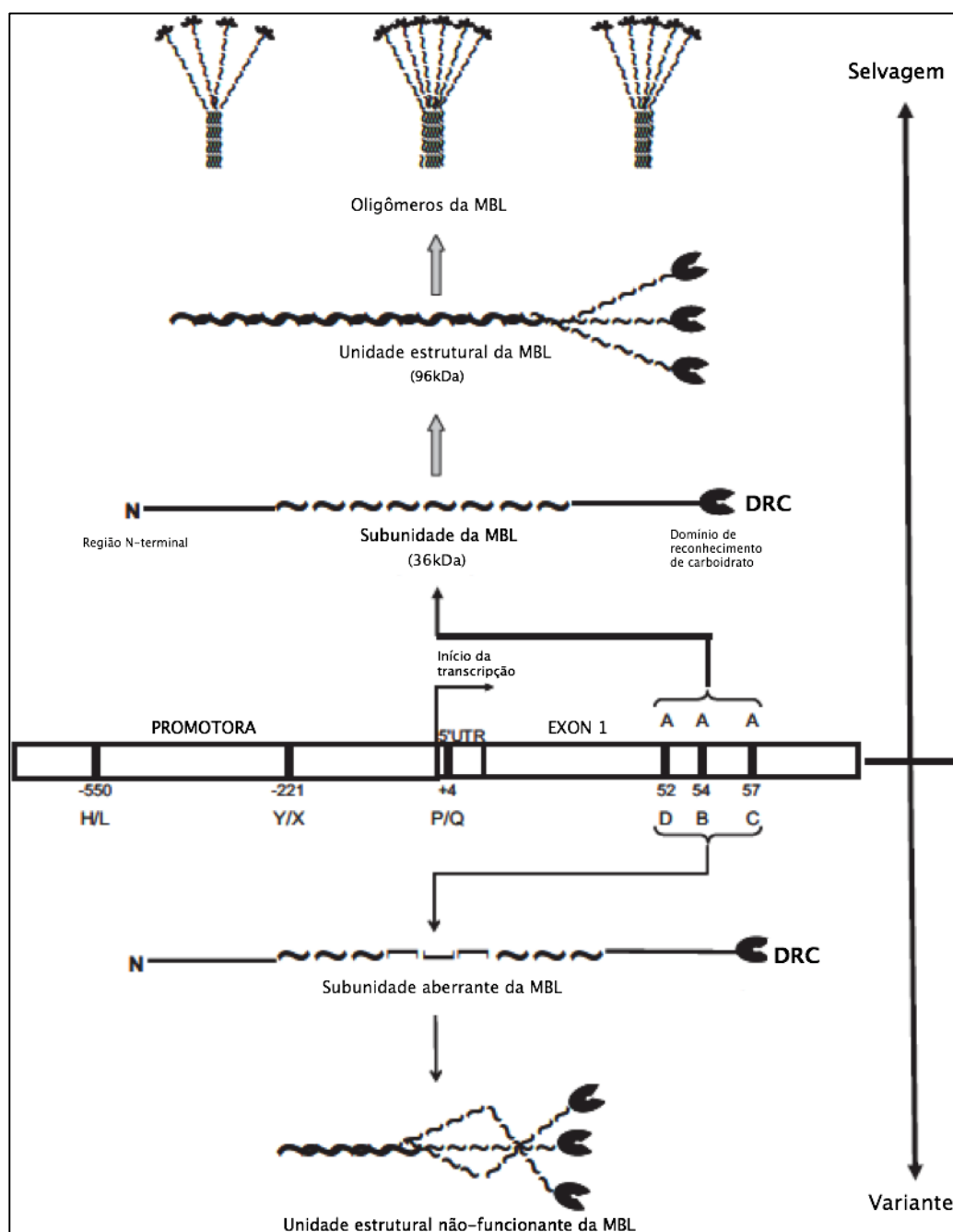


Figura 4 – Formação genética e funcional da MBL. O gene *MBL2* é responsável pela produção da MBL. Esta proteína MBL circula sob forma de multímeros, cujas unidades básicas são compostas por uma região N-terminal rica em cisteína, uma região de colágeno e um domínio de reconhecimento de carboidrato. A presença de mutações resulta na produção de MBL não funcional. Os pontos de mutações mais frequentes são nos códons 54, 57 e 52, denominadas alelo “B”, “C” e “D”. O alelo “A” representa a região codificadora do tipo selvagem, enquanto a presença das mutações, é representada por “O” (Adaptado de Bouwman; Roep; Roos, 2003).

que polimorfismos do gene *MBL2*, responsável pela produção da proteína MBL, estivessem associados a maior vulnerabilidade para desenvolvimento de GMP nos indivíduos acometidos. Estudos para avaliação de polimorfismos do gene *MBL2* em GM são escassos. Alguns autores têm demonstrado que variantes deste gene podem estar ligadas à deficiência sérica da MBL e ao desenvolvimento de nefrite em pacientes com LES (TANHA et al. 2014). Em GMP, apenas estudo recente realizou a genotipagem do *MBL2*. Neste, Bally et al. (2016) descreveram a presença de polimorfismo no códon 57 em um caso índice. Em seguida, foram sequenciados os genes de mais 77 pacientes, com o objetivo de detectar genótipos relacionados a níveis séricos reduzidos de MBL, encontrados em quatro pacientes.

Este gene está localizado no cromossomo 10 e é responsável pela produção das sequências Glicina-Xaa-Yaa (Xaa-Yaa representando sequências de aminoácidos) características da tripla hélice de colágeno da MBL (LU et al. 2002). É bem conhecido que pontos de mutações ou polimorfismos de uma única base (*SNPs*) no primeiro de seus quatro éxons resulta na produção de MBL não funcionante, por falência de oligomerização da unidade básica do homotrímero (PETERSEN; THIEL; JENSENIUS, 2001). As mutações mais frequentes são as dos códons 54 (Glicina → Ácido aspártico), 57 (Glicina → Ácido glutâmico) e 52 (Arginina → Cisteína), por convenção, denominadas alelo “B”, “C” e “D” respectivamente, refletindo a ordem de suas descobertas (WORTHLEY; BARDY; MULLIGHAN, 2005). O alelo “A” representa a região codificadora do tipo selvagem, englobando os alelos “B”, “C” e “D”. As mutações são representadas por “O” e podem estar presentes em heterozigose (A/O) em cerca de 35% da população, ou em homozigose (O/O) em 8% da população geral (MINCHINTON et al. 2002).

2.1.6. Considerações finais

Muito se aprendeu a respeito da fisiopatogenia da GMP desde o modelo experimental de Heymann que descobriu a base molecular e os conceitos da deposição de complexos

imunes e injúria glomerular da doença. É notável, entretanto, que décadas após o trabalho inicial, ainda não há um modelo fisiopatogênico capaz de explicar a doença em todos os pacientes. A conclusão da revisão da literatura é que a GMP parece ser uma doença multifatorial, na qual mutações genéticas levam a alterações estruturais nas proteínas de células podocitárias que passam a servir como alvo para anticorpos circulantes, resultando na formação *in situ* de depósitos glomerulares imunes que ativam as vias do complemento.

2.2. JUSTIFICATIVA

Apesar de avanços no conhecimento da fisiopatogenia da GMP, o desfecho clínico é variável e imprevisível, podendo haver remissão espontânea em cerca de 30% dos pacientes. Além disso, o acometimento renal na GM pode ocorrer isoladamente até anos antes de outras manifestações de uma doença sistêmica como o LES, muitas vezes não sendo possível diferenciar a GMP da GMS no momento do diagnóstico. Como não existem biomarcadores ideais de diagnóstico e prognóstico em GMP, ainda não há consenso a respeito de quais pacientes devem ser tratados e quando iniciar o tratamento, que é baseado em medicações imunossupressoras, em geral, onerosas e com efeitos tóxicos inerentes. Talvez, a identificação mais precisa da etiopatogenia da doença possa levar ao uso de marcadores confiáveis, proporcionando um cuidado mais personalizado (RONCO; DEBIEC, 2015).

Em revisão de literatura, apenas um estudo realizou a genotipagem do *MBL2* em GMP, com o objetivo de avaliar os níveis séricos de MBL naqueles pacientes, sem haver um grupo para comparação. Além disso, estudos quanto a dosagem sérica das subclasses de IgG nesta glomerulopatia também são escassos e com resultados conflitantes. Por estes motivos, foi realizado este trabalho com o objetivo de detectar a presença de polimorfismos genéticos do *MBL2* em GMP e GMS, comparados a um grupo controle, bem como avaliar diferenças do %IgG4 sérico entre os dois grupos de pacientes. Com os resultados obtidos, espera-se que

esse estudo possa agregar novos conhecimentos e contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da GMP.

2.3. OBJETIVOS

- Verificar a frequência de polimorfismos genéticos do *MBL2* entre os pacientes portadores de GMP e GMS, comparados a indivíduos saudáveis e entre si.
- Determinar os níveis séricos de IgG4 e IgG nos pacientes com GM e avaliar se há diferença do %IgG4 entre os pacientes com GMP e GMS.

3. CAPÍTULO II: MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo do tipo exploratório, realizado entre 2014 e 2015. Foram incluídos 60 pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Glomerulopatias do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC - UFPE) e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), que preencheram os critérios de inclusão. Para a análise comparativa, foi utilizado um grupo controle histórico de 101 indivíduos saudáveis.

3.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

A pesquisa foi idealizada no Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e foi realizada com os pacientes acompanhados nos Ambulatórios de Glomerulopatias do HC - UFPE e do IMIP. Ambos estão localizados na cidade do Recife, estado de Pernambuco, e são os únicos ambulatórios públicos de referência para doenças glomerulares no estado de Pernambuco, atendendo também demandas de estados vizinhos. Atualmente, cerca de 2.000 pacientes estão cadastrados nesses ambulatórios.

3.3. CASUÍSTICA

A população de estudo foi composta por pacientes portadores de GMP e GMS, acompanhados nos Ambulatórios de Glomerulopatias do HC - UFPE e do IMIP.

3.3.1. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: pacientes maiores de 16 anos, com diagnóstico histopatológico de GMP ou GMS documentado por biópsia renal com microscopia óptica e imunofluorescência. O diagnóstico de LES foi estabelecido pelos critérios do SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*, 2012) (anexo C).

3.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos pacientes com nefrite lúpica classes III ou IV associadas à classe V, para avaliar apenas aqueles com GMS pura. Portadores de GM secundária a outras doenças também foram excluídos. Outras causas secundárias foram afastadas através de sorologias para HIV, hepatites B e C, além de investigação para doenças associadas, realizadas conforme história pessoal, familiar, idade e antecedentes mórbidos.

3.3.3. Amostra

Sessenta indivíduos, selecionados por conveniência, preencheram os critérios de inclusão e compuseram a amostra do estudo. Trinta e cinco pacientes tiveram o diagnóstico de GMP e 25 de GMS. Por motivos operacionais, não foi possível avaliar a genotipagem do *MBL2* de um paciente com GMS e a dosagem sérica de IgG e IgG4 de quatro pacientes (três com GMP e um com GMS).

Para o grupo controle (GC) foi utilizado um banco de amostras de sangue de 101 indivíduos saudáveis, cuja genotipagem do *MBL2* já havia sido previamente realizada e os

resultados publicados (SANDRIN-GARCIA et al. 2011). Este controle histórico foi composto por doadores de sangue que preencheram questionário relatando a ausência de doenças autoimunes pessoais ou familiares. Utilizou-se também a presença de genótipos do HLA, haplótipos DR3, DR4, DQ2, DQ8, associados com aumento de risco de diabetes tipo I, doença celíaca e tiroidite autoimune, como critério de exclusão destes indivíduos.

3.4. DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS

VARIÁVEL	TIPO	DEFINIÇÃO
Etiologia da GM	Qualitativa Nominal	GMP: Pacientes com biópsia renal compatível com GMP. GMS: Pacientes com biópsia renal compatível com GMS, com diagnóstico de LES estabelecido pelos critérios do SLICC.
Idade	Quantitativa Contínua	Representada em anos
Sexo	Qualitativa Nominal	Masculino Feminino
Tempo de doença	Quantitativa Contínua	Representada em meses
Proteinúria	Quantitativa Contínua	Representada em g/dia
Creatinina sérica	Quantitativa Contínua	Representada em g/dl
Imunossupressão	Qualitativa Nominal	Sim: uso prévio ou atual de imunossupressor documentado em prontuário.

		Não: ausência de registro em prontuário de uso prévio ou atual de imunossupressor.
Albumina sérica	Quantitativa Contínua	Representada em g/dl
Alelo do éxon 1 do <i>MBL2</i>	Qualitativa Nominal	Alelo "selvagem": A Alelo "variante": O
Genótipo do éxon 1 do <i>MBL2</i>	Qualitativa Nominal	Homozigoto: A/A Heterozigoto: A/O
Polimorfismo do éxon 1 do gene <i>MBL2</i>	Qualitativa Nominal	Sim: presença do alelo O Não: ausência do alelo O
Atividade de doença	Qualitativa Nominal	Sim: proteinúria $\geq 500\text{mg} / \text{dia}$ Não: proteinúria $< 500\text{mg} / \text{dia}$

3.5. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

3.5.1. Coleta de dados

Após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os participantes do estudo tiveram amostras de sangue coletadas através de punção endovenosa. Para cada paciente, foram coletados 5ml de sangue em tubo com EDTA para avaliação gênica, e 5ml de sangue em tubo com gel separador com ativador de coágulo para dosagem de IgG e subclasse IgG4. As amostras foram armazenadas em recipiente de isopor com gelo seco e encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Neste laboratório, a extração do DNA genômico foi feita imediatamente após a coleta das amostras, enquanto o sangue armazenado nos tubos com gel

separador com ativador de coágulo material foi centrifugado e o plasma obtido, congelado a -80°C. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes eram registrados, no momento da coleta sanguínea, em ficha específica elaborada para este fim (apêndice A).

3.5.2. Extração do DNA

Foram realizadas as extrações de DNA dos indivíduos portadores de GM, posteriormente organizadas em banco de amostras. O DNA genômico foi isolado a partir de linfócitos com auxílio do kit de extração de DNA *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA), segundo as recomendações do fabricante.

3.5.3. Genotipagem do éxon 1 do gene *MBL2*

Os códons 52, 54 e 57 do éxon 1 do gene *MBL2* foram genotipados utilizando a tecnologia de sondas Taqman®, em plataforma de PCR em tempo real ABI 7500 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA). Os polimorfismos foram agrupados em uma categoria nomeada alelo O, de acordo com Garred *et al.* (GARRED et al. 2003), enquanto a combinação dos três alelos selvagens foi designada alelo A.

3.5.4. Dosagem sérica de IgG e subclasse IgG4

O plasma congelado a -80°C, obtido do tubo com gel separador com ativador de coágulo foi, posteriormente, enviado ao Laboratório Álvaro, no Paraná, para a dosagem sérica

da IgG, através de Imunoturbidimetria, e da subclasse IgG4 por Nefelometria.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi construído um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel® e exportado para o software SPSS®, versão 17, onde foram realizadas as análises. Para avaliar as características dos pacientes foram calculadas média e mediana para as variáveis quantitativas, de acordo com a normalidade; e obtidas as frequências, para as variáveis qualitativas. A normalidade das variáveis quantitativas foram feitas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando houve normalidade, a comparação entre os grupos GMP, GMS e GC foi feita pelo teste da ANOVA, e a comparação entre os grupos GMP e GMS, pelo teste t de Student. Nos casos em que a normalidade não foi indicada, aplicou-se o teste de Mann-Whitney e foram calculadas a mediana, primeiro e terceiro quartis. Para comparação das variáveis qualitativas entre os grupos GMP e GMS, aplicou-se o teste Qui-quadrado. A frequência dos alelos e da distribuição dos genótipos nos indivíduos com GM e GC foram feitas por contagem direta e analisadas pelo teste Qui-quadrado. Nos casos em que houve associação calculou-se a razão de chance (Odds Ratio, OR), com um intervalo de confiança de 95%. Quando calculado o OR, os alelos e genótipos homozigotos correspondentes com maior frequência foram selecionados como referência. Para representação dos valores de IgG, IgG4 e %IgG4 foram calculados as medianas, primeiros e terceiros quartis. Todas as conclusões foram tiradas considerando o nível de significância estatística de 5%.

3.7. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres

Humanos do IMIP (CAAE 34861714.0.0000.5201) e os pacientes foram esclarecidos quanto aos procedimentos necessários para participação no estudo. Os mesmos foram assegurados quanto ao sigilo das informações obtidas e quanto ao atendimento ambulatorial, que não sofreria qualquer tipo de prejuízo, independente da participação ou não no trabalho. Todos os procedimentos relacionados ao estudo foram iniciados apenas após o esclarecimento do paciente e sua autorização, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice B).

4. CAPÍTULO III: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Polimorfismos do gene *MBL2* e GM

Dados dos pacientes portadores de GM e do GC estão descritos na tabela 1. O GC foi composto por 101 indivíduos saudáveis (59 mulheres e 42 homens), com idade média $30,1 \pm 9,1$ anos.

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com GMP e GMS e do GC

CARACTERÍSTICAS	GMP N= 35	GMS N = 25	GC N = 101	p-valor
Idade, anos [*]	44,9 ± 13,8	33,9 ± 9,1	30,1 ± 9,1	<0,001 ¹
Sexo masculino, %(n)	65,7% (23)	24,0% (6)	41,6% (42)	0,004 ²
Tempo de doença, meses	13 (5,5 - 31)	30 (7 - 44)	-	0,107 ³
Imunossupressão, %(n)	68,6% (24)	96,0% (24)	-	0,009 ²
Atividade de doença, %(n)	71,4% (25)	48,0% (12)	-	0,066 ²
Proteinúria, g/dia [#]	2,0 (0,5 - 4,3)	0,5 (0,1 - 1,7)	-	0,008 ³
Albumina sérica, g/dl [*]	3,30 ± 1,35	3,74 ± 0,67	-	0,167 ⁴
Creatinina sérica, g/dl [#]	1,1 (0,8 - 1,5)	0,8 (0,6 - 1,0)	-	0,002 ³

Nota: ¹p-valor do teste da ANOVA; ²p-valor do teste Qui-quadrado para comparação de proporção; ³p-valor do teste de Mann-whitney; ⁴p-valor do teste t de Student; *média ± desvio padrão; #mediana (Q1 - Q3).

A tabela 2 mostra a distribuição dos alelos e genótipos do *MBL2* nos pacientes com GM e controles saudáveis. O alelo O do éxon 1 foi mais frequente no grupo com GM comparada aos indivíduos saudáveis (42% x 22%; $p < 0,001$), com OR = 2,54 (95% IC = 1,51 - 4,31). Com relação a distribuição de genótipos, observou-se que a heterozigose predominou entre os pacientes com GM (83%) comparados ao GC (28%). No GC, houve predomínio do genótipo A/A (64%). Não houve nenhum indivíduo do grupo de pacientes com o genótipo O/O. O genótipo A/O esteve

associado à GM com OR = 11,16 (95% IC = 4,77 - 28,41) quando comparado ao genótipo A/A.

