



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

**MARCADORES DE NECROSE TUBULAR AGUDA E LESÃO
INFLAMATÓRIA GLOMERULAR NO SEDIMENTO URINÁRIO DE
PACIENTES COM SÍNDROME NEFRÓTICA**

Salvador – Brasil
2015

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**MARCADORES DE NECROSE TUBULAR AGUDA E LESÃO INFLAMATÓRIA
GLOMERULAR NO SEDIMENTO URINÁRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME
NEFRÓTICA**

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Co-orientadora: Maria Brandão Tavares

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil
2015

“MARCADORES DE NECROSE TUBULAR AGUDA E LESÃO INFLAMATÓRIA GLOMERULAR NO
SEDIMENTO URINÁRIO DE PACIENTES COM SÍNDROME NEFRÓTICA”

CAROLINE VILAS BOAS DE MELO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Paulo Benigno Pena Batista
Professor Adjunto
EBMSP



Dr. Paulo Novis Rocha
Professor Adjunto
UFBA/HUPES



Dr. Sérgio Marcos Arruda
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos pacientes que reservaram um tempo em meio à sua doença a fim de contribuir para esta gota no oceano da pesquisa diagnóstica de doenças renais.

AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, o maior Biólogo, Cientista e Professor, Aquele que me deu o dom da vida. Obrigada, Senhor Deus.

Ao meu orientador Dr. Washington, pela oportunidade de ser sua estudante e pela paciência e assistência empregada no decorrer desses dois anos de orientação.

Ao Dr. Lain Pontes, pela consultoria que ajudou a definir o tema a ser desenvolvido no meu mestrado.

À minha co-orientadora Maria Brandão, parceira de pesquisa, que esteve presente desde o início desta trajetória. Pelo apoio de sempre, muito obrigada.

Ao Dr. Geraldo Gileno, pela contribuição na análise eletroforética e por estar sempre disposto a passar conhecimento.

À toda a equipe de pesquisa em doença renal da Fiocruz-BA, em especial à estudante de iniciação científica Paula Neves, pelo suporte na coleta das amostras.

Ao médico patologista Carlos Alberto, pelo auxílio na análise citopatológica.

Aos departamentos de nefrologia dos hospitais Ana Nery, Robertos Santos e Santo Antônio pelo auxílio na captação de pacientes.

À Faculdade de Farmácia da UFBA, pela contribuição com a análise convencional.

Aos meus pais, Inês e Jailson, pela fé depositada em mim e por dividirem comigo a carga emocional de todos os momentos desta fase de vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Patologia e Biointervenção, pelas diversas vezes em que me ofereceram ajuda.

Aos amigos do Grupo WLCS, em especial à Micely Hermida, Joselli O'Hare, Isadora Lima e Valter Almeida, pela amizade e companheirismo.

Às minhas colegas de mestrado Bárbara, Bruna, Camila, Catiule e Jéssica, pela parceria nos seminários e aulas da pós-graduação.

Aos amigos Matheus, Marcelo, Suze e Hanna, pelos momentos de força e de diversão, tão necessários.

À Ana Maria Fiscina e ao pessoal da biblioteca do CPqGM, pela consultoria e revisão.

À Fundação Oswaldo Cruz, pela estrutura e pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Melo, Caroline Vilas Boas de. Marcadores de necrose tubular aguda e lesão inflamatória glomerular no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica. 57 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

Necrose tubular aguda (NTA) é a causa mais frequente de lesão renal aguda (LRA) em pacientes hospitalizados. Em pacientes com síndrome nefrótica (SNO), a NTA mimetiza, por vezes, quadro de glomerulonefrite rapidamente progressiva e requer instituição precoce de imunossuppressores. A análise do sedimento urinário é uma ferramenta não invasiva, de baixo custo e ampla disponibilidade. O achado de células epiteliais no sedimento urinário de pacientes com LRA foi associado ao diagnóstico de NTA. Entretanto, estudos em pacientes com SNO associada são escassos. Técnicas de diagnóstico utilizando sedimento urinário corado normalmente não são utilizadas nesses casos. Além do mais, o sedimento urinário é uma importante fonte de proteínas; estudos proteômicos do sedimento urinário revelaram importantes frações de proteínas não encontradas em sobrenadante, que pode ser usado como potencial biomarcador de LRA. Nosso objetivo é identificar alterações citológicas e proteicas no sedimento urinário que permitam o diagnóstico diferencial entre NTA ou lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF) em pacientes com SNO. Trata-se de um estudo de corte transversal, onde foram incluídos 32 pacientes: 5 pacientes normais (grupo controle), 10 com NTA, 9 sem NTA e 8 com glomerulonefrites exsudativas. As células do sedimento urinário foram contadas, citocentrifugadas, coradas em hematoxilina/eosina ou Papanicolaou e contadas diferencialmente como pequenas (<30µm de diâmetro), médias (30-48µm) e grandes (>48µm) ou classificadas por fenótipo (escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos). A média de creatinina sérica foi 1,6±1,2 mg/dL e mediana da proteinúria/24h foi 8279[3482–13662] mg. Os diagnósticos histológicos mais frequentes foram Lesão Mínima e Glomerulopatia Membranosa em pacientes sem glomerulonefrites exsudativas com ou sem NTA, e Nefrite Lúpica em pacientes com glomerulonefrites exsudativas. A análise morfométrica por tamanho de células mostrou menor proporção de células pequenas (P=0,05) e maior de células grandes (P=0,01) no grupo de pacientes normais comparado ao grupo de pacientes com NTA ou INF, enquanto na análise fenotípica a proporção de células escamosas é maior no grupo controle que os grupos com NTA (P=0,01) ou INF (P=0,01). O número de leucócitos foi maior em pacientes com INF (50%) que nos pacientes sem INF (13%, P=0,05). A eletroforese de amostras de 32 pacientes revela importante fração proteica em termos de quantidade e variabilidade no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica. Nossos dados sugerem que o achado de leucócitos pode ser um parâmetro para identificação diferencial de pacientes com lesões inflamatórias-proliferativas glomerulares e a eletroforese do sedimento urinário tem importante perfil de bandas para pesquisa de biomarcadores para o diagnóstico diferencial não invasivo e rápido de lesão renal aguda em pacientes com síndrome nefrótica.

Palavras-chave: Necrose tubular aguda; glomerulonefrite; sedimento urinário; lesão renal aguda.

Melo, Caroline Vilas Boas de. Markers of acute tubular necrosis and inflammatory glomerular lesion in urinary sediment of patients with nephrotic syndrome. 57 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Acute tubular necrosis (ATN) is the most frequent cause of acute kidney injury (AKI) in hospitalized patients. In patients with nephrotic syndrome (NS), acute tubular necrosis mimic, sometimes, rapidly progressive glomerulonephritis and requires premature institution of immunosuppressive treatment. The analysis of urinary sediment is a non-invasive tool, low cost and wide availability. The found of epithelial cells in the urinary sediment of patients with AKI was associated to ATN diagnosis. However, studies in patients with AKI in the set of NS are scarce. Diagnostics techniques using stained urinary sediment are not ordinarily used in these cases. Furthermore, urinary sediment is an important source of proteins; proteomic studies revealed important fractions of proteins not found in urinary supernatant that could be used as potential biomarkers for AKI. Our goal is identify cytological alterations and protein in urinary sediment which allow the differential diagnosis between ATN and inflammatory-proliferative glomerular lesion (INF) in patients with NS. This is a cross sectional study, in which 32 patients were included: 5 normal patients (control group), 10 with ATN, 9 without ATN and 8 with exudative glomerulonephritis. The cells of urinary sediment were counted, cytocentrifuged, stained of hematoxylin/eosin or Papanicolaou and differentially counted as small (<30µm of diameter), medium (30-48µm) and large (>48µm) or classified for phenotype (scamous, urothelial, tubular and leucocyte cells). The mean of serum creatinine was $1,6 \pm 1,2$ mg/dL and median of proteinuria/24h was 8279[3482–13662] mg. The most frequent diagnostics were Minimal Lesion and Membranous Glomerulopathy in patients with or without ATN and Lupus Nephritis in patients with exudative glomerulonephritis. The morphometric analysis for size of cells showed smaller proportion of small cells ($P=0,05$) and bigger of large cells ($P=0,01$) in group of normal patients compared to group of patients with ATN or INF, while in phenotypic analysis the proportion of scamous cells is larger in control group than in ATN ($P=0,01$) or INF ($P=0,01$) groups. The number of leucocytes was bigger in patients with INF (50%) compared with patiens without INF (13%, $P=0,05$). The electrophoretic analysis of 32 patients reveal important protein fraction in terms of quantity and variability in urinary sediment of NS patients. Our data suggests that leukocytes can be a parameter to identify patients with proliferative-inflammatory glomerular lesion and the electrophoresis of urinary sediment has important bands profile to proteomic research of biomarkers to differential diagnosis of acute kidney injury in patients with nephrotic syndrome.

Keywords: Acute tubular necrosis; glomerulonephritis; urinary sediment; acute kidney injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma de alocação de pacientes nos grupos de estudo.	32
Figura 2	Número de cilindros nos grupos sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF) e estratificados avaliando NTA presente (NTA) ou ausente (S/NTA) e lesão inflamatória glomerular presente (INF) ou ausente (S/INF).	36
Figura 3	Número de células epiteliais nos grupos sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF) e estratificados avaliando NTA presente (NTA) ou ausente (S/NTA) e lesão inflamatória-proliferativa presente (INF) ou ausente (S/INF).	36
Figura 4	Fotomicrografia de células do sedimento urinário em aumento de 200x corada em H/E (A e B) evidenciando células uroteliais (seta amarela) e células tubulares (seta preta) e de material fresco em aumento de 100x (C e D).	37
Figura 5	Histograma da distribuição de tamanho de células representadas em lâminas citológicas.	38
Figura 6	Fotomicrografia de células do sedimento urinário em aumento de 100x, corada em H/E representando células pequenas, médias e grandes.	38
Figura 7	Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA-S/INF), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA-S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF).	39
Figura 8	Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem NTA (S/NTA) e com NTA (NTA).	40
Figura 9	Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF).	40

Figura 10	Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA-S/INF), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA-S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF).	41
Figura 11	Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos sem NTA (S/NTA) e com NTA (NTA).	42
Figura 12	Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos Controle, sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF).	43
Figura 13	Fotomicrografia do sedimento urinário em aumento de 200x de paciente com NTA evidenciando estrutura de células tubulares em arquitetura de túbulo renal (seta).	43
Figura 14	Eletroforese do sedimento urinário de 2 pacientes normais (Controle), 2 pacientes sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/NTA-S/INF), 3 pacientes com NTA sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (NTA-S/INF) e 2 pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular.	44
Figura 15	Distribuição de bandas dos (Controle), 2 pacientes sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/NTA-S/INF), 3 pacientes com NTA sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (NTA-S/INF) e 2 pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes portadores de síndrome nefrótica submetidos à biópsia renal nos anos de 2013 e 2014.	33
Tabela 2.	Comparação das características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes do grupo controle (CTRL), grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA–S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA–S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.	33
Tabela 3.	Características histológicas dos pacientes submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.	34
Tabela 4.	Comparação das características histológicas dos pacientes do grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA–S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA–S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.	35
Tabela 5.	Comparação das características físico-químicas da urina dos pacientes do grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA–S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA–S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.	35
Tabela 6.	Presença de evidências de células renais no sedimento urinário resultantes de processos patológicos de necrose tubular aguda.	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHM	Alterações histológicas mínimas
AKIN	Acute Kidney Injury Network
CTRL	Grupo controle
G1	Grupo sem necrose tubular aguda e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular
G2	Grupo com necrose tubular aguda e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular
G3	Grupo com lesão inflamatória-proliferativa glomerular
GESF	Glomeruloesclerose segmentar e focal
GNM	Glomerulopatia membranosa
GNPD	Glomerulonefrite proliferativa difusa
GMRP	Glomerulonefrite rapidamente progressiva
H/E	Hematoxilina/eosina
INF	Grupo com lesão inflamatória-proliferativa glomerular
LM-GESF	Doença do espectro lesão mínima - glomeruloesclerose segmentar e focal
LRA	Lesão renal aguda
LTIC	Lesão túbulo-intersticial crônica
NL	Nefrite lúpica
NTA	Necrose tubular aguda
NTA-S/INF	Grupo com necrose tubular aguda e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular
RIFLE	Risk, Injury, Failure, Loss e Endstage
S/NTA-S/INF	Grupo sem necrose tubular aguda e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular
SNO	Síndrome nefrótica
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)	18
2.2 NECROSE TUBULAR AGUDA (NTA)	19
2.3 GLOMERULOPATIAS E LRA	21
2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR MÉTODOS ALTERNATIVOS	23
3. HIPÓTESE	26
4. OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GERAL	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
5. METODOLOGIA	27
5.1 PACIENTES	27
5.1.1 Critérios de inclusão	27
5.1.2 Critérios de exclusão	27
5.2 VARIÁVEIS ANALISADAS	28
5.3 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E ANÁLISE HISTOLÓGICA	28
5.4 ANÁLISE URINÁRIA	29
5.4.1 Convencional	26
5.4.2 Sedimento	29
5.4.3 Citológica	29
5.4.3.1 Classificação de células por tamanho	29
5.4.3.2 Classificação de células por fenótipo	30
5.4.4 Eletroforética	30
5.5 PROPOSTA DE ANÁLISE	30
5.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
6. RESULTADOS	32
6.1 PACIENTES	32
6.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES	32
6.3 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	34
6.4 ANÁLISE CONVENCIONAL	35
6.5 ANÁLISE DO SEDIMENTO	36

6.5.1 Cilindros.....	36
6.5.2 Células epiteliais.....	36
6.6 ANÁLISE CITOLÓGICA.....	37
6.6.1 Definição dos parâmetros para classificação de tamanho de células.....	38
6.6.2 Contagem diferencial por tamanho.....	39
6.6.3 Contagem diferencial por fenótipo.....	41
6.7 ANÁLISE ELETROFORÉTICA.....	44
7. DISCUSSÃO	45
8. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Lesão renal aguda (LRA) é definida como declínio abrupto da função renal e consequentes alterações no metabolismo hidroeletrolítico, ácido básico e elevação nos níveis séricos de creatinina, este último utilizado como critério diagnóstico da LRA (SINGRI; AHYA; LEVIN, 2003). LRA é comum em pacientes hospitalizados ocorrendo em 5 a 35% desses pacientes, e contribui para maior morbidade e mortalidade (LIANO; PASCUAL, 1996).

Etiologicamente, a LRA pode ser definida como pré-renal, quando há diminuição na perfusão renal sem lesão estrutural; pós-renal nos casos de obstrução do trato urinário; e intrínseca renal quando há lesão aos diversos compartimentos do rim (vasos, glomérulos e túbulos). A necrose tubular aguda (NTA), definida pela lesão ao tecido epitelial dos túbulos renais, é apontada como a causa mais frequente de LRA juntamente com a LRA pré-renal (LIANO; PASCUAL, 1996).

As doenças que acometem os glomérulos – glomerulopatias – são frequentes no Brasil e foram responsáveis por 17.629 internações no ano de 2014. A Região Nordeste liderou com 39% das internações, e nesta, o Estado da Bahia se destaca em primeiro lugar dos casos (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>). Esses dados revelam que as glomerulopatias são um importante problema de saúde pública em nosso Estado.

