

## Podocitúria na doença de Fabry

Podocyturia in Fabry disease

### Autores

Ester Miranda Pereira<sup>1</sup>

Adalberto Socorro da Silva<sup>1</sup>

Anatália Labilloy<sup>1</sup>

José Tiburcio do Monte Neto<sup>1</sup>

Semiramis Jamil Hadad do Monte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Piauí.

### RESUMO

**Introdução:** A doença de Fabry (DF) é uma desordem lisossômica ligada ao cromossomo X ocasionada por mutações no gene que codifica a enzima lisossômica  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -GAL). A redução ou ausência da atividade dessa enzima leva ao acúmulo progressivo de gb3. A doença renal é uma importante consequência clínica da acumulação de Gb3. Podócito é o tipo celular mais afetado na doença renal, que mostra apenas uma resposta parcial à Terapia de Reposição Enzimática. Além disso, a disfunção podocitária é a principal contribuinte para a perda progressiva da função renal e pode ser encontrada alterada mesmo antes do início da microalbuminúria. Assim, a podocitúria na DF pode ser uma ferramenta importante para prever a doença renal. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi quantificar a excreção urinária de podócitos em pacientes com DF (V269M, n = 14) e controles saudáveis (n = 40), e relacioná-las com as variáveis sexo, idade, tempo de terapia e a razão albumina: creatinina (AUC). **Métodos:** Podócitos urinários foram identificados utilizando imunofluorescência para podocalixina e DAPI. O número de células podocalixina positivo foi contado e o número médio foi utilizado (faixa normal 0-0.6 podócitos/mL). **Resultados:** O número médio de podócitos na urina de pacientes com DF foi significativamente maior do que os controles saudáveis ( $p < 0.0001$ ). Observou-se uma correlação positiva entre podocitúria e AUC ( $p = 0.004$ ;  $r^2 = 0.6417$ ). **Conclusão:** A podocitúria pode ser uma ferramenta adicional para avaliar a progressão da doença renal em pacientes que se espera que tenha um fenótipo mais agressivo.

**Palavras-chave:** doença de fabry; podócitos; técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

### ABSTRACT

**Introduction:** Fabry disease is a lysosomal storage disorder due to abnormalities in the GLA gene (Xq22). Such changes result in the reduction/absence of activity of the lysosome enzyme  $\alpha$ -GAL, whose function is to metabolize globotriaosylceramide (Gb3). Renal disease is a major clinical outcome of the accumulation of Gb3. Podocyte injury is thought to be a major contributor to the progressive loss of the renal function and may be found altered even before the onset of microalbuminuria. **Objective:** The aim of this study was to quantify the urinary excretion of podocytes in Fabry disease patients (V269M, n = 14) and healthy controls (n = 40), and to correlate podocyturia with the variables gender, age, time of therapy and albumin: creatinine ratio (ACR). **Methods:** Urinary podocytes were stained using immunofluorescence to podocalyxin and DAPI. The number of podocalyxin-positive cells was quantified and the average number was taken (normal range 0-0.6 podocytes/mL). **Results:** The average number of podocytes in the urine of Fabry disease patients was significantly higher than in healthy controls ( $p < 0.0001$ ). We observed a positive correlation between podocyturia and ACR ( $p = 0.004$ ;  $r^2 = 0.6417$ ). We found no correlation between podocyturia and gender, age or duration of therapy. **Conclusion:** Podocyturia is an important parameter in the assessment of renal disease in general, and it may serve as an additional early tool for monitoring Fabry disease nephropathy even before changes in ACR are seen. This may prove to be a useful tool to assess disease progression in patients expected to have a more aggressive phenotype.

**Keywords:** fabry disease; fluorescent antibody technique, indirect; podocytes.

Data de submissão: 24/06/2015.

Data de aprovação: 27/10/2015.