Tabela 2 - Polimorfismos do éxon 1 do *MBL2* em pacientes com GM e GC

Polimorfismos do <i>MBL2</i>	GM (N = 59)	GC (N = 101)	p-valor ¹	OR (95% IC)
Alelos				
A	69 (58%)	158 (78%)	<0,001	1,00 (ref)
O	49 (42%)	44 (22%)		2,54 (1,51 - 4,31)
Genótipos				
A/A	10 (17%)	65 (64%)	<0,001	1,00
A/O	49 (83%)	28 (28%)		11,16 (4,77 - 28,41)
O/O	0 (0%)	8 (8%)		-

¹p-valor do teste Qui-quadrado para independência.

Avaliou-se ainda a associação estatística do polimorfismo do *MBL2*, comparando-se os grupos GMP e GMS ao GC (tabela 3). Observa-se que tanto no grupo GMP como no GMS, o alelo O esteve associado com a doença, quando comparados ao GC, com OR = 2,53 (95% IC = 1,36 - 4,71) e OR = 2,55 (95% IC = 1,24 - 5,22), respectivamente. Quanto a genotipagem, a heterozigose A/O associou-se a GMP (OR = 10,98; 95% IC = 3,92 - 36,06) e GMS (OR = 11,34; 95% IC = 3,39 - 49,88). Comparando os grupos GMP e GMS entre si, não houve diferença do grau de associação dos alelos ou dos genótipos com uma etiologia específica.

4.1.2. Percentual sérico de IgG4 na GMP e GMS

Para avaliar possíveis diferenças do %IgG4 sérico entre as etiologias, foram realizadas as dosagens séricas de IgG4 e IgG em 32 pacientes com GMP e 24 com GMS. Os parâmetros clínico laboratoriais destes pacientes estão demonstrados na tabela 4. Os pacientes com GMP tiveram proteinúria maior quando comparados ao GMS (mediana 2,5 g/dia × 0,4 g/dia). A maioria dos pacientes com GMP havia utilizado imunossupressão (22 / 32) e tinha doença ativa (24 / 32).

Tabela 3 - Polimorfismos do éxon 1 do *MBL2* em GMP × controle, GMS × controle e GMP × GMS.

	GMP (N = 35)	GC (N = 101)	OR (95% IC)	GMS (N = 24)	GC (N = 101)	OR (95% IC)	GMP (N = 35)	GMS (n = 24)	OR (95% IC)
Alelos									
A	41 (59%)	158 (78%)	2,53 (1,36 - 4,71)	28 (58%)	158 (78%)	2,55 (1,24 - 5,22)	41 (59%)	28 (58%)	1,01 (0,45 - 2,27)
O	29 (41%)	44 (22%)		20 (42%)	44 (22%)		29 (41%)	20 (42%)	
Genótipos									
A/A	6 (17%)	65 (64%)	10,98 (3,92 - 36,06)	4 (17%)	65 (64%)	11,34 (3,39 - 49,88)	6 (17%)	4 (17%)	1,03 (0,21 - 5,65)
A/O	29 (83%)	28 (28%)		20 (83%)	28 (28%)		29 (83%)	20 (83%)	

Nota: Os grupos referências para comparação foram pacientes com alelo A e pacientes com genótipo A/A.

Tabela 4 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com GMP e GMS e dosagem sérica de IgG e IgG4.

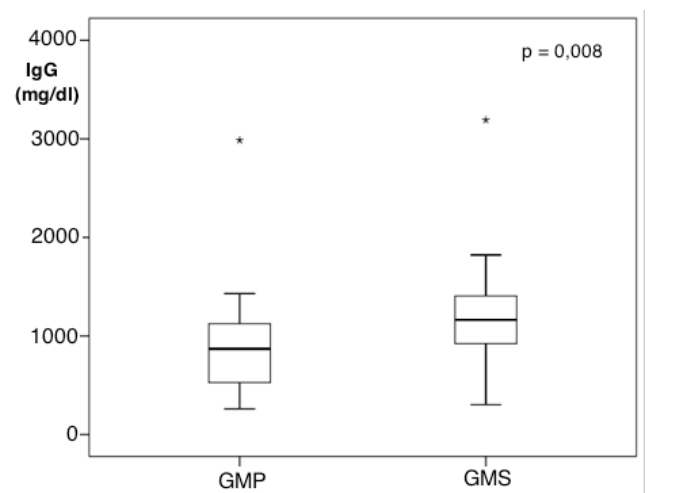
CARACTERÍSTICAS	GMP (n= 32)	GMS (n = 24)	p-valor
Idade, anos*	44,6 ± 13,2	34,0 ± 9,3	0,001 ¹
Sexo masculino, %(n)	69% (22)	21% (5)	<0,001 ²
Tempo de doença, meses [#]	13,0 (5,8 - 31,0)	28,0 (7,0 - 45,8)	0,130 ³
Uso de imunossupressão	69% (22)	96% (23)	0,009 ²
Atividade de doença, %(n)	75% (24)	46% (11)	0,017 ²
Proteinúria, g/dia [#]	2,6 (0,7 - 4,8)	0,4 (0,1 - 1,3)	0,002 ³
Albumina sérica, g/dl*	3,27 ± 1,40	3,75 ± 0,68	0,109 ¹
Creatinina sérica, g/dl [#]	1,1 (0,8 - 1,6)	0,7 (0,6 - 1,0)	0,001 ³

Nota: ¹p-valor do teste t de Student; ²p-valor do teste Qui-quadrado para comparação de proporção; ³p-valor do teste de Mann-whitney; *média ± desvio padrão; #mediana (Q1-Q3).

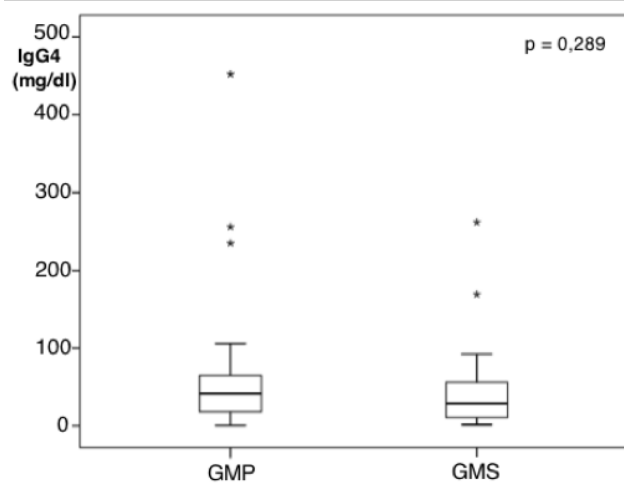
As medianas dos níveis séricos de IgG e IgG4 e o %IgG4 estão demonstradas na figura 5. Os níveis de IgG total foram mais baixos nos pacientes com GMP comparados aos com GMS (870 mg/dl × 1164 mg/dl; p = 0,008). A concentração sérica de IgG4 (41 mg/dl × 29 mg/dl) foi maior para GMP, porém sem significância estatística. O %IgG4 foi maior nos pacientes com GMP (5% × 3%; p = 0,016).

Na figura 6, apresenta-se a frequência do genótipo A/O e o %IgG4 sérico, comparando os pacientes com GMP e GMS. Não houve diferença entre a frequência dos genótipos A/O entre os dois grupos. Entretanto, o %IgG4 foi mais elevado nos portadores de GMP.

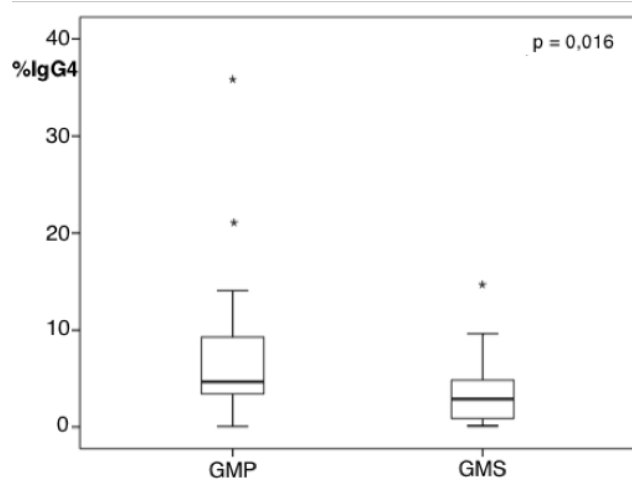
Figura 5 - Box-plot de níveis séricos de IgG (a), IgG4 (b) e %IgG4 (c), segundo os grupos GMP e GMS.



(a)



(b)



(c)

Figura 6 - Comparação dos grupos GMP e GMS quanto ao genótipo A/O e ao %IgG4 sérico

	GMP (N = 35)	GMS (N = 24)	
Genótipo A/O (%)	83%	83%	
%IgG4 (mediana)	5%	3%	p = 0,016

4.2. DISCUSSÃO

Este estudo investigou a presença de polimorfismos do éxon 1 do *MBL2* em pacientes com GM e a possível relação do %IgG4 sérico e das variantes gênicas com as etiologias analisadas. Os resultados sugerem que a presença do alelo O e, principalmente, do genótipo heterozigoto A/O podem estar relacionados a maior vulnerabilidade para GM e que a elevação sérica do %IgG4 pode indicar a etiologia primária da doença. Este estudo teve o diferencial de avaliar polimorfismos do *MBL2* em pacientes com GMP, comparados a um grupo controle e a GMS.

Estudos propõem que a GMP resulte do conjunto de três condições: presença de antígenos podocitários, produção de anticorpos contra o auto antígeno e indivíduo geneticamente susceptível (SALANT, 2013). Desde o modelo da nefrite de Heymann, têm sido descritos potenciais antígenos envolvidos na GMP (BECK et al. 2009; DEBIEC et al. 2002; DEBIEC et al. 2011; MURTAS et al. 2012; TOMAS et al. 2014), sendo o mais consistentemente relacionado a patogênese e evolução da doença, o *PLA2R1*, membro da família da lectina. Em comum, a maioria destes antígenos têm o fato de se localizarem no tecido renal com anticorpos predominantemente do subtipo IgG4. Deste modo, esta é uma questão ainda sem resposta definitiva na GMP: predomínio de anticorpos do subtipo IgG4, na

presença de C4d, sendo ausente o C1q na biópsia renal.

A ativação da via da MBL por IgG4-G0 (SALANT, 2013) surgiu como uma potencial explicação para esta questão. Corroborando com esta hipótese, apesar de não ser avaliada rotineiramente na imunofluorescência renal, alguns trabalhos demonstraram a presença da MBL nos glomérulos de pacientes portadores de GMP (SEGAWA et al. 2010; LHOTTA; WURZNER; KONIG, 1999). Yang et al. (2016) demonstraram ainda maiores níveis séricos das proteínas MASP-1, MASP-2 e MBL, componentes da via das lectinas, em pacientes com anticorpos séricos anti-*PLA2R1* total e do subtipo IgG4 simultaneamente presentes, comparados aqueles com estes anticorpos negativos, o que poderia ser mais uma evidência desta ativação em GMP.

Sabe-se que a formação dos complexos imunes e ativação das vias de complemento ocorre em indivíduos portadores de variações gênicas que os tornam geneticamente susceptíveis. A associação mais substancial foi encontrada em pacientes brancos com *SNPs* do HLA-DQA1 e do *PLA2R1* (STANESCU et al. 2011), porém outros polimorfismos genéticos também foram descritos como possíveis fatores de vulnerabilidade para a doença (CHEN et al. 2008; DEBIEC et al. 2004; LIU et al. 2010; NISHIMUKAI et al. 1988; THIBAUDIN et al. 2007; VAUGHAN et al. 1995). Apesar das evidências de ativação da via das lectinas e do reconhecimento da influência de fatores genéticos para o desenvolvimento da GMP, em revisão de literatura, estudos a respeito da avaliação gênica do *MBL2* nos pacientes com GMP são escassos.

Neste trabalho, o polimorfismo do *MBL2* esteve associado à GM, sem diferença de frequência entre GMP e GMS. Estudos em LES também têm demonstrado associação de nefrite com variantes genéticas de *MBL2*. Resultados semelhantes ao presente trabalho foram encontrados por autores espanhóis, que demonstraram aumento de susceptibilidade para nefrite em pacientes lúpicos com mutação no códon 54 do éxon 1 (OR = 2,3) (VILLARREAL et al. 2001) e em estudo brasileiro, que demonstrou associação do genótipo A/O com nefrite (p = 0,02) (SANDRIN-GARCIA et al. 2011). O genótipo O/O, previamente associado a nefrite lúpica com OR = 2,6 (TANHA et al. 2014), não foi encontrado em nenhum paciente no presente estudo. Já em GMP, do nosso conhecimento, apenas Bally et al. (2016) avaliaram a presença do polimorfismo do *MBL2* nesta glomerulopatia. Neste estudo, cinco de 78 pacientes portadores de GMP apresentaram genótipos relacionados a baixa dosagem sérica de MBL, porém não houve grupo controle para comparação.

Sabendo da possibilidade de ativação da via das lectinas pela IgG4, os níveis séricos desta imunoglobulina também foram analisados, encontrando um %IgG4 maior nos pacientes com GMP comparados aqueles com GMS. Apesar das evidências do envolvimento da IgG4 na patogênese da GMP, estudos quanto a dosagem sérica desta imunoglobulina também são escassos. Semelhante a este trabalho, Li et al. (2010) e Kuroki et al. (2002) encontraram elevação do %IgG4 em pacientes com GMP, comparados a indivíduos com outras glomerulopatias primárias e a indivíduos saudáveis, respectivamente. Ao contrário, Imai et al. (1997) não encontraram diferenças ao comparar o %IgG4 sérico de nove pacientes com nefrite lúpica a 21 pacientes com GMP. É possível que características clínico laboratoriais diversas das amostras avaliadas naquele e no presente estudo, tenham influenciado para a diferença dos resultados encontrados.

No presente estudo observou-se ainda menor concentração sérica de IgG nos pacientes portadores de GMP em relação àqueles com GMS, semelhante ao estudo de Kuroki et al. (2002). Uma possibilidade é que, devido a maior mediana de proteinúria do grupo GMP, estes pacientes apresentem maior perda urinária de IgG. Além disso, sabe-se que pacientes portadores de LES possuem níveis de IgG reduzidos (LEE; LEVINSON; SHUMACHER, 1993) e que o tratamento pode normalizá-los (YAP et al. 2014). Assim, devido a maioria dos pacientes do grupo com GMS ter utilizado terapia imunossupressora e estarem com a doença renal em remissão neste trabalho, a redução relativa de IgG sérica no grupo GMP já era esperada.

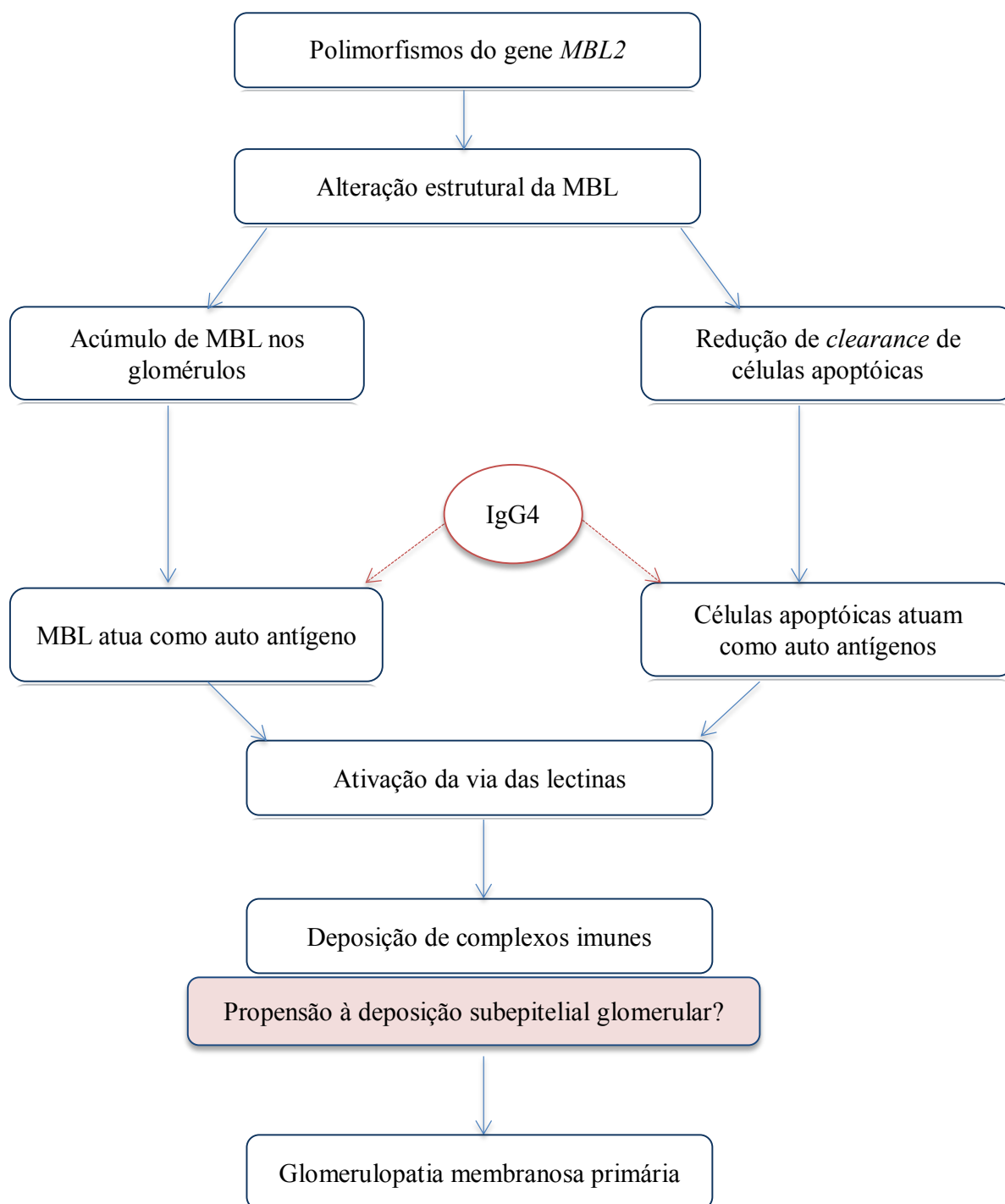
Apesar de os níveis séricos de IgG e IgG4 poderem ser alterados diante de algumas situações como o grau de proteinúria, que pode levar à perda urinária de imunoglobulinas, nas doenças glomerulares a excreção urinária das subclasses de IgG é proporcional aos seus níveis séricos (SHAKIB et al. 1977). Assim, a possibilidade de perda seletiva de alguma subclasse como motivo para elevação proporcional de IgG4 na GMP foi minimizada. Alguns trabalhos sugerem ainda que, quando em níveis séricos muito elevados, as moléculas de IgG4 poderiam ligar-se entre si ou com outras moléculas, retardando sua filtração e aumentando a concentração sérica (LI et al. 2014). Entretanto, como os níveis séricos de IgG4 não diferiram significativamente entre os grupos neste estudo, o aumento do %IgG4 sérico na GMP não pode ser atribuído a agregação e baixa filtração destas imunoglobulinas, tornando a elevação de %IgG4 sérica na GMP relevante.