As glomerulopatias manifestam-se desde por alterações no sumário de urina (hematúria ou proteinúria) assintomáticas a quadros mais graves de síndrome nefrótica (SNO) ou síndrome nefrítica, nesta última não sendo infrequente a presença de LRA. SNO caracteriza-se por proteinúria maciça, edema, dislipidemia e hipoalbuminemia e é a principal manifestação em pacientes com glomerulopatias submetidos à biópsia renal no Brasil e no mundo (POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010). Os diagnósticos mais comuns nestes pacientes são a doença por lesão mínima, glomeruloesclerose segmentar e focal e glomerulopatia membranosa, doenças nas quais as alterações morfológicas glomerulares não parecem justificar a ocorrência de LRA. Entretanto, a SNO tem sido associada à LRA há anos (CHAMBERLAIN; PRINGLE; WRONG, 1966), e em casos graves pode requerer terapêutica substitutiva (RAIJ et al., 1976). A LRA em pacientes com SNO foi

associada predominantemente à lesão ao epitélio tubular (NTA) em estudo prévio (TAVARES et al., 2012). Pode, por vezes, mimetizar uma glomerulonefrite rapidamente progressiva (RODAMILANS et al., 2010). O diagnóstico diferencial rápido entre essas condições é necessário para as intervenções terapêuticas adequadas, que são distintas entre NTA e glomerulonefrite rapidamente progressiva. A glomerulonefrite rapidamente progressiva requer tratamento precoce com imunossuppressores para evitar a progressão para doença renal crônica, enquanto na NTA, o tratamento é de suporte e a imunossupressão é desnecessária. Atualmente, o diagnóstico diferencial é feito por meio da biópsia renal, procedimento invasivo (BRACHEMI; BOLLÉE, 2014), de alto custo que não está amplamente disponível no sistema de saúde público no Brasil.

De forma contrária à biópsia renal, a análise do sedimento urinário é um procedimento não invasivo, de baixo custo, de simplicidade técnica e que requer apenas equipamentos comuns disponíveis nos laboratórios de hospitais e clínicas. Estudos prévios associaram a presença de células epiteliais tubulares renais e cilindros granulosos à presença de NTA (TSAI et al., 2005), enquanto a presença de hemácias com morfologia alterada pode estar associada às doenças glomerulares exsudativas ou crescênticas (CARMO et al., 2007). Perazella e colaboradores (2008) atribuíram escore aos elementos encontrados no sedimento urinário como marcador diagnóstico diferencial entre LRA pré-renal e NTA. Os autores notaram que aumento do número de células epiteliais tubulares e cilindros granulosos estão associados à presença de NTA. Em estudo posterior, Perazella e colaboradores (2010) demonstraram que o escore de sedimento urinário foi preditivo ao agravamento do quadro de pacientes que não tiveram o diagnóstico esclarecido, e que o maior grau de escore refletindo a morte celular pode ser associado a formas mais graves de LRA. Entretanto, o escore não foi validado em pacientes com doenças glomerulares.

Diante das limitações apresentadas pelos atuais recursos para diagnóstico da NTA, novos marcadores biológicos têm sido propostos (VAIDYA et al., 2008). A análise proteômica da urina vem sendo amplamente utilizada na busca por novos marcadores para LRA. Porém, os estudos proteômicos na busca de biomarcadores tem sido realizados, em sua grande maioria, a partir da fase solúvel da urina. Pesquisadores compararam as frações de proteínas excretadas na fase solúvel e sedimento da urina e constataram que aproximadamente 50% das proteínas estão no sedimento (ZHOU et al., 2006). Em estudo recente, foram identificadas 60 proteínas

no sedimento urinário, dentre as quais 16 não haviam sido encontradas em sobrenadante (MATAIJA-BOTELHO et al., 2009). Dessa forma, o estudo do sedimento urinário pode ser útil na identificação de novos marcadores biológicos para diagnóstico diferencial entre NTA somente e glomerulonefrites exsudativas.

Neste estudo nos propomos a avaliar o sedimento urinário do ponto de vista citológico e do perfil eletroforético de proteínas excretadas na urina de pacientes com SNO, com o objetivo de distinguir NTA de lesão inflamatória-proliferativa glomerular. Compararemos os resultados obtidos em pacientes com NTA somente com o de pacientes apresentando glomerulopatias exsudativas que justifiquem o quadro de insuficiência renal. Nossa hipótese é de que o sedimento urinário contém elementos que permitam o desenvolvimento de testes rápidos e não invasivos para o diagnóstico diferencial dessas duas condições, pelo qual o estudo citológico combinado à avaliação do perfil de proteínas poderá ajudar no diagnóstico precoce e não invasivo dessas condições.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LESÃO RENAL AGUDA (LRA)

Na Lesão Renal Aguda (LRA) há redução abrupta do funcionamento renal, que pode ocorrer em horas ou dias, resultando em alterações na homeostase hidroeletrólítica, metabolismo ácido básico e elevação nos níveis séricos de creatinina e, por vezes, diminuição do débito urinário (SINGRI; AHYA; LEVIN, 2003; BELLOMO et al., 2004). LRA pode apresentar configuração suficientemente grave que pode evoluir para doença renal crônica necessitando de tratamento dialítico ou terapia de substituição renal. Entretanto, se diagnosticada precocemente e tratada adequadamente, a função renal pode ser recuperada (LAMEIRE et al., 2013).

LRA pode ocorrer por acometimento de regiões do sistema renal que antecedem aos rins, caracterizando uma LRA pré-renal, no qual não há lesão aos diversos compartimentos dos rins e está associada à diminuição da perfusão sanguínea, causada usualmente por hipovolemia, diminuição do débito cardíaco, ação de drogas, vasodilatação periférica e vasoconstrição renal. LRA pode ser causada ainda, embora menos frequente, por disfunções em sistemas posteriores aos rins, como exemplo a obstrução do sistema coletor de urina por cálculos ou neoplasias, caracterizando LRA pós-renal. Quando lesões ocorrem no parênquima renal, acometendo glomérulos, túbulos, interstício e vasos sanguíneos, a LRA é caracterizada como intrínseca renal (LAMEIRE et al., 2013).

As causas mais frequentes de LRA em pacientes hospitalizados são associadas a lesões pré-renais secundárias à desidratação na maioria dos casos ou por lesão intrínseca renal, na qual a necrose tubular aguda (NTA) é apontada como a causa principal, sendo responsável por 85% dos casos (THADHANI; PASCUAL; BONVENTRE, 1996) e os números de internações têm aumentado. Houve um aumento de um ponto percentual nos casos de internamento por lesão renal, aguda ou crônica, entre 2013 e 2014 na região nordeste do Brasil. A letalidade por LRA é alta, principalmente entre os casos que necessitam de tratamento por diálise, variando entre 37% e 88% em estudo realizado em pacientes em terapia intensiva (SCHWILK et al., 1997).

LRA é uma doença assintomática até que a perda da função renal seja significativa. Por não apresentar manifestações clínicas específicas o diagnóstico de

LRA é realizado mais comumente em contexto de outra doença aguda (BELLOMO et al., 2004). A LRA acarreta um acúmulo de compostos nitrogenados no sangue como ureia e creatinina. Ambos são marcadores comumente avaliados por testes laboratoriais para fins diagnósticos de LRA. O critério diagnóstico de LRA amplamente utilizado é avaliação de creatinina sérica, considerando função renal comprometida quando elevada a partir do valor basal em 1,5 em homens e 1,2 em mulheres e crianças (TAVARES, M.B., 2011). Entretanto, a creatinina é um marcador tardio, necessitando haver acentuada redução da taxa de filtração glomerular para que seu nível sérico seja elevado, e não é capaz de identificar a etiologia da LRA (BASTOS, M.G., 2011). A variação nos métodos diagnósticos e a particularidade de cada caso tem como consequência uma limitação na compreensão da epidemiologia e fisiopatologia da LRA. Recentemente, foram propostos novos critérios diagnósticos para LRA (RIFLE – Risk, Injury, Failure, Loss e Endstage – e AKIN – Acute Kidney Injury Network) (BELLOMO et al., 2004; MEHTA et al., 2007) que têm sido amplamente citados na literatura. Entretanto, esses critérios levam em consideração a elevação da creatinina sérica e os dados de valor basal nem sempre estão disponíveis no prontuário do paciente, levando a um impasse na prática clínica de diagnóstico de LRA.

LRA é um fator de risco de mortalidade em pacientes hospitalizados, além de se associar ao aumento no tempo de internamento e custo hospitalar. Desta forma, estudos têm sido realizados para melhor compreensão da etiologia da LRA, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de medidas de análise de fatores preditivos e marcadores biológicos sensíveis para diagnóstico precoce da LRA.

2.2 NECROSE TUBULAR AGUDA (NTA)

Necrose Tubular Aguda (NTA) é a principal causa de LRA em pacientes hospitalizados, sendo responsável por 85% dos casos de LRA intrínseca renal (THADHANI; PASCUAL; BONVENTRE, 1996).

NTA é definida pela morte das células epiteliais dos túbulos renais, e é frequentemente utilizada como sinônimo de LRA. As lesões nefrotóxicas e isquêmicas são as principais causas de NTA, e em ambiente hospitalar, é frequentemente associada a uma causa multifatorial (LAMEIRE; VANHOLDER, 2001). Um estudo recente demonstrou que, independentemente das comorbidades, pacientes com NTA

isquêmica ou multifatorial tem maior taxa de mortalidade que NTA nefrotóxica (SANTOS et al., 2006).

A fisiopatologia da NTA é similar independente da etiologia. A lesão isquêmica diminui o aporte de oxigênio para as células tubulares, que necrosam e se desprendem do epitélio obstruindo o lúmen, e por sua vez a taxa de filtração glomerular (TFG) diminui pela ação de fluxo retrógrado consequente à obstrução luminal (LAMEIRE et al., 2013). Evidências mostram que as células dos túbulos renais são mais suscetíveis à lesão quando o rim sofre hipoperfusão, e estudos sugerem que a associação de nefrotoxicidade e lesão isquêmica agravam o quadro, aumentando a probabilidade de NTA (BREZIS; ROSEN, 1995), caracterizando uma condição multifatorial.

Histopatologicamente, a NTA ocorre principalmente por lesões aos túbulos, porém, em menor proporção, alterações em glomérulos e interstício também podem ser observadas (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1991). Em túbulos, as principais alterações ocorrem por dilatação tubular, necrose individual de células, presença de células no lúmen tubular, perda da borda em escova, adelgaçamento do epitélio tubular, presença de cilindros na luz dos túbulos e evidência de regeneração epitelial como presença de figuras mitóticas e hiperchromatismo celular (JENNETTE et al., 2007). Em pacientes com falha renal, a necrose individual de células de maneira não uniformizada e a perda da borda em escova de forma difusa foram achados histológicos mais incidentes que em pacientes em recuperação (SOLEZ; MOREL-MAROGER; SRAER, 1979). As células delineando a cápsula de Bowman são frequentemente proeminentes e em alto número, porém apesar de ser uma alteração comum, não é de todo específica. O interstício pode exibir edema com separação tubular ou com epitélio basofílico delineando túbulos dilatados (ROBBINS; COTRAN; KUMAR, 1991). Quando essas alterações ocorrem em mais que 10% da cortical representada, podem refletir em redução na taxa de filtração glomerular, com uma especificidade de 96% (TAVARES, M.B., 2011).

Entretanto, achados histológicos em biópsias renais de pacientes com ambas as etiologias citadas demonstram que não há obstrução por células necróticas em todos os túbulos, não justificando a elevada diminuição da TFG em pacientes com LRA (SOLEZ; MOREL-MAROGER; SRAER, 1979). Outros fatores implicados na fisiopatologia da NTA são a liberação de vasoconstritores e redução na produção de vasodilatadores no rim, inflamação e acúmulo de leucócitos na vasa recta que podem

contribuir para perpetuar a lesão isquêmica, contribuindo para a diminuição da TFG, desproporcional ao aspecto histológico. Entretanto, em pacientes com doença glomerular associada, Tavares e colaboradores (2008) demonstraram que a intensidade de NTA se correlaciona com insuficiência renal.

LRA associada à NTA é uma lesão reversível, pois ocorre regeneração do epitélio tubular e restituição da função renal mesmo sem um tratamento específico até o momento. Estudos recentes demonstram maior risco de desenvolvimento de doença renal crônica em pacientes que tiveram episódio de LRA (COCA; SINGANAMALA; PARIKH, 2012). Portanto, estudos que colaborem com o entendimento da fisiopatologia ou diagnóstico precoce dessa condição podem contribuir para descoberta de intervenções terapêuticas visando reduzir a gravidade da LRA assim como progressão para doença renal crônica.

2.3 GLOMERULOPATIAS E LRA

As doenças glomerulares são a terceira causa de doença renal crônica (DRC) em pacientes em terapia de diálise no Brasil (SESSO et al., 2008), e foram responsáveis por 17.629 internações, excluindo os casos de LRA e DRC no ano de 2014 (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>). A morbidade foi maior na região nordeste, na qual o estado da Bahia contou com a maioria dos casos, representando 10% do total de internações para o referido ano (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>).

As glomerulopatias são lesões estruturais glomerulares podendo se manifestar por alterações assintomáticas, detectada quando o sumário de urina apresenta proteinúria e/ou hematuria, ou quadros sintomáticos mais graves como síndrome nefrótica (quando há proteinúria maciça, edema, hipoalbuminemia e dislipidemia) ou síndrome nefrítica (caracterizada por LRA, hipertensão e hematuria) (FALK; NACHMAN, 2012).

Doenças glomerulares podem ser classificadas como primárias, quando tem origem nos rins e afetam apenas esses órgãos, ou secundárias, quando os glomérulos são afetados em consequência de outras doenças, como doenças infecciosas, neoplasias ou doenças autoimunes. A glomerulopatia primária mais frequente é nefropatia por IgA nos Estados Unidos e em alguns países da Europa e Ásia (PESCE;

SCHENA, 2010), e a principal no Brasil é a glomeruloesclerose segmentar e focal (POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010; TAVARES et al., 2012).

As glomerulopatias podem ou não apresentar sintomas. Entre estes, manifestam-se desde alterações leves no sumário de urina, como hematúria persistente ou recorrente e proteinúria isolada, a quadros mais graves onde podem desenvolver síndrome nefrótica (SNO) ou síndrome nefrítica, sendo que nesta caracteristicamente ocorre LRA (FALK; NACHMAN, 2012) e é necessária instituição de tratamento imunossupressor precocemente em muitos casos, a fim de evitar evolução para DRC, ao contrário da LRA associada à NTA isolada para a qual não há tratamento específico.

SNO ocorre por lesão ao podócito, que é a célula epitelial visceral glomerular, e pela alteração na permeabilidade glomerular, com maior perda de albumina e menor de outras proteínas solúveis (HULL; GOLDSMITH, 2008). SNO caracteriza-se por proteinúria maciça, maior que 3g/24h, edema, dislipidemia e hipoalbuminemia, e é a principal manifestação das glomerulopatias primárias e secundárias diagnosticadas no Brasil e no mundo (POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010), configurando maior risco de progressão para DRC quando presente (DONADIO et al., 1988)(RYDEL et al., 1995). Complicações decorrentes da SNO incluem aumento do risco de tromboembolismo e suscetibilidade a infecções devido à baixa concentração de IgG e prejuízo à função de células T (OGI et al., 1994), ascite, derrame pericárdico ou pleural e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (KODNER, 2009).

As glomerulopatias mais comumente associadas à SNO se apresentam histologicamente como Doença por Lesão Mínima (LM), Glomeruloesclerose Segmentar e Focal (GESF) e Glomerulopatia Membranosa (GNM), caracterizadas como glomerulopatias primárias que normalmente não causam LRA. Apesar disso, a SNO foi associada à LRA na década de 60 quando foram publicados 9 casos de LRA com quadro de síndrome nefrótica e diagnósticos histológicos de GNM, glomerulonefrite proliferativa e alterações histológicas mínimas (AHM) (CHAMBERLAIN; PRINGLE; WRONG, 1966). Estudos mais recentes têm feito relatos similares. Há relato de caso de LRA em paciente com NTA e síndrome nefrótica secundária à GESF (POLAINA RUSILLO et al., 2008). LRA pode ocorrer em pacientes com SNO por diurese excessiva, uso de antiinflamatórios não-esteróides, sepse ou trombose de veia renal (HULL; GOLDSMITH, 2008). Apesar disto, a associação de

SNO com doença glomerular não justifica por si só a evolução para uma lesão aguda, exceto nas doenças glomerulares proliferativas ou crescênticas.