### Correspondência para:

Ester Miranda Pereira.  
Laboratório de Imunogenética  
e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Piauí.  
Avenida Universitária - lado  
ímpar, Teresina, PI, Brasil.  
CEP: 64049-550.  
E-mail: estermperreira@ufpi.edu.br

DOI: 10.5935/0101-2800.20160008

## INTRODUÇÃO

A doença de Fabry é um distúrbio do armazenamento lisossômico causado por anomalias no gene GLA,<sup>1,2</sup> ligado ao cromossomo X em seres humanos (Xq22).<sup>3,4</sup> Tais alterações resultam em redução ou ausência de atividade da hidrolase  $\alpha$ -galactosidase A ( $\alpha$ -gal A) ou incapacidade da  $\alpha$ -gal A de penetrar o lisossomo.<sup>5</sup> Esta enzima metaboliza glicoesfingolípídeos neutros com resíduos de D-galactosil, principalmente a globotriaosilceramida (Gb3), o principal lípídeo acumulado na doença de Fabry.<sup>6</sup>

O acúmulo intracelular progressivo de glicoesfingolípídeos resulta em múltiplas disfunções de órgãos. A nefropatia de Fabry é uma das consequências clínicas mais graves deste acúmulo.<sup>7,8</sup> Os podócitos são o tipo celular renal mais afetado, e apresentam resposta sub-ótima a terapia de reposição enzimática (TRE).<sup>9</sup> Apesar da história natural e dos achados histopatológicos da nefropatia de Fabry terem sido amplamente descritos nas últimas décadas, curiosamente o mecanismo exato que liga o insulto bioquímico inicial e a insuficiência renal ainda carece de maiores explicações.

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas que desempenham um papel fundamental na barreira de filtração glomerular. Lesões podocitárias levam a perda da integridade da barreira e progressão para doença renal crônica.<sup>10</sup> Foi demonstrado que a fusão dos pedicelos precede microalbuminúria na doença de Fabry, em fenômeno aparentemente reversível quando ocorre a depuração precoce dos depósitos podocitários de Gb3.<sup>11</sup> Os podócitos podem se soltar dos glomérulos, movendo-se para o espaço urinário, passando pelos túbulos e chegando até a urina, produzindo um fenômeno conhecido como podocitúria. Com efeito, a perda de podócitos até níveis inferiores a um patamar promove glomeruloesclerose. Ichickwa e colegas especularam que tais lesões somente podem sofrer reversão completa se a correção do insulto inicial for realizada quando o dano atinge menos de 25% da população de podócitos.<sup>12</sup> Assim, a podocitopenia é preditor de diagnóstico de doenças renais glomerulares em humanos em cenários experimentais e clínicos.<sup>10</sup>

Podócitos podem ser recuperados da urina em quantidades mínimas em indivíduos hígidos, mas podem ser encontrados em maiores números como achado precoce de doenças glomerulares.<sup>13</sup> A

avaliação da podocitúria por métodos citológicos ou moleculares é uma valiosa avaliação não-invasiva e acessível da doença glomerular e de sua progressão.

A determinação da situação e grau de podocitúria na doença de Fabry pode ser uma valiosa ferramenta para prever doença renal em etapas nas quais a reversibilidade histológica e funcional ainda é uma realidade. Além disso, a perda de podócitos pela urina na DF pode ter utilidade no monitoramento da progressão da doença e da insuficiência renal e da resposta aos tratamentos padrão. O objetivo do presente estudo é quantificar a excreção urinária de podócitos em pacientes com DF (V269M, n = 14) e controles hígidos (n = 40) e correlacionar a podocitúria às variáveis gênero, idade, tempo de tratamento e relação albumina/creatinina (RAC).

## MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Institucional de Ética da Universidade Federal do Piauí (0404.0.045.000-10). Todos os pacientes assinaram termo de consentimento informado antes de sua inclusão no estudo. Os dados demográficos e clínicos foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes.

### PARTICIPANTES

Os participantes do estudo foram 14 pacientes diagnosticados com doença de Fabry em TRE (0,2 mg/Kg a cada duas semanas), todos de uma mesma família residente no estado do Piauí. Foi feito um heredograma dos pacientes com 610 membros da família, setenta e nove dos quais com diagnóstico molecular confirmado de DF (V269M). Cada indivíduo do heredograma foi analisado em função do caso-índice identificado em 2005 em Teresina - Piauí.