Os resultados obtidos por este trabalho indicam que o polimorfismo do *MBL2* associa-se a GMP comparada ao GC, e que o %IgG4 é maior na GMP comparada a GMS. Assim,

apesar de não estabelecer uma relação de causalidade, estes resultados sugerem que a variação gênica esteja relacionada a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de GMP. Um modelo hipotético a respeito destes mecanismos etiopatogênicos foi proposto (figura 7). Uma possibilidade é que o polimorfismo genético do *MBL2*, leve a uma alteração na conformação da estrutura de tripla hélice da proteína MBL, causando seu depósito nos glomérulos. O acúmulo da própria proteína alterada ou de células apoptóticas, decorrentes de sua baixa capacidade de *clearance*, poderia fazê-las atuar como auto antígenos para os anticorpos do subtipo IgG4 na GMP, causando ativação da via das lectinas. Este anticorpo, apesar de ter sua produção sérica aumentada na GMP, teria também maior deposição glomerular. Como a mutação não esteve relacionada apenas a uma etiologia em particular, os resultados podem sugerir ainda que a presença de *SNPs* do *MBL2* esteja associada a formação e/ou deposição de imunocomplexos preferencialmente localizados na região subepitelial podocitária. Os motivos precisariam ser esclarecidos com pesquisas adicionais.

Uma limitação do estudo foi o tamanho da amostra. Entretanto, a detecção desta associação estatística mesmo em uma amostra pequena, pode sugerir uma real influência desta variação genética na doença. Ainda, com relação a dosagem sérica de IgG4 e IgG, trata-se da maior casuística dentre os trabalhos realizados com objetivos semelhantes. Uma segunda limitação pode ser o uso de grupos heterogêneos para comparação. Entretanto, características clínicas como idade e sexo podem não ser comparáveis entre as duas etiologias avaliadas, já que sabidamente a GMP predomina em homens de meia idade (RONCO; DEBIEC, 2015) e a GMS em mulheres jovens (ZENG et al. 2008). Raça não foi discriminada como em outros estudos pois, na população brasileira, esta avaliação baseada apenas na cor pele é extremamente imprecisa, conforme demonstrado em estudo que utilizaram 12 marcadores de ancestralidade na população Pernambucana (COELHO et al. 2015). Outros exames laboratoriais que poderiam trazer dados adicionais ao estudo, como a determinação sérica e urinária das demais subclasses de IgG e dosagem sérica do anti-*PLA2R1*, não estiveram disponíveis.

Figura 7 - Modelo hipotético dos mecanismos etiopatogênicos da GMP. Polimorfismo genético do *MBL2*, causando alteração na conformação da estrutura de tripla hélice da proteína MBL. A própria proteína alterada ou células apoptóticas, decorrente de sua baixa capacidade de *clearance*, poderiam se acumular nos glomérulos e passar a atuar como auto antígenos para os anticorpos do subtipo IgG4 na GMP, levando a ativação da via das lectinas.



5. CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

5.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou associação estatística do polimorfismo do gene *MBL2* com a GM, sugerindo que há um possível envolvimento deste gene nesta patologia. Comparados ao GC, pacientes com GM apresentaram maior frequência de heterozigose A/O. Este genótipo associou-se a uma maior vulnerabilidade para o desenvolvimento da patologia, quando comparado ao genótipo A/A. Entretanto, não houve diferença entre as frequências de *SNPs* nos grupos com GMP e GMS. Estes achados devem servir como base para estudos, preferencialmente populacionais, nos quais a expressão gênica possa ser melhor observada.

A avaliação da IgG total e IgG4 em portadores de GMP, demonstrou que o %IgG4 foi maior e os níveis de IgG sérica foram menores nestes pacientes, quando comparados aqueles com GMS. A IgG4 sérica teve tendência a ser mais elevada na GMP, porém não atingiu significância estatística. É possível que o %IgG4 sérico seja capaz de servir como biomarcador no diagnóstico diferencial entre as duas etiologias da GM avaliadas.

O estudo propõe a hipótese de que o polimorfismo genético do *MBL2* resulte em uma alteração estrutural da proteína MBL, passando a se depositar no glomérulo na GMP. A própria proteína alterada em excesso, ou as células apoptóticas decorrentes de sua baixa capacidade de *clearance*, poderiam passar a atuar como auto antígenos para os anticorpos do subtipo IgG4, causando ativação da via das lectinas. Devido a característica multifatorial da GMP e ao caráter exploratório do estudo, são necessários estudos adicionais.

5.2. CONCLUSÕES

- Comparados a indivíduos saudáveis, pacientes com GM apresentaram maior frequência de polimorfismos do éxon 1 do gene *MBL2*;
- Não houve diferença de frequência de polimorfismos do *MBL2* entre os grupos de pacientes com GMP e GMS;
- %IgG4 foi maior nos pacientes com GMP, comparados a pacientes com GMS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AALBERSE, R. C.; SCHUURMAN, J. IgG4 breaking the rules. *Immunology*, v. 105, n. 1, p. 9–19, jan. 2002.
2. ARIAS, L. F. et al. Glomerular diseases in a Hispanic population: review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Medical Journal*, v. 127, n. 3, p. 140-144, jul. 2009.
3. BALLY, S. et al. Phospholipase A2 Receptor-Related Membranous Nephropathy and Mannan-Binding Lectin Deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology*, maio. 2016. [Epub ahead of print]
4. BARISONI, L.; SCHNAPER, H. W.; KOPP, J. B. A proposed taxonomy for the podocytopathies: A reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 2, n. 3, p. 529-542, abr. 2007.
5. BECK, L. H. et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 1, p. 11-21, jul. 2009.
6. BOUWMAN, L. H.; ROEP, B. O.; ROOS, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Human Immunology*, v. 67, n. 4-5, p. 247–56, abr. 2006.
7. BRASIL. Ministério do Planejamento. Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>>. Acesso em: jan. 2016.
8. BRUSCHI, M. et al. Direct characterization of target podocyte antigens and auto-antibodies in human membranous glomerulonephritis: alfa-enolase and borderline anti- gens. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 10, p. 2008-2017, set. 2011.
9. CHÁVEZ VALENCIA, V. et al. Epidemiology of glomerular disease in adults: a database review. *Gaceta médica de México*, v. 150, n. 5, p. 403-408, set-out. 2014.
10. CHEN, C. H. et al. Impact of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on primary membranous nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 23, n. 10, p. 3166-3173, maio. 2008.

11. COELHO, A. V. et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco. *Brazil. Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 1, p. 2876-2884, mar. 2015.
12. COENEN, M. J. H. et al. Phospholipase A2 receptor (PLA2R1) sequence variants in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 24, n. 4, p. 677-83, mar. 2013.
13. CRENSIGLOVA, C. et al. Frequency and clinical histological analysis of glomerular diseases in a tertiary hospital in southern Brazil. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n. 1, p. 42-48, mar. 2016.
14. CUNNINGHAM, P. N.; QUIGG, R. J. Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 16, n. 5, p. 1214-22, maio. 2005.
15. DEBIEC, H. et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 26, p. 2053-2060, jun. 2002.
16. DEBIEC, H. et al. Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies. *Lancet*, v. 364, n. 9441, p. 1252-1259, out. 2004.
17. DEBIEC, H. et al. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *The New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 22, p. 2101-10, jun. 2011.
18. DIZ, M. C. E.; SCHERER, P.; KIRSZTAJN, M. Perfil Clínico-Epidemiológico de Glomerulopatia Membranosa Primária em Brasileiros (71 casos). *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 29, n. 2, jun. 2007.
19. ESPINOSA-HERNÁNDEZ, M. C4d como herramienta diagnóstica en la nefropatía membranosa. *Nefrologia*, v. 32, n. 3, p. 295-299, fev. 2012.
20. FERRAZ, F. H. et al. Profile of glomerular diseases in a public hospital of Federal District, Brazil. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 32, n. 3, p. 249-256, jul-set. 2010.

21. GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin deficiency revisited. *Molecular Immunology*, v. 40, n. 2-4, p. 73-84, set. 2003.
22. GESUALDO, L. et al. The Italian experience of the national registry of renal biopsies. *Kidney International*, v. 66, n. 3, p. 890-894, set. 2004.
23. GLASSOCK, R. J. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology*, v. 23, n. 4, p. 324-32, jul. 2003.
24. GLASSOCK, R. J. The pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy: a 50-year odyssey. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 56, n. 1, p. 157-67, jul. 2010.
25. HEYMANN, W.; LUND, H. Z.; HACKEL, D. B. The nephrotic syndrome in the rats; with special reference to the progression of the glomerular lesion and to the use of nephrotoxic sera obtained from ducks. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicina*, v. 39, n. 2, p. 218-24, fev. 1952.
26. HOFSTRA, J. M.; FERVENZA, F. C.; WETZELS, J. F. Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nature Reviews Nephrology*, v. 9, n. 8, p. 443-58, ago. 2013.
27. HUANG, C. C. et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Modern Pathology*, v. 26, n. 6, p. 799-805, jun. 2013.
28. IMAI, H. et al. IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. *Kidney International*, v. 51, n. 1, p. 270-6, ago. 1997.
29. KLOUDA, P. T. et al. Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRW3. *Lancet*, v. 2, n. 8146, p. 770-1, out. 1979.
30. KUROKI, A. et al. Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy. *Internal Medicine*, v. 41, n. 11, p. 936-42, nov. 2002.
31. KUTLUGUN, A. A. et al. Comparison of the clinical and laboratory presentations of primary and secondary glomerular diseases. *Renal Failure*, v. 33, n. 8, p. 781-784, jul. 2011.

32. LEE, A. H.; LEVINSON, A. I.; SCHUMACHER, H. R JR. Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 22, n. 4, p. 252-264, fev. 1993.
33. LHOTTA, K.; WU, R. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 14, n. 4, p. 881–886, abr. 1999.
34. LI, J. et al. Clinical significance of detection of plasma and urine IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of Peking University*, v. 42, n. 6, p. 671-4, dez. 2010.
35. LI, L. S.; LIU, S. H. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13,519 renal biopsies. *Kidney international*, v. 66, n. 3, p. 920-923, set. 2004.
36. LI, X. L. et al. IgG4-related membranous nephropathy with high blood and low urine IgG4/IgG ratio: a case report and review of the literature. *Clinical Rheumatology*, v. 33, n. 1, p. 145-148, jan. 2014.
37. LIU, Y. H. et al. Association of phospholipase A2 receptor 1 polymorphism with idiopathic membranous nephropathy in Chinese patients in Taiwan. *Journal of Biomedical Science*, v. 17:81, out. 2010.
38. LU, J. et al. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, n. 2-3, p. 387-400, set. 2002.
39. MA, H.; SANDOR, D. G.; BECK, L. H. JR. The role of complement in membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology*, v. 33, n. 6, p. 531-42, nov. 2013.
40. MAISONNEUVE, P. et al. Distribution of primary renal diseases leading to end-stage renal failure in the United States, Europe, and Australia/New Zealand: results from an international comparative study. *American Journal of Kidney Disease*, v. 35, n. 1, p. 157-65, jan. 2000.
41. MALAFRONTÉ, P. et al. Paulista Registry of glomerulonephritis: 5-year data report. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, v. 21, n. 11, p. 3098-105, set. 2006.

42. MALHOTRA, R. et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*, v. 1, n. 3, p. 237-243, mar. 1995.
43. MAVERAKIS, E. et al. Glycans in the immune system and the altered glycan theory of autoimmunity: a critical review. *Journal of autoimmunity*, v. 57, p. 1-13, fev. 2015.
44. MAZZUCHI, N. et al. Frequency of diagnosis and clinic presentation of glomerulopathies in Uruguay. *Nefrologia*, v. 25, n. 2, p. 113-120. 2014.
45. MESQUITA, M. et al. Renal biopsy findings in Belgium: a retrospective single center analysis. *Acta Clinica Belgica*, v. 66, n. 2, p. 104-109, mar-abr. 2011.
46. MINCHINTON, R. M. et al. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 56, n. 6, p. 630-41, dez. 2002.
47. MURTAS, C. et al. Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 7, n. 9, p. 1394-1400, set. 2012.
48. MURTAS, C.; GHIGGERI, G. M. Membranous glomerulonephritis: histological and serological features to differentiate cancer-related and non-related forms. *Journal of nephrology*, jan. 2016.
49. NAUMOVIC, R. et al. Renal biopsy registry from a single centre in Serbia : 20 years of experience. *Nephrology, dialysis, transplantation*, v. 24, n. 3, p. 877-885, mar. 2009.
50. NAUTA, A. J. et al. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *European Journal of Immunology*, v. 33, n. 10, p. 2853-63, out. 2003.
51. NIRULA, A. et al. What is IgG4? A review of the biology of a unique immunoglobulin subtype. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 23, n. 1, p. 119-24, jan. 2011.
52. NISHIMUKAI, H. et al. Factor B subtypes in Japanese patients with IgA nephropathy and with idiopathic membranous nephropathy. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, v. 5, n. 4, p. 196-202. 1988.

53. NISHIHARA, R. M. et al. Deposition of the lectin pathway of complement in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Human Immunology*, v. 74, n. 8, p. 907-10, ago. 2013.
54. OLIVEIRA, L. B. et al. Clinical and epidemiological prevalence of glomerulopathies elderly in the city of Uberaba - MG. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 37, n. 2, p. 166-170, abr-jun. 2015.
55. PANDA, A. K. et al. Mannose binding lectin: a biomarker of systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Research & Therapy*, v. 14, n. 5, p. R218, out. 2012.
56. PETERSEN, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association, v. 38, n. 2-3, p. 133-49, ago. 2001.
57. PETRI, M. al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, v. 64, n. 8, p. 2677-2686, ago. 2012.
58. POLANCO, N. et al. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 21, n. 4, p. 697-704, abr. 2010.
59. POLITO, M. G.; MOURA, L. A. R.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9617 native kidney biopsies. *Nephrology, dialysis, transplantation*, v. 25, n. 2, p. 490-496, fev. 2010.
60. PRUNOTTO, M. et al. Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 21, n. 3, p. 507-519, mar. 2010.
61. PUCIĆ, M. et al. High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations. *Molecular and Cellular Proteomics*, v. 10, n. 10, out. 2011.
62. RISPENS, T. et al. Fc-Fc interactions of human IgG4 require dissociation of heavy chains and are formed predominantly by the intra-chain hinge isomer. *Molecular Immunology*, v. 53, n. 1-2, p. 35-42, jan. 2013.

63. RIVERA, F.; LÓPEZ-GOMÉZ, J. M.; PÉREZ-GARCIA, R. Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. *Kidney International*, v. 66, n. 3, p. 898-904, set. 2004.
64. RONCO, P.; DEBIEC, H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nature Reviews Nephrology*, v. 8, n. 4, p. 203-13, fev. 2012.
65. RONCO, P.; DEBIEC, H. Anti-Phospholipase A2 receptor antibodies and the pathogenesis of membranous nephropathy. *Nephron Clinical Practice*, v. 128, n. 3-4, p. 232-237, Nov. 2014.
66. RONCO, P.; DEBIEC, H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. *Lancet*, v. 385, n. 9981, p. 1983-92, Maio. 2015.
67. RYCHLIK, I. et al. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994 – 2000. *Nephrology, dialysis, transplantation*, v. 19, n. 12, p. 3040-3049, dez. 2004.
68. SALANT, D. J. Genetic variants in membranous nephropathy: perhaps a perfect storm rather than a straightforward conformeropathy? *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 24, n. 4, p. 525-8, mar. 2013.
69. SAM, R. et al. Lupus-like membranous nephropathy: Is it lupus or not? *Clinical and experimental nephrology*, v. 19, n. 3, p. 395-402, jun. 2015.
70. SANDRIN-GARCIA, P. et al. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Human Immunology*, v. 72, n. 6, p. 516-21, jun. 2011.
71. SATO, N. et al. Significance of glomerular activation of the alternative pathway and lectin pathway in lupus nephritis. *Lupus*, v. 20, n. 13, p. 1378-86, nov. 2011.
72. SEGAWA, Y. et al. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatric Nephrology*, v. 25, n. 6, p. 1091-9, fev. 2010.
73. SETHI, S.; FERVENZA, F. C. Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification. *Seminars in Nephrology*, v. 31, n. 4, p. 341-348, jul. 2011.

74. SHAKIB, F. et al. Asymmetric depression in the serum level of IgG subclasses in patients with nephrotic syndrome. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 28, n. 3, p. 506-511, jun. 1977.
75. SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Censo de diálise. 2014. Disponível em <<http://www.censo-sbn.org.br/censosAnteriores>>. Acesso em 6 jan. 2016.
76. SPRANGERS, B. et al. Beneficial effect of rituximab in the treatment of recurrent idiopathic membranous nephropathy after kidney transplantation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 5, n. 5, p. 790-7, maio. 2010.
77. STANESCU, H. C. et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 7, p. 616-26, fev. 2011.
78. STONE, J. H. IgG4: a tantalizing link between causes of membranous glomerulonephritis and systemic disease. *Kidney International*, v. 83, n. 3, p. 348-50, mar. 2013.
79. SUGIYAMA, H. et al. Japan Renal Biopsy Registry and Japan Kidney Disease Registry: Committee report for 2009 and 2010. *Clinical and Experimental Nephrology*, v. 17, n. 2, p. 155-173, abr. 2013.
80. SWAMINATHAN, S. et al. Changing incidence of glomerular disease in Olmsted County, Minnesota: a 30-year renal biopsy study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 1, n. 3, p. 483-487, maio. 2006.
81. TANHA, N. et al. MBL2 gene variants coding for mannose-binding lectin deficiency are associated with increased risk of nephritis in Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 23, n. 11, maio. 2014.
82. THIBAUDIN, D. et al. TNFA2 and d2 alleles of the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism are associated with onset/occurrence of idiopathic membranous nephropathy. *Kidney International*, v. 71, n. 5, p. 431-437, mar. 2007.
83. THURMAN, J. M.; HOLERS, V. M. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 3, p. 1305-10, fev. 2006.

84. TOMAS, N. M. et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *The New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 24, p. 2277-87, dez. 2014.
85. TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease, v. 40, n. 7, p. 423-9, nov. 2003.
86. VAL-BERNAL, J. F. et al. C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalina-fixed paraffin-embedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histology and Histopathology*, v. 26, n. 11, p. 1391-7, nov. 2011.
87. VAN DEN BRAND, J. A. et al. Long-term outcomes in idiopathic membranous nephropathy using a restrictive treatment strategy. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 25, n. 1, p. 150-8, jan. 2014.
88. VAUGHAN, R. W.; DEMAINE, A. G.; WELSH, K. I. A DQA1 allele is strongly associated with idiopathic membranous nephropathy. *Tissue Antigens*, v. 34, n. 5, p. 261-69, nov. 1989.
89. VAUGHAN, R. W. et al. An analysis of HLA class II gene polymorphism in British and Greek idiopathic membranous nephropathy patients. *European Journal of Immunogenetics*, v. 22, n. 2, p. 179-186, abr. 1995.
90. VILLARREAL, J. et al. Mannose binding lectin and FcγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)*, v. 40, n. 9, p. 1009-1012, set. 2001.
91. WALPORT, M. J. Complement. *The New England Journal of Medicine*, v. 344, n. 14, p. 1058-66, abr. 2001.
92. WORTHLEY, D. L.; BARDY, P. G.; MULLIGHAN, C. G. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Internal Medicine Journal*, v. 35, n. 9, p. 548-55, Set. 2005.
93. YANG, Y. et al. IgG4 anti-phospholipase A2 receptor might activate lectin and alternative complement pathway meanwhile in idiopathic membranous nephropathy: an inspiration from a cross-sectional study. *Immunologic Research*, v. 64, n. 4, p. 919-930, Ago. 2016. .