Tavares e colaboradores (2012) associaram LRA em pacientes com SNO à NTA, no qual foi observado que o grau de NTA estava relacionado a uma maior frequência de insuficiência renal em pacientes com doença glomerular. Este quadro, por vezes, pode apresentar configuração clínica que mimetiza glomerulopatias que cursam com síndrome nefrítica, como a glomerulonefrite rapidamente progressiva (GNRP) (RODAMILANS et al., 2010). A abordagem terapêutica é diversa nas duas condições, sendo necessário um diagnóstico rápido e conclusivo. A GNRP exige intervenção terapêutica imunossupressora precoce a fim de evitar a progressão para DRC, enquanto na NTA a medida terapêutica é substancialmente de suporte, e a imunossupressão é desnecessária. Marcadores não invasivos que auxiliem no diagnóstico diferencial dessas condições serão úteis para instituição de terapêutica adequada e eficaz.

2.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL POR MÉTODOS ALTERNATIVOS

Diante das limitações para o padrão utilizado para o diagnóstico diferencial da causa da LRA, métodos não invasivos têm sido estudados de forma a diminuir o tempo do diagnóstico e evitar as demais complicações associadas à biópsia renal como sangramentos e hematomas.

A análise urinária ou urinálise investiga, a partir de uma amostra de urina, marcadores químicos e moleculares que excretados em níveis incomuns, podem ser marcadores etiológicos da doença. Neste procedimento, a análise do sedimento urinário tem sido amplamente utilizada na rotina de clínicas e hospitais para diagnóstico de doenças renais. A urinálise possui a vantagem de ser um procedimento de baixo custo, amplamente disponível no sistema público de saúde no Brasil, com simplicidade na técnica e possibilidade de realização por uma ampla gama de profissionais da saúde.

Estudos prévios demonstraram que a presença de hemácias com morfologia alterada em sedimento de urina está associada às glomerulopatias exsudativas ou crescênticas (CARMO et al., 2007). Abreu, Requião-Moura e Sesso (2007) citam presença concomitante de cilindros hemáticos, dismorfismo eritrocitário e proteinúria >500mg/dl como os três parâmetros para identificação da etiologia do sangramento,

como glomerular ou não. Eritrócitos provenientes de lesão glomerular não apresentam morfologia uniforme, com biconvexidade da célula e tamanho bem preservados, pois mecanismos traumáticos ocorrem na passagem pela membrana basal glomerular e diferença osmótica ocorrida nos túbulos que alteram a morfologia e conferem aspecto deformado ao eritrócito (ABREU; REQUIÃO-MOURA; SESSO, 2007). Presença de 20% de dismorfismo eritrocitário e/ou 5% de acantócitos demonstraram sensibilidade de 96% e especificidade de 93% para o diagnóstico de lesão glomerular (STAPLETON, 1987). Dentre as principais causas de hematúria de origem glomerular, glomerulopatias primárias e secundárias, como GNRP, glomerulonefrite rapidamente progressiva, Nefropatia por IgA e secundárias a lúpus eritematoso sistêmico estão presentes (ABREU; REQUIÃO-MOURA; SESSO, 2007).

A presença de cilindros granulosos, células epiteliais do túbulo renal e cilindros de células epiteliais do túbulo renal em sedimento urinário foi associada à NTA (TSAI et al., 2005). Perazella e colaboradores (2008) atribuíram um sistema de escore à presença de células epiteliais do túbulo renal e cilindros granulosos, que foi altamente preditivo ao diagnóstico final de NTA. Em estudo refinado, foi demonstrado que o escore atribuído com base nesses elementos foi altamente preditivo para o agravamento do quadro clínico de pacientes que não tiveram diagnóstico esclarecido previamente, e que o maior grau de escore possui associação diretamente proporcional à gravidade de LRA, refletida pela maior taxa de necrose celular (PERAZELLA et al., 2010), entretanto, este sistema não foi avaliado em pacientes com doenças glomerulares associadas.

Diversos estudos tem proposto marcadores moleculares para diagnóstico de NTA (VAIDYA et al., 2008). O estudo proteômico da urina como alternativa para desenvolvimento de um método diagnóstico sensível e não invasivo tem sido amplamente utilizado na investigação de novos marcadores para identificar a etiologia da LRA. Entretanto, estes estudos são realizados em sua maioria a partir da fração solúvel da urina, e a fase de sedimento tem sido subestimada.

Em pesquisa realizada em pacientes saudáveis, foram comparadas as frações de proteína presentes na forma solúvel e de sedimento da urina, em que observou-se que aproximadamente 50% de proteínas da amostra total estava presente em fase de sedimento, sendo similares tanto em perfil como número de proteínas que na fase de sobrenadante (ZHOU et al., 2006). Um estudo proteômico em fase de sedimento e sobrenadante evidenciou que 60 diferentes proteínas foram sequenciadas em

sedimento urinário, onde 16 delas foram exclusivas à esta fração (MATAIJA-BOTELHO et al., 2009). Entretanto, estudos envolvendo pacientes com síndrome nefrótica são escassos e ainda não foram realizados em associação com NTA.

Portanto, a avaliação do sedimento urinário e caracterização das células presentes na urina de pacientes com síndrome nefrótica e LRA pode ser útil para diferenciar condições inflamatórias glomerulares de NTA, auxiliando na conduta terapêutica inicial até que o diagnóstico definitivo esteja disponível. Adicionalmente, o estudo do perfil de proteínas presentes no sedimento urinário desses pacientes poderá contribuir para identificação de marcadores biológicos não invasivos para diagnóstico da etiologia da LRA em pacientes com doença glomerular.

3. HIPÓTESE

O sedimento urinário contém elementos que permitam o desenvolvimento de testes rápidos e não invasivos para o diagnóstico diferencial entre pacientes com NTA ou lesão inflamatória-proliferativa glomerular associados à SNO, causando LRA.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações no sedimento urinário para diagnóstico diferencial entre necrose tubular aguda e lesão inflamatória-proliferativa glomerular em pacientes com síndrome nefrótica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Comparar as alterações citológicas do sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica e insuficiência renal, que tenham necrose tubular aguda apenas, ou que tenham lesões glomerulares inflamatórias-proliferativas agudas como substrato morfológico da disfunção renal:

- bioquímica convencional;
- microscopia do sedimento urinário;
- citologia do sedimento urinário.

4.2.2 Comparar o perfil eletroforético das proteínas excretadas na urina de pacientes com síndrome nefrótica e insuficiência renal que tenham ou necrose tubular aguda apenas, ou que tenham lesões glomerulares inflamatórias-proliferativas agudas como substrato morfológico da disfunção renal.

5. METODOLOGIA

5.1 PACIENTES

Este foi um estudo de corte transversal, prospectivo, no qual foram incluídos 27 pacientes com SNO submetidos à biópsia renal realizadas em hospitais de referência em nefrologia de Salvador, Bahia (Hospital Santo Antônio, Hospital Ana Nery e Hospital Geral Roberto Santos) e encaminhadas para o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA, onde foram processadas para fins diagnósticos. Neste estudo utilizamos os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

5.1.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com síndrome nefrótica, definida por proteinúria acima de 3,5g/24h;
- Biópsias renais com no mínimo 7 glomérulos representados e lesão fibrótica intersticial menor que 30% da cortical representada;
- Pacientes que consentiram com o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.1.2 Critérios de exclusão

- Pacientes com diabetes mellitus, mieloma múltiplo ou linfoma e doenças sanguíneas que apontam picos de proteínas monoclonais;
- Pacientes com rins transplantados;
- Pacientes com infecções agudas.

O número amostral foi definido tendo em perspectiva um poder de teste de 80% e nível de confiança bilateral de 95% a partir de estudo da frequência de focos de NTA em pacientes com glomerulopatias (77%) com e sem LRA no estado da Bahia (TAVARES et al., 2012). O cálculo foi realizado a partir da frequência de 7% de LRA em pacientes sem NTA (proporção de exposição entre controles) e de 67% de LRA em pacientes com NTA (proporção de exposição entre casos). O odd ratio calculado a partir dessa análise de frequência foi de 26.97% e a razão de controles por caso foi 1:1, subdividindo uma amostra de 9 pacientes por grupos de estudos:

Grupo 1: pacientes sem necrose tubular aguda e sem glomerulonefrites proliferativas ou exsudativas como substrato morfológico da disfunção renal (S/NTA-S/INF).

Grupo 2: pacientes com necrose tubular aguda e sem glomerulonefrites proliferativas ou exsudativas como substrato morfológico da disfunção renal (NTA-S/INF).

Grupo 3: pacientes com lesão glomerular inflamatória ou crescentes em qualquer número, com ou sem necrose tubular aguda (INF).

Adicionalmente, incluímos 5 voluntários sem qualquer alteração bioquímica indicativa de comprometimento renal (controle normal).

5.2 VARIÁVEIS ANALISADAS

As variáveis analisadas foram gênero, idade, níveis séricos de creatinina, colesterol e albumina, dosagem de proteína em urina de 24 horas, diagnóstico histológico, presença de hipertensão arterial sistêmica. Por exceção do aspecto histológico, os demais dados foram obtidos através da revisão do prontuário médico.

5.3 OBTENÇÃO DOS ESPÉCIMES E ANÁLISE HISTOLÓGICA

As biópsias colhidas foram divididas e submetidas aos seguintes procedimentos: (1) fixadas em líquido de Bouin ou formalina alcoólica ácida, para exame por microscopia óptica, (2) fixadas em glutaraldeído, para análise por microscopia eletrônica de transmissão e (3) mantidas em soro fisiológico gelado para estudo por imunofluorescência. Foram embebidas e incluídas em parafina, cortadas com 2 μ m de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. As seguintes alterações foram utilizadas como evidência (presença ou ausência) de necrose tubular: dilatação tubular, adelgaçamento do epitélio tubular, cilindros, edema intersticial, evidência de regeneração epitelial como hiper Cromatismo celular e mitoses. A intensidade de NTA foi estimada semiquantitativamente e considerada presente quando acometendo >10% da área cortical representada na biópsia renal (TAVARES, M.B. 2011).

5.4 ANÁLISE URINÁRIA

Aproximadamente 50 ml de urina foram coletados por meio de diurese espontânea, anteriormente à realização da biópsia.

5.4.1 Convencional

Onze parâmetros físico-químicos: bilirrubina, urobiligênio, corpos cetônicos, pH, ácido ascórbico, glicose, proteína, sangue, nitrito, leucócitos e densidade, realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (LACTFAR-UFBA).

5.4.2 Sedimento

Uma alíquota de 10 a 25 mL de urina foi transferida para um tubo de centrifuga graduado de 50 mL e centrifugada a 2000 $\times g$ por 10 minutos a 4°C (Tubo 1). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em aproximadamente 0,5 mL do sobrenadante remanescente no tubo. Utilizando micropipeta e ponteira, foram coletados 25 μ l da suspensão e colocados sobre a lâmina de vidro e cobertos com lamínula de vidro de 24x24mm². A presença e quantidade de cilindros granulosos foram mensuradas através do exame da lâmina em microscópio ótico comum em aumento de 100x e 400x.

5.4.3 Citológica

Após a análise convencional, foi adicionada solução HBSS (Ca^{+2}/Mg^{+2} + Gentamicina) ao tubo 1 até o volume final de 40 mL. A amostra foi centrifugada a 1600 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a ressuspensão do sedimento foi feita em 1 mL de solução fixadora de células PreservCytSolution (Hologic), posteriormente homogeneizado e 15 μ l foram dispensados em Câmara de Neubauer para contagem de células (totais e epiteliais). A concentração das células foi ajustada para 5-8x10⁵ células/mL para citocentrifugação. Então, 100 μ l de amostra foram citocentrifugados a 500 rpm por 5 minutos (cytospin), as lâminas secas ao ar livre foram fixadas em acetona a 4°C por 5 min e posteriormente coradas em Papanicolau ou H/E. As lâminas foram então analisadas para quantificação das populações celulares caracterizadas quanto ao número, tipo e tamanho, representadas em 10 fotografias aleatórias em aumento de 100x utilizando microscópio ótico comum e contadas semi-automaticamente utilizando-se o programa ImagePro-Plus 7.0 (MediaCybernetics).

5.4.3.1 Classificação das células por tamanho

Foi realizada medição em micrômetros de todas as células representadas em uma foto de 1 paciente de cada grupo. As frequências dos tamanhos das células foram distribuídas em um histograma. A partir da análise do histograma, foram definidos

pontos de corte extremos para considerar células de tamanho pequeno, médio ou grande.

5.4.3.2 Classificação das células por fenótipo

Foram observadas evidências de morte celular, fenótipo, tipos de junções celulares e populações distintas, para classificar as células em escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos.

5.4.4 Eletroforética

Uma alíquota de 10 a 25 mL de urina coletada nas condições descritas no início do subcapítulo 5.4 foi transferida para um tubo de centrifuga de 50 mL e centrifugada a 2000 xg por 10 minutos a 4°C (Tubo 2). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em tampão de lise celular contendo 50mM DTT, 2M thiourea, 8M urea e 1% CHAPS. Foi adicionado 150 µl de inibidor de protease (Complete mini tablets, Roche) e a amostra armazenada a -20°C. A dosagem de concentração de proteína foi realizada por meio de Ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976). Posteriormente, foi realizada eletroforese monodimensional (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida a 12% conforme protocolo previamente descrito em literatura (MATAIJA-BOTELHO et al., 2009). A quantidade da amostra utilizada foi padronizada para 1 mg/ml de proteína. As bandas foram reveladas por nitrato de prata utilizando kit de coloração (Silver Stain Plus, Bio-Rad). A imagem do gel foi digitalizada utilizando o programa para análise comparativa e quantitativa das bandas pelo programa semiautomatizado ImageQuant TL V8.1.

5.5 PROPOSTA DE ANÁLISE

Os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos expressos como valores absolutos ou relativos quando conveniente. O teste de normalidade D'Agostino & Pearson foi aplicado para definir se a análise obedece um perfil paramétrico ou não paramétrico. Os valores sumarizados como médias ou medianas (populações celulares, número de bandas no gel etc.) foram submetidos a teste t ou ANOVA, quando recomendado. Os pós-testes Bonferroni ou Dunn foram aplicados, quando recomendado. Análise apenas comparativa do perfil de distribuição de bandas

será apresentada de maneira descritiva com ilustração adequada por fotografias. O nível crítico para significância dos utilizado será $P < 0,05$.

5.6 Considerações éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pelo Parecer de número 184.419 pelo CEP do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM – FIOCRUZ/BA.

6. RESULTADOS

6.1 PACIENTES

Uma amostra de 55 pacientes foi analisada. Destes, 4 pacientes foram excluídos por não apresentarem o número mínimo de 7 glomérulos, e outros 19 foram excluídos por apresentarem lesão túbulo intersticial crônica (LTIC) comprometendo mais que 30% da cortical representada em biópsia (figura 1).