### PODOCITÚRIA

Amostras de urina jato médio foram colhidas em frascos esterilizados e processadas imediatamente. Para o processamento, cerca de 50 mL de urina foram transferidos para um tubo e centrifugados a 350 g por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso, lavado com HDF (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 5,5 mM glicose, 4 mM NaHCO<sub>3</sub> e EDTA 0,2% em dH<sub>2</sub>O) e centrifugado em lâminas de microscópio. As lâminas preparadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente e permeabilizadas com Triton X-100 0,2%

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 10 minutos. As amostras foram então bloqueadas por uma hora em solução contendo BSA 0,2%, 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  soro de cabra a 1% em PBS. A seguir, as amostras foram incubadas com anticorpo primário Mouse anti-Podocalyxin (Invitrogen) por uma hora e com anticorpo secundário Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Mouse IgG (Invitrogen) por 45 minutos. Todos os passos foram executados em temperatura ambiente. DAPI foi utilizado para corar ácidos nucleicos. As lâminas foram observadas por microscopia de fluorescência. Dois profissionais da saúde independentes avaliaram cada amostra, e o valor médio das duas medições foi adotado. Podocitúria foi definida em termos do número de células positivas para podocalixina por lâmina por mL de urina.

#### RELAÇÃO ALBUMINA/CREATININA (RAC)

As concentrações de albumina e creatinina nas amostras de urina foram determinadas com os produtos LabTestAlbumin Kit e LabTestCreatinine Kit (Minas Gerais, Brasil), respectivamente, segundo o protocolo especificado pelo fabricante. A RAC da urina foi calculada a partir das concentrações urinárias de albumina e creatinina, com valores expressos em mg/g.

#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software IBM SPSS Statistics v.21. O teste de t foi utilizado para avaliar as diferenças nas medianas, considerando nível de significância de  $p < 0,05$ . O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para subsidiar a análise das correlações lineares entre as variáveis.

#### RESULTADOS

Os dados demográficos dos pacientes encontram-se na Tabela 1. Catorze indivíduos (sete homens e sete mulheres) com a mutação V269M no exon 6 do gene GLA foram incluídos no estudo. Suas idades variaram entre 8-74 anos, e a duração do tratamento com agalsidase alfa varou entre 1-24 meses. Também foi colhida a urina de 40 indivíduos hígidos sem histórico de doença renal, que serviram como grupo de controle.

Os podócitos que se soltam no espaço urinário recuperados na urina podem ser visualizados e quantificados utilizando-se métodos citológicos combinados com coloração por imunofluorescência para as proteínas da superfície dos podócitos.<sup>14</sup> Como

observado em outras glomerulopatias,<sup>15-18</sup> houve perda significativa de podócitos pela urina ( $p = 0,0001$ ) nos pacientes com DF (Mediana  $\pm$  DP: 0,8193  $\pm$  0,1090), em comparação aos indivíduos do grupo de controle (Mediana  $\pm$  DP: 0,4450  $\pm$  0,03754) (Figura 1).

Além disso, o número de podócitos na urina apresentou correlação positiva ( $r^2 = 0,6417$ ) com a RAC urinária ( $p = 0,0006$ , IC 95% = 0,4703 a 0,9345) (Figura 2). No entanto, não foi identificada correlação com as variáveis idade e tempo de tratamento (Figura 3).

#### DISCUSSÃO

Os nefrologistas que tratam doença de Fabry enfrentam duas importantes questões: a primeira em relação ao momento ótimo para iniciar a TRE. Com efeito, não existe consenso clínico com relação a esta questão. Alguns iniciam o tratamento logo após o diagnóstico, enquanto outros preferem aguardar o aparecimento dos primeiros sintomas.<sup>19-22</sup> Uma vez que o padrão ouro para a investigação de nefropatia é a proteinúria, e a proteinúria é uma consequência da podocitopenia, percebemos que o teste de podocitúria poderia proporcionar um diagnóstico mais precoce.