94. YAP, D. Y. et al. Serum immunoglobulin G level in patients with lupus nephritis and the effect of treatment with corticosteroids and mycophenolate mofetil. *Lupus*, v. 23, n. 7, p. 678-683, Jun. 2014.
95. ZAZA, G.; BERNICH, P.; LUPO, A. Incidence of primary glomerulonephritis in a large North-Eastern Italian area: a 13-year renal biopsy study. *Nephrology, dialysis, transplantation*, v. 28, n. 2, p. 367–372, Fev. 2013.
96. ZENG, C. H. et al. Etiology and clinical characteristics of membranous nephropathy in Chinese patients. *American Journal of Kidney Diseases*, n. 52, v. 4, p. 691-8, Out. 2008.

APÊNDICE A - FICHA DE COLETA DE DADOS

MESTRADO UFPE – CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
SERVIÇO DE NEFROLOGIA UFPE / IMIP
DENISE MARIA DO NASCIMENTO COSTA

FICHA:

DADOS PESSOAIS

NOME: _____

HOSPITAL: (1) HC (2) IMIP REG: _____ FICHA GN: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____ PROCEDÊNCIA: _____

RAÇA: (1) BRANCA (2) PARDA (3) NEGRA (4) OUTRAS _____ (5) ND

SEXO: (1) MASCULINO (2) FEMININO ADMISSÃO NA GN: _____

DADOS INICIAIS

ETIOLOGIA: (1) PRIMÁRIA (2) LES (Tempo de diagnóstico de LES: _____)

IDADE NA BIÓPSIA: _____

TEMPO DE DOENÇA RENAL ATÉ A BIÓPSIA: _____

LABORATÓRIO

HEMATÚRIA ($HM \geq 5PC$): (1) SIM (2) NÃO (3) ND

LEUCOCITÚRIA ($L \geq 5PC$): (1) SIM (2) NÃO (3) ND

PROTEINÚRIA: _____

ALBUMINA: _____

CT: _____

LDL: _____

CREATININA: _____

FAN: (1) POS _____ (2) NEG (3) ND

ANTI-DNA: (1) POS _____ (2) NEG (3) ND

C3: (1) BAIXO (2) NORMAL (3) ND

C4: (1) BAIXO (2) NORMAL (3) ND

PA: _____

EDEMA: (1) SIM (2) NÃO (3) ND

BIÓPSIA (Data: ____/____/____)

MO: LÂMINA _____ NÚMERO DE GLOMÉRULOS _____

FASE: (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) ND

ACHADOS ADICIONAIS: (1) PROLIFERAÇÃO ENDOCAPILAR (2) CRESCENTES

(3) NECROSE FIBRINÓIDE (4) ESCLEROSE GLOMERULAR (global (5) FI _____

(6) AT _____ (7) OUTROS _____

IMF: (1) IgG ____ (2) IgM ____ (3) IgA ____ (4) C3 ____ (5) C1q ____ (6) K e L ____ (7) NEG (8) ND

ME: (1) SIM _____ (2) NÃO _____

DADOS DE TRATAMENTO E RESPOSTA**REALIZOU TRATAMENTO ESPECÍFICO:** (1) SIM (2) NÃO**TRATAMENTO UTILIZADO (QUAL / DOSE / TEMPO):**

PRIMEIRO: _____

SEGUNDO: _____

TERCEIRO: _____

OUTROS: _____

RESPOSTA EM 6 MESES: (1) SEGUIMENTO INSUFICIENTE (2) SEM REMISSÃO

(3) REMISSÃO COMPLETA (Prot<500mg/dia) (4) REMISSÃO PARCIAL (Prot 0,5-3,5g/dia)

RESPOSTA EM 1 ANO: (1) SEGUIMENTO INSUFICIENTE (2) SEM REMISSÃO (3) RC (4) RP**RESPOSTA EM 5 ANOS:** (1) SEGUIMENTO INSUFICIENTE (2) SEM REMISSÃO (3) RC (4) RP**ÚLTIMA CONSULTA:** ____/____/____**DADOS DA COLETA****DATA DA COLETA:** _____ **IDADE NA COLETA:** _____**DOENÇA EM ATIVIDADE:** (1) SIM (2) NÃO**HEMATÚRIA (HM $\geq$ 5PC):** (1) SIM (2) NÃO (3) ND**LEUCOCITÚRIA (L $\geq$ 5PC):** (1) SIM (2) NÃO (3) ND**PROTEINÚRIA:** _____**ALBUMINA:** _____**CT:** _____ **LDL:** _____**CREATININA:** _____**FAN:** (1) POS _____ (2) NEG (3) ND**ANTI-DNA:** (1) POS _____ (2) NEG (3) ND**C3:** (1) BAIXO (2) NORMAL (3) ND**C4:** (1) BAIXO (2) NORMAL (3) ND**PA:** _____**EDEMA:** (1) SIM (2) NÃO**RESULTADOS****MBL:** Dosagem sérica _____

Polimorfismos (1) SIM (Códon _____ / Promotora _____)

(2) NÃO

IgG total _____ / **IgG1** _____ / **IgG2** _____ / **IgG3** _____ / **IgG4** _____

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Resolução 466/12)

Serviço de Nefrologia



Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa **POLIMORFISMOS DO GENE DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE E DOSAGEM SÉRICA DE IgG4 EM GLOMERULOPATIA MEMBRANOSA**, sob a responsabilidade da pesquisadora Denise Maria do Nascimento Costa, Médica Nefrologista (e-mail: demnc@hotmail.com, Dados para contato: Avenida Professor Moraes Rêgo, número 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, telefone: 88798767). Participam também da pesquisa: Profa. Dra. Lucila Maria Valente, Médica, chefe da Nefrologia do HC - UFPE; Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho, Médico Alergista e Imunologista do HC – UFPE e Profa. Dra. Paula Sandrin Garcia, Professora adjunta do Departamento de Genética.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que o(a) senhor(a) não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que o(a) senhor(a) esteja bem esclarecido(a) sobre sua participação na pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o(a) Sr(a) não será penalizado(a) de forma alguma, sendo garantido o seu atendimento médico sem qualquer alteração. Também garantimos que o(a) Senhor(a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa e todos os dados utilizados na pesquisa são confidenciais. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A Glomerulopatia Membranosa é uma doença do rim com causas ainda pouco conhecidas. Esta pesquisa tem como objetivo verificar se há relação entre alteração do sistema complemento e das imunoglobulinas G com o desenvolvimento desta doença. Tanto o complemento como as imunoglobulinas são componentes do sistema de defesa do organismo contra vários agentes, e alterações dos seus funcionamentos podem levar ao desenvolvimento de algumas doenças, incluindo doenças renais. Serão convidados a participar deste estudo todos os pacientes com diagnóstico de Glomerulopatia Membranosa, confirmado por biópsia renal, acompanhados no Ambulatório de Glomerulopatias do Hospital das Clínicas e do IMIP.

Caso deseje participar, será coletado sangue numa quantidade de 10 ml (medida aproximada de uma colher de sopa). A coleta de sangue será realizada no Hospital das Clínicas e no IMIP por pessoas treinadas para que não haja o aparecimento de hematomas no local da punção, o que pode ser evitado com a compressão do local após a retirada da agulha. Se você é alérgico a álcool, informe à pesquisadora para que possa ser utilizado outro produto para limpeza do braço. Como o material utilizado na coleta de sangue é descartável e de uso individual, não há risco de contaminação. Tudo será feito com o máximo de cuidado para não causar sofrimento desnecessário para você.

A participação na pesquisa se restringe apenas à coleta do sangue, não sendo necessárias visitas posteriores ao ambulatório para novas coletas, apenas para manter o acompanhamento habitual com a equipe de Nefrologia. Posteriormente, caso seja confirmada alteração do complemento ou de imunoglobulinas, você poderá ser acompanhado e tratado por profissionais especializados no

Ambulatório de Imunodeficiência do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e/ou no Ambulatório de Genética do IMIP. Com os resultados do estudo poderemos estar contribuindo com a possibilidade de evitar o surgimento da doença ou com o desenvolvimento de um tratamento mais específico para a doença.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) que objetiva defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelho, 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 hs (manhã) e 13:30 às 16:00hs (tarde). Pode também ser consultado o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE E MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES COM GLOMERULOPATIA MEMBRANOSA, como voluntário(a).

Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento / assistência / tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____
 Nome: _____ Assinatura: _____

APÊNDICE C - ARTIGO ORIGINAL 1

TITLE: POLYMORPHISMS IN THE MBL2 GENE AND THE PERCENTAGE OF
SERUM IgG4 IN MEMBRANOUS NEPHROPATHY

RUNNING TITLE: MBL2 AND IgG4 IN MEMBRANOUS NEPHROPATHY

Autores: Denise Maria do Nascimento Costa^{a,b}. Lucila Maria Valente^a. Paula Sandrin Garcia^c. Antônio Henrique Santana Cavalcante^c. Maria Alina Gomes de Mattos Cavalcante^a. Gisele Vajgel Fernandes^a. Camila Barbosa Lyra de Oliveira^{a,b}. Carolina de Andrade Jordão de Vasconcelos^b. Emanuel Sávio Cavalcante Sarinho^a.

a - Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco - HC-UFPE

b - Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP

c – Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami at the Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE)

Corresponding author:

Address: Hospital das Clínicas - Serviço de Nefrologia (Secretaria de Nefrologia). Av. Professor Moraes Rego. 1235 - Cidade Universitária. Recife - PE. 50670-901.

Telephone/Fax: 558121263734

Email: demnc@hotmail.com

Word count for abstract: 215

Word count for text: 2.937

Keywords: Complement activation. Membranous glomerulonephritis. Mannose-binding lectin. Immunoglobulin G. Lupus nephritis. Genetic polymorphism.

ABSTRACT

INTRODUCTION Idiopathic membranous nephropathy is an immune-mediated disease, the pathogenesis of which involves the lectin pathway, IgG4 and genetic susceptibility. The objective of this study was to evaluate the frequency of MBL2 gene polymorphisms in patients with membranous nephropathy compared to a control group, and compare the frequency of polymorphisms and the percentage of serum IgG4 (%IgG4) between the groups with idiopathic etiology and secondary to systemic lupus erythematosus.

METHODS This was an exploratory study conducted between 2014 and 2015, which included 35 patients with idiopathic membranous nephropathy and 25 with membranous nephropathy secondary to systemic lupus erythematosus. For comparison, a historical control group was used with 101 healthy blood donors.

RESULTS The variant O allele was more frequent in the group of patients when compared to the control group ($p < 0.001$). The heterozygosity A/O was associated with the disease with an OR = 11 (95% CI = 4.77 - 28.41). Amongst the patients, the frequency of polymorphism was similar for both etiologies. The group with the idiopathic etiology presented a lower median serum IgG ($p = 0.008$) and a higher %IgG4 ($p = 0.016$) compared to the group with the secondary etiology. There was no difference in the serum IgG4 levels between the groups of patients (41×29 mg / dl).

CONCLUSION Polymorphism of the MBL2 gene was associated with membranous nephropathy, although there was no frequency difference between the assessed etiologies. The serum %IgG4 was higher in idiopathic membranous nephropathy when compared to secondary to systemic lupus erythematosus. These results suggest that this genetic variation may confer increased vulnerability to membranous nephropathy, and that the serum %IgG4 may be used as an additional marker for a differential diagnosis between the two etiologies.

POLYMORPHISMS IN THE MBL2 GENE AND THE PERCENTAGE OF SERUM IgG4 IN MEMBRANOUS NEPHROPATHY

INTRODUCTION

Membranous nephropathy (MN), characterized histopathologically by the thickening of the basement membrane, may have a primary etiology (IMN) or a secondary one. Idiopathic membranous nephropathy (IMN) is one of the leading causes of nephrotic syndrome worldwide, and is responsible for around 20% of all cases. It is also the second most prevalent primary glomerular disease in Brazil^{1,2}. Among the secondary forms, systemic lupus erythematosus (SLE) is the most frequent³. Although the membranous nephropathy secondary to SLE (LMN) stems from the systemic formation of immune complexes with subsequent glomerular deposition, IMN appears to be a local immune-mediated disease, and is characterized by the in situ formation of immune complexes in the glomerular subepithelial space due to the reaction of podocyte antibodies, native or exogenous antigens, thus causing podocyte injury with consequent proteinuria⁴.

Some podocyte antigens that participate in the immune complexes in IMN have been previously described^{5,6}. A common finding with regard to these antigens is that they are mostly targets for IgG4, a subclass of IgG predominant in renal deposits in the IMN, in contrast to LMN, in which IgG1, IgG2 and IgG3 are predominant^{7,8}. Despite being treated as an immunoglobulin with low activation capacity in the complement pathways, glomerular deposits of C3, C4d and the C5b-9 membrane attack complex, demonstrate that these pathways are involved in IMN⁹⁻¹¹. A lack of C1q, together with the presence of the mannose-binding lectin (MBL) protein, a major component of the lectin pathway of the complement and of IgG4, in renal deposits in IMN patients, therefore suggest that both the pathway and IgG4 may be involved in the pathogenesis of the disease^{8,12,13}. Besides the local importance of IgG4, detected in renal immunofluorescence, these antibodies may also be systemically involved in the pathogenesis of the disease¹⁴.

There is a degree of uncertainty regarding the trigger responsible for the formation of immune complexes and activation of the complement pathway in IMN, however it is known that it occurs in genetically susceptible individuals¹⁵⁻¹⁸. Although there is evidence regarding the involvement of the lectin pathway in IMN, very few studies have investigated the possible relationship between this glomerulopathy and polymorphisms of the MBL2 gene, which is

responsible for producing MBL. While lupus nephritis has been associated with genetic variants of MBL2 and the consequent deficient production of the MBL protein, only Bally et al. (2016) have evaluated the sequencing of the MBL2 gene in IMN, and found polymorphisms in five out of 78 patients¹⁹⁻²¹. This gene is responsible for producing the amino acid sequences of the collagen triple helix of the MBL²². Mutation points (single base polymorphisms - SNPs) in exon 1 of the MBL2 result in the production of non-functional MBL²³. The A allele represents the coding region of the wild type, while the presence of SNPs in codons 52, 54 and 57, represented by O, may be present in the heterozygous (W/O) in about 35% of the population, or homozygous (O/O) in 8% of the general population²⁴.

For these reasons, this study has aimed to determine the frequency of MBL2 gene polymorphisms in patients with MN compared to healthy subjects. An additional aim was to analyze the percentage differences of the serum IgG4 (%IgG4) and the frequency of MBL2 polymorphisms when comparing patients with IMN and those with LMN.

RESULTS

Data from patients with MN and the control group (CG) are described in Table 1. The control group consisted of 101 healthy subjects (59 women and 42 men), with a mean age of 30.1 ± 9.1 years.

Table 2 presents the distribution of the alleles and genotypes of MBL2 in patients with MN and healthy controls. In both groups, the allele and genotype frequencies were within the Hardy-Weinberg equilibrium. The O allele of exon 1 was more frequent in the group with MN compared to healthy subjects (42% vs. 22%; $p < 0.001$), with an OR = 2.54 (95% CI = 1:51 to 4:31). With regard to the distribution of genotypes, it was observed that the heterozygous was predominant among patients with MN (83%), compared to the CG (28%). In the CG, there was a predominance of genotype A/A (64%). None of the patients presented with genotype O/O. Genotype A/O was associated with MN with an OR = 11.16 (95% CI = 4.77 - 28.41), compared to genotype A/A.

The frequency of MBL2 polymorphism was also evaluated, comparing the IMN and LMN groups with the CG (Table 3). It was found that in both the IMN and LMN groups, the O allele was associated with the disease, when compared to the CG. In the genotyping, heterozygosity A/O was associated with IMN (OR = 10.98; 95% CI = 3.92 - 36.06) and LMN

(OR = 11.34; 95% CI = 3.39 - 49.88). When comparing the IMN and LMN groups there was no difference in the frequency of alleles or genotypes with a specific etiology.

In order to evaluate the possible differences of serum %IgG4 between the two etiologies, serum levels of IgG4 and IgG were measured in 32 patients with IMN and 24 with LMN. Patients with IMN presented with higher proteinuria when compared to those with LMN (median 2.6g/day $\times$ 0.4g/day. $p=0.002$). Most of the patients with IMN had used immunosuppression (22/32) and presented with active disease (24/32). The median levels of serum IgG and IgG4 and %IgG4 are presented in Figure 1. The total IgG levels were lower in patients with IMN when compared to those with LMN (870 mg/dl $\times$ 1164 mg/dl; $p = 0.008$). The serum concentration of IgG4 (41 $\times$ 29 mg/dl) was higher for the IMN group, although there was no statistical significance. The %IgG4 was higher in patients with IMN (5% $\times$ 3%; $p = 0.016$).

DISCUSSION

This study has investigated the association of exon 1 polymorphisms of the MBL2 with MN, and the possible difference in the frequency of these polymorphisms and of serum %IgG4 of the analyzed etiologies. The results suggest that the presence of the O allele and, in particular the heterozygous genotype A/O, may be related to an increase in vulnerability for MN, and that an increased %IgG4 in the primary etiology of the disease may indicate its involvement in the pathophysiological mechanism. The differential aspect of the present study is an evaluation of the MBL2 polymorphisms in patients with IMN, compared to the control group and those with LMN.

Studies suggest that IMN stems from a combination of three conditions: the presence of podocyte antigens, the production of antibodies against the autoantigen, and a genetically susceptible individual²⁸. Since the Heymann nephritis model in 1952, potential antigens involved in IMN have been described, where PLA₂R, a member of the lectin family, is the most consistent as being related to the pathogenesis and progression of the disease^{5,6,29-31}. One of the most common facts is that most of these antigens are located in the renal tissue, predominantly with antibody type IgG4⁷. Thus, with regard to this issue, there is still no definitive answer on IMN: a predominance of IgG4 subtype antibodies, with the presence of C4d, with no C1q in renal biopsy. The activation of the MBL pathway by IgG4 with low terminal galactose emerged as a possible explanation for this particular question²⁸.

Corroborating this hypothesis, although it is not routinely evaluated in renal immunofluorescence, some studies have demonstrated the presence of MBL in the glomeruli of patients with IMN^{8,12}. Yang et al. have also reported higher serum levels of MASP-1, MASP-2 and MBL in patients with positivity to total and IgG4 anti-PLA₂R antibodies, compared to those with bi-negativity to these antibodies, which could provide a clue for lectin activation¹⁴.

It is known that genetic susceptibility is also part of the etiopathogenic mechanism of IMN. An association with more substantial genetic polymorphism was found in Caucasian patients with HLA-DQA1 SNPs and PLA₂R¹⁸, although other genetic variants have been described as potential vulnerability factors for the disease^{17,32-36}. In the present study, MBL2 polymorphism was associated with MN, however there was no difference when IMN and LMN were compared. Studies on SLE, including patients with LMN, have also demonstrated a positive association between nephritis and genetic variants of MBL2. Villarreal et al. have reported increased susceptibility to nephritis in lupus patients with a mutation in codon 54 of exon 1 (OR = 2.3), and another Brazilian study has demonstrated an association of genotype A/O with nephritis (p = 0.02)^{19,37}. In the present study, genotype O/O, previously related to a 2.6-fold greater risk of developing LN²⁰, was not encountered in any of the patients. Only Bally et al. have evaluated the presence of MBL2 polymorphism in IMN. The authors reported that five out of 78 patients presented MBL2 genotypes associated with low serum levels of MBL, however there was no comparison group²¹.