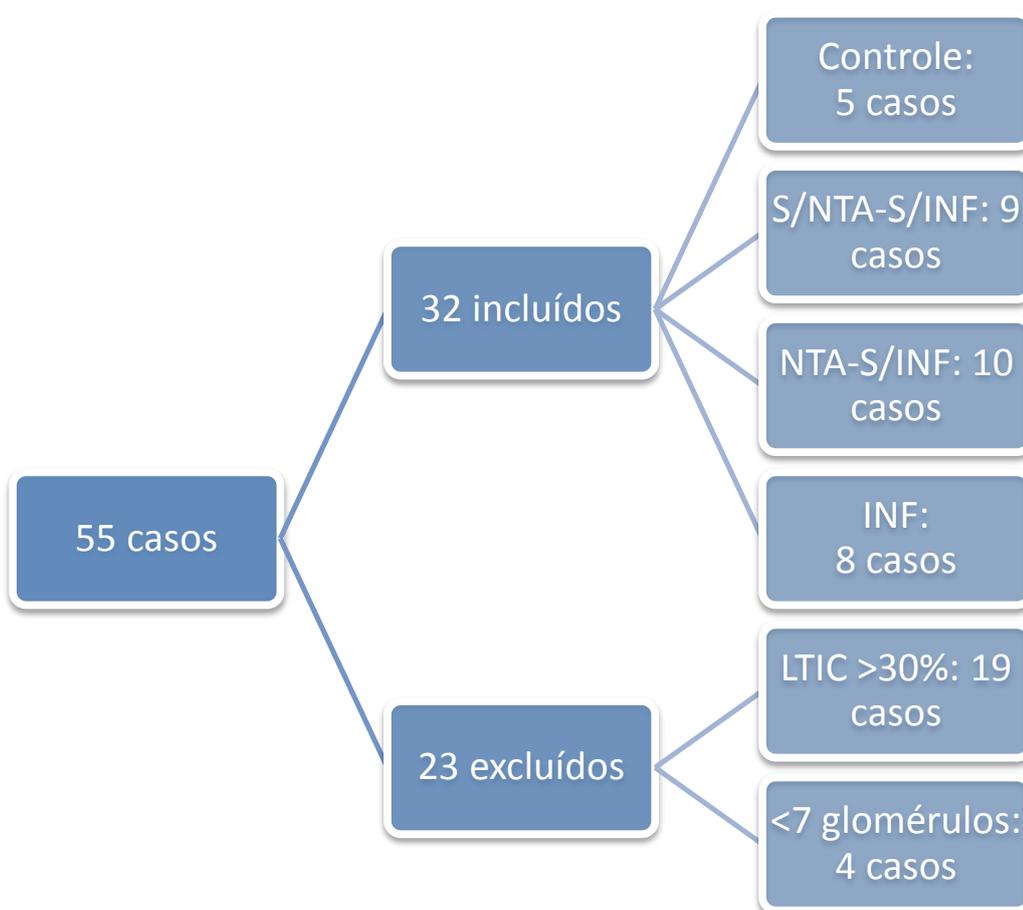


Figura 3: Fluxograma de alocação de pacientes nos grupos de estudo.

6.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

As características demográficas, laboratoriais e clínicas dos 27 pacientes incluídos no estudo estão apresentadas na tabela 1. Houve discreta predominância

do sexo feminino (52%). A média de idade foi de 37 ± 16 anos, hipertensão arterial sistêmica (HAS) esteve presente na maioria dos casos (81%) e proteinúria de 24h apresentou uma mediana de 8279mg/24h.

Tabela 1. Características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes portadores de síndrome nefrótica submetidos à biópsia renal nos anos de 2013 e 2014.

Total (n)	27 (%)
Sexo	
Feminino	14 (52)
Idade (anos)*	37 ± 16
Uréia sérica (mg/dl)*	$55 \pm 41,7$
Creatinina sérica (mg/dl)*	$1,6 \pm 1,2$
Albumina sérica (g/dl)*	$1,9 \pm 0,5$
Colesterol sérico (mg/dl)*	338 ± 140
Proteinúria de 24h (mg)**	8279[3482–13662]
HAS	22 (81)

Nota: *Dados expressos em média \pm desvio padrão. **Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica.

A tabela 2 apresenta as características clínicas e demográficas dos pacientes quando estratificadas nos grupos de estudo, no qual a média de colesterol sérico foi maior ($P=0,02$) e a média de albumina sérica menor ($P=0,04$) no grupo com NTA sem lesão inflamatória glomerular (NTA-S/INF) que o grupo com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF).

Tabela 2. Comparação das características clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes do grupo controle (CTRL), grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA-S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA-S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.

	CTRL	S/NTA-S/INF	NTA-S/INF	INF	P
Total (n)	5 (%)	9 (%)	10 (%)	8 (%)	
Sexo					
Feminino	5 (100)	4 (44)	5 (50)	5 (63)	
Idade (anos)*	$29,4 \pm 5,0$	$34 \pm 15,5$	42 ± 18	$32 \pm 13,4$	0,3
Uréia sérica (mg/dl)*	$23,8 \pm 2,6$	34 ± 20	$73,2 \pm 46,8$	$56,6 \pm 46,2$	0,1
Creatinina sérica (mg/dl)*	$0,8 \pm 0,05$	$1,4 \pm 1,1$	$1,4 \pm 0,6$	$1,9 \pm 1,7$	0,6
Albumina sérica (g/dl)*	-	$1,9 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,6$	0,04 ^a
Colesterol sérico (mg/dl)*	-	361 ± 102	412 ± 166	227 ± 73	0,02 ^b
Proteinúria de 24h (mg)**	-	6965[3913–13437]	7540[3482–13844]	8488[2860–16081]	0,8
HAS	0 (0)	8 (89)	9 (90)	5 (63)	0,3

Nota: *Dados expressos em média \pm desvio padrão. **Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. HAS = Hipertensão Arterial Sistêmica. a e b= média albumina sérica menor e de colesterol sérico maior no grupo NTA-S/INF que o grupo INF.

6.3 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

As alterações anatomopatológicas encontradas estão descritas na tabela 3. O diagnóstico histológico mais frequente foi alterações histológicas mínimas (AHM) contando com 26% dos casos, seguido de glomerulonefrite membranosa (GNM) (22%). A média de fibrose tubulointersticial foi baixa (8,4%). Focos de NTA estiveram presentes em 17 (63%) pacientes. A média de intensidade de NTA estimada visualmente foi de 26,8±26,7% da cortical representada.

Tabela 3. Características histológicas dos pacientes submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.

Parâmetros	N (%)
Total	27
Diagnóstico histológico	
AHM	7 (26)
GNM	6 (22)
GESF	4 (15)
NL	4 (15)
GNPD	2 (7)
Outros	4 (15)
Fibrose Tubulointersticial*	8,4±7,3
Necrose Tubular Aguda (NTA)	17 (63)
Intensidade NTA*	26,8±26,7

Nota: AHM = Alterações Histológicas Mínimas, GESF = Glomeruloesclerose Segmentar e Focal, GNM = Glomerulonefrite Membranosa, GNPD = Glomerulonefrite Proliferativa Difusa Generalizada, NL= Nefrite Lúpica, Outros = Glomerulonefrite Membranoproliferativa, amiloidose, glomerulonefrite difusa crescêntica, *Dados expressos em média ± desvio padrão.

Comparando as características histológicas entre os grupos de estudo (tabela 4), observa-se que o grupo S/NTA–S/INF não apresentou apenas um diagnóstico predominante, enquanto alterações histológicas mínimas (AHM) foi o diagnóstico histológico mais frequente no grupo NTA–S/INF, com frequência de 50%. No grupo INF a nefrite lúpica (NL) foi o diagnóstico mais frequente (50%).

Tabela 4. Comparação das características histológicas dos pacientes do grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA–S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA–S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.

Parâmetros	S/NTA–S/INF	NTA–S/INF	INF
Total	9 (%)	10 (%)	8 (%)
Diagnóstico histológico			
AHM	4 (4)	4 (40)	0 (0)
GNM	3 (3)	2 (20)	0 (0)
GESF	2 (2)	2 (20)	0 (0)
NL	0 (0)	0 (0)	4 (50)
GNPD	0 (0)	0 (0)	2 (25)
Outros	0 (0)	2 (20)	2 (25)

Nota: AHM = Alterações Histológicas Mínimas, LM-GESF = Doenças do Espectro Lesão Mínima – Glomeruloesclerose Segmentar e Focal, GNM = Glomerulonefrite Membranosa, GNPD = Glomerulonefrite Proliferativa Difusa Generalizada, NL = Nefrite Lúpica, Outros: Amiloidose, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite difusa crescêntica.

6.4 ANÁLISE CONVENCIONAL

Através do exame bioquímico do sumário de urina de 17 dos 27 pacientes com SNO e 5 voluntários saudáveis, observou-se uma média de pH ácido em todos os grupos, predominância de pacientes com urina apresentando cor amarela clara e proteína esteve presente na maioria dos casos. Nenhum dos pacientes apresentou sumário de urina com presença de glicose, cetona, bilirrubina e urobilina, e nitrito foi negativo em todos os casos (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação das características físico-químicas da urina dos pacientes do grupo sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA–S/INF), grupo com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA–S/INF) e grupo com lesão inflamatória-proliferativa (INF) submetidos à biópsia renal em Salvador nos anos de 2013 e 2014.

Parâmetros	CONTROLE	S/NTA–S/INF	NTA–S/INF	INF	P
Total (n)	5 (%)	4 (%)	7 (%)	6 (%)	
Cor					
Amarelo claro	5 (100)	3 (75)	6 (86)	5 (83)	0,9
Amarelo ouro	0 (0)	1 (25)	1 (14)	0 (0)	0,4
Avermelhada	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (17)	0,3
Densidade*	1019 ± 10,2	1017 ± 3,6	1017 ± 9,1	1014 ± 3,9	0,7
pH*	5,7 ± 0,4	6,0 ± 0,7	5,5 ± 0,6	5,8 ± 1,0	0,6
Proteína	0 (0)	4 (100)	4 (57)	4 (67)	0,1
Hemoglobina	0 (0)	2 (50)	5 (71)	3 (50)	0,7
Glicose	0 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0,4
Cetona	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Bilirrubina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Urobilina**	5 (100)	4 (100)	7 (100)	6 (100)	
Nitrito	(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

Nota: *Dados expressos em média ± desvio padrão. **Vestígios.

6.5 ANÁLISE DO SEDIMENTO

6.5.1 Cilindros

Cilindros granulosos foram observados em 23 (85%) dos casos, com número semelhante entre os grupos de estudo (Figura 2).

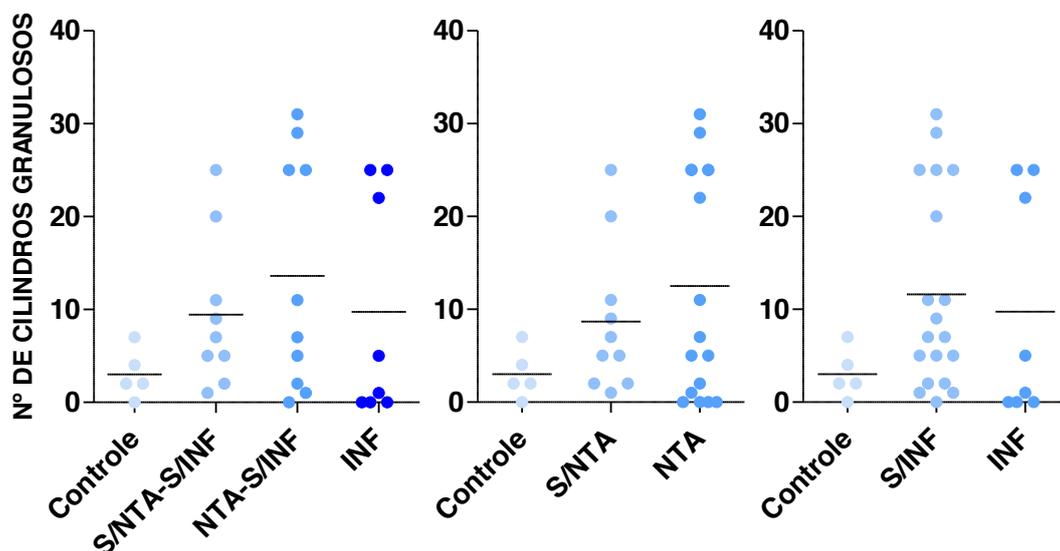


Figura 4: Número de cilindros nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF) e estratificados avaliando NTA presente (NTA) ou ausente (S/NTA) e lesão inflamatória glomerular presente (INF) ou ausente (S/INF).

6.5.2 Células epiteliais

Houve tendência a maior número de células epiteliais no grupo com lesão inflamatória-proliferativa glomerular, porém, sem significância estatística (Figura 3).

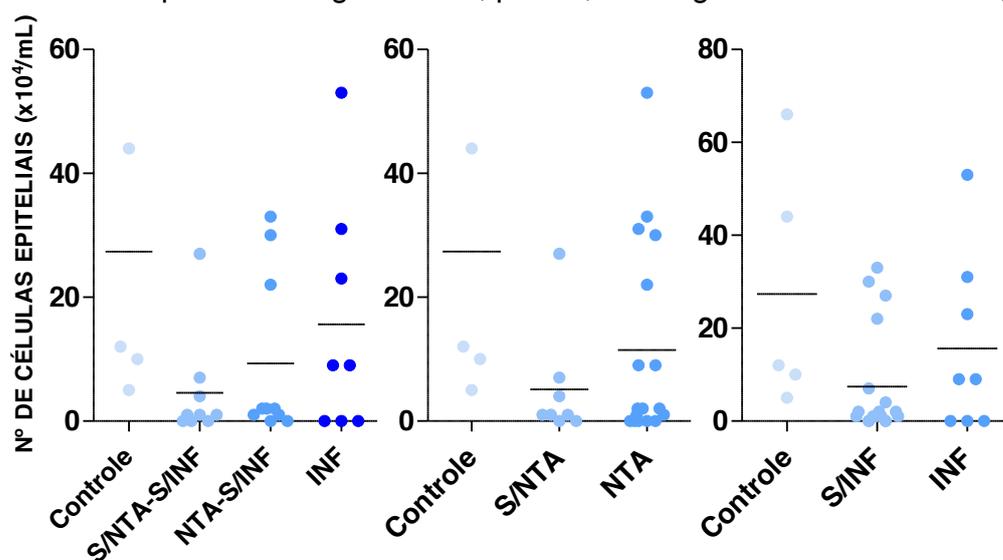


Figura 3: Número de células epiteliais nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF) e estratificados avaliando NTA presente (NTA) ou ausente (S/NTA) e lesão inflamatória-proliferativa presente (INF) ou ausente (S/INF).