No presente estudo, investigamos o grau de podocitúria em pacientes com DF com o fenótipo clássico. Nossos resultados sugerem que pacientes com DF de ambos os gêneros apresentam significativa excreção urinária de podócitos em comparação a indivíduos saudáveis. A determinação do status e grau de podocitúria na doença de Fabry pode ser um relevante preditor para doença durante os estágios em que a reversibilidade histológica e funcional ainda pode ser atingida.

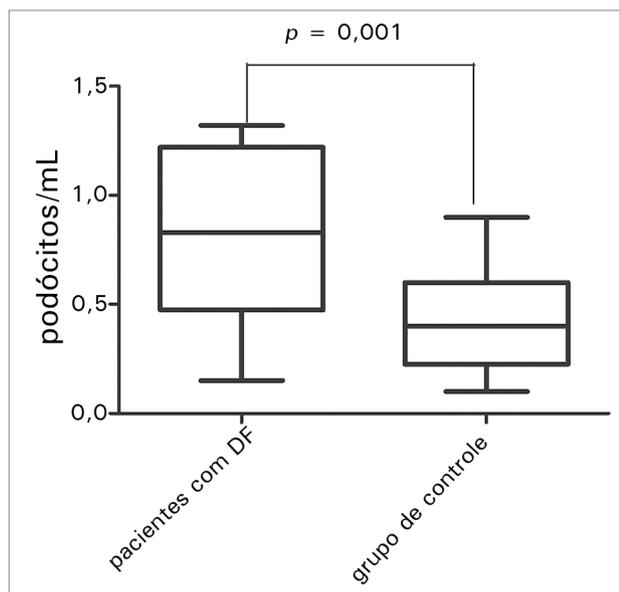
O presente estudo piloto demonstrou a viabilidade e a relevância clínica da avaliação da podocitúria em indivíduos com doença de Fabry. Contudo, este é um estudo transversal com um número limitado de pacientes, todos com o mesmo genótipo de doença. Futuros estudos longitudinais de seguimento são necessários, especialmente com a inclusão de uma população genotipicamente diversa de pacientes com doença de Fabry antes do desenvolvimento de proteinúria evidente. Tais estudos poderiam ser utilizados para melhor avaliar o valor preditivo da podocitúria em relação à progressão da doença e suas alterações histopatológicas, bem como a relação temporal de tais eventos com marcadores conhecidos de doença glomerular, no contexto da doença de Fabry.

**TABELA 1** INFORMAÇÃO CLÍNICA E DEMOGRÁFICA DE PACIENTES COM DOENÇA DE FABRY

Pacientes com DF	Idade	Gênero	Angioceratoma	Anormalidades no ECG	TFGe < 80 mL/min/1,73m <sup>2</sup>	Lesões Radiográficas
1	27	M	Não	Sim	Sim	Sim
2	33	F	Não	Sim	Sim	Sim
3	8	F	Não	Não	Não	Não
4	20	F	Não	Não	Não	Não
5	8	M	Não	Não	Não	Não
6	31	M	Não	Sim	Não	Não
7	23	F	Não	Não	Não	Não
8	53	F	Não	Não	Sim	Não
9	22	M	Não	Não	Não	Não
10	35	M	Não	Não	Não	Não
11	46	F	Sim	Sim	Sim	Não
12	74	M	Sim	Sim	Sim	Sim
13	37	F	Não	Não	Não	Sim
14	35	F	Não	Sim	Não	Não

DF: Doença de Fabry; M: Masculinos; F: Femininos; ECG: Ecocardiograma; TFGe: Taxa de Filtração Glomerular Estimada (calculada usando a fórmula CDK-EPI).