Knowing the possibility that the MBL pathway is activated by IgG4, the present study also evaluated the serum levels of this immunoglobulin, and encountered a higher %IgG4 in patients with IMN when compared to those with LMN. Similar results were found by Li et al. and Kuroki et al., who reported increased %IgG4 in IMN compared to other primary glomerulopathies and healthy individuals, respectively^{38,39}. In contrast to this, Imai et al. encountered no differences when comparing the serum %IgG4 of nine patients with lupus nephritis to 21 patients with IMN⁴⁰. The present study observed even lower concentrations of serum IgG in patients with IMN in comparison to those with LMN, similar to the study of Kuroki et al.³⁹. It is known that SLE patients present with reduced levels of IgG and the treatment may normalize this situation^{41,42}. Thus, because most patients in the LMN group in the present study had undergone immunosuppressive therapy and were in remission, a relative reduction of serum IgG in the IMN group was expected.

It is also known that one possible factor capable of altering the levels of serum IgG and IgG4 in patients with glomerulopathies is the degree of proteinuria, since there may be urinary excretion of immunoglobulins. However, in glomerular diseases, urinary loss of IgG subclasses is proportional to the serum levels⁴³, which could rule out the possibility of selective excretion of IgG subclasses as a reason for the proportional increase of IgG4 in IMN. Some studies even suggest that IgG4 molecules in very high serum levels may bind with one another or with other molecules, slowing down filtration and increasing the serum concentration⁴⁴. As serum levels of IgG4 did not differ significantly between the groups in the present study, the filtration hypothesis was minimized, thus the increased serum %IgG4 in IMN became a relevant fact.

Although a causal relationship was not established, the results of this study suggest that it is possible that the genetic variation of MBL2 could be related to increased susceptibility to the development of IMN. Some possibilities for this have been suggested (Figure 3). One hypothesis is that polymorphism of the MBL2 gene leads to a change in conformation of the triple helix structure of the MBL protein, causing its deposits in the glomeruli. An accumulation of the altered protein itself or apoptotic cells, due to its poor competence in clearance, could cause them to act as autoantigens for the IgG4 subtype antibodies in IMN, thus activating the lectin pathway. As the mutation was not only related to one particular cause, the results may even suggest that the presence of SNPs of the MBL2 could be associated with the formation and/or deposition of immune complexes mostly located in the subepithelial area.

One limitation of this study may have been the small sample. However, detecting the association of polymorphism with MN even within this sample, may suggest that genetic variation has a real influence on the disease, indicating the need of populational studies. Moreover, with regard to evaluating the serum %IgG4, in relation to other studies performed with similar objectives this has been the largest sample. A second limitation may have been the heterogeneous groups used for comparison. However, clinical characteristics such as age and sex may not be comparable between the two etiologies evaluated, since it is known that IMN is more prevalent in middle-aged men and LMN in younger women^{2,45}. Race was not categorized, as in other studies, since assessment based only on skin color is extremely inaccurate in Brazilian population, as demonstrated in a study that used 12 ancestry markers in this population⁴⁶. Other laboratory tests could provide additional data to the study, such as serum and urinary determination of other subclasses of IgG and anti-PLA₂R serum levels.

In conclusion, this study discovered that, compared to healthy individuals, patients with MN presented a higher frequency of polymorphisms in the exon 1 of the MBL2 gene. Between the groups of patients with IMN and LMN, there was no difference in frequency of MBL2 polymorphisms, and the % IgG4 was higher in patients with IMN.

CONCISE METHODS

Study Design

This was an exploratory study, conducted between 2014 and 2015, at the Glomerulopathy Outpatient Clinics at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC - UFPE) and the Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Both are referral centers for patients with glomerular diseases in the state of Pernambuco, North-eastern Brazil. Pernambuco is the seventh most populous state in the Brazil with an estimated population of over 9 million and a poverty incidence of 52.5%²⁵. Currently, around 2.000 patients have registered at these clinics since 1998.

The sample was selected by convenience. Inclusion criteria were: patients aged 16 years and over with a histopathologic diagnosis of IMN and LMN, documented by renal biopsy with optical microscopy and immunofluorescence. The diagnosis of LMN was established by SLICC criteria (Systemic Lupus International Collaborating Clinics. 2012)²⁶, and patients with lupus nephritis associated with class III or IV were excluded. Patients were also excluded if they presented with MN secondary to other diseases, determined through serology for HIV and hepatitis B and C; and further individualized investigation regarding personal and family histories, age and medical history. For both groups, the presence of proteinuria ≥ 500 mg/day was considered as disease activity.

Sixty patients met inclusion criteria. Thirty-five patients were diagnosed with IMN and 25 with LMN. It was not possible to perform the sequencing of the MBL2 gene in one patient with LMN. Due to operational reasons, it was not possible to measure the levels of serum IgG and IgG4 in four patients (three with IMN and one with LMN).

For the control group (CG) we used a blood bank of samples from 101 healthy individuals. An evaluation of the MBL2 gene of this group had been conducted previously and published as an article¹⁹. This historic control was composed of healthy blood donors, who had completed questionnaires reporting the absence of personal or family autoimmune diseases. Furthermore, this group also underwent genotyping of HLA haplotypes DR3, DR4,

DQ2 and DQ8 molecules associated with the increased risk of type I diabetes, celiac disease and autoimmune thyroiditis. The presence of a haplotype risk was an exclusion criterion.

Local Research Ethics Committee approved the research project. Patients were informed about the procedures in order to participate in the study and they signed the informed consent forms prior to collecting material.

Laboratory analyses

Blood samples (5 ml) were collected in an EDTA tube for genetic evaluation. The samples were immediately stored in a styrofoam container with ice, and sent to the Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami at the Universidade Federal de Pernambuco (LIKA). Genomic DNA was isolated from lymphocytes with the aid of a Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), according to manufacturer's recommendations.

Polymorphisms in the exon 1 of the MBL2 gene (codons 52, 54 and 57) were genotyped using Taqman® probes technology, in real-time PCR platform ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). The polymorphisms of three codons of exon 1 were grouped into a category named the O allele, according to Garred et al.²⁷, while a combination of the three wild alleles was designated the A allele.

To measure the serum IgG and subclass IgG4, 5 ml of blood were collected through intravenous puncture, in a tube with clot activator and gel separator. The samples were immediately stored in a styrofoam container with ice, submitted to centrifugation and kept at -80°C. Subsequently, the measurements of total IgG and IgG4 were performed by immunoturbidimetric and nephelometric techniques, respectively. The %IgG4 was obtained from the ratio of IgG4 by IgG, multiplied by 100 ($\text{IgG4} / \text{IgG} \times 100$).

Statistical analysis

A database was constructed on a Microsoft Excel® spreadsheet, and exported to SPSS 17, where analyzes were performed. Normality of the quantitative variables was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. In cases where normality was indicated, comparison between the IMN, LMN and Control Group was performed with the ANOVA test, and between the IMN and LMN groups, with the Student t-test. In cases where normality was not indicated, Mann-Whitney test was applied. To evaluate characteristics of patients we

calculated the mean and median values, according to normality, for the quantitative variables, and calculated the frequencies for qualitative variables. To compare qualitative variables between the IMN and LMN groups, the Chi-square test was applied.

The allelic frequency and the frequency distribution of genotypes in individuals with MN and the CG were conducted by direct counting and analyzed by the Chi-square test and, when there was an association, the odds ratio was calculated, with a 95% confidence interval. When calculating the OR, the alleles and the homozygous genotypes that corresponded to the highest frequency were selected as a reference. In order to represent the values of IgG, IgG4 and the %IgG4, the median and the first and third quartiles were calculated. All conclusions were drawn with a 5% level of significance.

Acknowledgements: *The authors would like to express their gratitude to Dr. Luis Sette and Dr. Gisélia Alves.*

Conflict of interests: *None.*

REFERENCES

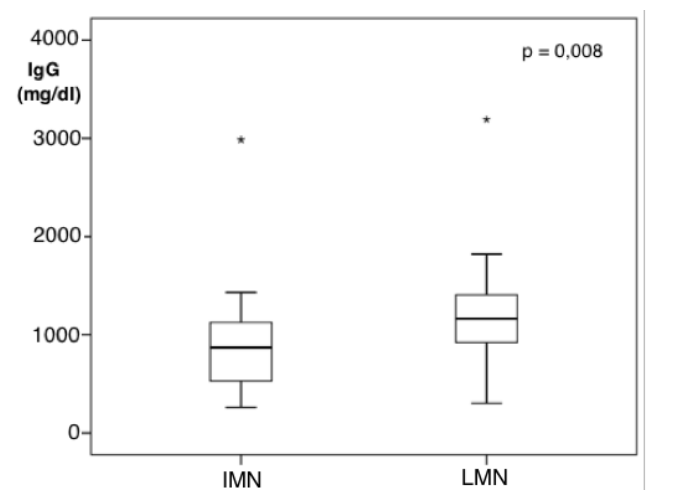
1. Malafronte P. Mastroianni-Kirsztajn G. Betônico GN. Romão JE Jr. Alves MA. Carvalho MF. Viera Neto OM. Cadaval RA. et al. Paulista Registry of glomerulonephritis: 5-year data report. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Nov;21(11):3098-105.
2. Ronco P. Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. *Lancet*. 2015 May 16;385(9981):1983-92.
3. Diz MCE. Scherer P. Kirsztajn GM. Clinical-Epidemiological Profile of primary Membranous Glomerulopathy in Brazilian Patients (71 cases). *J Bras Nefrol* 2007 Jun 29(2):71-79.
4. Ronco P. Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Feb 28;8(4):203-13.
5. Beck LH Jr. Bonegio RG. Lambeau G. Beck DM. Powell DW. Cummins TD. Klein JB. Salant DJ. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2009 Jul 2;361(1):11-21.
6. Tomas NM. Beck LH Jr. Meyer-Schwesinger C. Seitz-Polski B. Ma H. Zahner G. Dolla G. Hoxha E. et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2014 Dec 11;371(24):2277-87.
7. Stone JH. IgG4: a tantalizing link between causes of membranous glomerulonephritis and systemic disease. *Kidney Int*. 2013 Mar;83(3):348-50.
8. Segawa Y. Hisano S. Matsushita M. Fujita T. Hirose S. Takeshita M. Iwasaki H. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jun;25(6):1091-9.
9. Aalberse RC. Schuurman J. IgG4 breaking the rules. *Immunology*. 2002 Jan;105(1):9-19.
10. Val-Bernal JF. Garijo MF. Val D. Rodrigo E. Arias M. C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histol Histopathol*. 2011 Nov;26(11):1391-7.
11. Cunningham PN. Quigg RJ. Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005 May;16(5):1214-22.
12. Lhotta K. Würzner R. König P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Apr;14(4):881-6.
13. Ma H. Sandor DG. Beck LH Jr. The role of complement in membranous nephropathy. *Semin Nephrol*. 2013 Nov;33(6):531-42.

14. Yang Y. Wang C. Jin L. He F. Li C. Gao Q. Chen G. He Z. et al. IgG4 anti-phospholipase A2 receptor might activate lectin and alternative complement pathway meanwhile idiopathic membranous nephropathy: an inspiration from a cross-sectional study. *Immunol Res.* 2016 Feb 2.
15. Klouda PT. Manos J. Acheson EJ. Dyer PA. Goldby FS. Harris R. Lawler W. Mallick NP. Williams G. Strong association between idiopathic membranous nephropathy and HLA-DRW3. *Lancet.* 1979 Oct 13;2(8146):770-1.
16. Vaughan RW. Demaine AG. Welsh KI. A DQA1 allele is strongly associated with idiopathic membranous nephropathy. *Tissue Antigens.* 1989 Nov;34(5):261-9.
17. Liu YH. Chen CH. Chen SY. Lin YJ. Liao WL. Tsai CH. Wan L. Tsai FJ. Association of phospholipase A2 receptor 1 polymorphisms with idiopathic membranous nephropathy in Chinese patients in Taiwan. *J Biomed Sci.* 2010 Oct 11;17:81.
18. Stanescu HC. Arcos-Burgos M. Medlar A. Bockenhauer D. Kottgen A. Dragomirescu L. Voinescu C. Patel N. et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med.* 2011 Feb 17;364(7):616-26.
19. Sandrin-Garcia P. Brandão LA. Coelho AV. Guimarães RL. Pancoto JA. Segat L. Donadi EA. de Lima-Filho JL. Crovella S. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol.* 2011 Jun;72(6):516-21.
20. Tanha N. Troelsen L. From Hermansen ML. Kjær L. Faurschou M. Garred P. Jacobsen S. MBL2 gene variants coding for mannose-binding lectin deficiency are associated with increased risk of nephritis in Danish patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2014 Oct;23(11):1105-11.
21. Bally S. Debiec H. Ponard D. Dijoud F. Rendu J. Fauré J. Ronco P. Dumestre-Perard C. Phospholipase A2 Receptor-Related Membranous Nephropathy and Mannan-Binding Lectin Deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2016 May 6. [Epub ahead of print]
22. Lu J. Teh C. Kishore U. Reid KB. Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Sep 19;1572(2-3):387-400.
23. Petersen SV. Thiel S. Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol.* 2001 Aug;38(2-3):133-49.
24. Minchinton RM. Dean MM. Clark TR. Heatley S. Mullighan CG. Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol.* 2002 Dec;56(6):630-41.
25. Brasil. Ministério do Planejamento. Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>>. Acesso em: jan. 2016.

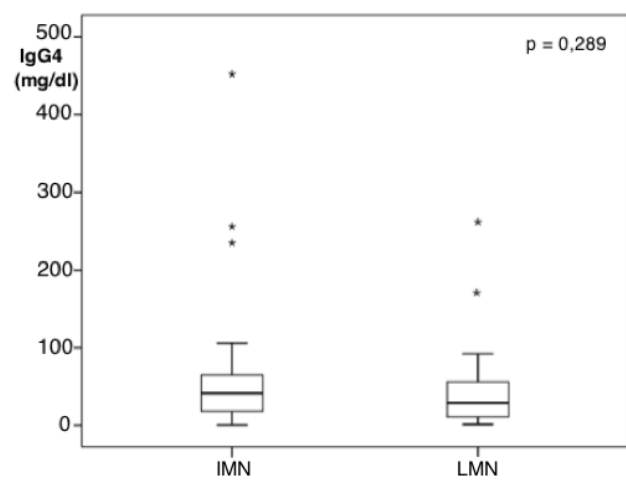
26. Petri M. Orbai AM. Alarcón GS. Gordon C. Merrill JT. Fortin PR. Bruce IN. Isenberg D. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2012 Aug;64(8):2677-86.
27. Garred P. Larsen F. Madsen HO. Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol.* 2003 Sep;40(2-4):73-84.
28. Salant DJ. Genetic variants in membranous nephropathy: perhaps a perfect storm rather than a straightforward conformeropathy? *J Am Soc Nephrol.* 2013 Mar;24(4):525-8.
29. Debiec H. Guignon V. Mougenot B. Decobert F. Haymann JP. Bensman A. Deschênes G. Ronco PM. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies. *N Engl J Med.* 2002 Jun 27;346(26):2053-60.
30. Debiec H. Lefeu F. Kemper MJ. Niaudet P. Deschênes G. Remuzzi G. Ulinski T. Ronco P. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med.* 2011 Jun 2;364(22):2101-10.
31. Murtas C. Bruschi M. Candiano G. Moroni G. Magistroni R. Magnano A. Bruno F. Radice A. et al. Coexistence of different circulating anti-podocyte antibodies in membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012 Sep;7(9):1394-400.
32. Nishimukai H. Nakanishi I. Kitamura H. Tamaki Y. Factor B subtypes in Japanese patients with IgA nephropathy and with idiopathic membranous nephropathy. *Exp Clin Immunogenet.* 1988;5(4):196-202.
33. Vaughan RW. Tighe MR. Boki K. Alexopoulos S. Papadakis J. Lanchbury JS. Welsh KI. Williams DG. An analysis of HLA class II gene polymorphism in British and Greek idiopathic membranous nephropathy patients. *Eur J Immunogenet.* 1995 Apr;22(2):179-86.
34. Debiec H. Nauta J. Coulet F. van der Burg M. Guignon V. Schurmans T. de Heer E. Soubrier F. Janssen F. Ronco P. Role of truncating mutations in MME gene in fetomaternal alloimmunisation and antenatal glomerulopathies. *Lancet.* 2004 Oct 2-8;364(9441):1252-9.
35. Thibaudin D. Thibaudin L. Berthoux P. Mariat C. Filippis JP. Laurent B. Alamartine E. Berthoux F. TNFA2 and d2 alleles of the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism are associated with onset/occurrence of idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2007 Mar;71(5):431-7.
36. Chen CH. Shu KH. Wen MC. Chen KJ. Cheng CH. Lian JD. Wu MJ. Yu TM. Tsai FJ. Impact of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on primary membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2008 Oct;23(10):3166-73.
37. Villarreal J. Crosdale D. Ollier W. Hajeer A. Thomson W. Ordi J. Balada E. Villardell M. et al. Mannose binding lectin and Fc gamma RIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford).* 2001 Sep;40(9):1009-12.

38. Li J. Qu Z. Zhang YM. Yu F. Huang J. Yang R. Zhao MH. Liu G. Clinical significance of detection of plasma and urine IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2010 Dec 18;42(6):671-4.
39. Kuroki A. Shibata T. Honda H. Totsuka D. Kobayashi K. Sugisaki T. Glomerular and serum IgG subclasses in diffuse proliferative lupus nephritis, membranous lupus nephritis, and idiopathic membranous nephropathy. *Intern Med*. 2002 Nov;41(11):936-42.
40. Imai H. Hamai K. Komatsuda A. Ohtani H. Miura AB. IgG subclasses in patients with membranoproliferative glomerulonephritis, membranous nephropathy, and lupus nephritis. *Kidney Int*. 1997 Jan;51(1):270-6.
41. Lee AH. Levinson AI. Schumacher HR Jr. Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease. *Semin Arthritis Rheum*. 1993 Feb;22(4):252-64.
42. Yap DY. Yung S. Ma MK. Mok MM. Kwan LP. Chan GC. Chan TM. Serum immunoglobulin G level in patients with lupus nephritis and the effect of treatment with corticosteroids and mycophenolate mofetil. *Lupus*. 2014 Jun;23(7):678-83.
43. Shakib F. Hardwicke J. Stanworth DR. White RH. Asymmetric depression in the serum level of IgG subclasses in patients with nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1977 Jun;28(3):506-11.
44. Li XL. Yan TK. Li HF. Xu PC. Jia JY. Wei L. Shang WY. Lin S. IgG4-related membranous nephropathy with high blood and low urine IgG4/IgG ratio: a case report and review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2014 Jan;33(1):145-8.
45. Zeng CH. Chen HM. Wang RS. Chen Y. Zhang SH. Liu L. Li LS. Liu ZH. Etiology and clinical characteristics of membranous nephropathy in Chinese patients. *Am J Kidney Dis*. 2008 Oct;52(4):691-8.
46. Coelho AV. Moura RR. Cavalcanti CA. Guimarães RL. Sandrin-Garcia P. Crovella S. Brandão LA. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res*. 2015 Mar 31;14(1):2876-84.
47. Ronco P.; Debiec H. Anti-Phospholipase A2 receptor antibodies and the pathogenesis of membranous nephropathy. *Nephron Clinical Practice*. v. 128.. n. 3-4. p. 232–237. Nov. 2014.