6.6 ANÁLISE CITOLÓGICA

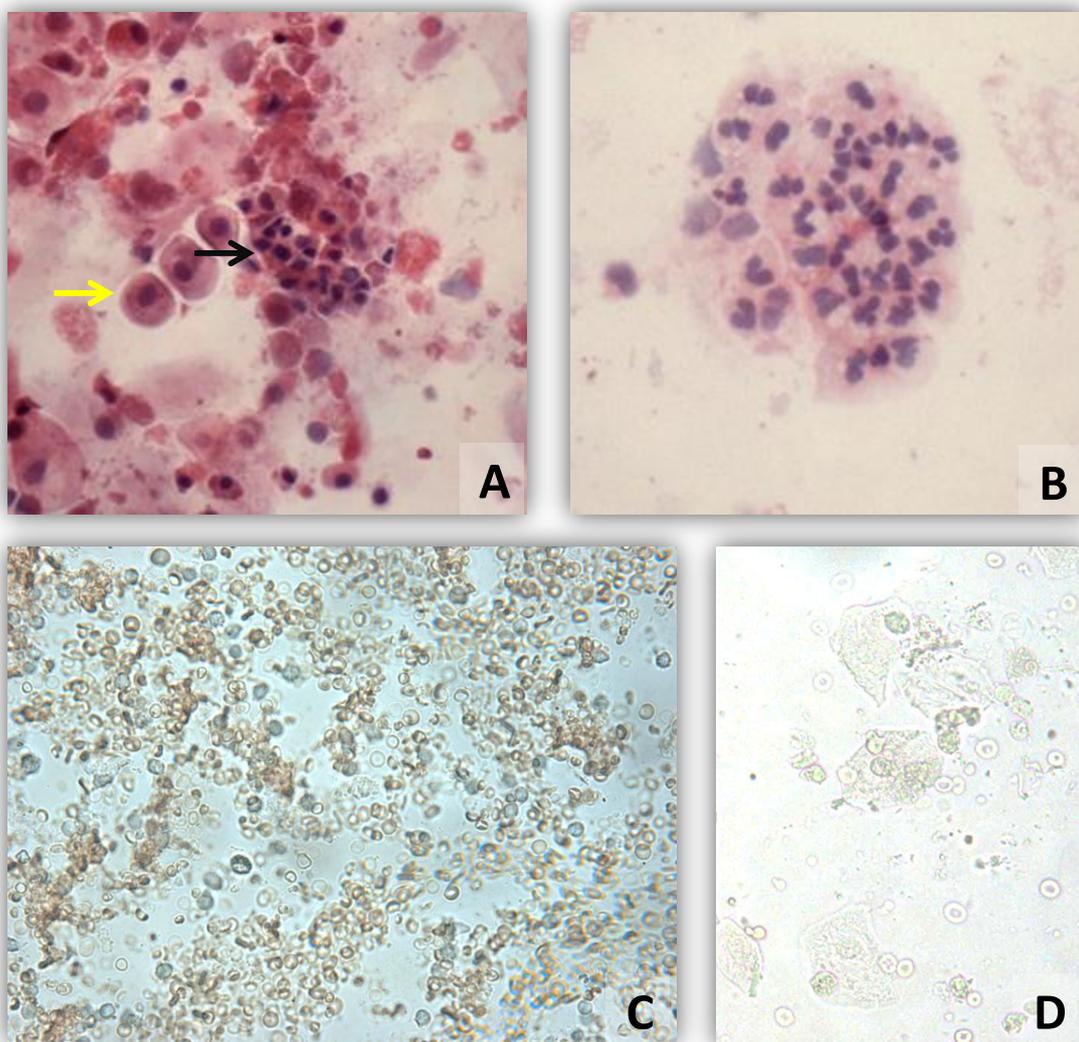


Figura 4: Fotomicrografia de células do sedimento urinário em aumento de 200x corada em H/E (A e B) evidenciando células uroteliais (seta amarela) e células tubulares (seta preta) e de material fresco em aumento de 100x (C e D).

O procedimento de coloração do sedimento urinário evidenciou melhor os elementos presentes (figura 4 A e B) em comparação à observação em material fresco (figura 4 C e D). A imagem 4A trata-se de lâmina de paciente com NTA, e evidencia células uroteliais e células do túbulo renal em cilindro, enquanto a imagem 4B mostra leucócitos polimorfonucleares de paciente com lesão inflamatória-proliferativa. As imagens 4C e 4D tratam-se de pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular.

6.6.1 Definição dos parâmetros para classificação de tamanho de células

A partir da distribuição de células por tamanho, foi observada maior frequência em intervalos específicos de tamanho, sendo possível definir o ponto de corte para classificação de células da seguinte maneira: pequenas quando forem menores que 30 μm ; médias de 30-48 μm ; e células grandes a partir de 48 μm de diâmetro (Figura 5), representadas em fotografia de microscopia ótica na figura 6.

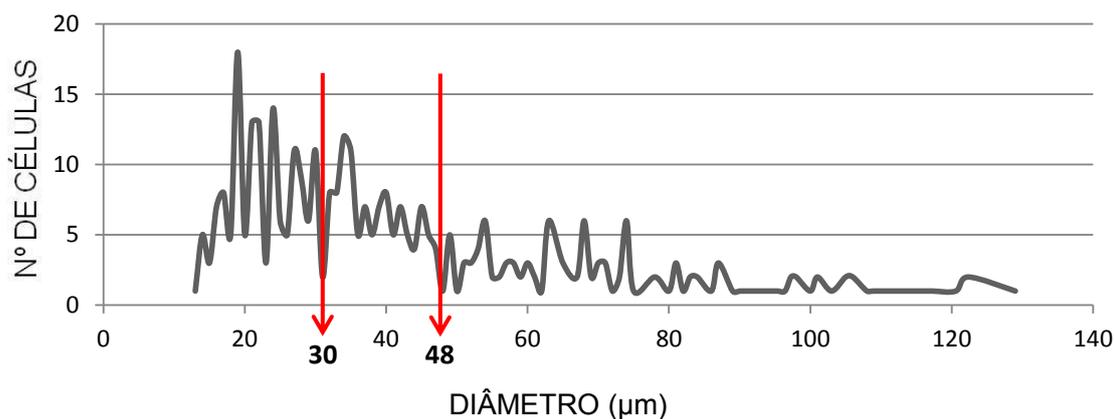


Figura 5: Histograma da distribuição de tamanho de células representadas em lâminas citológicas.

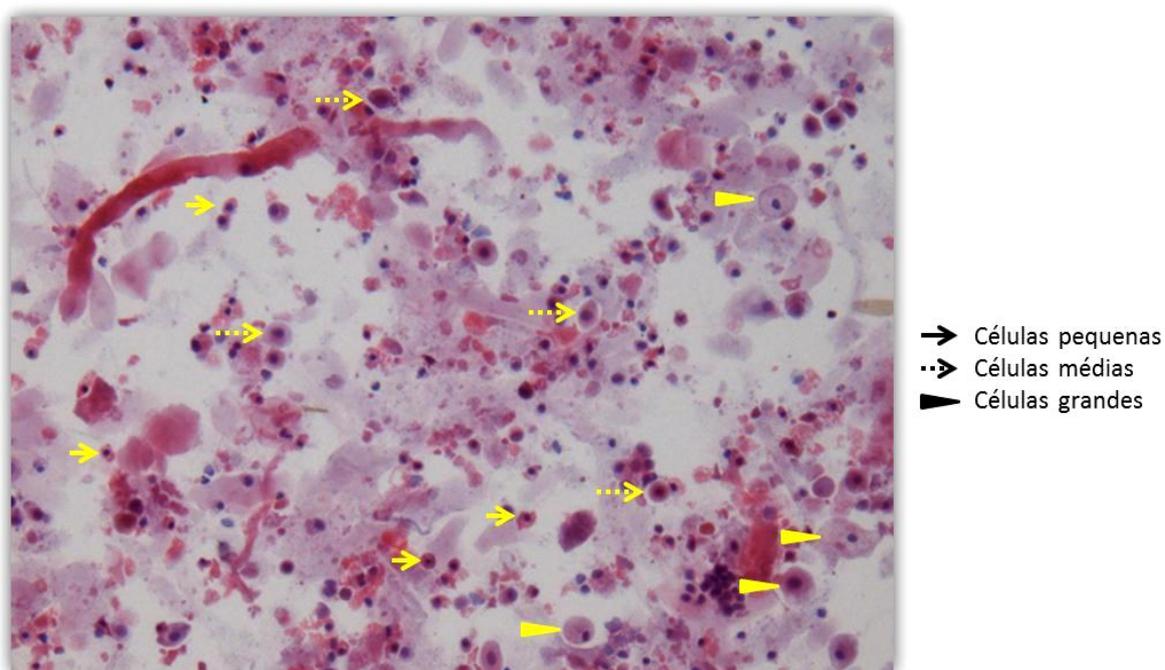


Figura 6: Fotomicrografia de células do sedimento urinário em aumento de 100x, corada em H/E representando células pequenas, médias e grandes.

6.6.2 Contagem diferencial por tamanho

Foram contadas diferencialmente as células de lâminas de 23 pacientes, visto que os outros 4 pacientes não apresentaram células (3 pacientes do grupo com NTA e 1 paciente do grupo sem NTA) no sedimento urinário. O grupo de pacientes normais (controle) apresenta menor proporção de células pequenas ($P=0,01$) e de células médias ($P=0,001$) que de células grandes. Observou-se menor proporção de células pequenas ($P=0,05$) e maior de células grandes ($P=0,05$) no grupo controle que o grupo com INF (figura 7).

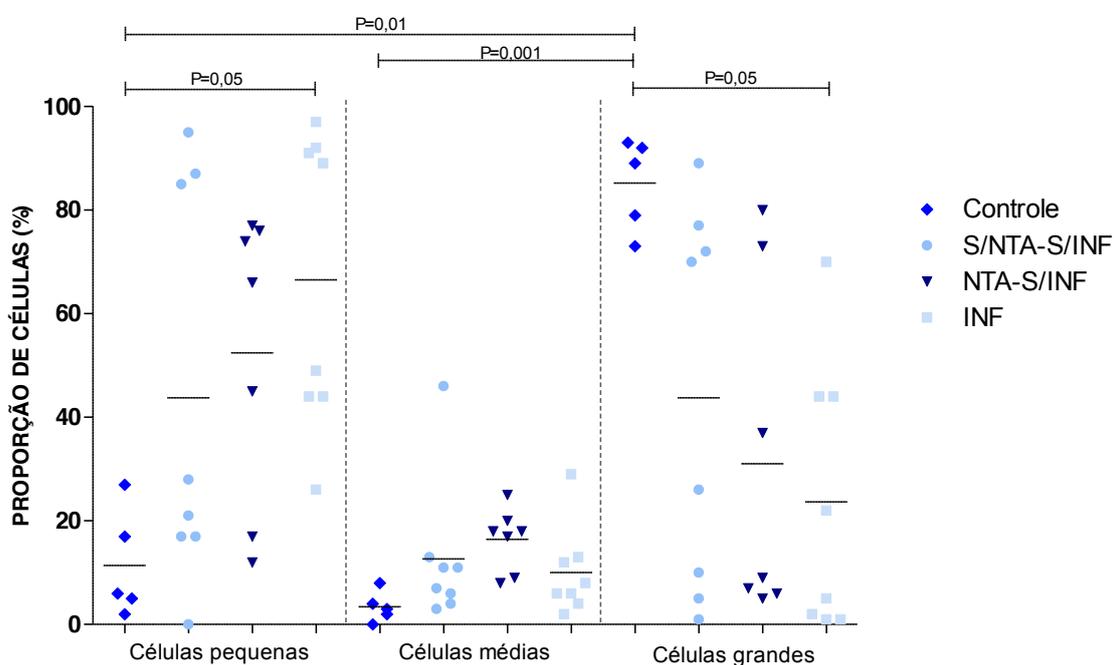


Figura 7: Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA-S/INF), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA-S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF).

Quando estratificados em grupos avaliando a presença ou ausência de NTA ou INF, também observamos no grupo controle uma menor proporção de células pequenas ($P=0,05$) e maior de células grandes ($P=0,01$) que o grupo com NTA (Figura 8) ou INF (Figura 9).

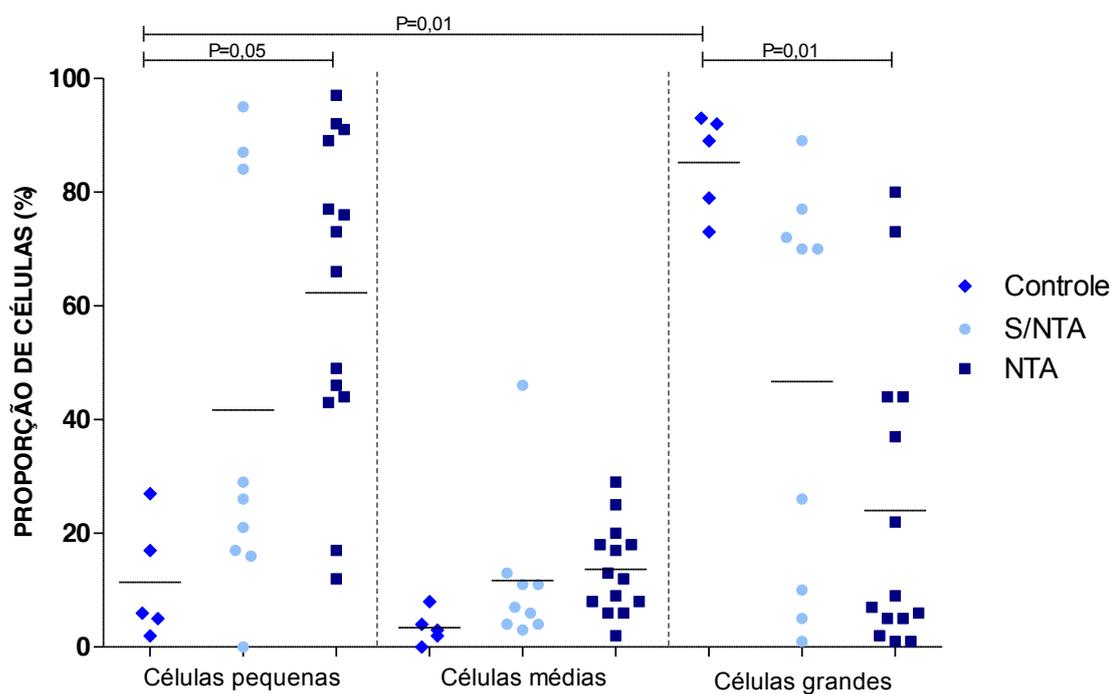


Figura 8: Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem NTA (S/NTA) e com NTA (NTA).

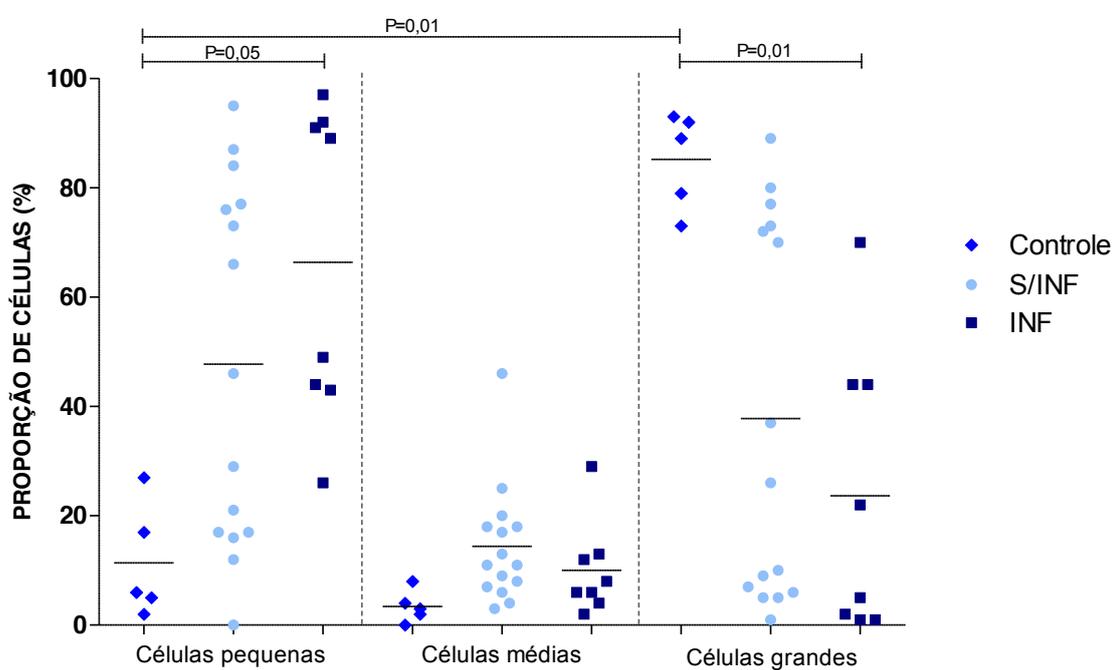


Figura 9: Proporção de células pequenas, médias e grandes nos grupos Controle, sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF).