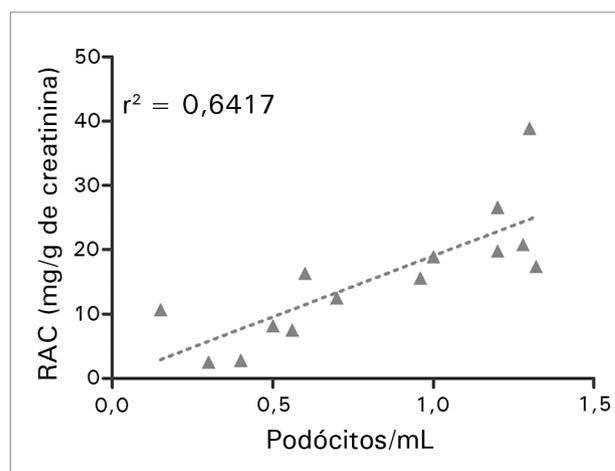
**Figura 1.** Pacientes com doença de Fabry perdem mais podócitos pela urina do que indivíduos hígidos. Uma amostra fresca de primeira urina (50-100 mL) foi utilizada. Os podócitos urinários foram corados por imunofluorescência para podocalixina e DAPI. O número de células positivas para podocalixina foi contado por dois profissionais da saúde e a média entre as contagens foi considerada no estudo.



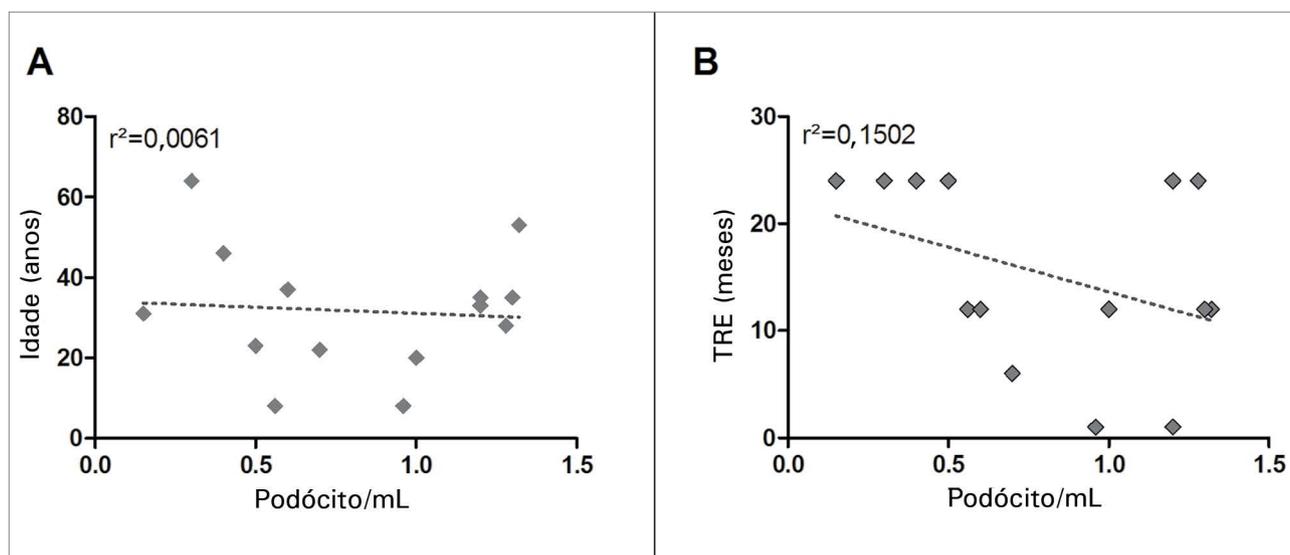
## CONCLUSÃO

Em resumo, a detecção urinária de podócitos livres por citologia e imunofluorescência é uma opção não invasiva para avaliar a disfunção glomerular e podocitária. Em uma coorte transversal de pacientes com doença de Fabry com fenótipo clássico, a perda de podócitos pela urina foi significativamente mais acentuada do que em indivíduos hígidos, além de

**Figura 2.** A podocitúria apresentou correlação com a relação albumina-creatinina nos pacientes com doença de Fabry. Os podócitos foram identificados por imunofluorescência contra podocalixina em amostras de urina fresca dos pacientes com DF, e o número de células positivas foi quantificado (podócitos/mL). A linha pontilhada representa a regressão linear.



apresentar forte correlação com a RAC urinária dos pacientes. A determinação de podocitúria em pacientes com doença de Fabry com fenótipo clássico pode ser um valioso insumo na avaliação e predição de doença renal nestes pacientes, mesmo antes da observação de alterações na RAC urinária. No entanto, mais estudos prospectivos devem ser realizados para melhor examinar a relação temporal com marcadores conhecidos de doença glomerular e validar nossos achados em uma população maior de pacientes com nefropatia de Fabry em estágio inicial.