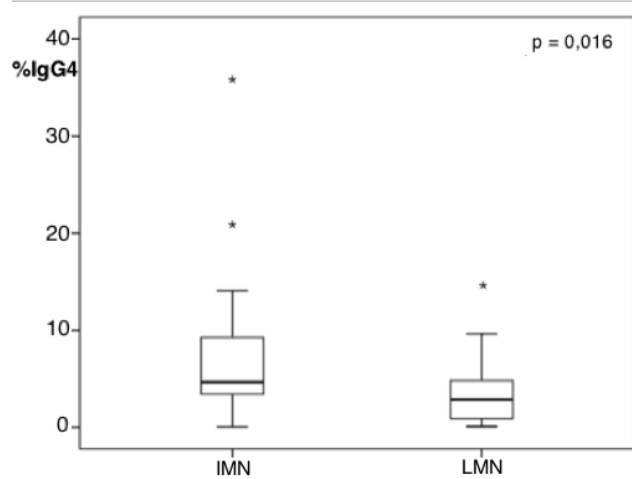
Figure 1 - Box-plot of serum levels of IgG (a), IgG4 (b) and %IgG4 (c), according to the IMN and LMN groups.



(a)



(b)



(c)

Figure 2 - Hypothetical model of the etiopathogenic mechanisms of IMN. Genetic polymorphism of MBL2 causing changes in the formation of the triple helix structure of the MBL protein. The accumulation of the changed protein itself or apoptotic cells due to its low clearance capacity could begin to act as autoantigens for the IgG4 subtype antibodies in IMN, leading to activation of the lectin pathway.

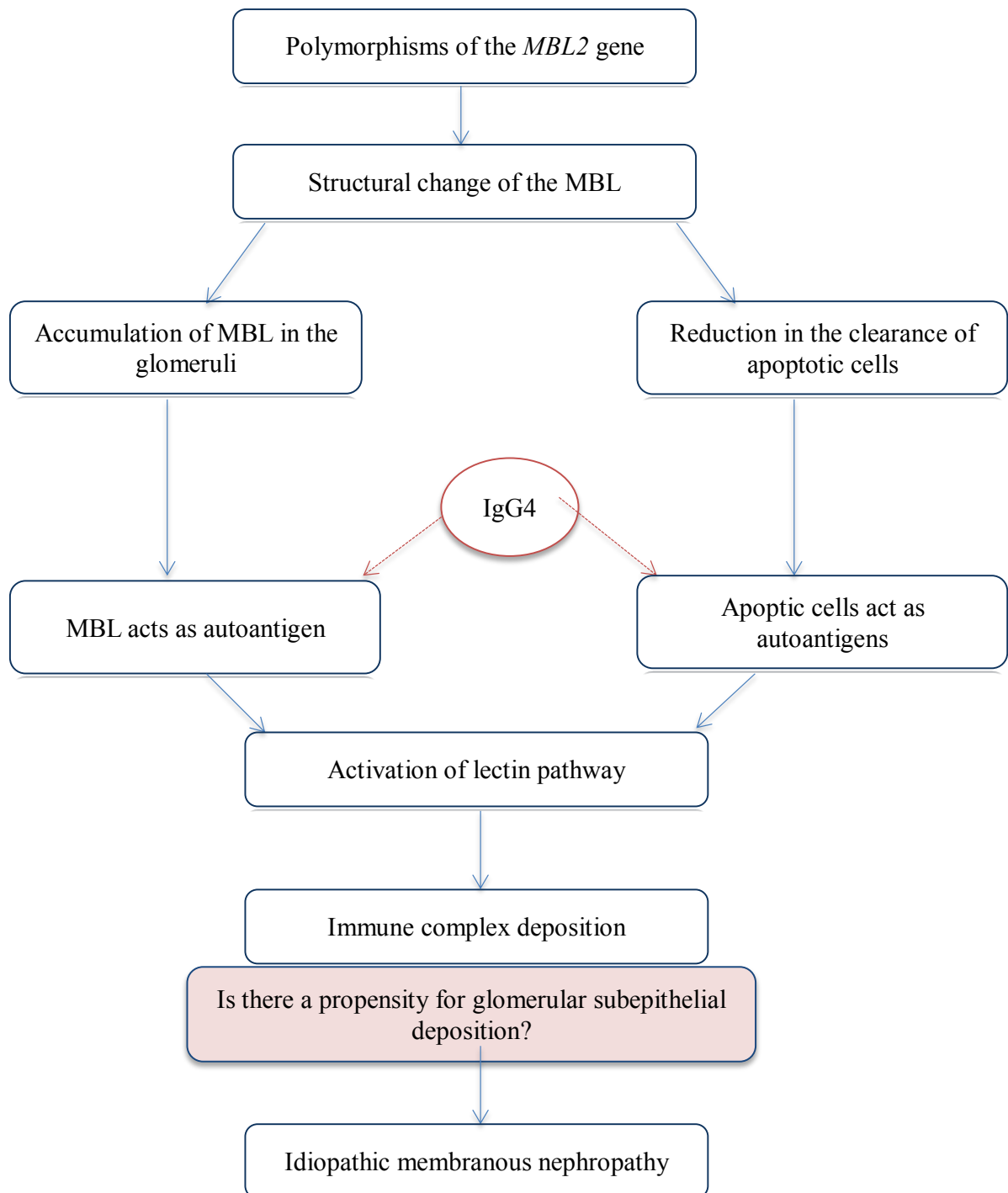


Table 1 – Clinical characteristics of patients with IMN and LMN and of the CG

CHARACTERISTICS	IMN N= 35	LMN N = 25	CG N = 101	p-value
Age. years*	44.9 ± 13.8	33.9 ± 9.1	30.1 ± 9.1	<0.001 ³
Males. %(n)	65.7% (23)	24.0% (6)	41.6% (42)	0.004 ⁴
Time of disease. months	13 (5.5 - 31)	30 (7 - 44)	-	0.107 ²
Immunosuppression. %(n)	68.6% (24)	96.0% (24)	-	0.009 ⁴
Activity of disease. %(n)	71.4% (25)	48.0% (12)	-	0.066 ⁴
Proteinuria. g/day [#]	2.0 (0.5 - 4.3)	0.5 (0.1 - 1.7)	-	0.008 ²
Serum albumin. g/dl*	3.30 ± 1.35	3.74 ± 0.67	-	0.167 ¹
Serum creatinine. g/dl [#]	1.1 (0.8 - 1.5)	0.8 (0.6 - 1.0)	-	0.002 ²

¹p-value of the Student t-test; ²p-value of the Mann-Whitney test; ³p-value of the ANOVA test; ⁴p-value of the chi-square test to compare the proportion; *mean±standard variation; [#]median (Q1-Q3).

Table 2 - Polymorphisms in the exon 1 of the MBL2 in patients with MN and the CG

Polymorphisms of the MBL2	MN (N = 59)	CG (N = 101)	p value ¹	OR (95% IC)
Alleles				
A	69 (58%)	158 (78%)	<0.001	1.00 (ref)
O	49 (42%)	44 (22%)		2.54 (1.51 - 4.31)
Genotypes				
A/A	10 (17%)	65 (64%)	<0.001	1.00
A/O	49 (83%)	28 (28%)		11.16 (4.77 - 28.41)
O/O	0 (0%)	8 (8%)		-

¹p-value of the Chi-square test for independence.

Table 3 - Polymorphisms in the exon 1 of the MBL2 in IMN x Control, LMN x Control and IMN x LMN.

	IMN (n = 35)	CG (n = 101)	OR (95%IC)	LMN (n = 24)	CG (n = 101)	OR (95%IC)	IMN (n = 35)	LMN (n = 24)	OR (95%IC)
Alleles									
A	41(59%)	158(78%)	2.53 (1.36 - 4.71)	28(58%)	158(78%)	2.55 (1.24 - 5.22)	41(59%)	28(58%)	1.01 (0.45 - 2.27)
O	29(41%)	44(22%)		20(42%)	44(22%)		29(41%)	20(42%)	
Genotypes									
A/A	6(17%)	65(64%)	10.98 (3.92 - 36.06)	4(17%)	65(64%)	11.34 (3.39 - 49.88)	6(17%)	4(17%)	1.03 (0.21 - 5.65)
A/O	29(83%)	28(28%)		20(83%)	28(28%)		29(83%)	20(83%)	

NB: The reference group in the comparisons was patients with allele A and patients with genotype A/A

APÊNDICE D - ARTIGO ORIGINAL 2

Title: COMPARATIVE ANALYSIS OF PRIMARY AND SECONDARY GLOMERULOPATHIES IN THE NORTHEAST OF BRAZIL: DATA FROM THE PERNAMBUCO REGISTRY OF GLOMERULOPATHIES - REPEG

Subtitle: The Pernambuco Registry of Glomerulopathies - REPEG

Author: Denise Maria do Nascimento Costa^{a,b}

Coauthors: Lucila Maria Valente^a, Pedro Alves da Cruz Gouveia^a, Filipe Wanick Sarinho^a, Gisele Vajgel Fernandes^a, Maria Alina Gomes de Mattos Cavalcante^a, Orlando Vieira Gomes^c, Camila Barbosa Lyra de Oliveira^{a,b}, Carolina de Andrade Jordão de Vasconcelos^b, Emanuel Sávio Cavalcante Sarinho^a.

a - Hospital das Clínicas at the Universidade Federal de Pernambuco - HC-UFPE

b - Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira - IMIP

c - Hospital de Ensino Doutor Washington Antônio de Barros at the Universidade Federal do Vale do São Francisco (HEDWAB-Univasf)

Contact address: Hospital das Clínicas - Serviço de Nefrologia (Secretaria de Nefrologia). Av. Professor Moraes Rêgo, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901.

Telephone: (+5581) 21263734

Email: demnc@hotmail.com

List of abbreviations:

REPEG – The Pernambuco Registry of Glomerulopathies

PG – Primary glomerulopathies

SG – Secondary glomerulopathies

HC-UFPE - Hospital das Clínicas - Universidade Federal de Pernambuco

IMIP - Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

HEDWAB-Univasf - Hospital de Ensino Doutor Washington Antônio de Barros - Universidade Federal do Vale do São Francisco

LM – Light microscopy

IF – Immunofluorescence

EM – Electron microscopy

UA – Urinary abnormalities

NS - Nephrotic syndrome

NepS - Nephritic syndrome

AKI – Acute kidney injury

CKD - Chronic kidney disease

FSGS - Focal segmental glomerulosclerosis

MN - Membranous nephropathy

MCD - Minimal change disease

IgAN - IgA nephropathy

MPGN – Membranous proliferative glomerulonephritis

MesGN - Non-IgA mesangial glomerulonephritis

CG - Collapsing glomerulonephritis

LN - Lupus nephritis

TIN - Tubulointerstitial nephritis

SLE - Systemic lupus erythematosus

ABSTRACT

Introduction In Brazil, glomerulopathies are the third leading cause of chronic renal disease, accounting for 11% of dialysis patients. However, studies on the prevalence of this disease in Northeastern Brazil are scarce.

Methods This was a retrospective study conducted at three public teaching hospitals in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. The aim was to describe the findings of biopsies and to conduct a comparative analysis on the clinical laboratory presentation of primary glomerulopathies (PG) and secondary glomerulopathies (SG).

Results A total of 1.159 biopsies performed between 1998 and 2016 were analyzed. The sample consisted of 678 biopsies of native kidneys, after excluding extra glomerular diseases and unsuitable material. PG were more frequent than SG (58% x 42%). There was a prevalence among PG of: focal segmental glomerulosclerosis (43%), membranous glomerulonephritis (15%), minimal change disease (14%), IgA nephropathy (10%), membranoproliferative glomerulonephritis (9%) (81% were immune-complex-mediated, 12% were complement-mediated and 7% with negative immunofluorescence), and collapsing glomerulopathy (3%). For SG, the main etiologies were: lupus nephritis (68%), infections (10%) and vasculitis (7%). The multivariate analysis demonstrated that female sex and hematuria were related to a greater chance of SG, with an *odds ratio* = 1.7 ($P < 0.001$) and 1.3 ($P = 0.011$), respectively. An elevated level of creatinine by 1g/dl increased the probability of a SG diagnosis by 8% ($P < 0,001$), and an increase of every 1g/day of proteinuria reduced this chance by 6% ($P = 0,027$). Nephrotic syndrome was more common among the PG, while urinary abnormalities and nephritic syndrome prevailed in patients with SG.

Conclusions This is the first registry of glomerulopathies in Northeastern Brazil. It also presents a comparative analysis of the main clinical laboratory abnormalities of PG and SG, and includes the current classifications of glomerular diseases.

Keywords: epidemiology, glomerulonephritis, pathology, kidney biopsy

PRESENTATION

In Brazil, glomerulopathies are the third leading cause of chronic renal disease; however, studies on the prevalence of this disease are scarce. This is the first registry of glomerulopathy in Northeastern Brazil. This was a retrospective study conducted in three public teaching hospitals, with the aim of describing the findings of 678 evaluated biopsies. A comparative analysis was also conducted on the leading clinical laboratory abnormalities of primary and secondary glomerulopathies, and included the current classifications of glomerular diseases.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PRIMARY AND SECONDARY GLOMERULOPATHIES IN THE NORTHEAST OF BRAZIL: DATA FROM THE PERNAMBUCO REGISTRY OF GLOMERULOPATHIES - REPEG

INTRODUCTION

Glomerulopathies are renal diseases with different histopathological subtypes. In addition to being crucial for diagnosis, microscopic evaluation can also offer prognostic data and serve as a guide for treatment¹. Once records have been collected and analyzed, biopsies may provide epidemiological information such as etiology, prevalence and incidence, clinical manifestations and other relevant data regarding renal pathologies². However, glomerulopathies are uncommon diseases and are often asymptomatic, accidentally discovered through routine tests. Thus, in general, records of these disorders are scarce³.

In Brazil, glomerulopathies are a major cause of end-stage renal disease, accounting for 11% of dialysis patients. According to the 2014 Dialysis Census by the Brazilian Society of Nephrology, chronic glomerulonephritis are the third main cause of chronic kidney disease in patients on dialysis, after hypertension and diabetes mellitus⁴. However, this diagnosis is often presumed, since it is based on clinical and laboratory presentation without performing a renal biopsy, especially when patients present with end-stage renal disease at their first consultation.

The most representative data on glomerulopathies in Brazil are the Paulista Registry of Glomerulopathies, and the biopsy registry at the Kidney and Hypertension Hospital of São Paulo^{2,5}. The first study evaluated patients in the state of São Paulo, and the second covered biopsies from all over Brazil, which had been sent to a single center in Southeast Brazil for analysis. There are also local studies that have evaluated specific populations, either by city or by age group, with fewer biopsies⁶⁻⁸. Due to the wide ethnic and socioeconomic diversity throughout Brazil, it is of considerable interest to gain knowledge regarding the regional peculiarities of glomerular diseases.

Pernambuco, located in Northeastern Brazil, is the seventh most populous state in the country, with more than 9 million people. The incidence of poverty is 52% and the mean household monthly income is US\$210,00⁹. While there is a noticeable distinction between the

socio-economic reality of this state and those of European and Asian countries, where most of the largest registries of glomerulopathies are located^{3,10-13}, it is however somewhat closer to other countries in Latin America^{14,15}.

This is the first study on glomerulopathies conducted in Pernambuco, in Northeastern Brazil. The aim of this retrospective study was to describe the main pathological clinical findings at the time of biopsy and compare this data to other available data in the literature. A comparative analysis was also conducted between primary glomerulopathies (PG) and secondary glomerulopathies (SG), regarding the epidemiological characteristics and clinical presentation.

METHODOLOGY

Data on patients monitored in referral glomerulopathy outpatient clinics at three public teaching hospitals, from February 1998 to January 2016, were evaluated and assembled, and hence, the Pernambuco Registry of Glomerulopathies (REPEG) was initiated. Two of the centers, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) and Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), are located in Recife, the capital of Pernambuco. The third, Hospital de Ensino Doutor Washington Antônio de Barros da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HEDWAB-UNIVASF), is located in Petrolina, a large city in the southern point of the state.

The following data were obtained: name of patient, age, sex, clinical and laboratory presentation, indication for renal biopsy, and histopathological and etiological diagnosis. The registry included results from light microscopy (LM) and immunofluorescence (IF), with or without electron microscopy (EM), compatible with glomerulopathies. Renal biopsies were evaluated by local nephropathologists, as well as from the southeast of Brazil and from North Carolina (USA). Biopsies of transplanted kidneys and rebiopsies were not included in the study.

Indications for renal biopsies were categorized into five clinical syndromes: urinary abnormalities (UA); nephrotic syndrome (NS); nephritic syndrome (NepS); acute kidney injury (AKI) and chronic kidney disease (CKD). UA were defined as hematuria and/or non-nephrotic proteinuria, with no other signs or symptoms of kidney disease. Hematuria was established by the presence of five or more red blood cells per field in urinalysis and non-nephrotic proteinuria

when proteinuria < 3.5g/day. NS was defined by proteinuria > 3.5g/day. NepS encompassed rapidly progressive glomerulonephritis, and was defined by hematuria, hypertension and increased creatinine. AKI was defined as a rapid deterioration of renal function, with changes that did not fit with a definition of NepS. CKD was established by the persistent reduction over more than three months of the glomerular filtration rate < 60 ml/min/m², with no other changes compatible with the previous definitions.

Histopathological findings were classified into two main categories: (1) PG (when signs and symptoms were exclusively due to isolated kidney disease and its consequences, with no family history of glomerulopathy); (2) SG (other cases which did not meet the criteria for primary glomerulopathy).

The subcategorization of histopathologic findings was established for PG as follows: (a) focal segmental glomerulosclerosis (FSGS); (b) membranous nephropathy (MN); (c) minimal change disease (MCD); (d) IgA nephropathy (IgAN); (e) membranoproliferative glomerulonephritis (MPGN); (f) non-IgA mesangial glomerulonephritis (MesGN); (g) collapsing glomerulonephritis (CG); (h) others, including IgM nephropathy (predominance of IgM deposits $\geq 2+$ in more than 50% of the mesangial region of non-sclerotic glomeruli), C1q nephropathy (glomerular deposition of C1q $\geq 2+$ in mesangial region, with corresponding electron dense deposit in EM and no clinical, laboratory or pathology findings of systemic lupus erythematosus) and advanced chronic glomerulonephritis. MPGN was defined when there was no identified secondary etiology, with the possibility of being immune-complex-mediated or complement-mediated (C3 $\geq 2+$ when compared to the other components of the IF) or with IF negative.

SG were subcategorized as follows: (a) lupus nephritis (LN); (b) related to paraproteinemias (associated with amyloidosis and multiple myeloma); (c) associated to infectious diseases (post-streptococcal glomerulonephritis and other bacterial, viral and parasitic causes); (d) related to metabolic disorders (diabetic nephropathy and secondary to storage diseases); (e) hereditary disorders (Alport's disease, thin basement membrane disease or other hereditary diseases); (f) vasculitis (microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis, or kidney isolated vasculitis); (g) cryoglobulinemias (h) others (including MPGN with identified underlying etiology); (i) unclassified cases (no definite diagnosis even with renal biopsy).