6.6.3 Contagem diferencial por fenótipo

Realizou-se a contagem diferencial das células avaliando o fenótipo, observando maior proporção de células escamosas no grupo controle que o grupo com NTA-S/INF ($P=0,05$) e que o grupo com INF ($P=0,01$). Há tendência a menor proporção de células uroteliais no grupo controle em relação aos demais grupos, enquanto esta proporção entre os grupos de interesse aparece semelhante. A proporção de células tubulares tende a ser maior no grupo com NTA-S/INF, enquanto o grupo com INF apresenta tendência a maior número de leucócitos que os demais grupos (figura 10).

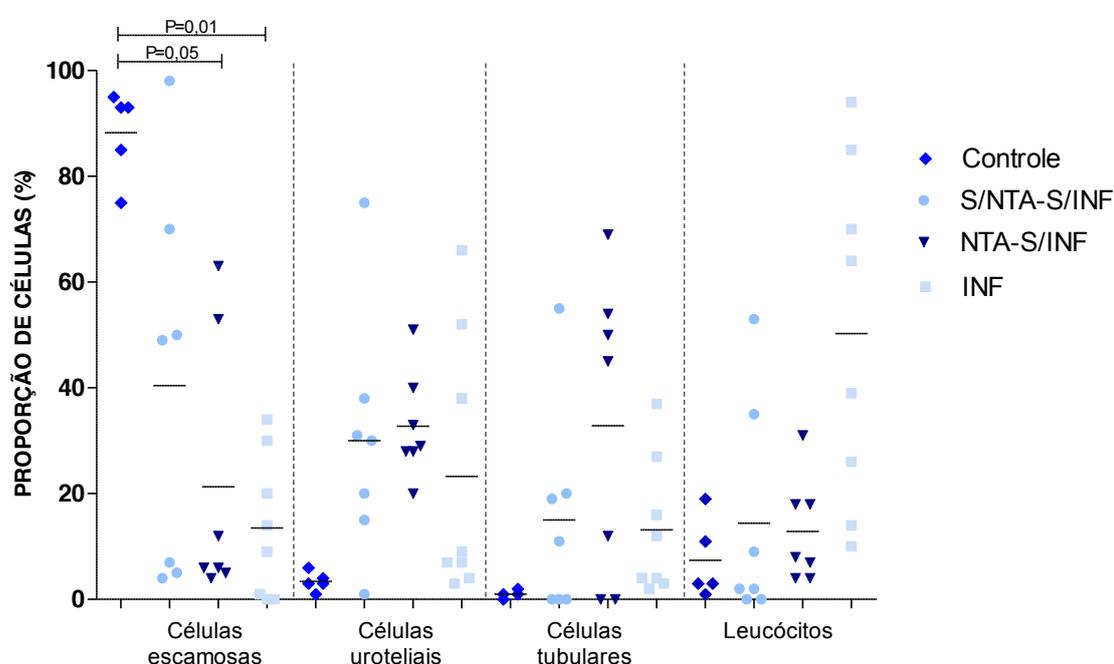


Figura 10: Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos Controle, sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (S/NTA-S/INF), com NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa (NTA-S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa (INF).

Avaliando a proporção de células por presença ou ausência de NTA, observa-se tendência a maior número de células tubulares em pacientes com NTA em relação a pacientes normais e sem NTA, mas sem significância estatística (Figura 11). Estratifcando em grupos por avaliação de INF, observa-se maior proporção de leucócitos no grupo com INF (média de 50%) que o grupo sem INF (13%, $P=0,05$) e tendência a menor proporção de células tubulares no grupo com INF (figura 12).

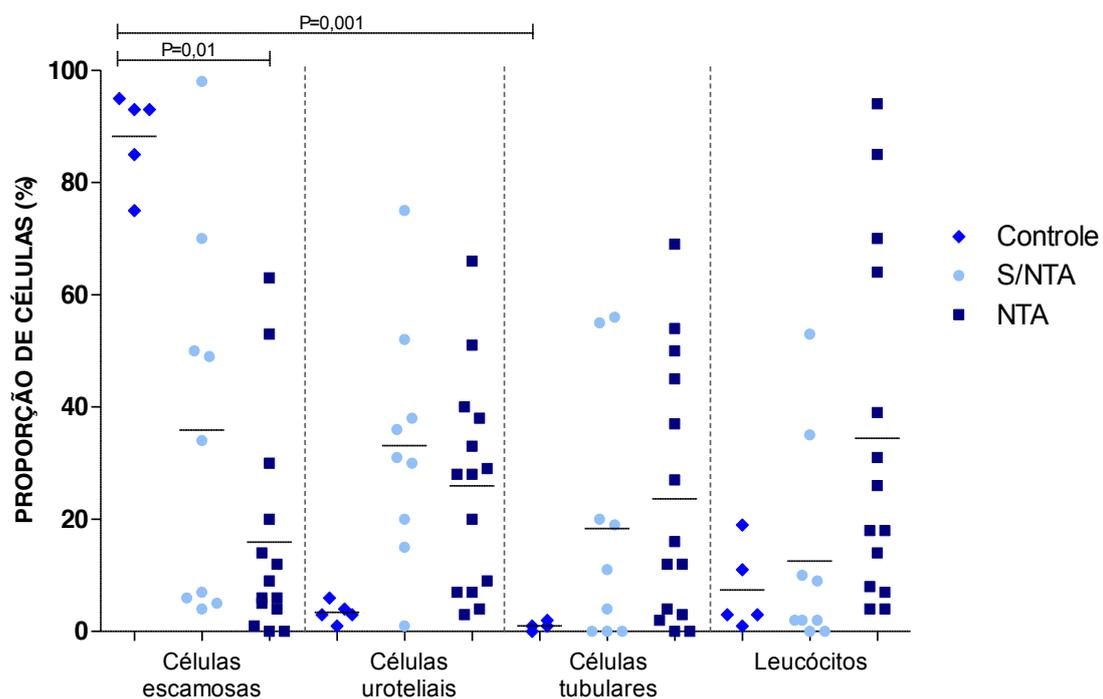


Figura 11: Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos sem NTA (S/NTA) e com NTA (NTA).

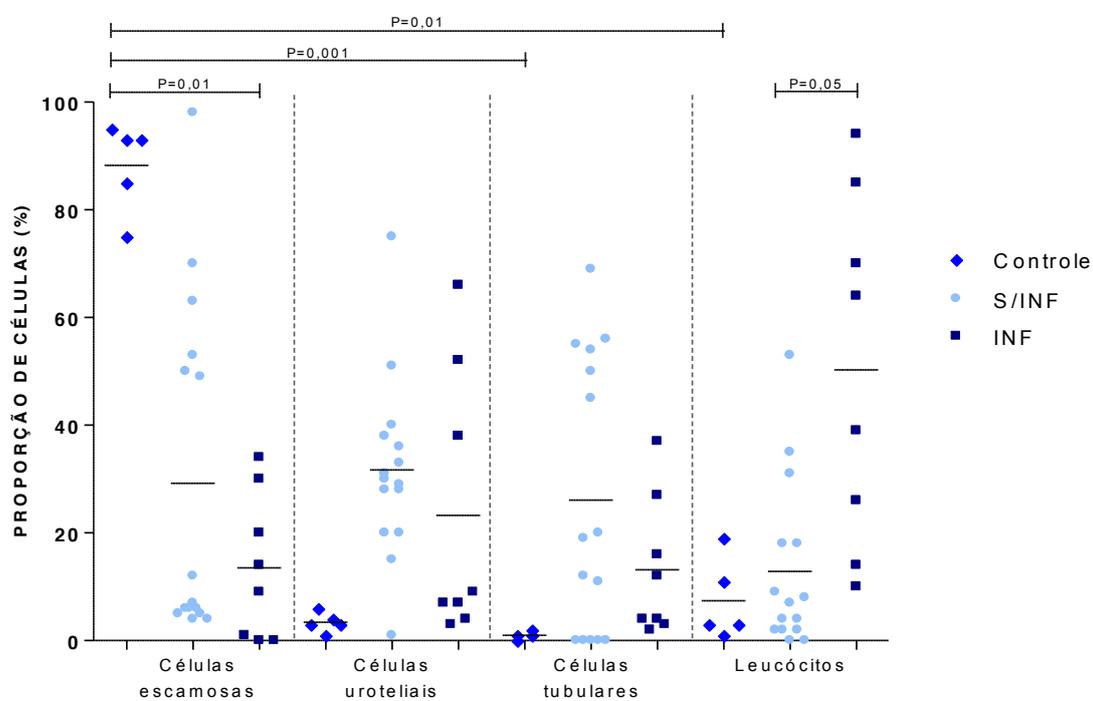


Figura 12: Proporção de células escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos nos grupos Controle, sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/INF) e com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF).

Nesta análise fenotípica, observamos padrões de junções celulares atípicos, com formato semelhante à arquitetura de túbulos renais, composto de células tubulares em processo de morte celular ou intactas (figura 13).

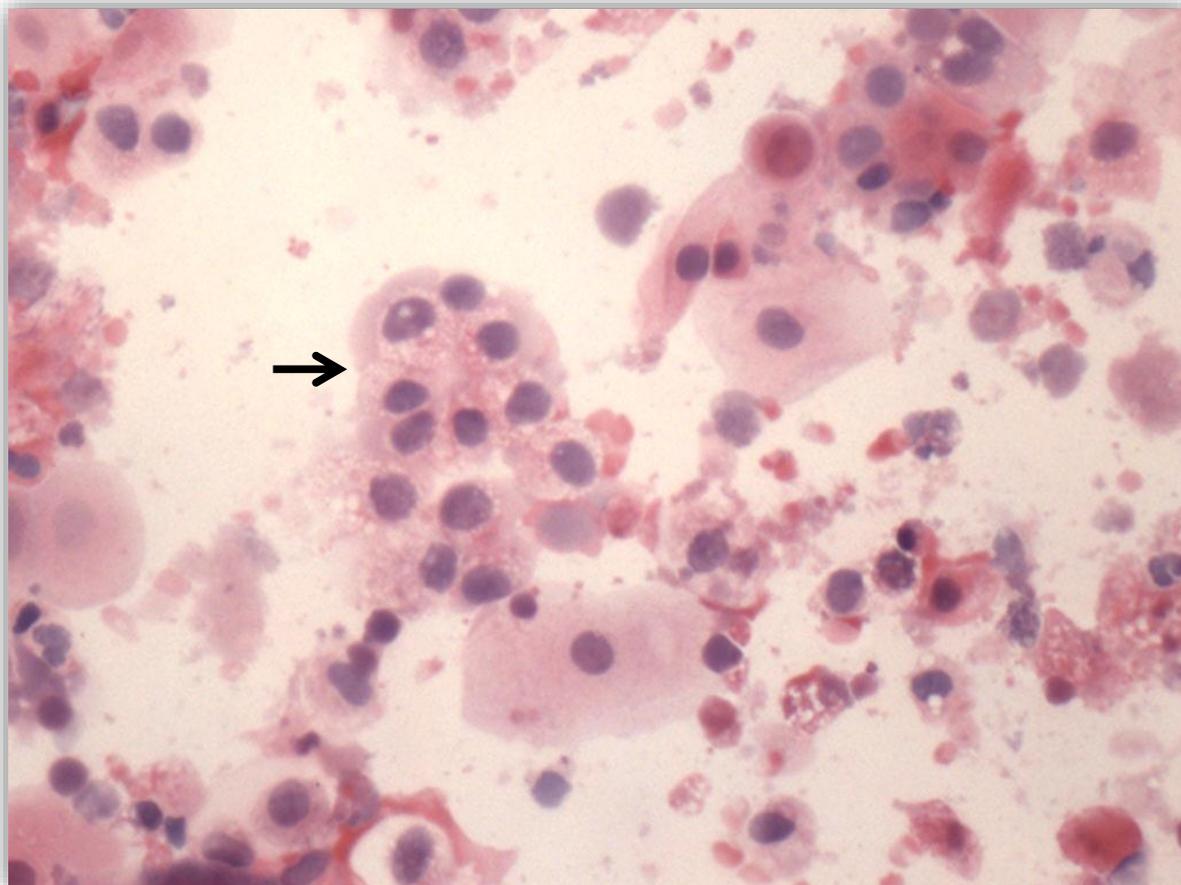


Figura 13: Fotomicrografia do sedimento urinário em aumento de 200x de paciente com NTA evidenciando estrutura de células tubulares em arquitetura de túbulo renal (seta).

Discriminamos a presença ou ausência e observamos que 64% dos pacientes com NTA apresentaram essas alterações contra 55% dos pacientes sem NTA (tabela 6).

Tabela 6. Presença de evidências de células renais no sedimento urinário resultantes de processos patológicos de necrose tubular aguda.

Células tubulares aderidas (n)	Presente (n, %)
Com NTA (14)	9 (64)
Sem NTA (9)	5 (56)

6.7 ANÁLISE ELETROFORÉTICA

Análise de amostras de 31 pacientes revelaram que o sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica apresentam tendência a maior número de bandas e maior variabilidade que pacientes normais (Figura 14).

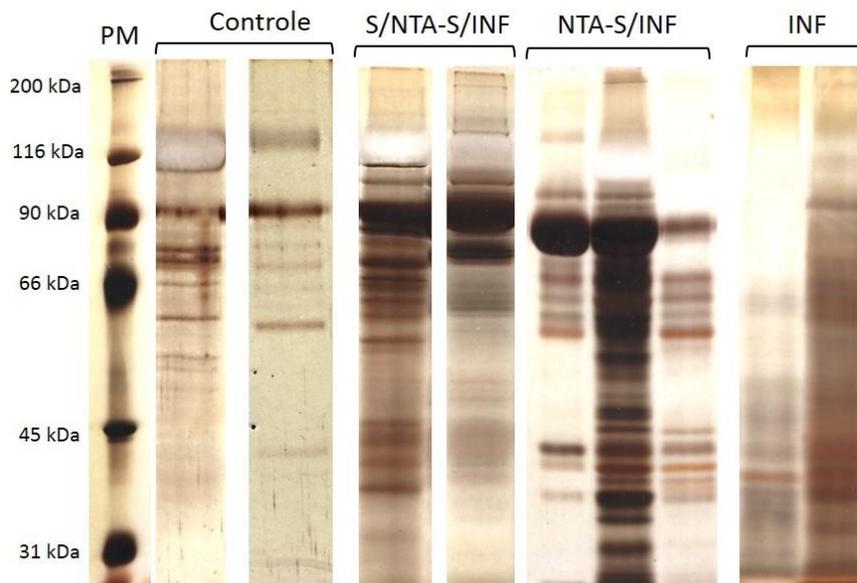


Figura 14: Eletroforese do sedimento urinário de 2 pacientes normais (Controle), 2 pacientes sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/NTA-S/INF), 3 pacientes com NTA sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (NTA-S/INF) e 2 pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular.

A distribuição de bandas é maior no grupo de pacientes com NTA-S/INF que os grupos S/NTA-S/INF ($P=0,01$) e INF ($P=0,001$), observando-se ainda tendência a maior concentração das bandas em menor peso molecular nos grupos S/NTA-S/INF e INF (Figura 15).