**Figura 3.** Não foi identificada correlação entre podocitúria e as variáveis idade e tempo de tratamento nos pacientes com doença de Fabry. Os podócitos foram identificados por imunofluorescência para podocalixina em amostras frescas de urina dos pacientes com DF, e o número de células positivas foi quantificado (podócitos/mL) e correlacionado com A) idade e B) terapia de reposição enzimática (TRE). A linha pontilhada representa a regressão linear.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos os pacientes e suas famílias, bem como os indivíduos saudáveis por sua participação no estudo. O presente estudo teve o apoio financeiro da Shire.

## REFERÊNCIAS

- Anderson W. A case of aneio-keratoma. *Br J Dermatol* 1898;10:113-7.
- Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa hemorrhagica Hebrae). *Arch Dermatol Syphilol* 1898;43:187-200. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01986897>
- Bishop DF, Kornreich R, Desnick RJ. Structural organization of the human alpha-galactosidase A gene: further evidence for the absence of a 3' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:3903-7. PMID: 2836863 DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.85.11.3903>
- Opitz JM, Stiles FC, Wise D, Race RR, Sanger R, Von Gemmingen GR, et al. The Genetics of Angiokeratoma Corporis Diffusum (Fabry's Disease) and Its Linkage Relations with the Xg Locus. *Am J Hum Genet* 1965;17:325-42. PMID: 17948499
- Duve C. Exploring cells with a centrifuge. *Science* 1975;189:186-94. PMID: 1138375 DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1138375>
- Sweeley C, Klionsky B. Fabry's disease: classification as a sphingolipidosis and partial characterization of a novel glycolipid. *J Biol Chem* 1963;238:3148-50. PMID: 14081947
- Fervenza FC, Torra R, Lager DJ. Fabry disease: an underrecognized cause of proteinuria. *Kidney Int* 2008;73:1193-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002677>
- Froissart M, Benistan K, Germain DP. Functional renal investigation in Fabry disease. *Presse Med* 2007;36:1S36-42.
- Fervenza FC, Torra R, Warnock DG. Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in the nephropathy of Fabry disease. *Biologics* 2008;2:823-43.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *2003*;83:253-307. PMID: 12506131
- Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, et al. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1797-802. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfq306>
- Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:205-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.mnh.0000165884.85803.e1>
- Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-8. PMID: 12631553 DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajprenal.00404.2002>
- Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:408-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2004070564>
- Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2001;89:342-7. PMID: 11598401 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000046097>
- Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schönlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:231-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.01470506>
- Kanno K, Kawachi H, Uchida Y, Hara M, Shimizu F, Uchiyama M. Urinary sediment podocalyxin in children with glomerular diseases. *Nephron Clin Pract* 2003;95:c91-9. PMID: 14646369 DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000074322>
- Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1379-83. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/15.9.1379>
- Politei J, Schenone AB, Cabrera G, Heguilen R, Szlago M. Fabry disease and enzyme replacement therapy in classic patients with same mutation: different formulations - different outcome? *Clin Genet* 2015 Mar 26. [Epub ahead of print]
- Sawai S. Fabry Disease: Pathogenesis, Clinical Symptoms, and Treatment with Enzyme Replacement Therapy. *Brain Nerve* 2015;67:1099-8.
- Sanchez-Niño MD, Carpio D, Sanz AB, Ruiz-Ortega M, Mezzano S, Ortiz A. Lyso-Gb3 activates Notch1 in human podocytes. *Hum Mol Genet* 2015;24:5720-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddv291>
- Liebau MC, Braun F, Höpker K, Weitbrecht C, Bartels V, Müller RU, et al. Dysregulated autophagy contributes to podocyte damage in Fabry's disease. *PLoS One* 2013;8:e63506. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063506>