As in previous studies, patients aged 19 years or under were considered as children. Those

aged 20 to 39 years were classified as young adults, those between 40 and 59 years as adults and 60 years and over as older people⁵.

Statistical analysis

Data were stored in a Microsoft Excel[®] database, which was exported to SPSS[®] 18, in which the analysis was performed. An evaluation of the influence of personal and clinical factors in classifying the etiology was conducted using the Chi-square test for independence, when the variable was qualitative. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of the quantitative variables, through which the non-normality was verified. The Mann-Whitney test was used to compare the distribution of quantitative variables between the primary and secondary etiology groups. A *P*-value less than 0.05 (by two-tailed testing) was considered to indicate statistical significance.

Factors included in the multivariate analysis were those that presented *P*-value less than 0.20 in the univariate analysis. The Poisson regression model with robust variance was applied to assess the risk of secondary etiological classification. A *P*-value less than 0.05 was considered for factors to remain in the model. The confidence intervals for the ratio of prevalence were also calculated and the Wald test was used to compare the risks for secondary classification of the etiology between the levels of the evaluated factors.

RESULTS

Global findings

The REPEG contains data on 1.926 patients monitored at glomerular disease outpatient clinics in the state of Pernambuco, over the last 18 years. Of the 1.159 kidney biopsies, 481 were inadequate for analysis, since there was no LM and/or IF or they only contained renal medullary tissue, and were consequently discarded from the study. Of the 678 biopsies evaluated, seven with extra-glomerular diseases were excluded so that only glomerular diseases were evaluated. EM had been performed in 7% of all cases (Figure 1).

As demonstrated in Table 1, there was a predominance of renal biopsies in young adult (50%) and female (60%) patients. The main indication for performing the procedure was NS, in over 50% of the samples analyzed, without renal failure (67%). Around 37% of patients had waited more than six months in order to perform a renal biopsy.

The frequency of different glomerular pathological findings is demonstrated in Table 2. Primary etiologies were more frequent (58%) with the predominance of FSGS (43%). Other causes of PG were MN (15%) and MCD (14%), followed by IgAN (10%) and MPGN (9%). LN represented 68% of secondary glomerular diseases with a predominance of class IV (29%), followed by class IV + V (22%) and V (21%). Glomerulopathies related to infectious diseases were the second most frequent cause of SG, the main cause being post-streptococcal glomerulonephritis (50%). Six out of eight patients with hepatosplenic schistosomiasis, presented immune complex-mediated MPGN biopsies. Other associations with infectious diseases were: HIV associated with immune-complex-mediated MPGN, amyloidosis and FSGS; MN related to syphilis and hepatitis B; CG associated with parvovirus infection. Other secondary causes (4%) identified in this registry were: anti-glomerular basement membrane disease, cancer, methimazole-induced vasculitis, sickle cell anemia and Crohn's disease.

MPGN accounted for 6% of all biopsies. Of these, 81% were immune-complex-mediated, 12% were complement-mediated and 7% presented negative IF. Of the 35 patients with immune-complex-mediated MPGN, the etiologies of ten were identified: cryoglobulinemia (2), HIV (1), chronic lymphocytic leukemia (1) and hepatosplenic schistosomiasis (6). CG represented 2% of all biopsies, with two etiologies were identified (parvovirus and anabolic) and 12 were idiopathic.

The three main indications for renal biopsy were evaluated according to the histopathological findings (Figure 2). Among the patients biopsied for NS, the main histopathological findings were FSGS (33%), followed by LN (19%). For patients who were only evaluated if they presented with initial symptoms of NepS, the main diagnosis was LN (44%), followed by vasculitis (19%) and IgAN (14%). When the initial presentation of renal disease was UA, there was a predominance of LN (46%), followed by FSGS (14%) and IgAN (11%).

Comparative analysis of primary and secondary glomerulopathies

Table 3 presents evaluations of the epidemiological and clinical laboratory profiles of patients, according to the etiology of the disease. In the univariate analysis, there is a difference between the primary and secondary groups regarding sex, hypertension, duration of symptoms, hematuria, proteinuria and serum creatinine.

Results of the multivariate model are presented in Table 4. Females demonstrated a greater chance of a secondary etiology with an $OR = 1.7$ (95% CI = 1.35 to 2.19), as well as the presence of hematuria $OR = 1.3$ (95% CI = 1.07 to 1.67). An increase in each 1g/day of proteinuria was related to a reduced chance of 6% of being classified as SG ($P < 0.001$). An increase in creatinine by 1g/dl, increased the risk of a secondary classification of the etiology of glomerulopathy by around 8% ($P = 0.027$).

Analyzing the etiology according to age groups (Table 5) after applying Pearson's test, younger patients presented a significantly higher risk for PG ($P = 0.001$). Comparing the reasons for renal biopsy (Figure 3), there was a predominance of NS for most patients. However, this presentation was more common in the PG group when compared to the SG ($79\% \times 41\%$, $P < 0.001$). There was a predominant manifestation of UA and NepS in patients with SG ($P < 0.001$). Within this series, AKI and CKD were not common indications for renal biopsy, and for both presentations there was a predominance of SG.

DISCUSSION

The REPEG is the first registry to have involved the biopsies of patients with glomerular diseases from three referral centers in the state of Pernambuco. Similar to other studies, the registry demonstrates a predominance of primary glomerular diseases, with a prevalence ranging from 54% to 69%^{2,11}. However, our prevalence of SG (42%) was higher than previous national studies, which have ranged from 23% to 34%, and that of international studies, which is around 24%^{1,2,5,16}. The higher prevalence of SG relative to other studies may have resulted from the diversity of classifications for these glomerulopathies, for example, the inclusion of hereditary changes and diabetes mellitus as secondary causes in this study. Mesquita et al. (2011) used

definitions for SG similar to this study, and encountered a prevalence of 57%, only considering renal biopsies with glomerular diseases¹⁷. However, regional differences may also have influenced these results. Among the SG, LN represented 68% of biopsies, similar to several other samples^{1,2,11,18}.

Amongst the PG, there was a predominance of FSGS, followed by MN, MCD, IgAN and MPGN. Several studies of biopsy registries, especially in Latin America, have demonstrated a predominance of FSGS, ranging from 25% to 35%^{2,5,7,15,19}. A high prevalence such as found in REPEG (43%), although unusual, was also observed in Mexico, and represented 47% of the biopsies¹⁴.

The most common indication for biopsy was NS, of which the main findings were FSGS and LN. Some studies presented a prevalence of FSGS and MCD among the causes of NS⁵. Rivera et al. (2004) also encountered this prevalence in children under 15 years, although in adults, in accordance with Gesualdo et al. (2004), MN was more prevalent^{10,12}. In the present study, the prevalence of LN among NS was higher when compared to other studies, for which there was a prevalence ranging from 5 to 10% of NS^{5,12,13}. The Japanese registry demonstrates that among the cases of NS there was a predominance of PG (particularly MCD, when IgAN was excluded), followed by diabetic nephropathy (9%)¹³. The discordant results from these epidemiological studies may be a consequence of individual indications of renal biopsies by the services.

Among the biopsies performed for NepS and UA there was a predominance of LN (44% and 46%, respectively), which is unlike results encountered by other authors^{5,10}, who have reported IgAN as the main glomerulopathy related to both presentations. In study by Rivera et al. (2004), there was a predominance of IgAN among the causes of UA in all age groups¹². In the Italian registry, there was predominance of IgAN in PG with NepS and UA, and immune-complex-mediated diseases among SG with the same presentations¹⁰. In the REPEG, IgAN was the third leading cause of NepS and UA. A lower proportion of IgAN in Pernambuco may have arisen because routine renal biopsies were not performed in cases of isolated hematuria, that is with no systemic manifestations of disease and with no renal failure or proteinuria > 500 mg/day.

A comparative analysis of PG and SG, with regard to patients' main clinical laboratory findings encountered a similar mean age among the groups. In the subanalysis by age, in accordance with a Brazilian study by Polito et al. (2010), PG prevailed in all age groups with a

significant difference for patients aged 40 years and under⁵.

The multivariate analysis of the present study investigated the association of clinical laboratory factors with primary or secondary etiologies and encountered a predominance of males among the PG and female among the SG. The predominance of women with SG is due to the high prevalence of immune-mediated glomerulonephritis, including LN, a pathology predominantly encountered in women. Polito et al. (2010) and Gesualdo et al. (2004) obtained similar results, also due to the high prevalence of LN among SG^{5,10}. On the other hand, Ferraz et al. (2010) and Kutlugun et al. (2011) encountered no gender differences among the etiologies^{7,20}. However, in the latter study there was a high prevalence of AA amyloidosis (43%) as a secondary cause, which may have been responsible for this difference in the results. The REPEG revealed higher proteinuria in patients with PG and an inversely proportional relationship between the increase in proteinuria and the chance of obtaining a diagnosis of SG. An earlier study encountered no difference in the mean proteinuria between the etiologies²⁰. The worsening of renal function and the presence of hematuria were also related to secondary etiology in the final model of this study. In fact, Kutlugun et al. (2011) demonstrated that renal dysfunction (creatinine > 1.5 mg/dl) was significantly more related to SG²⁰.

One advantage of this study is the comparative analysis of the clinical and laboratory manifestations of the primary and secondary etiologies of glomerulopathy. It also has the distinction of being the first registry to assess MPGN according to its new classification²¹. This current categorization, based on the findings of IF, allows a greater understanding of the pathophysiology of the disease, which thus facilitates the search for the etiologic mechanisms involved. Furthermore, it is the first registry to evaluate CG as a distinct entity from FSGS. As in the Barisoni, Schnaper and Kopp study (2007), this would be a more appropriate nomenclature, since CG presents more podocyte proliferation than depletion²². However, although advantageous, this characteristic prevents any comparison of our data with other glomerulopathies registries that have not yet incorporated these classifications.

Unlike previous studies, in this study there was no description of race^{2,3}. A genetic study conducted in the state of Pernambuco demonstrated that assessing race based solely on skin color can be extremely imprecise in our population²³. Some of the disadvantages of this study are the fact that is a retrospective analysis and there was no EM in some biopsies.

This is the first registry of glomerulopathies in Northeastern Brazil. As well as providing

important information on these conditions according to regional differences, it has also provided a comparative analysis of the major clinical laboratory changes of the affected patients. To the best of our knowledge, this is the first registry to use the most current classifications for MPGN and CG. Since establishing the REPEG, the data gathered herein are extremely relevant for obtaining a greater understanding of these diseases within our environment, thus helping to provide better assistance to patients and also the ability to serve as a database for future studies.

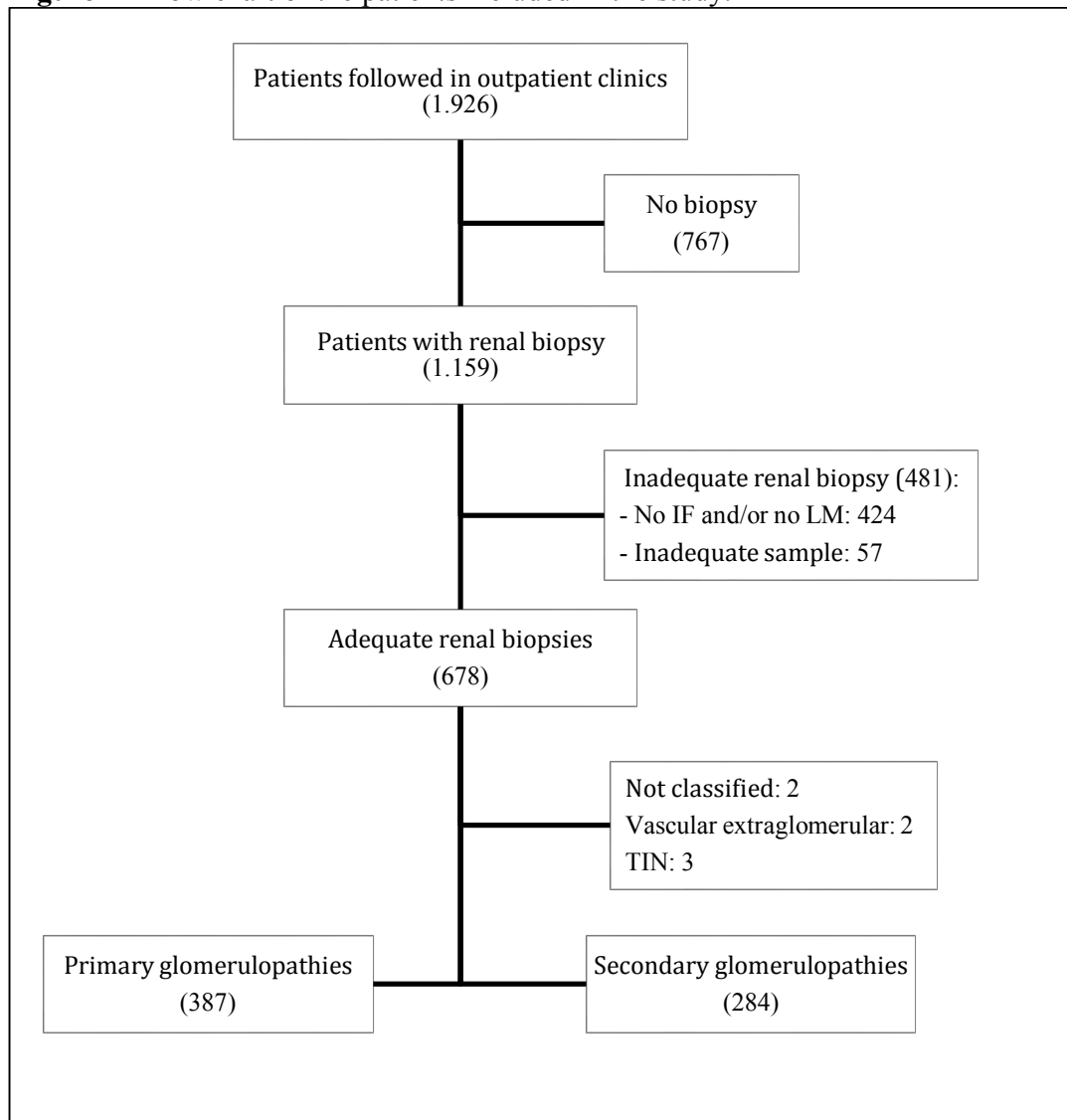
Acknowledgments: *The authors would like to express their thanks to the renal pathologists: Marcello F. Franco; Luiz Antonio Moura; Luiz Antonio da Fonte; J. Charles Jennette; Suzana Moraes de Oliveira Melo.*

Conflicts of interest: *None.*

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Naumovic R, Pavlovic S, Stojkovic D, Basta-Jovanovic G, Nesic V. Renal biopsy registry from a single centre in Serbia: 20 years of experience. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):877-85.
2. Malafronte P, Mastroianni-Kirsztajn G, Betônico GN, Romão JE Jr, Alves MA, Carvalho MF, Viera Neto OM, Cadaval RA, et al. Paulista Registry of glomerulonephritis: 5-year data report. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Nov;21(11):3098-105.
3. Rychlík I, Jancová E, Tesar V, Kolsky A, Lácha J, Stejskal J, Stejskalová A, Dusek J, et al. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 Dec;19(12):3040-9.
4. Sociedade Brasileira de Nefrologia. Censo de diálise. 2014. Disponível em <<http://www.censo-sbn.org.br/censosAnteriores>>. Acesso em 6 jan. 2016.
5. Polito MG, de Moura LA, Kirsztajn GM. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9.617 native kidney biopsies. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Feb;25(2):490-6.
6. Crensiglova C, Rehme BB, Kinasz LR, Chula DC, Nascimento MM, Soares MF. Frequency and clinical histological analysis of glomerular diseases in a tertiary hospital in southern Brazil. *J Bras Nefrol*. 2016 Mar;38(1):42-48.
7. Ferraz FH, Martins CG, Cavalcanti JC, Oliveira FL, Quirino RM, Chicon R, Cavechia SR. Profile of glomerular diseases in a public hospital of Federal District, Brazil. *J Bras Nefrol*. 2010 Jul-Sep;32(3):249-56.
8. Oliveira LB, Cobo Ede C, Machado JR, Custódio FB, da Silva MV, de Oliveira FA, Correa RR, dos Reis MA. Clinical and epidemiological prevalence of glomerulopathies elderly in the city of Uberaba - MG. *J Bras Nefrol*. 2015 Apr-Jun;37(2):166-70.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=pe>>. Acesso em 6 jan. 2016.
10. Gesualdo L, Di Palma AM, Morrone LF, Strippoli GF, Schena FP; Italian Immunopathology Group, Italian Society of Nephrology. The Italian experience of the national registry of renal biopsies. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):890-4.
11. Li LS, Liu ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China: analysis based on 13.519 renal biopsies. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):920-3.
12. Rivera F, López-Gómez JM, Pérez-García R; Spanish Registry of Glomerulonephritis. Clinicopathologic correlations of renal pathology in Spain. *Kidney Int*. 2004 Sep;66(3):898-904.

13. Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, Saito T, Kohda Y, Nishi S, Tsuruya K, Kiyomoto H, et al. Japan Renal Biopsy Registry and Japan Kidney Disease Registry: Committee Report for 2009 and 2010. *Clin Exp Nephrol*. 2013 Apr;17(2):155-73.
14. Chávez Valencia V, Orizaga de La Cruz C, Becerra Fuentes JG, Fuentes Ramírez F, Parra Michel R, Aragaki Y, Márquez Magaña I, Pazarin Villaseñor HL, Villanueva Pérez MA, García Cárdenas MA. Epidemiology of glomerular disease in adults: a database review. *Gac Med Mex*. 2014 Sep-Oct;150(5):403-8.
15. Mazzuchi N, Acosta N, Caorsi H, Schwedt E, Di Martino LA, Mautone M, Gadola L, Petraglia A, Noboa O; Programa de Prevención y Tratamiento de las Glomerulopatías. Frequency of diagnosis and clinic presentation of glomerulopathies in Uruguay. *Nefrologia*. 2005;25(2):113-20.
16. Zaza G, Bernich P, Lupo A; 'Triveneto' Register of Renal Biopsies (TVRRB). Incidence of primary glomerulonephritis in a large North-Eastern Italian area: a 13-year renal biopsy study. *Nephrol Dial Transplant*. 2013 Feb;28(2):367-72.
17. Mesquita M, Fosso C, Bakoto Sol E, Libertalis M, Corazza F, Vanden Houte K, Dratwa M. Renal biopsy findings in Belgium: a retrospective single center analysis. *Acta Clin Belg*. 2011 Mar-Apr;66(2):104-9.
18. Swaminathan S, Leung N, Lager DJ, Melton LJ 3rd, Bergstralh EJ, Rohlinger A, Fervenza FC. Changing incidence of glomerular disease in Olmsted County, Minnesota: a 30-year renal biopsy study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 May;1(3):483-7.
19. Arias LF, Henao J, Giraldo RD, Carvajal N, Rodelo J, Arbeláez M. Glomerular diseases in a Hispanic population: review of a regional renal biopsy database. *Sao Paulo Med J*. 2009;127(3):140-4.
20. Kutlugun AA, Tokgoz B, Sipahioglu MH, Oymak O, Utas C. Comparison of the clinical and laboratory presentations of primary and secondary glomerular diseases. *Ren Fail*. 2011;33(8):781-4.
21. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification. *Semin Nephrol*. 2011 Jul;31(4):341-8.
22. Barisoni L, Schnaper HW, Kopp JB. A proposed taxonomy for the podocytopathies: a reassessment of the primary nephrotic diseases. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007 May;2(3):529-42.
23. Coelho AV, Moura RR, Cavalcanti CA, Guimarães RL, Sandrin-Garcia P, Crovella S, Brandão LA. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res*. 2015 Mar 31;14(1):2876-84.