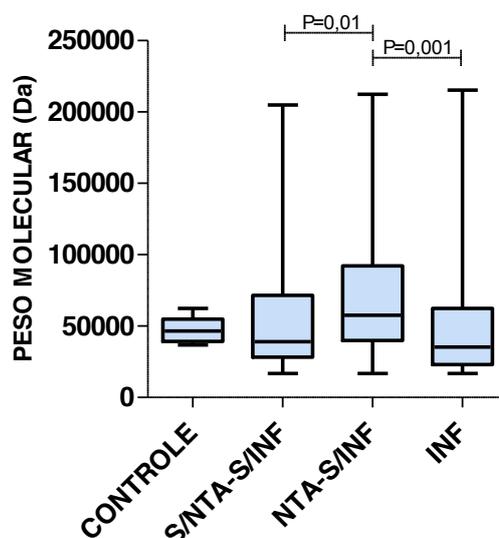


Figura 15: Distribuição de bandas dos (Controle), 2 pacientes sem NTA e sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (S/NTA-S/INF), 3 pacientes com NTA sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular (NTA-S/INF) e 2 pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular.

6. DISCUSSÃO

Avaliamos neste estudo as alterações no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica, do ponto de vista citológico e eletroforético, a fim de identificar elementos que possam ser úteis no diagnóstico diferencial rápido e não invasivo entre NTA e doenças glomerulares inflamatórias-proliferativas. Observamos que a análise citológica após coloração do sedimento urinário se torna mais clara e evidente. Na contagem diferencial das células observamos maior número de leucócitos no sedimento urinário de pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular. A análise eletroforética evidenciou grande quantidade e variabilidade de bandas no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica, principalmente no grupo de pacientes com NTA.

O número amostral calculado de 9 pacientes por grupo não foi alcançado no grupo de pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (N=8). Isto pode ter ocorrido devido ao alto índice de exclusão de pacientes no estudo devido à lesão tubulointersticial crônica acometendo mais de 30% da cortical renal representada na biópsia, que reflete diagnóstico tardio contribuindo para o maior percentual desses pacientes apresentando lesão crônica significativa. Com base nos resultados da análise citológica, um novo cálculo amostral deve ser realizado a partir do efeito observado para avaliações futuras observando parâmetros citológicos. A amostra foi composta por pacientes adultos jovens. HAS esteve presente na maioria desses pacientes e as médias dos níveis séricos de ureia e creatinina foi elevada, fatores associados a pior prognóstico e progressão da doença renal (ALVES, M.A.V.F.R., 2011).

Os diagnósticos histológicos mais frequentes nos pacientes sem lesão inflamatória-proliferativa glomerular foram alterações histológicas mínimas e glomerulopatia membranosa, achado semelhante a outros estudos realizados no Brasil (FERRAZ et al., 2010)(POLITO; DE MOURA; KIRSZTAJN, 2010)(TAVARES et al., 2012). No grupo com lesão inflamatória-proliferativa glomerular (INF) prevaleceram as glomerulonefrites secundárias, sendo a glomerulonefrite lúpica a mais frequente (4, 50%). Focos de NTA estiveram presentes em 63% dos pacientes, demonstrando alta frequência desta lesão histológica em glomerulopatias primárias, como encontrado por Tavares e colaboradores (2012).

Não foram observadas alterações significativas na análise convencional de parâmetros físico-químicos na urina. Entretanto, em análise citológica de material fresco, observou-se tendência a maior número de células semelhantes a células epiteliais no grupo com glomerulonefrites inflamatórias-proliferativas, porém sem significância estatística. O número de cilindros granulosos não mostrou diferenças entre os grupos. Estudos relatam que cilindros granulosos são preditivos ao diagnóstico final de NTA, entretanto, a análise foi feita em conjunto com a presença de células epiteliais do túbulo renal, e o diagnóstico de NTA não foi confirmado pela realização de biópsia renal (TSAI et. al., 2005). Pesquisadores propuseram a aplicação de um escore avaliando esses elementos como diagnóstico de NTA em pacientes com LRA não associada à doença glomerular (PERAZELLA et al., 2008; PESCE; SCHENA, 2010). Em nosso estudo, porém, o escore aplicado à presença de células epiteliais dos túbulos renais e cilindros em sedimento urinário foi de difícil reprodutibilidade. Chawla e colaboradores (2008) relatam dificuldade semelhante, tendo atribuído à ausência de controle de pH e o atraso de um dia na análise da urina, que pode comprometer a integridade dos elementos do sedimento urinário. Neste trabalho, avaliamos o sedimento urinário no mesmo dia da coleta da urina com tempo médio de 2 horas devido ao tempo entre a coleta e a entrega da amostra na Fiocruz/BA, o que pode ter levado à degradação de alguns cilindros. Entretanto, houve preservação dos componentes celulares, pois evidenciamos grande número de células na maioria das amostras. A identificação de células dos túbulos renais em material fresco sem qualquer preparação especial que facilite distingui-las entre outros elementos do sedimento urinário constituiu um desafio, visto que esta é dificultada em pacientes com glomerulonefrite devido ao grande número de outras células como hemácias dismórficas e leucócitos.

Diante das limitações descritas acima, optamos por realizar a análise diferencial por morfometria após coloração por H/E ou Papanicolaou. Quando processadas por fixação e coloração em lâmina, o material se torna permanente, podendo ser revisado, e suas estruturas são melhor evidenciadas. Nossa proposta foi elaborar um método que pudesse ser reproduzido em rotina de laboratório ou à beira do leito, com fácil realização. Preliminarmente, examinamos a frequência dos tamanhos de células em histograma e pudemos definir pontos de corte para classificá-las com menos arbitrariedade, em pequenas, médias e grandes. Um método semelhante foi utilizado em trabalho realizado por Rofe e colaboradores (1955), no qual sucessivas

centrifugações do sedimento urinário de pacientes normais foram realizadas para separar células maiores e menores, fixando-as em lâminas diferentes e corando-as com hematoxilina de Harris, orange G e verde luz, propondo o uso da técnica para definição de parâmetros normais para exame do sedimento urinário.

Por meio dessa metodologia, pudemos observar as distintas populações celulares que foram facilmente diferenciadas visualmente e com pontos de corte bem definidos, conforme demonstrado em histograma. Células pequenas foram definidas quando menores que 30 μm de diâmetro. Rofe (1955) mostra que células de origem renal e leucócitos podem ser caracterizadas como pequenas. Perazella e colaboradores (2008) relatam células epiteliais do túbulo renal com diâmetro de 11 a 15 μm . Rinsgrud (2001) escreve que células uroteliais são difíceis de distinguir de células epiteliais do túbulo renal e que uma ferramenta para isso seria a avaliação do tamanho, em que células tubulares são menores que células uroteliais. Dessa forma, células uroteliais são caracterizadas aqui como células médias (30-48 μm) ou grandes (*umbrella cells*). Rofe (1955) descreve células do epitélio transicional e pavimentoso como células grandes, caracterizadas aqui como maiores que 48 μm .

A contagem diferencial por tamanho foi realizada em 23 dos 27 pacientes incluídos, visto que 1 paciente sem NTA e 3 pacientes com NTA não apresentaram células no sedimento urinário, o que pode ter ocorrido por não se tratar da primeira urina do dia. Propusemos aqui, além das avaliações entre os três grupos definidos clinicamente, apenas histologicamente (presença de NTA isoladamente ou de lesão inflamatória-proliferativa). A maior proporção de células grandes no grupo controle, que persiste quando comparada aos grupos com NTA e INF é compatível com o esperado, em que pacientes normais não apresentem células como leucócitos e células tubulares, justificado pela ausência de lesão renal neste grupo. Quando presentes, as células em sedimento urinário de pessoas sem lesão renal são majoritariamente grandes, características do epitélio pavimentoso, em que sua descamação pouco tem a ver com doenças glomerulares, podendo ocorrer na infecção do trato urinário (BAÑOS-LAREDO; NÚÑEZ-ÁLVAREZ; CABIEDES, 2010). Observamos ainda proporção semelhante de células médias em pacientes com SNO, com tendência a ser menor que a proporção de células grandes e pequenas, compatível com o esperado de maior quantidade de outras células como tubulares em pacientes com NTA (TSAI et al., 2005; PERAZELLA et al., 2008) e leucócitos em pacientes com doenças glomerulares (RINSGRUD, 2011); este grupo, por sua vez,

mostra tendência a maior número de células pequenas que os demais grupos, possivelmente devido a presença de células inflamatórias.

Para corroborar esses dados, foi realizada análise morfológica diferencial avaliando células por fenótipo e classificando as populações em escamosas, uroteliais, tubulares e leucócitos, a fim de estabelecer significado diagnóstico mais preciso. Neste método, células tubulares correspondem às células pequenas, células uroteliais às células médias e grandes e células escamosas como células grandes.

A análise por fenótipo mostra maior proporção de células escamosas no grupo controle, observada ainda quando comparada aos grupos com NTA-S/INF e INF. Há ainda tendência a maior número de células tubulares, correspondentes a células pequenas no grupo com NTA-S/INF, também observada quando avaliada NTA isoladamente. Em avaliação isolada de INF, há maior proporção de leucócitos no grupo com INF com proporção média de 50% comparado ao grupo sem INF (13%) e tendência a menor proporção de células tubulares no grupo com INF. Estes resultados são semelhantes à análise por tamanho, pelas mesmas possibilidades levantadas anteriormente.

A média de proporção de células escamosas e uroteliais foi alta nos pacientes com doença glomerular, mas sem valor diagnóstico para esta condição. Células escamosas estão em constante esfoliação no epitélio pavimentoso, e só em grandes quantidades acompanhadas de piúria pode indicar infecção do trato urinário (BAÑOS-LAREDO; NÚÑEZ-ÁLVAREZ; CABIEDES, 2010). Boon e colaboradores (1981) realizaram estudo morfométrico de células uroteliais coradas por Papanicolaou como ferramenta diagnóstica para câncer de bexiga, e evidenciaram que células provenientes de urotélio lesionado são menores que células uroteliais normais, por serem encontradas na camada mais basal. Isto é consistente com a ausência de células uroteliais basais, visto que observamos principalmente células uroteliais de tamanho médio ou grande, oriundas de camadas mais superficiais do urotélio, achado não indicativo de lesão grave ao urotélio.

É de ampla concordância na literatura que a presença de células tubulares é indicativa de NTA, entretanto, a análise é realizada em conjunto com cilindros granulados (MARCUSSEN et al., 1995; TSAI et al., 2005; PERAZELLA et al., 2008;). Ademais, estudos com glomerulonefrites associadas à NTA são escassos, fator que nesta casuística pode ter interferência pela alta proporção de outras células,

subestimando o valor de células tubulares em pacientes sem NTA isolada de outros diagnósticos histológicos.

Nesta análise por fenótipo, chama atenção a proporção de leucócitos mais alta no grupo de pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular. Estudos mostram que elevado número de leucócitos pode ser associado a algum tipo de infecção no trato urinário. Entretanto, esta variável de confusão causal pode ser contornada pelos dados de proteinúria e quadro clínico do paciente (RINSGRUD, 2001). Na infecção do trato urinário há grande número de leucócitos no sedimento urinário, porém, a presença de proteinúria é forte sinal para doença de origem glomerular. Todos os pacientes deste trabalho possuem SNO e não houve relato de sintomas compatíveis com infecção do trato urinário em nenhum caso, sendo inclusive contraindicação para realização da biópsia renal (FALK; NACHMAN, 2012). Adicionalmente, em análise convencional não foi detectada presença de nitrito, relatado como produto de metabolismo bacteriano. Portanto, os leucócitos em sedimento urinário podem ser indicadores de processo inflamatório renal, conceito que Baños-Laredo, Núñez-Álvarez, Cabiedes (2010) relatam como atualmente aceito na clínica, e neste estudo, de provável origem glomerular.

Fogazzi e colaboradores (2005) utilizaram leucocitúria como um dos 12 parâmetros para diferenciar doenças glomerulares proliferativas de não proliferativas, encontrando maior número de leucócitos que se correlacionavam a lesões histológicas características de glomerulonefrites proliferativas. Afirmam ainda que foi o primeiro estudo a utilizar sistematicamente dados de leucocitúria na investigação de doenças glomerulares, entretanto, não avaliaram em contraste à NTA. Fernández-Aceñero e colaboradores (2008) realizaram exame de sedimento urinário por decantação, corado em Papanicolaou e consideraram atípica presença de leucócitos polimorfonucleares. Buscavam significado diagnóstico para lesão de natureza maligna, mas seus resultados mostraram que grande número desses elementos não estava associado a esse tipo de lesão. Entretanto, não buscaram a etiologia deste achado.

Observamos ainda nesta análise fenotípica a presença de estruturas de células tubulares aderidas atipicamente, em formato semelhante ao de túbulo renal. Estudos que avaliaram células epiteliais do túbulo renal como valor diagnóstico para NTA não relataram esses elementos, entretanto, em nosso trabalho observamos presentes em 64% dos pacientes com NTA. Possivelmente, tais estruturas sejam produto de

processos patológicos da NTA, visto que não há justificativa para essas células se aderirem em arquitetura circular sem que haja uma matriz que lhes confira essa forma. Acreditamos assim, que no processo de descamação do epitélio tubular no processo de isquemia ou nefrotoxicidade, as células se aderem ainda no túbulo, ora por adesão celular, ora por precipitarem na matriz protéica de Tamm-Horsfall secretada por células tubulares em um processo semelhante à formação de cilindros. Essas estruturas também foram encontradas em 55% dos pacientes que não tinham NTA, entretanto, este grupo é consideravelmente menor. Essas observações são úteis para novo cálculo amostral que possa evidenciar melhor a utilidade dessa ferramenta para diagnóstico de NTA associada a doenças glomerulares.

A despeito da proposta inicial, que seria identificar precocemente e não invasivamente pacientes com NTA para diferenciá-los de pacientes com glomerulonefrites exsudativas, nossos dados mostraram que podemos identificar mais facilmente os pacientes com lesão inflamatória-proliferativa glomerular, pela análise de leucocitúria de origem glomerular. Demonstramos assim que o caminho inverso, afastando a possibilidade de lesão inflamatória-proliferativa glomerular em pacientes com síndrome nefrótica, pode-se postergar a imunossupressão até realização de biópsia renal e adotar medidas de suporte ou terapia renal substitutiva quando indicada. De maneira inversa, uma vez identificada a probabilidade de acometimento glomerular nesses pacientes, a conduta clínica poderá ser mais rápida e efetiva, adotando medidas de pulsoterapia que retardem a progressão da doença e realizando a biópsia renal em tempo oportuno para definir estágio de cronicidade da doença e continuidade do tratamento. Contudo, a despeito dos dados apresentados serem úteis na tomada de decisão inicial, a biópsia renal ainda é imprescindível para diagnóstico acurado da doença glomerular.

Além do estudo da urinálise, a urina é uma importante fonte de informações para a descoberta de novas ferramentas para identificação de doenças renais. A análise de biomarcadores vem sendo amplamente estudada (FLISER et al., 2007). Um campo de pesquisa em potencial vem do estudo do perfil de proteínas, que pode ser útil no desenvolvimento de testes rápidos, com amplas aplicações no espectro da diagnose de doenças renais. Entretanto, a maioria desses estudos é realizada a partir de amostras solúveis da urina (sobrenadante), enquanto o sedimento urinário é normalmente negligenciado, apesar de ser descrito na literatura que esta porção da

urina pode contribuir com o conhecimento do proteoma urinário (ZHOU et al., 2006; FLISER et al., 2007; MATAIJA-BOTELHO et al., 2009).

Demonstramos em nosso estudo que o sedimento urinário apresenta uma ampla variedade de proteínas, que ocorre devido à fisiopatologia das doenças glomerulares que cursam com síndrome nefrótica, que pela alteração da seletividade do capilar glomerular pode contribuir para maior quantidade e variedade de proteínas que podem precipitar no sedimento urinário (VARGHESE et al., 2007).

Essas proteínas podem se acumular no sedimento por precipitação, co-precipitação ou através da lise de células e cilindros presentes no sedimento (ZHOU et al., 2006). Mataija-Botelho e colaboradores (2008) afirmam que células escamosas contribuem pouco para a massa total de proteínas presentes no sedimento urinário. Em nosso estudo, essa informação pode ser corroborada pelos resultados de pacientes normais, que apresentaram majoritariamente células escamosas em análise morfológica tiveram menor variabilidade e quantidade de proteínas em análise eletroforética, comparado ao sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica.

A despeito da grande quantidade de proteínas encontradas, não observamos um padrão de bandas específico entre os grupos de pacientes com SNO. Apesar disso, observamos que o grupo de pacientes com NTA apresentaram quatro bandas diferentes correspondentes ao mesmo peso molecular em 3 pacientes (24%), que não foram encontradas em pacientes sem NTA. Houve ainda uma banda de mesmo peso molecular observada em 6 pacientes (33%) que não tinham lesão inflamatória-proliferativa glomerular. Há maior distribuição de diferentes bandas no grupo com NTA-S/INF, o que pode ser atribuído à atividade nefrotóxica ou isquêmica nestes pacientes (LAMEIRE et al., 2013), com intensa perda de células no sedimento urinário e conseqüentemente maior variabilidade de proteínas dos diversos compartimentos celulares. Há tendência a maior concentração de bandas em menor peso molecular nos grupos S/NTA/S-INF e INF, ainda mais evidente neste último, possivelmente a maior atividade enzimática neste grupo devido ao processo inflamatório glomerular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Proteínas como albumina, transferrina e α 1-antitripsina foram relatadas como biomarcadoras de doenças glomerulares (THONGBOONKERD, V.; MALASIT, P., 2005), enquanto há descrito o aumento de NH_3 em pacientes com NTA (CHEYRON; DAUBIN; POGGIOLI, 2003). Varghese e colaboradores (2007) identificaram 14 proteínas em pacientes com objetivo de diferenciar doenças glomerulares no espectro

na síndrome nefrótica, com resultados altamente sensíveis e específicos para glomeruloesclerose segmentar e focal, nefropatia membranosa e nefropatia diabética. Estes estudos diferem-se do presente trabalho pelo alvo de estudo, já que extraíram as proteínas do sobrenadante urinário.

Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo precursor de proteômica que investiga o perfil de proteínas da fase de sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica. Nossos resultados indicam que a continuação do estudo proteômico de identificação dessas proteínas por espectrometria de massas em um maior número de pacientes se faz necessária, para futuras aplicações como um painel de detecção rápida, aumentando a pesquisa e produção biotecnológica e fornecendo diagnóstico alternativo precoce, rápido e mais barato para pacientes nestas condições estudadas.

8. CONCLUSÕES

- 1) A contagem de leucócitos pode ser parâmetro para a investigação de doença glomerular em pacientes com síndrome nefrótica, auxiliando na conduta clínica até que a biópsia renal seja realizada;
- 2) O número de cilindros granulosos e proporção células pequenas e células tubulares não foram úteis no diagnóstico diferencial de NTA apenas ou associadas a lesões inflamatórias-proliferativas glomerulares em pacientes com síndrome nefrótica nas condições deste trabalho;
- 3) A distribuição de bandas no sedimento urinário de pacientes com síndrome nefrótica tende a ser maior que em indivíduos sem alterações fisiológicas renais;
- 4) Pacientes com NTA tem maior número de bandas, e pacientes sem NTA e com INF mostram bandas concentradas em menor peso molecular;
- 5) Não houve padrão específico na distribuição de bandas entre os grupos, porém pelo número de bandas possivelmente exclusivas, a identificação pode definir candidatos a marcadores.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Effector mechanisms of humoral immunity. In: ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 7 ed. 2012. p. 269-292.

ABREU, P. F.; REQUIÃO-MOURA, L. R.; SESSO, R. Avaliação diagnóstica de hematúria. **J. Bras. Nefro.I**, v. 29, p., 2007.

ALVES, M.A.V.F.R. Biomarcadores em Glomerulopatias. In: ABENSUR, H. (ed.). **Biomarcadores na nefrologia, e-book Sociedade Brasileira de Nefrologia**. 2011. p. 36-42.

BAÑOS-LAREDO, M. E.; NUÑEZ-ÁLVAREZ, C. A.; CABIEDES, J. Análisis de sedimento urinario. **Reumatol. Clin.**, v. 6, n. 5, p. 268-272, 2010.

BASTOS, M.G. Biomarcadores de função renal na DRC. In: H. ABENSUR (ed.). **Biomarcadores na nefrologia, e-book Sociedade Brasileira de Nefrologia**. p. 8-18, 2011.

BELLOMO, R.; RONCO, C.; KELLUM, J. A.; MEHTA, R. L.; PALEVSKY, P. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. **Crit. Care**, v. 8, n. 4, p. R204-212, 2004.

BRACHEMI, S.; BOLLÉE, G. Renal biopsy practice: What is the gold standard? **World J. Nephrol.**, v. 3, n. 4, p. 287-294, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BREZIS, M.; ROSEN, S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 10, p. 647-655, 1995.

BOON, M. E.; KURVER, P. H. J.; BAAK, J. P. A.; OOMS, E. C. M. Morphometric differences between urothelial cells in voided urine of patients with grade I and grade II bladder tumours. **J. Clin. Pathol.**, v. 34, p. 612-615, 1981.

CARMO, P. A. V.; MAGALHÃES, S. S.; CARMO, W. B.; FERNANDES, N. S.; BASTOS, R.; ANDRADE, L. C. F.; BASTOS, M. G. Avaliação comparativa da sedimentoscopia urinária realizada pelo nefrologista e pelo profissional de análises clínicas em pacientes com glomerulopatias. **J. Bras. Nefrol.**, v. 29, p., 2007.

CHAMBERLAIN, M. J.; PRINGLE, A.; WRONG, O. M. Oliguric renal failure in the nephrotic syndrome. **Q. J. Med.**, v. 35, n. 138, p. 215-235, 1966.

CHAWLA, L. S.; DOMMU, A.; BERGER, A.; SHIH, S.; PATEL, S. S. Urinary sediment cast scoring index for acute kidney injury: a pilot study. **Nephron Clin. Pract.**, v. 110, p. 145-150, 2008.

CHEYRON, D. D.; DAUBIN, C.; POGGIOLI, J.; RAMAKERS, M.; HOUILLIER, P.; CHARBONNEAU, P.; PAILLARD, M. Urinary Measurement of Na/H Exchanger Isoform 3 (NHE3) Protein as New Marker of Tubule Injury in Critically Ill Patients With ARF. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 42, p. 497-506, 2003.

COCA, S. G.; SINGANAMALA, S.; PARIKH, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. **Kidney Int.**, v. 81, n. 5, p. 442-448, 2012.

DATASUS. Tecnologia da informação a serviço do SUS. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>. Acesso em: abril 2015.

DONADIO, J. V., JR.; TORRES, V. E.; VELOSA, J. A.; WAGONER, R. D.; HOLLEY, K. E.; OKAMURA, M.; ILSTRUP, D. M.; CHU, C. P. Idiopathic membranous nephropathy: the natural history of untreated patients. **Kidney Int.**, v. 33, n. 3, p. 708-715, 1988.

EGGENSPERGER, D. L.; KING, C.; GAUDETTE, L. E.; ROBINSON, W. M.; O'DOWD, G. J. Cytodiagnostic urinalysis. Three years experience with a new laboratory test. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 91, n. 2, p. 202-206, 1989.

FALK, C.J.R.; NACHMAN, P.H. Primary Glomerular Disease. In: B. M. Brenner (ed.). **Brenner and Rector's The Kidney.**, Primary Glomerular Disease, 2012. v. p.1293.

FERNANDEZ-ACEÑERO, M. J.; LORENCE, D.; CRIADO, L.; AGUIRREGOICOA, E. Atypical cells in the urinary sediment: protocol for cytological analysis of the urinary sediment. **Cytopathology**, v. 19, p. 381-384, 2008.

FERNÁNDEZ-LLAMA, P. et al. Tamm-Horsfall protein and urinary exosome isolation **Kidney Int.**, v. 77, n. 8, p. 736-742, 2010.

FERRAZ, F. H. et al. Profile of glomerular diseases in a public hospital of Federal District, Brazil. **J. Bras. Nefrol.**, v. 32, n. 3, p. 249-256, 2010.

FLISER, D.; et al. Advances in Urinary Proteome Analysis and Biomarker Discovery. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 19, p. 1057-1071, 2007.

FOGAZZI, G.B.; SAGLIMBENI, G.; BANFI, G. CANTÚ, M. MORONI, G.; GARIGALI, G.; CESANA, B.M. Urinary sediment features in proliferative and non-proliferative glomerular diseases. **J. Nephrol.**, v. 18, n.6, p. 703-10, 2005.

HULL, R. P.; GOLDSMITH, D. J. Nephrotic syndrome in adults. **BMJ**, v. 336, n. 7654, p. 1185-1189, 2008.

JENNETTE, J.C.; OLSON, J.L.; SCHWARTZ, M.M.; SILVA, F.G. **Heptinstall's Pathology of the Kidney.** 6th ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KODNER, C. Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. **Am. Fam. Physician**, v. 80, n. 10, p. 1129-1134, 2009.

LAMEIRE, N.; VANHOLDER, R. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 12 Suppl 17, n., p. S20-32, 2001.

LAMEIRE, N. et al. Acute kidney injury: an increasing global concern. **Lancet**, v. 13, p. 382, 2013.

LIANO, F.; PASCUAL, J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. **Kidney Int.**, v. 50, n. 3, p. 811-818, 1996.

MARCUSSEN, N.; SCHUMANN, J.; CAMPBELL, P.; KJELLSTRAND, C. Cytodiagnostic urinalysis is very useful in the differential diagnosis of acute renal failure and can predict the severity. **Renal Failure**, v.17, n.6, p. 721-9, Nov 1995.

MATAIJA-BOTELHO, D.; MURPHY, P.; PINTO, D. M.; MACLELLAN, D. L.; LANGLOIS, C.; DOUCETTE, A. A. A qualitative proteome investigation of the sediment portion of human urine: Implications in the biomarker discovery process. **Proteom. Clin. Appl.**, v. 3, n. 1, p. 95-105, 2009.

MAYA, I.D.; ALLON, R. Interventional nephrology. In: B. M. Brenner (ed.). **Brenner and Rector's The Kidney**, Dialysis and Extracorporeal Therapies, 2012. v.1. p. 2432-2461.

MEHTA, R. L. et al. LEVIN, A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Crit. Care**, v. 11, 2007.

OGI, M.; YOKOYAMA, H.; TOMOSUGI, N.; HISADA, Y.; OHTA, S.; TAKAEDA, M.; WADA, T.; NAITO, T.; IKEDA, K.; GOSHIMA, S.; ET AL. Risk factors for infection and immunoglobulin replacement therapy in adult nephrotic syndrome. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 24, n. 3, p. 427-436, 1994.

PERAZELLA, M. A.; COCA, S. G.; KANBAY, M.; BREWSTER, U. C.; PARIKH, C. R. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, n. 6, p. 1615-1619, 2008.

PERAZELLA, M. A.; COCA, S. G.; HALL, I. E.; IYANAM, U.; KORAI SHY, M.; PARIKH, C. R. Urine microscopy is associated with severity and worsening of acute kidney injury in hospitalized patients. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 3, p. 402-408, 2010.

PESCE, F.; SCHENA, F. P. Worldwide distribution of glomerular diseases: the role of renal biopsy registries. **Nephrol. Dial Transplant.**, v. 25, n. 2, p. 334-336, 2010.

POLAINA RUSILLO, M.; BORREGO UTIEL, F. J.; RUIZ AVILA, I.; PEREZ BANASCO, V. [Acute renal failure in a case of nephrotic syndrome secondary to focal and segmental glomerulosclerosis]. **Nefrologia**, v. 28, n. 1, p. 106-107, 2008.

POLITO, M. G.; DE MOURA, L. A.; KIRSZTAJN, G. M. An overview on frequency of renal biopsy diagnosis in Brazil: clinical and pathological patterns based on 9,617 native kidney biopsies. **Nephro.I Dial Transplant.**, v. 25, n. 2, p. 490-496, 2010.

RAIJ, L.; KEANE, W. F.; LEONARD, A.; SHAPIRO, F. L. Irreversible acute renal failure in idiopathic nephrotic syndrome. **Am. J. Med.**, v. 61, n. 2, p. 207-214, 1976.

RINSGRUD, K. M. Cells in the urine sediment. **Lab. Med.**, v. 32, n., p., 2001.

ROBBINS, S. L.; COTRAN R.S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

RODAMILANS, M. F.; BARROS, L. L.; CARNEIRO, M. M.; DOS SANTOS, W. L.; ROCHA, P. N. Challenges in clinical-pathologic correlations: acute tubular necrosis in a patient with collapsing focal and segmental glomerulosclerosis mimicking rapidly progressive glomerulonephritis. **Renal Fail.**, v. 32, n. 8, p. 1005-1008, 2010.

ROFE, P. The cells of normal human urine. **J. Clin. Pathol.**, v. 8, n., p., 1955.

RYDEL, J. J.; KORBET, S. M.; BOROK, R. Z.; SCHWARTZ, M. M. Focal segmental glomerular sclerosis in adults: presentation, course, and response to treatment. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 25, n. 4, p. 534-542, 1995.

SANTOS, W. J. et al. Patients with ischaemic, mixed and nephrotoxic acute tubular necrosis in the intensive care unit--a homogeneous population? **Crit. Care**, v. 10, n. 2, p. R68, 2006.

SCHWILK, B.; WIEDECK, H.; STEIN, B.; REINELT, H.; TREIBER, H.; BOTHNER, U. Epidemiology of acute renal failure and outcome of haemodiafiltration in intensive care. **Inten. Care Med.**, v. 23, n. 12, p. 1204-1211, 1997.

SESSO, R.; PRADO, F.; VICIOSO, B.; RAMOS, L. R. Prospective study of progression of kidney dysfunction in community-dwelling older adults. **Nephrology**, v. 13, n. 2, p. 99-103, 2008.

SINGRI, N.; AHYA, S. N.; LEVIN, M. L. Acute renal failure. **JAMA**, v. 289, n. 6, p. 747-751, 2003.

SOLEZ, K.; MOREL-MAROGER, L.; SRAER, J. D. The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. **Medicine**, v. 58, n. 5, p. 362-376, 1979.

STAPLETON, F. B. Morphology of urinary red blood cells: a simple guide in localizing the site of hematuria. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 34, n. 3, p. 561-569, 1987.

TAVARES, M. B. et al. Acute tubular necrosis and renal failure in patients with glomerular disease. **Renal Fail.**, v. 34, n. 10, p. 1252-1257, 2012.

TAVARES, M.B. **Insuficiência renal aguda em pacientes com doença glomerular: aspectos histológicos e papel da necrose tubular aguda**. 2011. Dissertação

(Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador, 2011.

THONGBOONKERD, V.; MALASIT, P. Renal and urinary proteomics: Current applications and challenges. **Proteomics**, v. 5, p. 1033-1042, 2005.

THADHANI, R.; PASCUAL, M.; BONVENTRE, J. V. Acute renal failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, n. 22, p. 1448-1460, 1996.

TSAI, J. J.; YEUN, J. Y.; KUMAR, V. A.; DON, B. R. Comparison and interpretation of urinalysis performed by a nephrologist versus a hospital-based clinical laboratory. **Am. J. Kid. Dis.**, v. 46, n. 5, p. 820-829, 2005.

VAIDYA, V. S. et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. **Clin. Transl. Sci.**, v. 1, n. 3, p. 200-208, 2008.

VARGHESE, S. A. et al. Urine Biomarkers Predict the Cause of Glomerular Disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 18, p. 913-922, 2007.

ZHOU, H. et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. **Kidney Int.**, v. 69, n. 8, p. 1471-1476, 2006.