Figure1 – Flow chart of the patients included in the study.

LM: light microscopy; IF: immunofluorescence; TIN: tubulointerstitial nephritis.

Table 1 – Distribution of cases according to age, sex, initial laboratory findings, clinical syndromes, time before performing renal biopsy and hypertension.

	N° of cases	Percentage%
Age		
0-19 years	112	18%
20-39 years	318	50%
40-59 years	163	25%
> 60 years	45	7%
Unknown	33	
Sex		
Male	271	40%
Female	400	60%
Clinical syndrome (reason for renal biopsy)		
UA	126	19%
NS	410	63%
NepS	86	13%
AKI	11	2%
CKD	18	3%
Unknown	20	
Time between symptoms and biopsy		
< 6 months	363	63%
6-12 months	79	14%
> 12 months	136	23%
Unknown	93	
Proteinuria		
< 1 g/day	41	7%
1-3.5g/day	184	30%
> 3.5g/day	378	63%
Unknown	68	
Creatinine		
≤ 1.5g/dl	416	67%
> 1.5g/dl	201	33%
Unknown	54	
Hypertension		
Yes	302	52%
No	280	48%
Unknown	89	

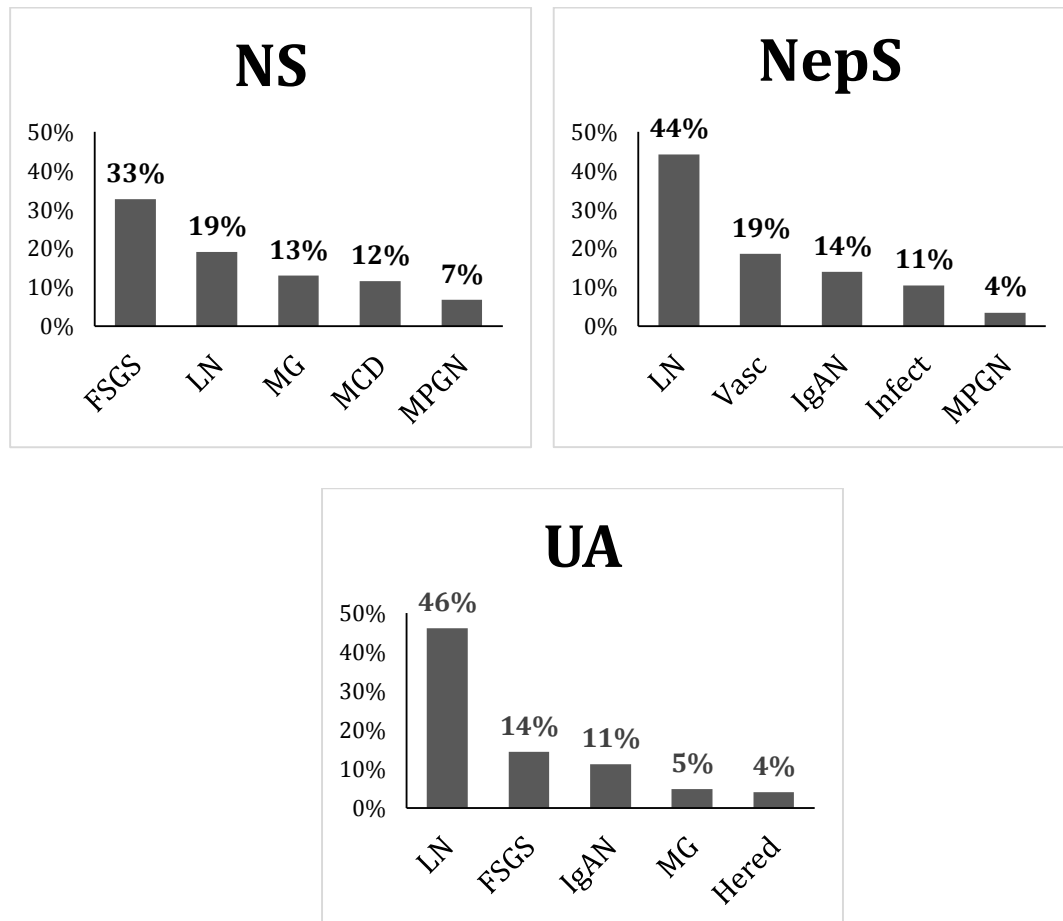
UA: urinary abnormalities; NS: nephrotic syndrome; NepS: Nephritic syndrome; AKI: acute kidney injury; CKD: chronic kidney disease.

Table 2 – Frequency of different glomerular pathological findings.

	N° of cases	% of subgroup	% of total
Primary glomerulopathies			
FSGS	166	43%	25%
MN	59	15%	9%
MCD	53	14%	8%
IgAN	38	10%	6%
MPGN	34	9%	5%
CG	12	3%	2%
MesGN	8	2%	1%
Others	17	4%	3%
TOTAL	387	100%	58%
Secondary glomerulopathies			
LN	192	68%	29%
Infectious	28	10%	4%
Vasculitis	20	7%	3%
Hereditary diseases	10	3%	1%
Metabolic	9	3%	1%
Paraproteinemia	8	3%	1%
Cryoglobulinemia	5	2%	1%
Others	12	4%	2%
TOTAL	284	100%	42%

FSGS: focal segmental glomerulosclerosis; MG: membranous nephropathy; MCD: minimal change disease; IgAN: IgA nephropathy; MPGN: membrane proliferative glomerulonephritis; CG: collapsing glomerulopathy; MesGN: non-IgA mesangial glomerulonephritis; LN: lupus nephritis.

Figure 2 – Clinical/pathological correlations observed in main primary and secondary glomerular diseases.



NS: nephrotic syndrome; NepS: nephritic syndrome; UA: urinary abnormalities; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis; LN: lupic nephritis; MN: membranous nephropathy; MCD: minimal change disease; MPGN: membranoproliferative glomerulonephritis; Vasc: vasculitis; IgAN: IgA nephropathy; Infect: infectious; Hered: hereditaries.

Table 3 – Distribution of etiologies according to the factors of personal, clinical and laboratory profiles of the evaluated patients.

Factor evaluated	Etiology		P-value
	Primary	Secondary	
Age±SD(years)	33.0±15.3	31.0±14.1	0.709 ²
Sex, N(%)			
Male	199(73%)	72(27%)	<0.001 ¹
Female	188(47%)	212(53%)	
Hypertension, N(%)			
Yes	172(57%)	130(43%)	0.273 ¹
No	172(61%)	108(39%)	
Time with symptoms, N(%)			
< 6 months	202(56%)	161(44%)	0.023 ¹
6 to 12 months	57(72%)	22(28%)	
> 12 months	83(61%)	53(39%)	
Hematuria, N(%)			
Yes	193(51%)	185(49%)	<0.001 ¹
No	144(69%)	64(31%)	
Proteinuria±SD (g/24h)	5.7±5.6	3.4±3.9	<0.001 ²
Albumin±SD(g/dl)	2.1±1.0	2.7±0.9	<0.001 ²
Creatinine±SD(mg/dl)	1.0±1.4	1.3±1.9	0.005 ²

¹p-value of the Chi-square test; ²p-value of the Mann-Whitney test.

Table 4 - Poisson model for the secondary etiology.

Factor evaluated	OR	95% CI	P-value¹
Sex			
Male	1.000	-	-
Female	1.722	1.353 - 2.191	<0.001
Hematuria			
Yes	1.337	1.070 - 1.670	0.011
No	1.000	-	-
Proteinuria	0.944	0.916 - 0.972	<0.001
Creatinine	1.079	1.009 - 1.153	0.027

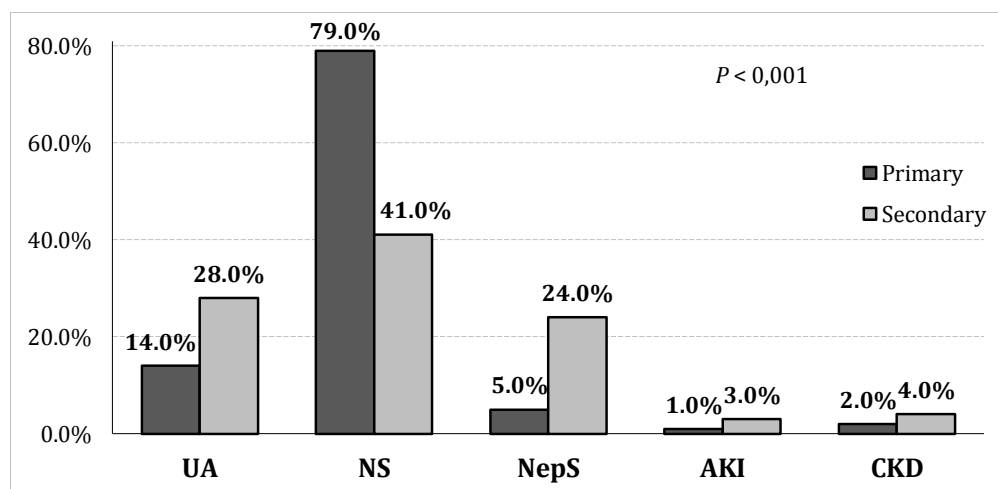
OR: odds ratio; ¹P-value of the Wald Chi-square test.

Table 5 – Distribution of etiologies according to age groups.

Age	Etiology		<i>P</i>-value¹
	Primary <i>N</i>(%)	Secondary <i>N</i>(%)	
0 to 19 years	78(70%)	34(30%)	0.006
20 to 39 years	163(51%)	155(49%)	< 0.001
40 to 59 years	100(61%)	63(39%)	0.337
60 or over	30(67%)	15(33%)	0.229

¹*P*-value of the Chi-square test for homogeneity

Figure 3 – Frequency of different forms of biopsy-proven primary and secondary glomerulopathies, according to the clinical syndromes



UA: urinary abnormalities; NS: nephrotic syndrome; NepS: nephritic syndrome; AKI: acute kidney injury; CKD: chronic kidney disease.

ANEXO A - Journal of the American Society of Nephrology: instructions to authors

Author Guidelines

Original Articles are traditional full-length manuscripts of 3000 words or less (excluding title page, methods, figure legends, tables, and references) that address an important research question with a thoughtful and clever experimental design. The order of the submitted manuscript should be as follows: title page, abstract (250 words or less), introduction, results, discussion, concise methods, acknowledgments, statement of competing financial interests, references, figure legends, and tables. Complete methods, providing sufficient detail to allow replication of the study, must be provided as supplemental information to be published online with the manuscript at the time of publication. Supplemental material that is of interest to the readership, such as additional figures or tables, is welcome and will be posted online. If you submit supplemental files that may only be posted online, then upload one PDF file that contains all of the supplemental information. Supplemental information is not composed, enhanced or manipulated after submission. The title page should include title, authors (first and last names) and affiliations (including division and/or department as applicable), running title (no more than 30 characters), separate word count for abstract and text, and the corresponding author's address, phone, fax, and email information. Abstracts should be written for easy reading with no abbreviations, but should tell a complete story covering relevant background, major methodology, major conclusions, and implications, using data as needed. Manuscripts needing only minimal revision will be published in the next available issue after acceptance and receipt of the final manuscript files.

ADDITIONAL ITEMS OF NOTE

Studies of DNA Polymorphisms: For population-based case-control studies describing an association between a DNA polymorphism and renal disease, in addition to insuring adequate sample size, appropriate correction of P values for multiple comparisons (P values must be rounded to two decimal places as applicable), and findings that “make sense” biologically, JASN will usually require one of the following for papers to be considered for publication: data showing an effect of the polymorphism on protein function or gene expression; confirmation of the association using a family-based method, eg, transmission-disequilibrium; replication of the association in an independent sample; or measurement of and correction for population stratification in the samples. Moreover, recent studies indicate that the haplotype

structure of the human genome is relatively limited. The genome has been depicted as a series of regions of high linkage disequilibrium (haplotype blocks), each with limited diversity, separated by sites of recombination. A particular SNP may be shared by several common haplotypes, of which only one is associated with a disease. It is not possible to identify this “risk haplotype” by genotyping a single SNP. Therefore, special consideration will be given to studies in which haplotype analysis is used to identify the “risk haplotype” associated with a renal disease.

REFERENCE FORMATS

References should be listed in order of their appearance in the text. Please adhere to the reference limit for each type of article. List all authors for each article cited (do not use et al). Journal names should be abbreviated according to the MEDLINE list of serials. Superscripted numbers in the text should be used to indicate references; these superscripted numbers must be placed immediately after a comma or period if cited at the end of a phrase or sentence.

ANEXO B - Nephrology Dialysis Transplantation: instructions to authors**TABLES**

All tables must be numbered consecutively and each must have a brief heading describing its contents. Any footnotes to tables should be indicated by superscript characters. Tables must be referred to in the main text in running order. All tables must be simple and not duplicate information given in the text.

ABBREVIATIONS

Authors should not use abbreviations in headings and figure legends should be comprehensive without extensive repetition of the Subjects and Methods section. Authors are advised to refrain from excessive use of uncommon abbreviations, particularly to describe groups of patients or experimental animals.

TRADE NAMES

Non-proprietary (generic) names of products should be used. If a brand name for a drug is used, the British or International non-proprietary (approved) name should be given. The source of any new or experimental preparation should also be given.

TRANSPARENCY DECLARATION & ETHICS

ALL papers submitted to NDT MUST include a 'Transparency declarations' section (which should appear at the end of the paper, before the 'References' section) within the article. We suggest authors concentrate on transparency declarations (i.e. conflicts of interest) of a financial nature, although relevant non-financial disclosures can also be made.

Authors should either include appropriate declarations or state 'None to declare'. Importantly, the declarations should be kept as concise as possible, should avoid giving financial details (e.g. sums received, numbers of shares owned etc.), and should be restricted to declarations that are specific to the paper in question. Authors will of course need to consider whether or not the transparency declarations need to be amended when revisions are submitted.

This Journal takes publication ethics very seriously. If misconduct is found or suspected after the manuscript is published, the journal will investigate the matter and this may result in the article subsequently being retracted.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS TO BE PUBLISHED IN NDT

Language editing

Particularly if English is not your first language, before submitting your manuscript you may wish to have it edited for language. This is not a mandatory step, but may help to ensure that the academic content of your paper is fully understood by journal editors and reviewers. Language editing does not guarantee that your manuscript will be accepted for publication.

Original Articles

Word count: maximum 3500 words, including abstract but excluding references, tables and figures.

Keywords: maximum 6

References: maximum 60

The order of original articles should be as follows:

1. Title page including the title (please bear in mind that we prefer a title to be concise yet eye-catching) and details of all authors, including first or given name, and affiliation;
2. On a separate page an abstract of ~250 words. It should consist of four paragraphs labelled 'Background', 'Methods', 'Results' and 'Conclusions'. They should briefly describe, respectively, the problems being addressed in this study, how the study was performed, the salient results and what the authors conclude from the results.
3. Keywords: no more than 6, in alphabetical order, characterizing the scope of the paper, the principal materials, and main subject of work.
4. Provide a short summary of max 3-4 sentences pointing out the main message of the paper.
5. On a new page: Introduction, Subjects and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Legends to figures and Figures. All pages should be numbered consecutively commencing with the title page. Headings (Introduction; Subjects and Methods, etc) should be placed on separate lines. It is important that authors number their pages prior to submission as reviewers will refer to particular pages when providing their comments on the manuscript.

Any statistical method must be detailed in the Subjects and Methods section, and any not in common use should be described fully or supported by references.

ANEXO C - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO PELO SLICC

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS PARA LES - SLICC (Systemic Lupus Collaborating Clinics, 2012)	
1.4 critérios, incluindo pelo menos 1 critério clínico e 1 imunológico; 2. Biópsia renal compatível com nefrite lúpica + FAN ou Anti-DNA positivo	
CRITÉRIOS CLÍNICOS	CRITÉRIOS LABORATORIAIS
1. LÚPUS CUTÂNEO AGUDO: rash malar (exceto discóide), LES bolhoso, necrose epidérmica tóxica variante do LES, rash maculopapular do LES, rash fotossensível do LES (sem dermatomiosite) ou LES cutâneo subagudo (lesões psoriasiformes e/ou anulares policíclicas que resolvem sem cicatriz, mas ocasionalmente com despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasias);	12. FAN POSITIVO
2. LÚPUS CUTÂNEO CRÔNICO: rash discóide clássico, LE hipertrófico/verrucoso, paniculite lúpica, LE pérmio, LE mucoso, LE túmido, overlap de LE discóide/líquen plano;	13. ANTI-DNA POSITIVO (> 2X acima do VR)
3. ÚLCERAS ORAIS: palato, boca e língua; ou úlceras nasais (sem outras causas como vasculite, Doença de Behcet, infecção herpética, Doença inflamatória intestinal, artrite reativa);	14. ANTI-SM POSITIVO
4. ALOPECIA NÃO-CICATRICIAL: (sem outras causas como medicações, alopecia areata, deficiência de ferro e alopecia androgênica);	15. ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPÍDEOS POSITIVOS
5. SINOVITE: envolvendo ≥ 2 articulações, com edema ou derrame articular (ou artralgia em duas ou mais articulações, e rigidez matinal ≥ 30 minutos);	16. COMPLEMENTO REDUZIDO (C3, C4, CH50)
6. SEROSITE: pleurisia típica por ≥ 1 dia ou derrame pleural ou atrito pleural; dor pericárdica típica por ≥ 1 dia ou efusão pericárdica ou atrito pericárdico ou ECG com sinais de pericardite (na ausência de outras causas como infecção, uremia e Síndrome de Dressler);	17. COOMBS DIRETO POSITIVO (na ausência de anemia hemolítica)
7. RENAL: Rel Alb/Cr (ou proteinúria de 24h) representando $\geq 500\text{mg}/24\text{h}$, ou cilindros hemáticos;	
8. NEUROLÓGICO: convulsão, psicose, mielite; mononeurite multiplex / neuropatia cranial ou periférica / estado confusional agudo (na ausência de outras causas conhecidas);	
9. ANEMIA HEMOLÍTICA	
10. LEUCOPENIA $<4.000/\text{MM}^3$ OU LINFOPENIA $<1.000/\text{MM}^3$: pelo menos uma vez, na ausência de outra causa conhecida;	
11. TROMBOCITOPENIA $<100.000/\text{MM}^3$: na ausência de outra causa conhecida;	

ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica

**DECLARAÇÃO**

Declaro que o projeto de pesquisa nº **4425 – 14** intitulado “**Avaliação de polimorfismo genéticos da lectina ligadora de manose e marcadores imunológicos em pacientes com glomerulopatia mebranosa.**” apresentado pelo (a) pesquisador (a) **Denise Maria do Nascimento Costa** foi APROVADO pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em 14 de outubro de 2014.

Recife, 15 de outubro de 2014



Dr. José Eulálio Cabral Filho

Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira