

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

**ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE LEUCÓCITOS DO
SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME NEFRÓTICA
IDIOPÁTICA**

Fábio Tadeu Lourenço Guimarães

Belo Horizonte
2014

Fábio Tadeu Lourenço Guimarães

**ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE LEUCÓCITOS DO
SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME NEFRÓTICA
IDIOPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Simões e Silva

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo

Belo Horizonte

2014

Aos meus familiares, meus amigos e parceiros que me incentivaram durante essa longa jornada. A todos os voluntários do estudo.

AGRADECIMENTOS

- À minha fé em Deus, que permitiu ter forças em todos os momentos difíceis nos últimos anos e permitiu que esse momento se tornasse realidade;

- A todos os amigos do laboratório de Imunologia da UFVJM, professores, técnicos e alunos de pós-graduação e de iniciação científica, pelo convívio e pela troca de experiências que possibilita o crescimento de todos;

- Aos alunos de Iniciação científica da UFVJM, Tamiris Campos Duarte e Irma Danielle Rodrigues Pedro e da UFMG, Rafael Machado e Gustavo Henrique Alvarenga;

- Ao aluno de Iniciação científica Renato Ramalho Silva, meu braço direito na coleta de dados;

A professora Dra. Patricia Furtado Gonçalves, coordenadora do programa DINTER na UFVJM;

Ao professor Dr. Wagner de Fátima Pereira, companheiro de DINTER e amigo para sempre;

Ao professor Dr. Alexandre Barbosa Reis, pela amizade e pela inspiração científica desde a graduação;

- Ao professor Dr. Sérgio Veloso Brant Pinheiro pela parceria e pela disponibilização do acesso aos pacientes;

- A professora Dra. Etel Rocha Vieira pela amizade e por ter me ensinado muito nesses anos de convívio;

- Ao professor Dr. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo, por ter me recebido no Labimuno e ter me possibilitado voltar a ter alegria com a pesquisa. Obrigado também pela amizade!

- A professora Dra. Ana Cristina Simões e Silva por ter aberto as portas para a realização do Doutorado e pela parceria;
- A minha mãe, Maria Vitória Lourenço Guimarães e a meu irmão, Carlos Eduardo Lourenço Guimarães pelo amor incondicional;
- A meu pai, Carlos Roberto Machado Guimarães (*in memoriam*) por ser meu maior incentivador nos estudos e pela referência como homem e como pai.
- A minha família linda: minha esposa Patricia Silva Santos Guimarães e meu filho Rodrigo Santos Guimarães por terem me ajudado e entendido tanto.

Dedico esse trabalho ao meu filho Rodrigo,
luz da minha vida!

Espero que tenha orgulho do trabalho do
papai e que algum dia ele possa te inspirar a
sempre procurar se empenhar ao máximo
naquilo que você acredita.



REITOR

Professor Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA

Professora Sandra Regina Goulart Almeida

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

PRÓ-REITORA DE PESQUISA

Professora Adelina Martha dos Reis

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Humberto José Alves

COORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professora Sandhi Maria Barreto

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professora Ana Cristina Côrtes Gama

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

Professora Cláudia Regina Lindgren Alves

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Professora Ana Cristina Simões e Silva

**SUBCOORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE - SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Professor Eduardo Araújo Oliveira

**COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
- SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE**

Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Coordenador

Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Subcoordenador

30/11/2012 a 29/11/2014

Mandato

Membros

Ana Cristina Simões e Silva - Titular

Benigna Maria de Oliveira - Suplente

Eduardo Araújo de Oliveira - Titular

Sérgio Veloso Brant Pinheiro - Suplente

Alexandre Rodrigues Ferreira - Titular

Débora Marques de Miranda - Suplente

Jorge Andrade Pinto - Titular

Helena Maria Gonçalves Becker - Suplente

Ivani Novato Silva - Titular

Juliana Gurgel - Suplente

Marcos José Burle de Aguiar - Titular

Roberta Maia de Castro Romanelli - Suplente

Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana - Titular

Cláudia Regina Lindgren Alves - Suplente

Suelen Rosa de Oliveira - Disc. Titular

Isabel Vasconcelos Poggiali - Disc. Suplente

RESUMO

A síndrome nefrótica idiopática (SNI) se caracteriza por proteinúria maciça, hipoproteinemia e edema. Considerando as características imunopatológicas da SNI, o presente estudo teve como objetivo analisar o perfil fenotípico e funcional de leucócitos do sangue periférico de crianças com SNI. Foram estudados 44 pacientes pediátricos com SNI, provenientes da Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e 10 crianças e adolescentes saudáveis utilizados como grupo controle (CON). Os pacientes foram subdivididos de acordo com os valores da proteinúria em urina de 24 horas no momento da coleta em grupo com proteinúria elevada (PE \geq 200mg/24 horas) e proteinúria reduzida (PR $<$ 200mg/24 horas) e de acordo com a resposta à corticoterapia em córtico-sensíveis (SNCS) e córtico-resistentes/dependentes (SNCR). Os pacientes e controles foram submetidos à coleta de sangue para análise *ex-vivo* do perfil fenotípico de leucócitos circulantes por citometria de fluxo. Foi também analisada a produção *in vitro* de citocinas pró e anti-inflamatórias em populações específicas de linfócitos do sangue periférico. Foram comparados os dados obtidos em pacientes e no grupo controle e de acordo com a intensidade da proteinúria. Além disso, foram avaliados o comportamento migratório e de ativação celular e o percentual de células T com perfil regulador em linfócitos de pacientes com síndrome nefrótica e do grupo controle. Tais parâmetros foram comparados nos subgrupos de SNCS e SNCR, bem como conforme a proteinúria. Os resultados mostraram aumento no percentual de linfócitos TCD4⁺TNF- α ⁺ e redução no percentual de linfócitos TCD8⁺IFN- γ ⁺ nos pacientes com SNI, independente dos níveis de proteinúria. Nos pacientes com PE, houve aumento no percentual de linfócitos TCD4⁺ marcados para as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-17 quando comparado ao grupo controle. Somente os pacientes com PE apresentaram aumento no percentual de linfócitos TCD8⁺TNF- α ⁺ em comparação ao grupo controle. Os achados sugerem que os pacientes com proteinúria persistente apresentam resposta pró-inflamatória mais acentuada e mediada por linfócitos T, principalmente pelos linfócitos T CD4⁺, mesmo sob uso de medicação anti-inflamatória. A comparação dos pacientes subdivididos conforme a resposta à corticoterapia mostrou redução nos percentuais de linfócitos B e células NK nos pacientes com SNCR quando comparado ao grupo CON. Já o grupo com SNCS apresentou apenas redução no percentual de células

NKT quando comparado ao CON. Em linfócitos T CD4⁺, a expressão de FoxP3 nos linfócitos TCD4⁺ foi significativamente maior nos pacientes do grupo SNCS quando comparado aos grupos CON e SNCR. O percentual de células CD4⁺CTLA4⁺ foi maior no grupo SNCS em relação ao SNCR. Foi observada redução na expressão da integrina CD18 em linfócitos TCD3⁺ e TCD8⁺ no grupo SNCS quando comparado ao CON. A análise dos receptores de quimiocinas, no entanto, revelou um aumento no percentual de linfócitos marcados para CCR2 e CXCR4 tanto no grupo SNCS quanto no SNCR quando comparados ao grupo controle. O aumento no percentual de células marcadas para o receptor CCR5 foi observado apenas no grupo SNCR comparado ao CON. A redução da expressão de CD18 na superfície de linfócitos TCD3 e TCD8, bem como as evidências de um perfil regulador em linfócitos TCD4 presente apenas em pacientes com SNCS sugerem que o controle da resposta inflamatória nesse grupo de pacientes possa estar relacionado a alterações nesses parâmetros. O aumento na expressão de receptores de quimiocinas CCR2 e CCR4 em todos os pacientes com SNI pode ser explicado pela natureza inflamatória da doença. Por outro lado, apenas o grupo com SNCR apresentou aumento na expressão de CCR5, indicando atividade inflamatória maior ainda nesse grupo de pacientes. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a capacidade de ativar mecanismos reguladores da resposta imune esteja associada à sensibilidade aos corticosteroides.

Descritores: Síndrome nefrótica idiopática, citometria de fluxo, células T reguladoras, integrinas, citocinas, receptores de quimiocinas.

ABSTRACT

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a disease characterized by massive proteinuria, hypoproteinemia and edema. Considering the immunopathological characteristics of INS, this study aimed to analyze the phenotypic and functional profile of peripheral blood leukocytes of pediatric patients with INS. We evaluated 44 pediatric patients with INS recruited at the Pediatric Nephrology Unit of the Clinics Hospital from Federal University of Minas Gerais and 10 health children and adolescent as control group (CON). Patients were subdivided according to the levels of proteinuria at the time of blood collection in high proteinuria (HP ≥ 200 mg/24 hours) and low proteinuria (LP < 200 mg/24 hours); and also based on the response to corticosteroids in steroid sensitive (SS) and steroid resistant/dependent (SR). Patients and controls were submitted to blood collection for *ex-vivo* analysis of the phenotype profile of circulating leukocytes by flow cytometry. *In vitro* production of pro- and anti-inflammatory cytokines in specific lymphocytes populations from peripheral blood was also analyzed. Data were compared between patients and controls and in patients according the level of proteinuria. In addition, the migratory and cellular activation behavior and the percentage of T-cells with regulatory profile were evaluated in lymphocytes of INS patients and controls. These parameters were compared in the subgroups of SS and SR patients, as well according to the proteinuria. Our results showed an increase of the percentage of CD4⁺TNF- α ⁺ lymphocytes and a decrease of the percentage of CD8⁺IFN- γ ⁺ lymphocytes in patients with INS, regardless the levels of proteinuria. In patients with HP, there was increased percentage of CD4⁺ lymphocytes stained to pro-inflammatory cytokines, IFN- γ , TNF- α and IL-17, as compared to control group. Only patients with HP exhibited an increase in the percentage of CD8⁺TNF- α ⁺ lymphocytes as compared to control group. These results suggest that patients with persistent proteinuria have more pronounced pro-inflammatory response, mediated primarily by TCD4⁺ lymphocytes, even under anti-inflammatory medication. The comparison of patients divided according to steroid response showed reduced percentages of B lymphocytes and NK cells in SR group as compared to control group. SS patients had lower percentage of NKT cells than controls. In CD4⁺ lymphocytes, the expression of the regulatory marker FoxP3 was significantly higher in SS patients than controls and SR group. The percentage of CD4⁺CTLA4⁺ cells was higher in SS

patients than in SR group. Reduced expression of the migration marker CD18 was observed in CD3⁺ and CD8⁺ T lymphocytes of the SS group as compared to controls. The analysis of chemokine receptors revealed increased percentage of lymphocytes stained for CCR2 and CXCR4 both in SS and SR groups as compared to the control group. The increased percentage of cells stained for CCR5 receptor was observed only in SR group as compared to controls. Reduced expression of CD18 on the surface of TCD3 and TCD8 lymphocytes, as well the higher percentage of TCD4 cells with regulatory profile only in SS patients suggest that the control of inflammatory response in this group of patients might be related to changes in these parameters. Higher expression of chemokine receptors, CCR2 and CCR4, in INS patients may be explained by the inflammatory nature of the disease. On the other hand, only SR group showed an increased expression of CCR5, indicating higher inflammatory activity in this subgroup of patients. Taken together, our results suggest that the ability to activate regulatory mechanisms of immune response would be associated with steroid sensitivity.

Key words: Idiopathic nephrotic syndrome, flow cytometry, regulatory T cells, Integrins, cytokines, chemokines receptors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Funções dos linfócitos Th1 e Th2	36
FIGURA 2 -	Função supressora das células T reguladoras	40
FIGURA 3 -	Estratégia de análise para separação das populações leucocitárias por citometria de fluxo	63
FIGURA 4 -	Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo	64
FIGURA 5 -	Sequência de procedimentos utilizados para as análises da intensidade média de expressão das células de interesse por citometria de fluxo	64
FIGURA 6 -	Sequência de procedimentos utilizados para as análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas celulares	69

ARTIGO 1 DE RESULTADOS

FIGURA 1 -	Análise da variação percentual ($\Delta\%$) de células com marcação intracitoplasmática de citocinas anti e pró-inflamatórias após estimulação inespecífica, <i>in vitro</i> , com PMA em pacientes com síndrome nefrótica idiopática (SNI) e grupo controle (CON)	93
FIGURA 2 -	Análise da variação percentual ($\Delta\%$) de células com marcação intracitoplasmática de citocinas anti e pró-inflamatórias após estimulação inespecífica, <i>in vitro</i> , com PMA em pacientes com proteinúria reduzida (PR), proteinúria elevada (PE) e grupo controle (CON)	94

ARTIGO 2 DE RESULTADOS

FIGURA 1 -	Análise do balanço celular em linfócitos do sangue	126
------------	--	-----

periférico de crianças com SNI

- FIGURA 2 - Análise de células T reguladoras em linfócitos TCD4⁺ do sangue periférico de crianças com SNI de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides 127
- FIGURA 3 - Análise da expressão de CD18 em células T, CD4 e CD8 em linfócitos do sangue periférico de crianças com SNI, de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides 128
- FIGURA 4 - Análise da frequência de células positivas para receptores de quimiocinas no sangue periférico de linfócitos de crianças com SNI de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides 129

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - Relação dos anticorpos monoclonais humanos conjugados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas e seus respectivos clones 65
- TABELA 2 - Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégia de análise 67
- TABELA 3 - Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos utilizados para detecção do percentual de citocinas em linfócitos 68

ARTIGO 1 DE RESULTADOS

- TABELA 1 - Caracterização de aspectos clínicos e bioquímicos de pacientes de acordo com a proteinúria 91
- TABELA 2 - Frequências de subpopulações de leucócitos e de linfócitos de sangue periférico em pacientes com síndrome nefrótica idiopática (SNI) como um todo ou subdivididos conforme a proteinúria (PE-proteinúria elevada e PR-proteinúria reduzida) em comparação aos valores em crianças saudáveis (CON) 92

ARTIGO 2 DE RESULTADOS

- TABELA 1- Caracterização de aspectos clínicos e bioquímicos dos pacientes com SNI subdivididos conforme a resposta aos corticosteroides 125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANCA – Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
- ANOVA – Análise de variância
- APC – Célula apresentadora de antígeno
- aTreg – Linfócito T regulador ativado
- CMF – canal médio de fluorescência
- CCR1 – Receptor de Quimiocina C-C do tipo 1
- CD – Grupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)
- CTLA-4 – Antígeno-4 de linfócito T citotóxico
- DRC – Doença renal crônica
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FoxP3 – Fator de transcrição *Forkhead box P3*
- FSC – *Forward Scatter* – tamanho das células
- GATA – Fator de transcrição GATA
- GEFS – Glomerulo esclerose focal e segmentar
- GITR - Gene induzido por glicocorticoides relacionado à família TNFR
- ICAM – Molécula de adesão intercelular
- IFN- γ – Interferon – gama
- IFN- α – Interferon – alfa
- IL – Interleucina
- iTreg – Linfócito T regulador induzido
- LTCD4⁺ – Linfócitos T CD4 positivos
- LTCD8⁺ – Linfócitos T CD8 positivos
- MBG - Membrana basal glomerular
- MCP-1(CCL2) – Proteína quimiotática para monócitos – tipo 1
- MIP-1alfa (CCL3) – Proteína inflamatória de macrófagos – tipo 1 alfa
- MIF – intensidade média de fluorescência
- NF- κ B – Fator nuclear- κ B
- NK – Natural Killer
- NKT – Célula T *Natural Killer*
- nTreg – Linfócito T regulador natural
- MHC-II – Complexo de histocompatibilidade principal – tipo II

PBS – Tampão salina fosfatado
PBS-P – Tampão salina fosfatado com saponina
PE – Ficoeritrina
PE – Proteinúria elevada
PHA – Fitohemaglutinina
PMA – Miristato acetato de forbol
PR – Proteinúria reduzida
RANTES (CCL5) – *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*
RFG – ritmo de filtração glomerular
sIL-2R – receptor de IL-2 solúvel no plasma
SNCD – Síndrome nefrótica córtico-dependente
SNCR – Síndrome nefrótica córtico-resistente
SNCS – Síndrome nefrótica córtico-sensível
SNLM – Síndrome nefrótica por lesões mínimas
SNI – Síndrome nefrótica idiopática
SRS – Fator reativo de pele
SSC – Side Scatter (granulosidade celular)
STAT – proteínas sinalizadoras de transdução e ativação da transcrição
suPAR – receptores solúveis de uroquinase ativadora de plasminogênio
t.a. – Temperatura ambiente
T-bet – fator de transcrição T-box
TCR – Receptor de células T
Th – Linhagem de células T helper
Th1 – Célula T helper 1
Th2 – Célula T helper 2
Th3 – Célula T helper 3
Th9 – Célula T helper 9
Th-17 – Célula T helper 17
TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Th1 – resposta imune do tipo pró-inflamatória
Tr1 – Célula T reguladora tipo 1
Treg – T reguladora
uPAR – receptor da uroquinase ativadora do plasminogênio

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	15
1 INTRODUÇÃO	21
REFERÊNCIAS	25
2 ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Evidências da participação do sistema imune na fisiopatologia da Síndrome Nefrótica Idiopática	27
Resumo	28
Abstract	29
2.1.1 Alterações imunológicas na SNI	30
2.1.2 - Fator de permeabilidade circulante	31
2.1.3 - Diferenciação de linfócitos	33
2.1.4- Células T reguladoras	36
2.1.5- Papel das Células T reguladoras na SNI	40
2.1.6- Migração e ativação celular na SNI	42
2.1.7 - Citocinas na SNI	45
2.1.8- Considerações finais	46
REFERÊNCIAS	47

3 OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
4 PACIENTES E MÉTODOS	58
4.1 - Desenho do estudo	58
4.2 - Critérios de inclusão	58
4.3 - Critérios de exclusão	58
4.4 - Aspectos éticos	59
4.5 Protocolo do estudo	59
4.5.1 - Coleta e processamento de amostras de sangue	60
4.5.2 - Análise ex-vivo de leucócitos do sangue periférico	61
4.5.3 - Análise de citocinas intracitoplasmáticas	63
4.5.4 - Análises estatísticas	69
REFERÊNCIAS	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 - ARTIGO ORIGINAL (1)	72
Aumento da expressão <i>in vitro</i> de citocinas pró-inflamatórias após estimulação inespecífica em Linfócitos T de crianças com síndrome nefrótica idiopática	
RESUMO	73
ABSTRACT	75
INTRODUÇÃO	77

PACIENTES E MÉTODOS	78
Caracterização dos pacientes e controles	78
Aspectos éticos	79
Protocolo do estudo	79
Coleta e processamento de amostras de sangue	80
Contagem de leucócitos	80
Análise ex-vivo dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	80
Análise do perfil de citocinas em leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	82
Análise estatística	83
RESULTADOS	84
DISCUSSÃO	86
REFERÊNCIAS	95
5.2 - ARTIGO ORIGINAL (2)	101
Perfil de ativação e regulação de linfócitos circulantes em pacientes pediátricos com síndrome nefrótica idiopática	
RESUMO	102
ABSTRACT	104
INTRODUÇÃO	106
PACIENTES E MÉTODOS	108
Caracterização dos pacientes e controles	108
Aspectos éticos	109
Protocolo do estudo	110

Coleta e processamento de amostras de sangue	110
Análise ex-vivo dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo	111
Análises estatísticas	113
RESULTADOS	113
Parâmetros clínicos	113
Análise fenotípica dos leucócitos do sangue periférico	114
Análise de linfócitos Treg (CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺CTLA4⁺) no sangue periférico	114
Análise do perfil migratório e de ativação de linfócitos do sangue periférico	115
DISCUSSÃO	116
REFERÊNCIAS	130
CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
ANEXOS	139

1 – INTRODUÇÃO

A Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI) é definida como uma doença glomerular caracterizada por proteinúria maciça, hipoproteinemia e edema (1-5). É classificada em primária ou idiopática e secundária. A forma primária da doença é mais comum na infância e decorre geralmente de alterações genéticas primárias do rim que acometem a barreira de filtração glomerular (6, 7). A forma secundária é mais comum em adultos e pode ocorrer durante o curso clínico de doenças sistêmicas que acometem os rins, como o diabetes mellitus e o lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo.

Na sequência de eventos que caracterizam a SNI ocorrem alterações primárias da permeabilidade e seletividade da barreira de filtração glomerular, que se torna incapaz de restringir a perda de proteínas para valores abaixo de 100mg/m² de superfície corporal por dia (8). A doença cursa com períodos de atividade ou recidivas intercalados por períodos de remissão nos quais não há alterações clínicas e nem proteinúria. Durante as recidivas, pode ocorrer proteinúria maciça que frequentemente supera 1.000mg/m²/dia (proteinúria de 24 horas) e/ou 2mg proteína/mg creatinina (relação proteína-creatinina em amostra de urina). Essa proteinúria geralmente acarreta em edema e diminuição significativa da proteinemia, em especial da albumina plasmática.

Em relação aos achados histopatológicos no tecido renal, a SNI pode ser classificada em duas formas principais: síndrome nefrótica por lesões mínimas (SNLM) e glomérulo esclerose focal segmentar (GEFS). A SNLM é a forma mais comum da doença em crianças, caracterizando-se pela escassez ou ausência de alterações do tecido renal à microscopia de luz. À microscopia eletrônica, observa-

se proliferação mesangial discreta e fusão dos processos podais, sem deposição de imunocomplexos (9). Alterações histopatológicas que caracterizam a SNLM estão presentes na maioria das crianças, porém a frequência desse diagnóstico diminui à medida que a idade aumenta (6). Clinicamente, a SNLM responde bem ao tratamento com corticosteroides, sendo que aproximadamente 90% dos pacientes com SNLM apresentam remissão completa em resposta à terapêutica com essa medicação (10).

A GEFS, por sua vez, é caracterizada pelo colapso dos capilares glomerulares, que apresentam esclerose e hialinose além de formação de adesão nos tufo glomerulares, podendo apresentar depósitos de imunoglobulinas e de componentes do sistema de complemento, hipertrofia glomerular, fibrose intersticial e atrofia tubular. (10). Nas biópsias desses pacientes, os glomérulos apresentam-se muito alterados, os podócitos adjacentes podem estar fundidos, assumindo uma morfologia achatada (8). Os glomérulos afetados se misturam aos íntegros, dando uma aparência de mosaico, sendo o tecido comprometido localizado predominantemente na junção córtico-medular (4). Os pacientes com GEFS geralmente respondem mal à corticoterapia, podendo apresentar resistência ao tratamento com corticoides (corticorresistentes) ou dependência ao uso contínuo de corticoides (cortico-dependentes) para se manterem em remissão (11). Embora a incidência global da SNI na infância tenha-se mantido estável ao longo das três últimas décadas (12), o padrão histológico está mudando. Os achados histopatológicos característicos de GEFS têm sido cada vez mais frequentes nas crianças com SNI (10, 13).

Do ponto de vista clínico, a SNI pode ser classificada de acordo com a resposta terapêutica, visto que o principal fator prognóstico da doença continua a ser

a resposta ao tratamento com corticosteroides e não as alterações histológicas encontradas (7). Os pacientes são classificados em: SN corticossensível (SNCS), quando apresentam remissão clínica e laboratorial persistentes após suspensão da corticoterapia; SN corticorresistente (SNCR) quando não há resposta ao uso de corticoide após 4 a 6 semanas de tratamento e SN cortico-dependente (SNCD) na qual os pacientes apresentam recidivas até 2 semanas após suspensão da corticoterapia ou recidivam durante a redução da dose de corticoide (5, 9). Os pacientes com SNCR e SNCD apresentam pior prognóstico do que os casos de SNCS.

Diversos estudos apontam para o papel do sistema imune na fisiopatologia da SNI, contribuindo para as alterações glomerulares e histológicas da doença (para revisão ver Pereira et al, *Inflammation Research* 2014) (14). Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas em relação ao conhecimento da SNI, sua fisiopatologia ainda não foi completamente elucidada. Alguns pacientes respondem mal a todas as modalidades terapêuticas, ou sofrem efeitos adversos aos medicamentos, sugerindo que a abordagem atual está longe de ser a ideal.

Dentro dessa perspectiva, esta tese de Doutorado está inserida em uma linha de pesquisa que aborda o estudo de biomarcadores em nefropatias pediátricas, mais especificamente moléculas relacionadas à resposta imuno-inflamatória na SNI, com o objetivo de caracterizar melhor a disfunção imunológica e de definir possíveis biomarcadores de interesse clínico.

Finalmente, é importante explicar que essa Tese de Doutorado foi elaborada de acordo com a resolução 03/2010 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da UFMG, que permite sua confecção em formato de artigos científicos a serem

submetidos a revistas médicas. Sendo assim, a apresentação do trabalho seguiu a seguinte estrutura:

1. Seção de Introdução;
2. Seção de Revisão da Literatura, apresentada sob a forma de artigo de revisão;
3. Seção de Objetivos;
4. Seção de Metodologia;
5. Seção de Resultados e Discussão, apresentada sob a forma de dois artigos originais;
6. Seção de Comentários Finais.

Observações:

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção de acordo com as normas de Vancouver.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso LSB, Silva JMPS, Simões e Silva AC, Pinheiro SCB, Salum RG. Síndrome Nefrótica. In: Leão E. Nefrologia pediátrica. Coopmed, Belo Horizonte. Pediatria ambulatorial; 2013.
2. McEnery PT, Strife CF. Nephrotic syndrome in childhood. Management and treatment in patients with minimal change disease, mesangial proliferation, or focal glomerulosclerosis. *Pediatr Clin North Am.* 1982 Aug;29(4):875-94. PubMed PMID: 7050865. Epub 1982/08/01. eng.
3. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant.* 2004 Aug;8(4):344-8. PubMed PMID: 15265159. Pubmed Central PMCID: 1450337.
4. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology.* 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 557-73.
5. Quintaes PSL WV. Síndrome nefrótica: fisiopatologia, complicações e tratamento. . In: Sarvier, editor. *Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento*2006.
6. Haycock G. The child with idiopathic nephrotic syndrome. In: Press U, editor. *Clinical Paediatric Nephrology.* 3rd ed. New York: Oxford: University Press; 2003. p. 341-66.
7. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Wilkins LW, editor. *Pediatric Nephrology.* 5th ed. Philadelphia2004. p. 543-56.
8. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet.* 2003 Aug 23;362(9384):629-39. PubMed PMID: 12944064.
9. Diniz JSS CL, Silva JMP. Síndrome nefrótica. In: Coopmed, editor. *Pediatria Ambulatorial.* 4a ed. Belo Horizonte2005. p. 648-57.
10. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical science.* 2004 Aug;107(2):125-36. PubMed PMID: 15157184.
11. Mathieson PW. Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. *Seminars in immunopathology.* 2007 Nov;29(4):415-26. PubMed PMID: 17955243.
12. Srivastava T, Simon SD, Alon US. High incidence of focal segmental glomerulosclerosis in nephrotic syndrome of childhood. *Pediatr Nephrol.* 1999 Jan;13(1):13-8. PubMed PMID: 10100283.
13. Hogg R, Middleton J, Vehaskari VM. Focal segmental glomerulosclerosis--epidemiology aspects in children and adults. *Pediatr Nephrol.* 2007 Feb;22(2):183-6. PubMed PMID: 17151873. Pubmed Central PMCID: 1764601.

14. Pereira W de F, Brito-Melo GE, Guimaraes FT, Carvalho TG, Mateo EC, Simoes e Silva AC. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2014 Jan;63(1):1-12. PubMed PMID: 24121975.

2 ARTIGO DE REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evidências da participação do sistema imune na fisiopatologia da Síndrome Nefrótica Idiopática

Guimarães FTL^{1,2}; Brito-Melo GE¹; Guimarães PSS¹; Rocha-Vieira E¹; Pinheiro SVB²; Pereira WF¹; Simões e Silva AC^{2*}.

¹ Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde, UFVJM, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5000, Diamantina, MG, 29000-000, Brasil

² Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina –Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brasil.

***Correspondência para Ana Cristina Simões e Silva**

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena, 190, 2º andar, sala 281, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil, 30130-100. FAX: + 55-31-34099770, TEL: + 55-31-34098073, e-mail: acssilva@hotmail.com

Suporte financeiro: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil)

Resumo

A Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI) é uma doença multifatorial, caracterizada por proteinúria, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. Estudos realizados em humanos e modelos animais associam a SNI às alterações na resposta imunológica, quer seja induzindo ou perpetuando a doença. No entanto, os mecanismos específicos relacionados ao sistema imune ainda não foram devidamente elucidados. A maioria das investigações mostra alterações na dinâmica dos linfócitos T, de citocinas além da participação do sistema complemento e dos linfócitos B na fisiopatologia da SNI. O objetivo desta revisão é descrever as evidências clínicas e experimentais da participação da resposta imunológica na etiopatogenia da SNI, enfatizando o papel de células T reguladoras, da atividade migratória celular, das citocinas/quimiocinas bem como dos receptores de quimiocinas nos mecanismos de lesão renal. O entendimento do papel fisiopatológico da resposta imune na SNI poderá proporcionar o desenvolvimento de terapias mais específicas e individualizadas, úteis para a melhora clínica do paciente e do prognóstico da doença.

Descritores: Síndrome nefrótica, linfócitos, células T reguladoras, citocinas, quimiocinas.

Abstract

Idiopathic nephrotic syndrome (INS) is a multifactorial disease characterized by proteinuria, hypoalbuminemia, generalized edema, and hyperlipidemia. Studies in humans and animal models associated INS with changes in the immune response. There is a consensus on the involvement of the immune system to induce or perpetuates INS. However, the specific mechanisms related to immune system remain to be elucidated. Most studies show changes in the dynamics of T lymphocytes, cytokines and involvement of complement and B lymphocytes in the pathophysiology of INS. The purpose of this article is to review the clinical and experimental evidence of the involvement of the immune response in the pathogenesis of INS with emphasis on regulatory T cells and chemokine receptors. The understanding of the physiopathological role of the immune response in INS will probably allow the development of more specific and individualized therapies, useful for clinical improvement and better prognosis.

Keywords: Nephrotic syndrome, lymphocytes, T reg cells, cytokines, chemokines.

2.1.1- Alterações imunológicas na SNI

Provavelmente o estudo de Gitlin et al. em 1956 foi o primeiro que associou a SN às alterações no sistema imune, tendo seus resultados evidenciado o aumento da síntese de gamaglobulinas em crianças com a doença (1). Após este estudo, seguiram-se outras investigações sobre as alterações imunológicas, destacando-se inicialmente os estudos sobre alterações nos linfócitos T e na produção de imunoglobulinas (2-7).

Em 1974, Shalboub e colaboradores (3) caracterizaram uma desordem conhecida como Nefrose Lipóide, demonstrando uma alteração primária de células T, que resultava na produção de “linfocinas tóxicas” no sangue periférico. Mais tarde, em 1976, Moorthy e colaboradores (8) demonstraram que o plasma de pacientes com Nefrose Lipóide inibia a resposta blastogênica de linfócitos ao mitógeno Fitohemaglutinina (PHA). A substância presente nesse sobrenadante foi descrita como sendo uma linfocina e denominada como Fator Reativo de Pele (SRF) (9). O SRF provocou redução nos sítios aniônicos da membrana basal glomerular, resultando em proteinúria (7, 10).

Estudos experimentais subsequentes mostraram que o sobrenadante da cultura de leucócitos de pacientes com SNI induziu proteinúria em ratos (4, 7). Outros estudos comprovaram a eficácia da plasmaférese na redução da proteinúria e estabilização da função renal em pacientes com GEFS, corroborando a participação de um fator circulante na etiopatogênese da doença (11, 12). A Nefrose Lipóide foi posteriormente denominada SNLM e a substância responsável pela proteinúria foi chamada de fator de permeabilidade (12-14). Diante dessas evidências, foi levantada a hipótese de que alterações funcionais de linfócitos T poderiam resultar na produção de um fator de permeabilidade capaz de alterar o

funcionamento e/ou as estruturas da barreira de filtração glomerular resultando em proteinúria (15).

2.1.2 - Fator de permeabilidade circulante

A presença de um fator de permeabilidade circulante, ainda desconhecido, produzido por linfócitos T tem sido sugerida na etiopatogênese da SNLM e da GEFS. Entretanto ainda não está claro se o fator é o mesmo ou se é diferente para as duas manifestações histopatológicas da doença.

O estudo de Dantal e colaboradores (1994) em pacientes com recidiva pós-transplante, mostrou que o uso de colunas de imuno-adsorção de proteína A foi associado com a melhora ou remissão da proteinúria (16). Tal descoberta levou esse grupo a inferir que o fator de permeabilidade seria uma imunoglobulina, fragmento de imunoglobulina ou proteína como, por exemplo, o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que além da sua ação fibrogênica, poderia estar envolvido na SNI devido a sua interação com moléculas inflamatórias. Nesse sentido o TGF- β poderia promover a quimiotaxia de granulócitos e macrófagos, em resposta a estímulos imunes, além de estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , e quimiocinas, como IL-8, proteína quimiotáxica de monócitos-1 (MCP-1) e *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES) (17-19).

O benefício da plasmaférese também foi relatado em revisão de McCarthy e colaboradores (2010), que relataram bons resultados com o uso da plasmaférese pré-transplante em pacientes de alto risco, prevenindo ou retardando o surgimento de GEFS, que pode ocorrer rapidamente após transplante renal nesses pacientes (20). Acredita-se que esse resultado positivo seja em decorrência da eliminação do

fator circulante responsável pelo surgimento/manutenção dos eventos relacionados com a doença renal (20). Le Berre e colaboradores (2009), utilizando modelo experimental de SN, demonstraram que ratos Bufallo/Mna que desenvolvem espontaneamente a GEFS, apresentaram recorrência da doença após serem transplantados com rins provenientes de ratos normais. Também foi observada remissão da doença quando rins nefróticos foram transplantados dos ratos Bufallo/Mna para ratos normais, confirmando a participação de algum fator de circulação extra-renal (21).

Outro mecanismo identificado como possível responsável pelas alterações podocitárias é a ligação na membrana, do receptor da uroquinase ativadora do plasminogênio (uPAR) com a integrina β_3 , promovendo ativação dessa integrina, que é associada ao apagamento dos processos podais e consequente proteinúria característicos da GEFS primária (22). A uPAR é uma proteína de membrana presente em várias células, incluindo podócitos. Como esta proteína não se encontra na circulação, ela não pode ser considerada como um fator circulante. No entanto, sua clivagem proteolítica pode liberar vários fragmentos de proteína circulantes conhecidos como receptores solúveis de uroquinase ativadora de plasminogênio (suPAR) a partir de células no interior da circulação, tais como os neutrófilos (23). O suPAR circula como vários fragmentos de diferentes tamanhos (20 - 55kDa) e a ausência de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer diferentes formas glicosiladas ou diferentes fragmentos de suPAR dificultam as investigações de como e quais fragmentos interferem na biologia podocitária (24, 25).

2.1.3 - Diferenciação de linfócitos

As células T são ativadas mediante a interação de seus receptores de superfície. Assim as células TCD4⁺ (T helper) *naives* podem se diferenciar em diversas subpopulações, tais como: T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper 17 (Th17), T helper 9 (Th9) e T reguladoras (Treg). Essas subpopulações de linfócitos T direcionam a resposta imune de forma a torná-la eficiente para as diversas situações onde há a necessidade de atuação dos linfócitos T helper. Por exemplo, a resposta imune anti-helmíntica é mais eficaz quando há a participação de linfócitos Th9. Já a resposta humoral, normalmente requer a participação mais efetiva dos linfócitos Th2. Essa denominação dada às subpopulações de linfócitos Th é determinada pelo padrão de citocinas produzidas e secretadas por essas células, além dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação dessas células (26). O fator determinante na diferenciação de células Th é o microambiente de citocinas existente no momento da ativação antígeno específica dessas células. No entanto, a natureza do antígeno e sua afinidade aos receptores envolvidos na ativação das células T, assim como outros elementos da resposta imune, tais como moléculas coestimuladoras ou inibidoras, também podem direcionar a diferenciação das células Th. As funções dos linfócitos Th1 e Th2 encontram-se na figura 1.

Os fatores de transcrição são elementos críticos para a diferenciação das células Th e consequente produção de citocinas. O destino da célula em cada linhagem requer pelo menos dois tipos de fatores de transcrição, os reguladores mestres e as proteínas sinalizadoras de transdução e ativação da transcrição (STAT). A atividade dos reguladores mestres é controlada pela sua expressão, enquanto que as proteínas STAT's são ativadas por meio de modificações pós-transcricionais, tais como a fosforilação. Algumas proteínas STAT's são

responsáveis por induzir a expressão de reguladores mestres. Além disso, as mesmas STATs e os reguladores mestres muitas vezes colaboram na regulação da produção de citocinas, agindo diretamente sobre os genes específicos. Os fatores essenciais de transcrição das linhagens Th são T-bet/Stat4 (Th1), GATA-3/STAT5 (Th2), ROR γ t/STAT3 (Th17), and Foxp3/STAT5 (Treg), respectivamente (figura 2).

A diferenciação em Th1 é iniciada por pela sinalização coordenada através do receptor de célula T (TCR) e receptores de citocinas associadas a proteína STAT1. Ambos os tipos de interferons, tipo I e tipo II, podem ativar STAT1 através de seus respectivos receptores (27-29), assim como a IL-27, uma citocina membro da família IL-12 (30).

Os receptores para cada uma destas citocinas são expressos em precursores de células T *naive* e são ativados por produtos de células estimuladas por patógenos do sistema imune inato. A ativação antígeno específica de STAT1 das células T *naives*, promove o aumento do fator de transcrição T-bet, que é o regulador mestre da diferenciação Th1 (31, 32). O T-bet potencializa a expressão gênica do IFN- γ e aumenta a expressão da cadeia induzível do receptor da IL-12 (IL-12R β 2) enquanto suprime fatores associados a Th2. A indução de um receptor de IL-12 durante a diferenciação das células Th1 possibilita a sinalização do IL-12 por meio da STAT4, o que potencializa ainda mais a produção de IFN- γ , e induz a expressão da IL-18Ra, conferindo assim, a capacidade de resposta a IL-18 por células Th1 maduras. Dessa forma, as células Th1 diferenciadas por meio da ação da IL-12 resultam em células efetoras maduras que podem produzir o IFN- γ , por vias dependente e independente do TCR, através de vias mediadas por IL-12 e IL-18 (33, 34). Sendo assim, tanto a IL-12 quanto o IFN- γ são duas citocinas importantes para a diferenciação em Th1 (35, 36).

A diferenciação de Th2 é iniciada por meio de sinalização via TCR em conjunto com a sinalização do receptor de IL-4, seguido da ativação de STAT6. Os sinais que emanam do TCR e dos receptores IL-4 agem em conjunto para aumentar a expressão de GATA-3, um regulador mestre de diferenciação Th2 (37, 38). O GATA-3 ativa sua própria expressão e induz mudanças epigenéticas no perfil de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e genes IL-13) enquanto suprime os fatores críticos para as vias de sinalização que levam à diferenciação de Th1, como STAT4 e a cadeia IL-12R β 2. Além disso, a sinalização da IL-4 previne a co-localização de TCR com os receptores de IFN- γ nas sinapses imunológicas entre células T e células apresentadoras de antígenos (APCs), sugerindo uma outra via em que a IL-4 poderia inibir o desenvolvimento de Th1 (39). Ainda podem estar envolvidas outras citocinas incluindo IL-2, IL-7 e linfopoietina estromal do timo (40-43).

O TGF- β desempenha um importante papel na diferenciação dos fenótipos Th17 e Treg. Em presença de IL-6 induz a diferenciação de Th17, enquanto em presença de IL-2, o TGF- β promove a diferenciação de células Treg (44, 45) (Figura 2). Recentemente, foi relatado o aumento da IL-17 em pacientes com SNI, sugerindo um papel de células Th17 na patogenia da doença (46).

É importante considerar que, de forma geral, mais de uma citocina são requeridas para a diferenciação em algum fenótipo celular particular. Além disso é necessário salientar que as citocinas podem promover a diferenciação e supressão de determinadas linhagens específicas de maneira concomitante. Sendo assim, células que são simultaneamente ou sequencialmente expostas a citocinas diversas cujos componentes normalmente induzem diferentes linhagens podem adquirir um fenótipo Th misto. Esse fato demonstra a complexidade dos eventos relacionados à diferenciação de células Th, principalmente no contexto *in vivo*. O controle e a

intensidade da ação das citocinas envolvidas nesse processo pode ocasionar efeitos indesejáveis que resultam em processos autoimunes órgão-específicos, doenças inflamatório-degenerativas e mesmo episódios alérgicos.

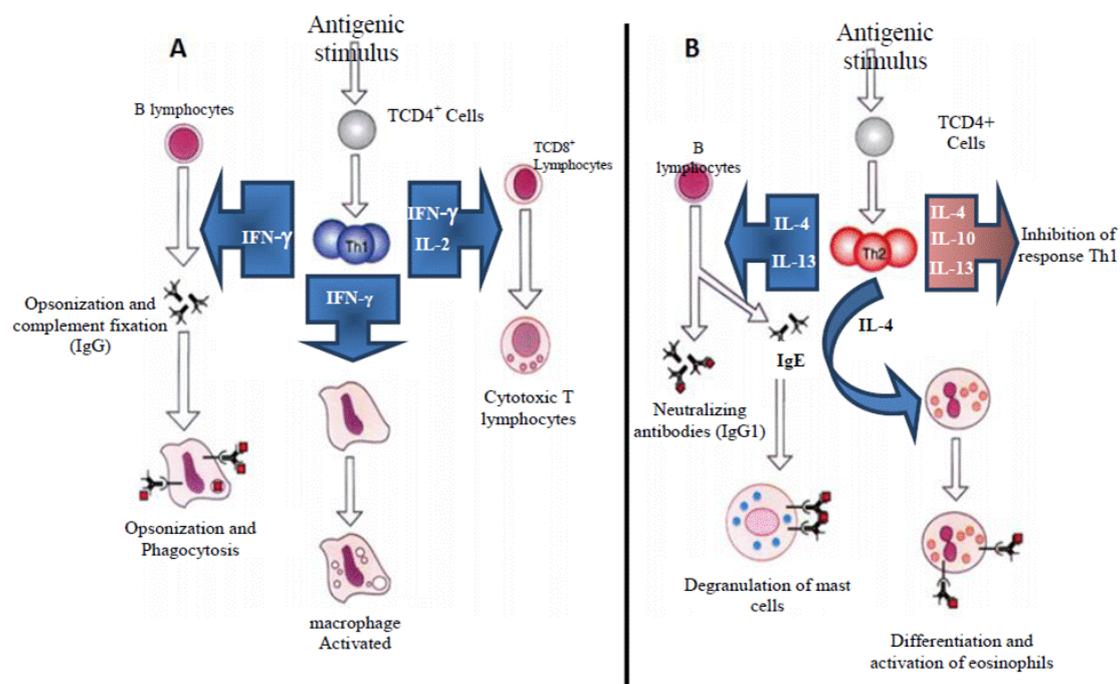


Figura 1 Funções dos linfócitos Th1 e Th2 – (A) Células Th1 induzem fagocitose e defesa, mediada por células T, contra microrganismos. (B) Células Th2 induzem produção de IgE e posterior degranulação de mastócitos e ativação de eosinófilos (14).

2.1.4- Células T reguladoras

Desde a década de 1970, foi cogitada a existência de uma subpopulação de células T com capacidade supressora, posteriormente denominada célula T reguladora (Treg) (47). Na tentativa de identificar essa subpopulação Treg especializada na supressão imunológica, Sakagushi e colaboradores (1995) observaram uma associação entre o surgimento de doenças auto-imunes e a depleção da população TCD4 que expressa CD25 em camundongos (48). Este estudo permitiu inicialmente caracterizar a população de células Treg como células

TCD4⁺ com expressão constitutiva da molécula CD25, um receptor de IL-2, tornando possível sua distinção das demais subpopulações de células T e conseqüentemente, a determinação de suas vias de desenvolvimento e a caracterização da sua potente atividade imunossupressora *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vitro* têm identificado uma longa lista de moléculas e vias metabólicas que contribuem para as atividades imunossupressoras de células Treg (49-52). No entanto, ainda não está claro o papel dessas moléculas e vias metabólicas nos efeitos *in vivo* das células Treg.

A principal célula com capacidade imunossupressora é o linfócito T regulador natural (nTreg), um linfócito TCD4⁺CD25^{high+} (53). No entanto, tendo em vista expressão induzida de CD25 em linfócitos em fase de expansão clonal, tornou-se necessária a busca de outros marcadores celulares que permitissem diferenciar células reguladoras, que apresentam expressão constitutiva de CD25, das células em fase de proliferação após ativação antígeno-específica, com expressão induzida de CD25. Sabe-se também que, ao contrário dos ratos, onde a maioria de células T CD4⁺CD25⁺ são potentemente supressoras, a população análoga nos seres humanos contém principalmente células efectoras ativadas e apenas uma pequena percentagem das células com maiores níveis de CD25 representam de fato células Tregs.

Nesse contexto, em 2001 foi identificado o fator de transcrição forkhead Box P3 (FoxP3) como sendo um controlador “mestre” para o desenvolvimento da função supressora de células TCD4⁺CD25⁺, permitindo, de maneira definitiva a determinação específica das células Treg (54). A partir de então diversos estudos em modelos animais e em humanos foram realizados no intuito de esclarecer os mecanismos de ação de FoxP3 nos contextos *in vitro* e *in vivo* (Para revisão, ver referência (55)).

As células Treg possuem a capacidade de suprimir a ativação, proliferação e as funções efetoras tais como a produção de citocinas de uma ampla variedade de células efetoras imunitárias *in vivo* e *in vitro*, incluindo células TCD4⁺ e TCD8⁺, células NK e NKT, células B e células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas ou macrófagos (56, 57). A deficiência ou ineficiência das células Treg está relacionada com a desordem autoimune hereditária fatal em camundongos e humanos (58) e com várias doenças auto-imunes (59).

Além das nTregs, as células Treg induzidas (iTreg) também apresentam capacidade supressora. As células iTreg originam-se na circulação periférica a partir da célula TCD4⁺ virgem (*naïves*) sob a ação de estímulos antigênicos (53) ou de citocinas imunossupressoras, como o TGF- β (60) (figura 2). As iTregs são subdivididas em Th3 (produtoras de TGF- β) e Tr1 (produtoras de IL-10 e IFN-alfa) (61). O responsável pela conversão das células TCD4 virgens em TCD4 reguladoras é o fator de transcrição FoxP3 e sua expressão em células Treg pode modificar ou aumentar a capacidade de regulação dessas células por múltiplos mecanismos (60, 61), dessa forma, FoxP3 torna as células Treg capazes de funcionar como células citotóxicas, eliminando diretamente células efetoras, de forma semelhante às células CD8⁺ citotóxicas. As células Treg que expressam FoxP3 podem apresentar em sua superfície celular moléculas como a galectina-1 capazes de interagir com receptores nas células T efetoras e interromper o ciclo celular. Outras funções relatadas são a inibição de células apresentadoras de antígenos (APCs), a secreção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- β e através do contato direto com as células (62, 63).

As células T efetoras podem expressar FoxP3, mas apenas transitoriamente e em níveis significativamente menores do que os presentes em células Tregs.

Acredita-se que os níveis reduzidos de FoxP3 em células T efetoras sejam insuficientes para suprimir a expressão de moléculas alvo relacionadas ao FoxP3, incluindo o receptor de citocina 7 (CD127), a IL-2 e o IFN- γ (64).

Outras moléculas indissociavelmente ligadas às funções Treg, como o antígeno-4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD152), GITR (gene induzido por glicocorticoides relacionado à família TNFR), CD39 (trifosfato de ectonucleosídeo difosfohidrolase-1) e CD95 (receptor FAS) são úteis para descrever o subconjunto de células Treg (65, 66). O CTLA-4, expresso na superfície de células Treg, pode mediar diretamente a supressão em células T ativadas por antígenos, induzindo a enzima indolamina 2, 3-dioxigenase e interagindo com CD80 e/ou CD86 em células dendríticas. Desta forma o CTLA-4 remove as moléculas CD80 e CD86 presentes na superfície dessas células, internalizando-as e degradando-as nas vesículas lisossomais das células T (63). Ao deixar de expressar CD80/CD86, as células apresentadoras de antígeno tornam-se incapazes de fornecer o sinal co-estimulatório às células T efetoras via CD28 (67, 68). A célula CTLA-4⁺ também possui capacidade de inibir a resposta imune por meio da inibição da secreção de IFN- γ , IL-2, IL-7 e IL-13 além de ativar a secreção de TGF- β e IL-10 (69).

Embora a presença do CTLA-4 não seja suficiente para a identificação das células Treg, tal antígeno é tipicamente expresso em células T efetoras após a ativação (63) e a sua deficiência prejudica a função imunossupressora das células Treg *in vivo* e *in vitro* em ratos (70). Sendo assim, essa molécula auxilia de forma significativa a determinação da subpopulação de células Tregs efetoras. Outro fator que reforça o papel do CTLA-4 é o fato de que em animais com deleção genética de CTLA-4, a função Treg é abolida com conseqüente promoção da auto-imunidade, que provoca morte prematura em decorrência de inflamação sistêmica (71, 72).

2.1.5- Papel das Células T reguladoras na SNI

Estudos recentes sugerem que o FoxP3 pode estar associado ao desenvolvimento da SNI (73, 74). Em relato de caso de SNI que apresentou infecção pelo vírus Influenza B, houve remissão da doença no decorrer da infecção sem uso de medicação. Em seguida, houve recidiva da doença, que foi tratada com sucesso com prednisolona (73). Tanto a indução da remissão, quanto a resposta melhora na resposta à prednisolona foram associadas ao aumento do número de células Tregs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ circulantes, sugerindo que tanto a infecção pelo vírus da influenza B, quanto a administração de corticoesteroides, podem aumentar o número de células Tregs circulantes nos pacientes com SNCS (73). Outra evidência da relevância das Treg no curso da SNI surgiu com o trabalho de Benz e colaboradores (2010), que observaram níveis menores de células $Foxp3^+$ em pacientes com GEFS, SNLM e SNCD do que no grupo controle (74).

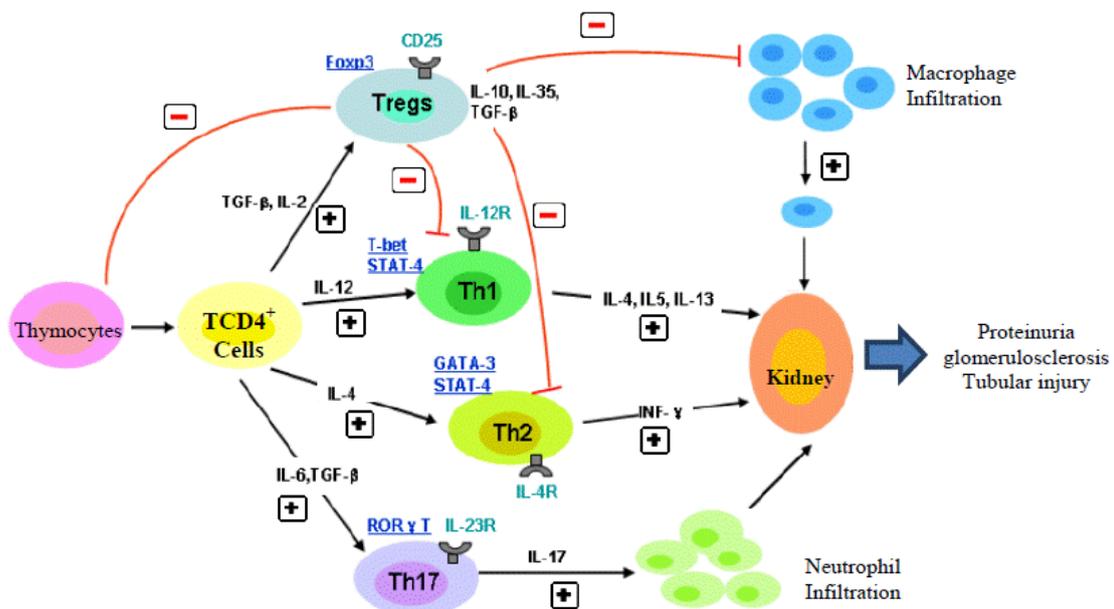


Figura 2. Função supressora das células T reguladoras - Mecanismos e vias desencadeadas pelas células T-reguladoras. Th1 e Th2 resposta relacionada à inflamação renal, infiltração de células, proteinúria, glomerulosclerose e lesão tecidual. IL = interleucina; LTCD4 + = linfócitos TCD4 +; Th = resposta T-helper; TGF-β = fator de crescimento transformador – beta (14).

Sugere-se que a eficiência da capacidade reguladora desempenhada pelas células Treg pode sofrer interferências de outras subpopulações leucocitárias. Dentre essas subpopulações encontram-se as células Th-17 e as células NKT.

As células T reguladoras (Treg) e células (Th17) foram descritas como dois subconjuntos distintos de células Th2 e Th1, que desempenham papéis opostos *in vivo* (75). Células Treg que expressam Foxp3 têm um papel anti-inflamatório através do contato direto com as células ou pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como a IL-10 e o TGF- β 1 (76), enquanto células Th17 expressando receptor de ácido retinóico relacionado ao receptor γ t (ROR γ t) desempenham um papel crucial na indução de resposta auto-imune e inflamação, por produzirem citocinas tais como IL-17, fator de necrose tumoral (TNF)- α , e IL-6 (77). Assim, o equilíbrio entre a ação de células Th17 e Treg pode ser importante no desenvolvimento / prevenção de doenças inflamatórias e auto-imunes (78).

Em estudo realizado com crianças com SNI, Shao e colaboradores (2009), encontraram redução na frequência de células T reguladoras e aumento na frequência das células Th17 em células mononucleares do sangue periférico, sendo sugerido que o aumento na relação celular Th17/Treg pode induzir inflamação tecidual local e contribuir para a lesão renal, proteinúria e progressão da SNI (46).

Estudos recentes têm avaliado a inibição da resposta Th17 como forma de tratamento de doenças, tendo o estudo de Huh e colaboradores (2011) obtido sucesso com uso da digoxina na supressão da diferenciação de células Th17 devido ao seu efeito antagônico sobre a atividade do ROR γ t (79), podendo originar novas possibilidades terapêuticas no futuro.

Ao contrário das células Th17, as células NKT parecem exercer um efeito protetor sobre a função das células Treg. Ao investigarem um modelo combinado de

transplante de medula e de coração, Hongo e colaboradores (2012) constataram que o aumento de células NKT e de células Foxp3⁺ nos tecidos de órgãos transplantados reduziu a incidência da rejeição a transplantes, tendo sido essa capacidade em contribuir para a tolerância a órgãos transplantados, atribuída tanto às células Tregs de ocorrência natural quanto às induzidas (80).

2.1.6- Migração e ativação celular na SNI

No mecanismo de migração leucocitária, inicialmente ocorre o aprisionamento e adesão firme dessas células na superfície endotelial e em seguida a migração através do endotélio vascular. A ligação dos leucócitos ao endotélio envolve rolamento mediado pelas selectinas seguidas por firme adesão mediada pela ativação das integrinas, que, por sua vez, decorre da interação de glicoproteínas transmembranas amplamente distribuídas na superfície das células endoteliais com os seus receptores cognatos em leucócitos (81, 82).

As integrinas formam heterodímeros por ligações covalentes entre as subunidades alfa (α) e beta (β) e constituem quatro famílias (83). A família beta 2 das integrinas é constituída pela subunidade beta 2 (β 2), denominada CD18, em combinação com uma das quatro subunidades alfa, ou seja, α L (CD11a), α M (CD11b), α X(CD11c) ou α D (CD11d). Estas combinações formam, respectivamente, as integrinas α L β 2 (LFA-1); α M β 2 (mac-1); α X β 2 e α D β 2 (82). Após estímulos lesivos, sinais quimiotáticos ativam as integrinas e induzem a fixação e rolamento dos leucócitos através da parede vascular (84). A integrina CD18 se liga a molécula de adesão intercelular (ICAM) na superfície das células endoteliais (85, 86). Ocorre aumento da expressão das ICAM pela ação de Citocinas e quimiocinas com consequente ativação das integrinas na superfície dos leucócitos, induzindo assim

maior fixação e extravasamento celular (82, 87). Portanto, o aumento na expressão das integrinas está diretamente relacionado aos mecanismos de ativação e migração celular.

Diferentes estudos tem buscado caracterizar os mecanismos de ativação e migração celular no desenvolvimento da SNI. Em estudo recente utilizando modelo experimental de síndrome nefrótica induzida pela doxorubicina em ratos, foi detectado aumento na expressão de CD18 em linfócitos T citotóxicos, assim como em células NK, sugerindo maior atividade migratória dos linfócitos T citotóxicos e das células NK para o tecido renal (88).

Os leucócitos podem responder sequencialmente às quimiocinas, que constituem um grupo de citocinas de baixo peso molecular cuja principal ação é o recrutamento e ativação de leucócitos em vários modelos de inflamação. Essa resposta pode ocorrer em várias etapas, permitindo a migração através do endotélio por meio de um receptor de quimiocina, através do interstício pela ação de um segundo receptor, e para o microambiente alvo utilizando ainda um terceiro receptor (89). Sendo assim, as múltiplas interações entre quimiocinas e seus receptores podem proporcionar variáveis padrões migratórios para diferentes subpopulações de leucócitos (90).

As quimiocinas na superfície das células endoteliais reagem com o receptor cognato dos leucócitos ativando as integrinas e promovendo firme adesão e rolamento celular que favorecem migração direcionada dos leucócitos para microambientes específicos através de vários gradientes quimioatrativos. (81, 82).

O TGF- β tem sido frequentemente relacionado à progressão das lesões renais através de seus efeitos fibrogênicos e por vezes pró-inflamatórios (91-93). O

TGF- β induz acúmulo de monócitos e de fibroblastos por estimular o aumento da expressão das quimiocinas MCP-1 e RANTES (17, 94, 95).

Outra quimiocina de interesse no estudo da fisiopatologia da SNI é a interleucina-8 (IL-8/CXCL8), um peptídeo produzido por células endoteliais e macrófagos, que tem a função de atrair neutrófilos e linfócitos para o tecido inflamado (95, 96). Vários estudos têm mostrado a elevação dos níveis séricos e urinários de IL-8/CXCL8 durante episódios de recidiva da SN (97, 98), enquanto que outros sugerem um papel dessa quimiocina na indução de proteinúria (99, 100).

Recentes avanços na análise de receptores de quimiocinas demonstram que sua expressão é um evento importante na diferenciação e polarização da resposta mediada por células T. Dessa forma, alguns estudos têm correlacionado a expressão de diferentes receptores de quimiocinas com a diferenciação da resposta imune em Th1 e Th2 (101, 102).

Foram descritos nove receptores para as quimiocinas CC (denominados CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8 e CCR9) e cinco para as quimiocinas CXC (denominados CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 E CXCR5) (103).

A expressão dos receptores CCR1, CXCR3 e CCR5 têm sido associada à resposta Th1, enquanto os receptores CCR3 e CCR4 foram associados à resposta Th2. Por outro lado, a expressão do receptor CCR2 tem sido associada à resposta do tipo 0 (101).

Ainda são escassos os estudos relacionando o comportamento de receptores de quimiocinas na SNI (104), podendo ser um alvo importante para futuras investigações.

2.1.7 - Citocinas na SNI

O papel das citocinas na SNI tem sido controverso. Enquanto estudos indicam aumento de IL-4, IL-10 e IL-13, sugerindo predomínio de resposta Th2, frequentemente é relatado aumento do TNF- α , que está mais associado a linfócitos Th1 (97, 105, 106). A hipótese do predomínio da resposta com padrão Th2 é reforçada pela associação entre SNI e alergia, sendo que alguns estudos demonstraram aumento de IgE e maior incidência de doenças alérgicas em pacientes com SN (105, 107).

No entanto, diversos estudos indicam predomínio da resposta Th1. Garin e colaboradores (2000) demonstraram a participação do TNF- α na SN após induzirem proteinúria em camundongos portadores de SN após injeção com TNF- α (99). Em outro estudo, Le Berre e colaboradores (2005), utilizaram ratos Buffalo/Mna que desenvolvem naturalmente a síndrome nefrótica com glomérulo esclerose focal e segmentar, tendo detectado elevado nível de TNF- α antes do início da fase de proteinúria, que se normalizou após o surgimento desta, sugerindo sua participação no início da lesão renal (108).

No estudo de Le Berre, o IFN- γ , assim como a IL-2 quase não foram detectados e chegaram a se apresentar reduzidos em relação ao controle durante o período de observação, sugerindo redução da resposta Th1. No entanto, outros estudos como o de Lama e colaboradores (2002), realizado com crianças com SNCS, obtiveram resultados sugestivos de resposta Th1, com aumento de IL-2, IL-2R, IFN- γ e TNF- α (109).

Em virtude dos resultados controversos, Araya e colaboradores (2006) afirmam não existirem evidências contundentes para definir um predomínio da resposta Th2 na SNI (97), sendo que a diversidade de resultados pode ser atribuída

à falta de padronização na escolha dos pacientes com SNI e às diferentes técnicas utilizadas para se mensurar os níveis de citocinas (97, 109, 110).

2.1.8- Considerações finais

A SNI tem apresentado um comportamento mais agressivo nos últimos anos, relacionado à maior incidência de GEFS e à evolução potencial para DRC em estágio terminal.

Até o presente momento não há definição consensual de marcadores laboratoriais capazes de caracterizar melhor a doença. Sendo assim, o prognóstico é estabelecido após a avaliação da resposta ao tratamento com terapia anti-inflamatória realizada com corticosteroides. No entanto, este tratamento não é eficaz para todos os pacientes, além de desencadear efeitos adversos.

A determinação de marcadores inflamatórios tem mostrado resultados promissores, correlacionando-se bem com o padrão de evolução das glomerulopatias, ou com o grau de proteinúria (111), surgindo como uma perspectiva promissora para a escolha da modalidade terapêutica ideal e para a determinação do prognóstico da doença.

Por outro lado, ainda persistem muitas dúvidas em relação à fisiopatologia da SNI. Os estudos apresentam resultados distintos, provavelmente devido a diferenças nas metodologias de quantificação de citocinas e à heterogeneidade dos grupos estudados. Dessa forma, assumem grande importância estudos bem delineados que avaliem potenciais biomarcadores para a SNI.

REFERÊNCIAS

1. Gitlin D, Janeway CA, Farr LE. Studies on the metabolism of plasma proteins in the nephrotic syndrome. I. Albumin, gamma-globulin and iron-binding globulin. *J Clin Invest.* 1956 Jan;35(1):44-56. PubMed PMID: 13278400. Pubmed Central PMCID: 438777.
2. Fodor P, Saitua MT, Rodriguez E, Gonzalez B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child.* 1982 Aug;136(8):713-7. PubMed PMID: 6980586. Epub 1982/08/01. eng.
3. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet.* 1974 Sep 7;2(7880):556-60. PubMed PMID: 4140273.
4. Lagrue G, Branellec A, Blanc C, Xheneumont S, Beaudoux F, Sobel A, et al. A vascular permeability factor in lymphocyte culture supernants from patients with nephrotic syndrome. II. Pharmacological and physicochemical properties. *Biomedicine / [publiee pour l'AAICIG].* 1975 Feb 28;23(2):73-5. PubMed PMID: 168931.
5. Giangiacomo J, Cleary TG, Cole BR, Hoffsten P, Robson AM. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. A possible cause of minimal-change nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1975 Jul 3;293(1):8-12. PubMed PMID: 1079322.
6. Herrod HG, Stapleton FB, Trouy RL, Roy S. Evaluation of T lymphocyte subpopulations in children with nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1983 Jun;52(3):581-5. PubMed PMID: 6603300. Pubmed Central PMCID: 1536051.
7. Boulton Jones JM, Tulloch I, Dore B, McLay A. Changes in the glomerular capillary wall induced by lymphocyte products and serum of nephrotic patients. *Clin Nephrol.* 1983 Aug;20(2):72-7. PubMed PMID: 6352108.
8. Moorthy AV, Zimmerman SW, Burkholder PM. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by plasma of patients with minimal-change nephrotic syndrome. *Lancet.* 1976 May 29;1(7970):1160-2. PubMed PMID: 58203.
9. Lagrue G, Branellec A, Xheneumont S, Weil B. Lymphokine 'skin reactive factor' (SRF) and the nephrotic syndrome. *Bibliotheca anatomica.* 1975;13:331-4. PubMed PMID: 1231773.
10. Tanaka R, Yoshikawa N, Nakamura H, Ito H. Infusion of peripheral blood mononuclear cell products from nephrotic children increases albuminuria in rats. *Nephron.* 1992;60(1):35-41. PubMed PMID: 1738411.
11. Weber S, Tonshoff B. Recurrence of focal-segmental glomerulosclerosis in children after renal transplantation: clinical and genetic aspects. *Transplantation.* 2005 Sep 27;80(1 Suppl):S128-34. PubMed PMID: 16286890.

12. Kausman JY, Kitching AR. A new approach to idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Oct;18(10):2621-2. PubMed PMID: 17898235.
13. Hashimura Y, Nozu K, Kanegane H, Miyawaki T, Hayakawa A, Yoshikawa N, et al. Minimal change nephrotic syndrome associated with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Jun;24(6):1181-6. PubMed PMID: 19189134.
14. de Fatima Pereira W, Brito-Melo GE, Guimaraes FT, Carvalho TG, Mateo EC, Simoes ESAC. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2013 Oct 11. PubMed PMID: 24121975.
15. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003 Aug 23;362(9384):629-39. PubMed PMID: 12944064.
16. Dantal J, Bigot E, Bogers W, Testa A, Kriaa F, Jacques Y, et al. Effect of plasma protein adsorption on protein excretion in kidney-transplant recipients with recurrent nephrotic syndrome. *N Engl J Med*. 1994 Jan 6;330(1):7-14. PubMed PMID: 8259160.
17. Wang SN, Hirschberg R. Tubular epithelial cell activation and interstitial fibrosis. The role of glomerular ultrafiltration of growth factors in the nephrotic syndrome and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 1999 Sep;14(9):2072-4. PubMed PMID: 10489207.
18. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annual review of medicine*. 2006;57:365-80. PubMed PMID: 16409155.
19. AA E. Immune mechanisms of glomerular injury. In: Wilkins LW, editor. *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P; 2004. p. 575-600.
20. McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010 Nov;5(11):2115-21. PubMed PMID: 20966123.
21. Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, et al. Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jan;20(1):57-67. PubMed PMID: 19020006. Pubmed Central PMCID: 2615726.
22. Wei C, Moller CC, Altintas MM, Li J, Schwarz K, Zacchigna S, et al. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nature medicine*. 2008 Jan;14(1):55-63. PubMed PMID: 18084301.
23. Furlan F, Orlando S, Laudanna C, Resnati M, Basso V, Blasi F, et al. The soluble D2D3(88-274) fragment of the urokinase receptor inhibits monocyte

chemotaxis and integrin-dependent cell adhesion. *Journal of cell science*. 2004 Jun 15;117(Pt 14):2909-16. PubMed PMID: 15173320.

24. Jefferson JA, Shankland SJ. Has the circulating permeability factor in primary FSGS been found? *Kidney Int*. 2013 Aug;84(2):235-8. PubMed PMID: 23903418. Pubmed Central PMCID: 3733481.

25. Thuno M, Macho B, Eugen-Olsen J. suPAR: the molecular crystal ball. *Disease markers*. 2009;27(3):157-72. PubMed PMID: 19893210. Pubmed Central PMCID: 3835059.

26. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1557-69. PubMed PMID: 18725574. Pubmed Central PMCID: 2518872.

27. Hibbert L, Pflanz S, De Waal Malefyt R, Kastelein RA. IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2003 Sep;23(9):513-22. PubMed PMID: 14565860.

28. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Dec 9;100(25):15047-52. PubMed PMID: 14657353. Pubmed Central PMCID: 299900.

29. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity*. 2002 Jun;16(6):779-90. PubMed PMID: 12121660.

30. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature reviews Immunology*. 2005 Jul;5(7):521-31. PubMed PMID: 15999093.

31. Mullen AC, High FA, Hutchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, et al. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science*. 2001 Jun 8;292(5523):1907-10. PubMed PMID: 11397944.

32. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 2000 Mar 17;100(6):655-69. PubMed PMID: 10761931.

33. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity*. 1997 Oct;7(4):571-81. PubMed PMID: 9354477.

34. Yang J, Murphy TL, Ouyang W, Murphy KM. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter

activation. *European journal of immunology*. 1999 Feb;29(2):548-55. PubMed PMID: 10064070.

35. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Dec 18;98(26):15137-42. PubMed PMID: 11752460. Pubmed Central PMCID: 64996.

36. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547-9. PubMed PMID: 8097338.

37. Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity*. 1998 Nov;9(5):745-55. PubMed PMID: 9846495.

38. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*. 1997 May 16;89(4):587-96. PubMed PMID: 9160750.

39. Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature*. 2004 Sep 30;431(7008):527-32. PubMed PMID: 15386021.

40. Le Gros G, Ben-Sasson SZ, Seder R, Finkelman FD, Paul WE. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *Journal of immunology*. 2008 Sep 1;181(5):2943-51. PubMed PMID: 18713964.

41. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of immunology*. 1990 Dec 1;145(11):3796-806. PubMed PMID: 2147202.

42. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 1992 Oct 1;176(4):1091-8. PubMed PMID: 1328464. Pubmed Central PMCID: 2119379.

43. Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992 Jul 1;89(13):6065-9. PubMed PMID: 1385868. Pubmed Central PMCID: 49438.

44. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological reviews*. 2010 Nov;238(1):247-62. PubMed PMID: 20969597. Pubmed Central PMCID: 2975272.

45. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179-89. PubMed PMID: 16473830.
46. Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Xie YY, Wang XG, et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Sep;24(9):1683-90. PubMed PMID: 19499249.
47. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May;18(5):723-37. PubMed PMID: 4911896. Pubmed Central PMCID: 1455602.
48. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64. PubMed PMID: 7636184.
49. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *International immunology*. 1998 Apr;10(4):371-8. PubMed PMID: 9620592.
50. Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A, Rudensky A. Homeostasis and energy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nature immunology*. 2002 Jan;3(1):33-41. PubMed PMID: 11740498.
51. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *Journal of immunology*. 1998 Feb 1;160(3):1212-8. PubMed PMID: 9570536.
52. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1985 Jan 1;161(1):72-87. PubMed PMID: 3871469. Pubmed Central PMCID: 2187548.
53. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004 May 17;199(10):1401-8. PubMed PMID: 15148338. Pubmed Central PMCID: 2211808.
54. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68-73. PubMed PMID: 11138001.
55. Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *European journal of immunology*. 2007 Nov;37 Suppl 1:S116-23. PubMed PMID: 17972355.

56. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmunity reviews*. 2010 Dec;10(2):112-5. PubMed PMID: 20807589.
57. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*. 2007 Mar;13(3):108-16. PubMed PMID: 17257897.
58. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):330-6. PubMed PMID: 12612578.
59. Miyara M, Gorochov G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011 Oct;10(12):744-55. PubMed PMID: 21621000.
60. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1875-86. PubMed PMID: 14676299. Pubmed Central PMCID: 2194145.
61. Le NT, Chao N. Regulating regulatory T cells. *Bone marrow transplantation*. 2007 Jan;39(1):1-9. PubMed PMID: 17057725.
62. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007 Feb 15;445(7129):771-5. PubMed PMID: 17220874.
63. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636-45. PubMed PMID: 19464986.
64. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology*. 2007 Apr;19(4):345-54. PubMed PMID: 17329235.
65. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *Journal of immunology*. 2001 Aug 1;167(3):1245-53. PubMed PMID: 11466340.
66. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87. PubMed PMID: 18510923.
67. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3. PubMed PMID: 21474713. Pubmed Central PMCID: 3198051.

68. Rudd CE. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nature reviews Immunology*. 2008 Feb;8(2):153-60. PubMed PMID: 18219311.
69. Simone R, Pesce G, Antola P, Rumbullaku M, Bagnasco M, Bizzaro N, et al. The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses. *BioMed research international*. 2014;2014:215763. PubMed PMID: 24605322. Pubmed Central PMCID: 3925529.
70. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271-5. PubMed PMID: 18845758.
71. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8. PubMed PMID: 7481803.
72. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995 Nov;3(5):541-7. PubMed PMID: 7584144.
73. Kimata T, Tsuji S, Kino J, Kitao T, Yamanouchi S, Kaneko K. Close association between proteinuria and regulatory T cells in patients with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013 Apr;28(4):667-9. PubMed PMID: 23263711.
74. Benz K, Buttner M, Dittrich K, Campean V, Dotsch J, Amann K. Characterisation of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jul;25(7):1291-8. PubMed PMID: 20386928.
75. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective. *Nature reviews Immunology*. 2009 Dec;9(12):883-9. PubMed PMID: 19935807.
76. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, et al. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunological reviews*. 2006 Aug;212:8-27. PubMed PMID: 16903903.
77. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nature immunology*. 2007 Apr;8(4):345-50. PubMed PMID: 17375096.
78. Homey B. [After TH1/TH2 now comes Treg/TH17: significance of T helper cells in immune response organization]. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. 2006 Aug;57(8):730-2. PubMed PMID: 16858592. Nach TH1/TH2 kommt nun Treg/TH17 : Bedeutung von T-Helfer-Zellen in der Organisation von Immunantworten.
79. Huh JR, Leung MW, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR, et al. Digoxin and its derivatives suppress TH17 cell differentiation by antagonizing

RORgammat activity. *Nature*. 2011 Apr 28;472(7344):486-90. PubMed PMID: 21441909. Pubmed Central PMCID: 3172133.

80. Hongo D, Tang X, Dutt S, Nador RG, Strober S. Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1581-9. PubMed PMID: 22174155. Pubmed Central PMCID: 3286219.

81. Picker LJ, Butcher EC. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annual review of immunology*. 1992;10:561-91. PubMed PMID: 1590996.

82. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan 28;76(2):301-14. PubMed PMID: 7507411.

83. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*. 2006 Oct 1;119(Pt 19):3901-3. PubMed PMID: 16988024. Pubmed Central PMCID: 3380273.

84. Penberthy TW, Jiang Y, Graves DT. Leukocyte adhesion molecules. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1997;8(4):380-8. PubMed PMID: 9391751.

85. Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica*. 1995 Mar-Apr;80(2):161-75. PubMed PMID: 7628754.

86. Li R, Xie J, Kantor C, Koistinen V, Altieri DC, Nortamo P, et al. A peptide derived from the intercellular adhesion molecule-2 regulates the avidity of the leukocyte integrins CD11b/CD18 and CD11c/CD18. *The Journal of cell biology*. 1995 May;129(4):1143-53. PubMed PMID: 7744962. Pubmed Central PMCID: 2120492.

87. Carr MW, Alon R, Springer TA. The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes. *Immunity*. 1996 Feb;4(2):179-87. PubMed PMID: 8624808.

88. Pereira WdF. Análises bioquímicas, biométricas, histológicas e imunológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas; 2013 (Tese).

89. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annual review of immunology*. 1997;15:675-705. PubMed PMID: 9143704.

90. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today*. 1998 Dec;19(12):568-74. PubMed PMID: 9864948.

91. August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney international Supplement*. 2003 Nov(87):S99-104. PubMed PMID: 14531781.
92. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2002 Jul;8(7):RA145-51. PubMed PMID: 12118214.
93. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2007 Mar;22(3):350-4. PubMed PMID: 17216262. Pubmed Central PMCID: 1794138.
94. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Dec;17(12):2145-52. PubMed PMID: 12454225.
95. Qi W, Chen X, Polhill TS, Sumual S, Twigg S, Gilbert RE, et al. TGF-beta1 induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006 Mar;290(3):F703-9. PubMed PMID: 16204411.
96. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine & growth factor reviews*. 1998 Mar;9(1):9-23. PubMed PMID: 9720753.
97. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, et al. A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2006 May;21(5):603-10. PubMed PMID: 16525836.
98. Cho MH, Lee HS, Choe BH, Kwon SH, Chung KY, Koo JH, et al. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol*. 2003 Jul-Aug;23(4):260-6. PubMed PMID: 12840601.
99. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2000 Aug;14(8-9):872-8. PubMed PMID: 10955948.
100. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res*. 2008 Dec;64(6):637-42. PubMed PMID: 18679168.
101. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med*. 1998 Mar 16;187(6):875-83. PubMed PMID: 9500790. Pubmed Central PMCID: 2212187.

102. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998 Jan 5;187(1):129-34. PubMed PMID: 9419219. Pubmed Central PMCID: 2199181.
103. Segerer S. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S15-8. PubMed PMID: 12612944.
104. Lotan D, Sheinberg N, Kopolovic J, Dekel B. Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys. *Pediatr Nephrol*. 2008 Jan;23(1):71-7. PubMed PMID: 17972109.
105. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical science*. 2004 Aug;107(2):125-36. PubMed PMID: 15157184.
106. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Feb;18(2):245-8. PubMed PMID: 12543875.
107. Lin CY, Lee BH, Lin CC, Chen WP. A study of the relationship between childhood nephrotic syndrome and allergic diseases. *Chest*. 1990 Jun;97(6):1408-11. PubMed PMID: 2347227.
108. Le Berre L, Herve C, Buzelin F, Usal C, Souillou JP, Dantal J. Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *Kidney Int*. 2005 Nov;68(5):2079-90. PubMed PMID: 16221207.
109. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2002 May;39(5):958-65. PubMed PMID: 11979339.
110. Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Macrophage inflammatory protein-1beta and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2009 Aug;51(4):443-7. PubMed PMID: 19400824.
111. Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007 Nov;22(11):1849-59. PubMed PMID: 17394023.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar alterações imunológicas em leucócitos do sangue periférico de crianças e adolescentes com SNI, subdivididas de acordo com a resposta à terapia com corticoides e a atividade da doença, ou seja, presença ou ausência de proteinúria significativa.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar populações e subpopulações de linfócitos, do sangue periférico de crianças e adolescentes com SNI, subdivididos conforme a resposta à corticoterapia e a persistência ou não de proteinúria significativa;
- Avaliar o perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias intracitoplasmáticas em cultura do sangue periférico de crianças e adolescentes com SNI, subdivididos conforme a persistência ou não de proteinúria significativa;
- Avaliar parâmetros relacionados à migração e ativação celular em linfócitos do sangue periférico em crianças e adolescentes com SNI, subdivididos conforme a resposta à corticoterapia;
- Avaliar células T com perfil regulador em linfócitos do sangue periférico em crianças e adolescentes com SNI subdivididos conforme a resposta à corticoterapia;
- Comparar os parâmetros obtidos nos subgrupos de pacientes com SNI com os resultados da análise de crianças e adolescentes saudáveis (grupo controle).

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 - Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal com amostra de conveniência, perfazendo um total de 54 crianças (36 do sexo masculino e 18 do sexo feminino).

4.2 - Critérios de inclusão

Grupo caso – Foram incluídos todos os pacientes pediátricos com diagnóstico confirmado de SNI (n=44, sendo 29 do sexo masculino e 15 do sexo feminino) segundo critérios estabelecidos pelo *International Study of Kidney Disease in Children* (1), em acompanhamento regular na Unidade de Nefrologia Pediátrica, no período de abril de 2010 a março de 2012, e que aceitaram participar do estudo. Caso os pacientes com SNI tivessem apresentado episódio atual ou recente de doença infecciosa e/ou alérgica a coleta era adiada por tempo mínimo de duas semanas após a recuperação das referidas alterações.

Grupo controle – Foram incluídas crianças saudáveis pareadas em sexo e idade com os casos (CON, n=10, sendo 7 do sexo masculino e 3 do sexo feminino), sem alterações ao exame clínico e que não apresentavam histórico de nefropatias, doenças crônicas, alergias ou infecções recentes.

4.3 - Critérios de exclusão

Grupo caso – Pacientes com síndrome nefrótica congênita e com síndrome nefrótica secundária a doenças sistêmicas foram excluídos do estudo. Também

foram excluídos os pacientes cujo tempo de acompanhamento e/ou a propedêutica não permitiram confirmar o diagnóstico de SNI.

Grupo controle – Foram excluídas as crianças e adolescentes que apresentavam quaisquer alterações ao exame clínico que sugerissem doenças agudas ou crônicas capazes de interferir com a resposta imunológica, assim como em uso de medicação imuno-moduladora. A história pregressa de nefropatias, doenças crônicas, alergias e infecções recentes (há duas semanas) também foi critério de exclusão.

4.4 - Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO 1) e da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (ANEXO 2). Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis por todos os sujeitos da pesquisa, bem como dos pacientes e controles (ANEXOS 3 e 4). Ressalta-se ainda que, em nenhum momento, o protocolo de estudo interferiu com qualquer prescrição ou recomendação médica (ANEXO 5) e foi devidamente respeitado o direito de recusa por parte dos responsáveis ou dos sujeitos em participar da pesquisa.

4.5 Protocolo do estudo

Os pacientes com SNI foram subdivididos de acordo com a resposta terapêutica: grupo córtico-sensível, que apresenta resposta rápida e prolongada ao corticóide (SNCS, n=30, sendo 21 meninos e 9 meninas) e grupo córtico-resistente/dependente, incluindo pacientes que não respondem ao corticóide, ou que não toleram a retirada do mesmo (SNCR, n=14, sendo 8 meninos e 6 meninas). Os

pacientes foram também subdivididos de acordo com a atividade da doença, caracterizada pela persistência de proteinúria (2-4): pacientes com proteinúria igual ou superior a 200mg em urina coletada por 24 horas [proteinúria elevada (PE), n=17] e pacientes com proteinúria reduzida ou ausente quando inferior a 200mg em urina coletada por 24 horas [proteinúria reduzida (PR), n=27].

Os pacientes com SNI foram submetidos aos seguintes exames de rotina, que fazem parte do protocolo de seguimento da Unidade de Nefrologia Pediátrica do HC-UFMG: no sangue, foram dosados albumina, colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina, ácido úrico. Na urina de 24 horas, foram analisados proteína e creatinina. Na urina de amostra única e exame bioquímico. O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado usando a fórmula de Schwartz (5).

Em relação aos pacientes com SNI, as coletas de sangue para avaliação dos parâmetros imunológicos foram concomitantes à coleta para os exames de sangue de rotina mencionados acima. Os controles saudáveis realizaram as coletas de sangue em uma única ocasião, específica para avaliação dos parâmetros imunológicos.

4.5.1 - Coleta e processamento das amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis contendo os anticoagulantes, ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA) e heparina. As amostras coletada em tubos com EDTA foram utilizadas, para análise *ex vivo* das populações e subpopulações de leucócitos, dos parâmetros reguladores, migratórios e de ativação celular por citometria de fluxo.

As amostras coletadas em tubos heparinizados foram utilizadas para a cultura de células e subsequente análise de citocinas intracitoplasmáticas.

Para realização do leucograma global foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). O balanço das diferentes subpopulações leucocitárias (leucograma diferencial) foi realizado pela análise do esfregaço sanguíneo, após coloração com Giemsa e May-Grunwald, utilizando-se microscópio de luz com objetiva de imersão (Olympus – BX41 TF - Japan).

4.5.2 - Análise *ex-vivo* de leucócitos do sangue periférico

Para a análise dos marcadores de superfície utilizou-se o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA - USA) e modificado como a seguir: 50µL de sangue foram incubados no escuro, por 30 minutos a temperatura ambiente (t.a.), com 1µL de anticorpos monoclonais específicos para diversos marcadores de superfície celular, conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE).

Após o período de incubação os eritrócitos foram lisados com 2mL de solução de lise eritrocitária (100 µL de solução de lise - Optilyse-B, Immunotec-USA) por 10 minutos t.a. ao abrigo da luz, seguido de centrifugação à t.a. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1mL de tampão PBS (tampão salina fosfatado - 0,15mol/L cloreto de sódio; 0,01mol/L fosfato de sódio - pH 7,2 a 7,4).

Para a marcação intracitoplasmática utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-*Forkhead box P3* (anti-Foxp3) foi realizada a marcação de superfície celular com anti-CD4 conforme descrito anteriormente, seguida da permeabilização das células com adição de PBS-P (tampão salina fosfatado com 0,5% de soro albumina bovina; 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina – pH 7,2 a 7,4) por 10 minutos t.a. e posterior incubação com o anticorpo monoclonal anti-Foxp3 por 30 minutos. Após

esse período, as células foram novamente lavadas com PBS-P. Após esse procedimento as amostras foram imediatamente adquiridas em citômetro de fluxo.

A aquisição dos dados foi realizada com o instrumento FACScan (Becton-Dickinson, USA) utilizando-se o programa Cell-Quest para a aquisição (10.000 eventos), para a identificação das populações celulares de interesse e determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares ou da sua intensidade de expressão.

A fenotipagem teve como objetivo a análise do percentual de diferentes marcadores em linfócitos, indicando a frequência das células de interesse nas diversas subpopulações estudadas, assim como a verificação da expressão desses marcadores nas subpopulações celulares citadas através da análise da intensidade média de fluorescência (MFI). As avaliações realizadas por MFI foram realizadas determinando-se o canal médio de fluorescência (CMF), que representa a intensidade de luz total emitida pela excitação do fluorocromo associado aos anticorpos monoclonais ligados à superfície celular. Foram realizados gráficos de distribuição pontual em função do tamanho e granulosidade celulares (FSC x SSC) para separação das populações celulares. Em seguida, utilizando-se histogramas em escala logarítmica, determinou-se a região para a população de interesse. As estratégias de análises para escolha das populações leucocitárias, detecção do percentual de células, assim como de MFI encontram-se nas figuras 3, 4 e 5.

Os anticorpos utilizados para marcação de superfície celular e intracitoplasmática, seus clones e suas especificidades estão mostrados na tabela 1. As combinações de anticorpos utilizados, as subpopulações leucocitárias avaliadas para cada combinação de anticorpos e a estratégia de análise encontram-se na tabela 2.

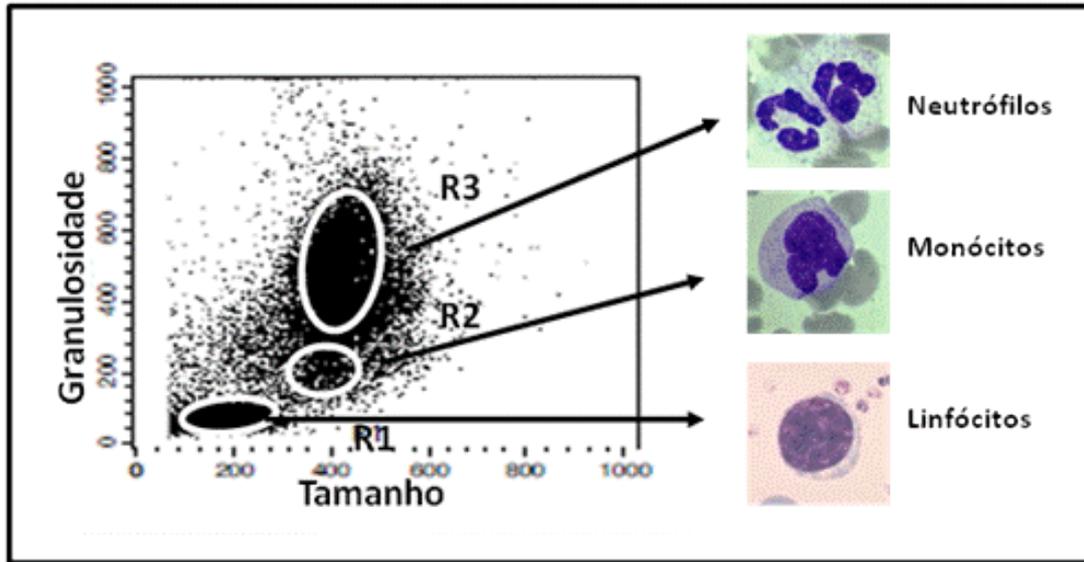


Figura 3. Estratégia de análise para separação das populações leucocitárias por citometria de fluxo. FSC = tamanho das células; SSC = granulosidade das células; R1 = gate para análise de linfócitos; R2 = gate para análise de monócitos; R3 = gate para análise de neutrófilos.

4.5.3 - Análise de citocinas intracitoplasmáticas

A detecção de citocinas intracelulares por citometria de fluxo é um método rápido, fácil e semiquantitativo, que permite a detecção de citocinas em uma única célula. Trata-se de um instrumento muito útil para o estudo da contribuição de células imunocompetentes na produção de citocinas em populações celulares heterogêneas, bem como para o estudo do padrão de citocinas em populações celulares homogêneas (6).

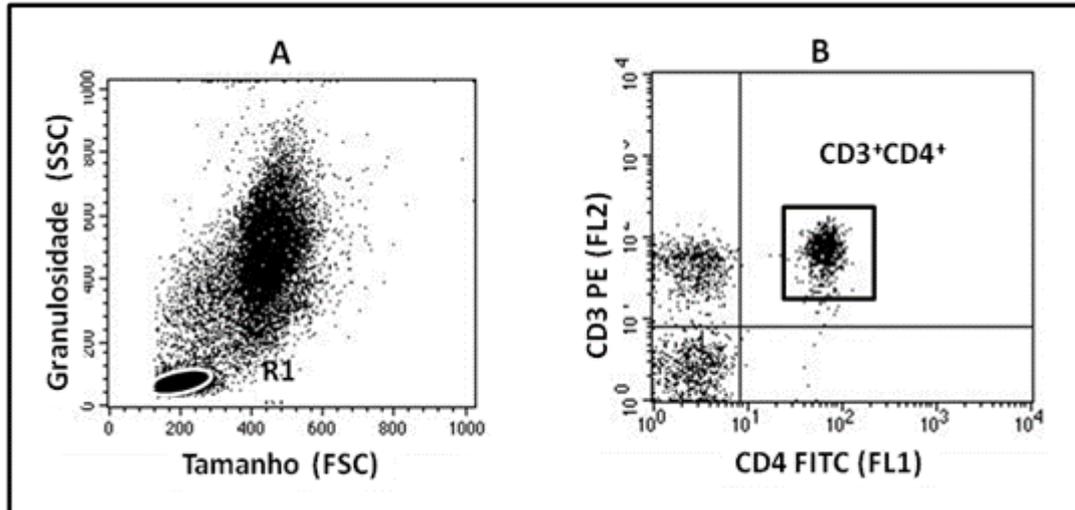


Figura 4. Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual; FL1 x FL2 são utilizados para avaliar parâmetros de interesse em populações ou subpopulações celulares específicas. Neste caso, exemplifica a análise percentual da população de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ na população de linfócitos.

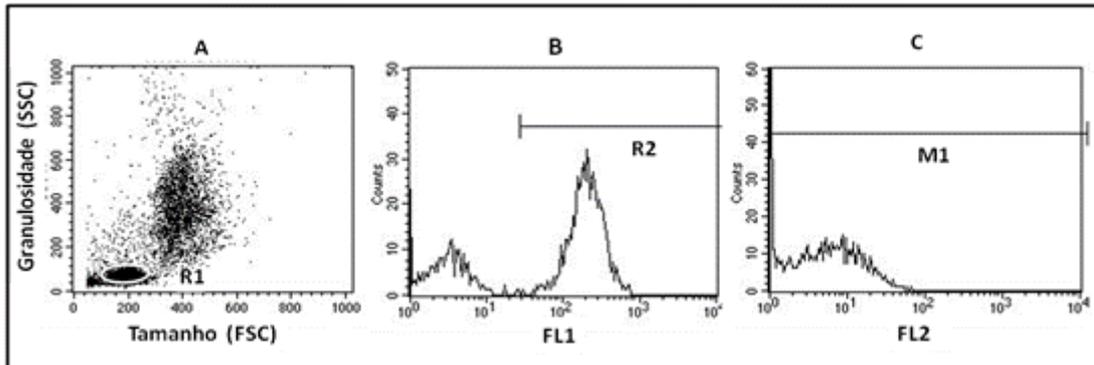


Figura 5. Sequência de procedimentos utilizados para as análises da intensidade média de expressão das células de interesse por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária (R1); (B) Histograma para separação de células negativas e positivas para o fluorocromo específico, R2 indica população positiva um fluorocromo (neste caso CD3 FITC - FL1); (C) M1 indica a população positiva para o fluorocromo FL2 (CD18 PE) selecionada na população positiva para FL1. M1 representa a expressão de células duplamente positivas (CD3⁺CD18⁺).

Tabela 1 – Relação dos anticorpos monoclonais humanos conjugados com fluorocromos utilizados na análise específica de moléculas de superfície e intracitoplasmáticas e seus respectivos clones.

Anticorpos (anti-human) e fluorocromos	Clone e marca
Marcação em superfície celular	
Anti-CD3 FITC	UCHT1 BioLegend
Anti-CD3 PE	HIT3a BD Biosciences
Anti-CD4 FITC	RPA-T4 Pharmingen tm
Anti-CD4 PE	L120 Pharmingen tm
Anti-CD8 FITC	HIT8a BioLegend
Anti-CD8 PE	HIT8a BD Pharmingen tm
Anti-CD19 FITC	HIB19 BD Pharmingen tm
Anti-CD19 PE	HIB19 BD Pharmingen tm
Anti-CD18 PE	6.7 BD Biosciences
Anti-CTLA4 PE	1493 R&D Systems
Anti-CD56 PE	B159 BD Biosciences
Anti-CCR2 PE	48607 R&D Systems
Anti-CCR5 PE	3A9 BD Biosciences
Anti-CCR7 PE	3D12 BD Pharmingen tm
Anti-CXCR3 PE	1C6/CXCR3 BD Pharmingen tm
Anti-CXCR4 PE	12G5 R&D Systems
Marcação intracitoplasmática	
Anti-FOXP3 PE	259D/C7 BD Biosciences
Anti-TNF- α PE	MAB11 BioLegend
Anti-IL10 PE	JES3-9D7 BioLegend
Anti-IFN- γ PE	4S.B3 BioLegend
Anti-IL4 PE	8D4-8 Pharmingen tm
Anti-IL6 PE	1936 R&D Systems
Anti-IL13 (PE)	JES10-5A2 BioLegend
Anti-IL17 (PE)	eBio64DEC17 Bioscience

Para avaliação do potencial de produção de citocinas em diferentes populações celulares, alíquotas de 500 μ L de sangue total foram adicionadas a 500 μ L do meio de cultura RPMI-1640 em dois tubos distintos. O primeiro tubo

correspondeu à cultura sem estímulo, denominada cultura CON e o segundo a cultura estimulada inespecificamente com Miristato Acetato de Forbol (PMA).

Em ambas foram adicionados 10 μ L de Brefeldina-A a 1mg/mL, que promove alteração do transporte intracelular do complexo de Golgi mediado por citocinas, permitindo seu acúmulo e obtenção de um maior sinal de citocinas que podem ser detectados por citometria de fluxo. Este método permite a detecção de vários tipos de citocinas em cada célula e as populações celulares que expressam uma citocina em particular. No tubo estimulado com PMA foram adicionados 25ng/mL de PMA e 1,0 μ L de Ionomicina a 1ng/mL.

Em seguida, as amostras foram incubadas por 4 horas, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Ao final da incubação, foi adicionada uma solução de EDTA numa concentração final de 20nM, seguindo-se reincubação por 15 minutos. Após esse tempo, as amostras foram lavadas com 6mL de PBS-W (PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica) e centrifugadas a 600g por 10 minutos a 18°C. Um volume de 1mL das culturas CON e PMA foram adicionados em dois tubos contendo 4 μ L de anticorpos monoclonais específicos para os receptores celulares CD4, CD8 e CD19. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente (t.a.), ao abrigo da luz.

Após incubação, os eritrócitos foram submetidos à lise por adição de 4,5mL de solução de lise eritrocitária e incubadas por 10 minutos t.a., ao abrigo da luz. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 400g por 10 minutos a 18°C, o sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas em 4mL de PBS-W e o volume completado até 12mL com PBS-P (PBS 0,015M, ph 7,4 contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). Após incubação por 10 minutos à t.a. ao abrigo da luz, a suspensão de células foi novamente centrifugada. O

sobrenadante foi aspirado e as células ressuspensas em 6mL de PBS-W. Seguiu-se nova centrifugação, aspiração do sobrenadante e ressuspensão celular em 350µL de PBS-W.

Tabela 2 – Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos; subpopulações leucocitárias avaliadas e estratégia de análise.

FITC	PE	Subpopulações analisadas	Estratégia de análise
CD19	CD3	Linfócitos B	%
CD3	CD56	Linfócitos NK e NKT	%
CD4	CD3	Linfócitos T auxiliares	%
CD8	CD3	Linfócitos T citotóxicos	%
CD4	FOXP3	Linfócitos T reguladores	MFI
CD4	CTLA4	Linfócitos T reguladores	%
CD3	CD18	Linfócitos T totais	MFI
CD4	CD18	Linfócitos T auxiliares	MFI
CD8	CD18	Linfócitos T citotóxicos	MFI
	CCR5	Linfócitos	%
	CCR2	Linfócitos	%
	CXCR4	Linfócitos	%
	CCR7	Linfócitos	%
	CXCR3	Linfócitos	%

%= percentual de células marcadas com os anticorpos;

MFI= expressão de células marcadas positivamente medidas pela intensidade média de fluorescência.

As combinações de anticorpos utilizadas, as populações leucocitárias avaliadas para cada combinação de anticorpos e a estratégia de análise encontram-se na tabela 2.

Após esse procedimento, foi feita a marcação intracitoplasmática de citocinas. Dessa forma, 25µL das suspensões celulares ressuspensas em PBS-W foram

transferidos para os poços correspondentes (CON e PMA), em placa de 96 poços de fundo em U, contendo 20µL da diluição dos anticorpos anti-citocinas em PBS-P e incubadas por 30 minutos à t.a. ao abrigo da luz.

Tabela 3 – Combinação de anticorpos e seus respectivos fluorocromos utilizados para detecção do percentual de citocinas em linfócitos.

Linfócitos T auxiliares		Linfócitos T citotóxicos		Linfócitos B	
FITC	PE	FITC	PE	FITC	PE
CD4	IFN-γ	CD8	IFN-γ	CD19	TNF-α
CD4	TNF-α	CD8	TNF-α	CD19	IL-4
CD4	IL-4	CD8	IL-4	CD19	IL-10
CD4	IL-6	CD8	IL-6		
CD4	IL-10	CD8	IL-10		
CD4	IL-13	CD8	IL-13		
CD4	IL-17				

Essa etapa foi seguida de duas centrifugações com 150µL de PBS-P e com 200µL de PBS-W respectivamente. Em seguida as células foram ressuspendidas em 200µL de PBS. Após 30 minutos, as amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros fenotípicos celulares e produção de citocinas, por citometria de fluxo (FACSCan – Becton Dickinson), procedendo a aquisição de 30.000 eventos por tubo (Figura 4). As análises foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest .

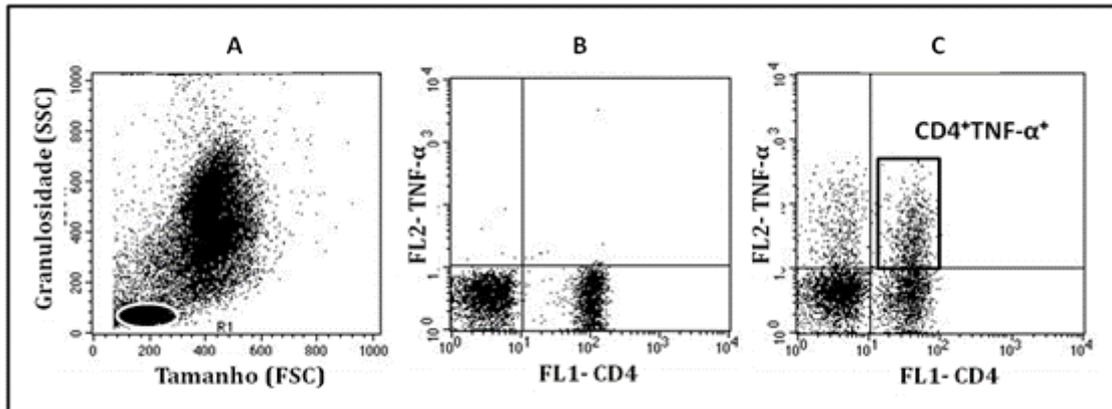


FIGURA 6. Sequência de procedimentos utilizados para as análises do perfil de citocinas intracitoplasmáticas por citometria de fluxo em culturas celulares. Neste caso, para determinação do percentual de células $CD4^+TNF-\alpha^+$. A= Gráfico de distribuição pontual em função de tamanho x granulidade, utilizados para seleção da população linfocitária (R1). B= análise do percentual de células $CD4^+TNF-\alpha^+$ em cultura sem estímulo. C= análise do percentual de células $CD4^+TNF-\alpha^+$ em cultura estimulada com PMA.

Após a determinação da população duplamente positiva, ou seja, marcada pelos dois fluorocromos, foi calculada a diferença entre o resultado encontrado para a cultura estimulada com o PMA e a cultura não estimulada, sendo representada como Delta (Δ).

4.5.4 - Análises estatísticas

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para a análise estatística dos dados. Os valores apresentados foram expressos em média e erro padrão ou mediana e intervalos interquartílicos. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste T de Student para dados não pareados foi usado para comparar médias entre dois grupos de distribuição normal enquanto a análise de variância foi usada para comparação entre três grupos. O teste de Mann Whitney comparou as medianas dos dados que apresentaram distribuição não paramétrica. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

REFERÊNCIAS

1. Barnett HL. International study of kidney disease in children. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*. 1979 Oct;21(10):1141-4. PubMed PMID: 529612.
2. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 557-73.
3. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003 Aug 23;362(9384):629-39. PubMed PMID: 12944064.
4. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Wilkins LW, editor. *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia 2004. p. 543-56.
5. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*. 1976 Aug;58(2):259-63. PubMed PMID: 951142.
6. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of immunological methods*. 1993 Feb 26;159(1-2):197-207. PubMed PMID: 8445253.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários estudos têm avaliado a resposta imunológica na Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI), embora ainda não haja consenso sobre seu papel na fisiopatologia da doença. Além disso, poucos estudos avaliaram se as alterações imunológicas persistem em pacientes com SNI sob uso de terapia imunossupressora. Neste contexto, o estudo apresentado a seguir buscou investigar a distribuição das subpopulações leucocitárias em pacientes com SNI, através da determinação da frequência de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e linfócitos B que expressam citocinas anti e pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17, após estímulo inespecífico *in vitro* com o mitógeno miristato acetato de forbol (PMA). Essa estratégia de análise permitiu avaliar como seria o comportamento celular desses indivíduos frente a um desafio imune inespecífico.

5.1 - ARTIGO ORIGINAL (1)

Aumento da expressão *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias após estimulação inespecífica em Linfócitos T de crianças com síndrome nefrótica idiopática

Guimarães FTL^{1,2}; Brito-Melo GE¹; da Silva RR¹; Guimarães PSS¹; Rocha-Vieira E¹; Pinheiro SVB²; Pereira WF^{1,2}; Simões e Silva AC^{2*}.

¹ Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde, UFVJM, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5000, Diamantina, MG, 29000-000, Brasil

² Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Faculdade de Medicina –Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brasil.

***Correspondência para Ana Cristina Simões e Silva**

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena, 190, 2º andar, sala 281, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil, 30130-100. FAX: + 55-31-34099770, TEL: + 55-31-34098073, e-mail: acssilva@hotmail.com

Suporte financeiro: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil)

RESUMO

Em virtude das características imuno-inflamatórias da Síndrome Nefrótica idiopática (SNI), torna-se de interesse a avaliação do perfil de células Th1, Th2 e Th17 e sua relação com a atividade da doença. Tendo em vista que as recidivas e/ou a persistência de proteinúria podem estar associadas a alterações no perfil de citocinas, este estudo investigou a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias em populações específicas de linfócitos. Foi realizado estudo transversal com 44 indivíduos com SNI (idade média $10,9 \pm 0,7$) em controle na Unidade de nefrologia Pediátrica do HC-UFMG, no período de abril de 2010 a março de 2012. Como grupo controle, foram avaliadas crianças saudáveis pareadas em idade e sexo ($n=10$). Os pacientes com SNI foram subdivididos em dois grupos de acordo com os valores da proteinúria em urina de 24 horas no momento da coleta: proteinúria elevada (PE) $\geq 200\text{mg}/24$ horas ($n=17$), e proteinúria reduzida (PR) $< 200\text{mg}/24$ horas ($n=27$). Foi realizada análise *ex-vivo* dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo utilizando marcadores de superfície celular para a determinação das subpopulações linfocitárias: linfócitos T, linfócitos TCD4, linfócitos TCD8, Células NK, NKT além de linfócitos B. Foram analisadas, *in vitro*, as frequências das citocinas intracitoplasmáticas: IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 em células marcadas com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti CD-19, após estimulação inespecífica com PMA. As frequências de linfócitos B ($\text{CD3}^- \text{CD19}^+ = 14,1 \pm 0,9\%$), de células NK [$\text{CD3}^- \text{CD56}^+ = 2,5 (0,9-8,0\%)$] e de células NKT [$\text{CD3}^+ \text{CD56}^+ = 0,6 (0,3-1,7\%)$] foram reduzidas nos pacientes com SNI em relação ao grupo controle [$20,6 \pm 2,8$; $7,5 (3,5-12)$ e $2,0 (0,5-3,5\%)$] respectivamente. Foi detectado aumento da frequência de células $\text{CD4}^+ \text{TNF-}\alpha^+$ no grupo SNI ($13,94 \pm 1,06\%$) quando comparado ao controle ($8,74 \pm 1,92\%$). Em linfócitos T citotóxicos, foi observada redução de IFN- γ no grupo SNI ($5,61 \pm 0,83\%$) comparado ao controle ($19,46 \pm 3,91\%$). Ao compararmos os pacientes com SNI que apresentavam PE e PR, observamos aumento de linfócitos TCD4 marcados para IFN- γ ($6,58 \pm 0,89\%$) e TNF- α ($14,43 \pm 1,18\%$) no grupo de pacientes com PE em relação ao grupo controle ($3,47 \pm 0,82$ e $8,74 \pm 1,92\%$ respectivamente). Em linfócitos T CD8, foi observado aumento no percentual de células marcadas para TNF- α nos pacientes com PE ($10,37 \pm 1,75\%$) em relação ao subgrupo com PR ($6,43 \pm 0,91\%$) e aos controles

($4,72 \pm 0,90\%$). O percentual de linfócitos T $CD8^+IFN-\gamma^+$, no entanto, apresentou-se significativamente reduzido nos subgrupos de PR ($4,75 \pm 0,78\%$) e PE ($7,12 \pm 1,8\%$) quando comparados ao controle ($19,46 \pm 3,91\%$). A produção de $TNF-\alpha$ mostrou-se aumentada nos linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e a produção de $IFN-\gamma$ reduzida nos linfócitos T citotóxicos dos pacientes com SNI, independente dos níveis de proteinúria. Nos pacientes com PE, houve aumento no percentual das citocinas pró-inflamatórias $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e $IL-17$ em linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) quando comparado ao grupo controle. Somente os pacientes com PE apresentaram aumento na expressão de $TNF-\alpha$ em linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) em comparação ao controle. Os resultados indicam resposta pró-inflamatória mais acentuada nos pacientes com proteinúria persistente, mesmo em uso de medicação anti-inflamatória.

Descritores: Síndrome nefrótica idiopática, citocinas, inflamação, proteinúria, resposta imune.

ABSTRACT

Taking into account the immune-inflammatory characteristics of idiopathic nephrotic syndrome (INS), the evaluation of Th1, Th2 and Th17 cells and their relationship with disease activity profile is of interest. Considering that relapses of INS and/or persistence of proteinuria may be associated with changes in cytokine profile, this study investigated the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in specific lymphocyte populations. We performed a cross-sectional study that included 44 individuals with INS (mean age $10,9 \pm 0,7$) followed-up at the Pediatric Nephrology Unit of HC-UFG, from April 2010 to March 2012. The control group comprised healthy children, matched for age and sex ($n = 8$). Patients with INS were subdivided into two groups according to the values of proteinuria in 24-hour urine: high proteinuria (HP) $\geq 200\text{mg}/24$ hours ($n = 17$) and low proteinuria (LP) $< 200\text{mg}/24$ hours ($n = 27$). Ex-vivo analysis of peripheral blood leukocytes by flow cytometry was performed using cell surface markers for T lymphocytes, TCD4 lymphocytes, TCD8, NK cells, NKT and B lymphocytes. The frequencies of intracellular cytokines, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 and IL-17, were also analyzed in cells labeled with anti-CD4, anti-CD8 and anti CD-19 antibodies. The frequency of B lymphocytes ($\text{CD3}^- \text{CD19}^+ = 14.1 \pm 0.9\%$), NK cells [$\text{CD3}^- \text{CD56}^+ = 2.5 (0,9-8,0\%)$] and NKT cells [$\text{CD3}^+ \text{CD56}^+ = 0.6 (0,3-1,7\%)$] were reduced in patients with INS compared to control group [20.6 ± 2.8 , $7.5 (3,5-12)$ and $2.0 (0.5-3,5) \%$ respectively]. Increased frequency of $\text{CD4}^+ \text{TNF-}\alpha^+$ cells was detected in INS ($13.94 \pm 1.06 \%$) compared with the control group ($8.74 \pm 1.92 \%$). The frequency of cytotoxic T lymphocytes expressing IFN- γ was lower in INS patients ($5.61 \pm 0.83 \%$) than in control group ($19.46 \pm 3.91 \%$). The analysis of patients with HP and LP showed higher frequencies of CD4 T

lymphocytes expressing IFN- γ (6.32 ± 0.93 %) and TNF- α (14.43 ± 1.18 %) in patients with HP than in controls (3.47 ± 0.82 and 8.74 ± 1.92 %, respectively). The frequency of CD8 T lymphocytes expressing TNF- α (10.37 ± 1.75 %) was increased in patients with HP when compared with the subgroup of LP (6.43 ± 0.91 %) and with controls (4.72 ± 0.90 %). On the other hand, the percentage of T CD8⁺IFN- γ ⁺ was significantly reduced in patients with HP (7.12 ± 1.8 %) in comparison with LP (4.75 ± 0.78 %) and control group (19.46 ± 3.91 %). Regardless the levels of proteinuria, patients with INS presented an increased expression of TNF- α in T helper lymphocytes (CD4⁺) and a reduced expression of IFN- γ in cytotoxic T lymphocytes. INS patients with HP had higher frequency of T helper lymphocytes (CD4⁺) expressing pro-inflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-17) than controls. Only patients with HP presented increased expression of TNF- α in cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺) in comparison to controls. The results indicate a more intense pro-inflammatory response in INS patients with HP, despite the use of anti-inflammatory medication.

Key words: Idiopathic nephrotic syndrome, cytokines, inflammation, proteinuria, immune response.

INTRODUÇÃO

A Síndrome Nefrótica (SN) é uma glomerulopatia bastante comum em crianças e caracteriza-se por proteinúria maciça, hipoalbuminemia, edema generalizado e hiperlipidemia. A SN pode ser causada por lesão renal primária ou estar associada a doenças sistêmicas. Denomina-se Síndrome Nefrótica Idiopática (SNI) aquela decorrente de lesão renal primária (1). Algumas evidências sugerem um papel importante do sistema imune no desencadeamento ou na manutenção da SNI, tais como: a resposta anormal dos linfócitos T nos pacientes com SNI (2-5), a possível participação de citocinas na fisiopatologia da doença (6), a existência de um fator de permeabilidade vascular circulante que tem sido relacionado às recidivas da doença após transplantes renal (6) e a melhora clínica observada nos pacientes após tratamento com corticosteroides e drogas imunossupressoras (7). No entanto, apesar do avanço dos estudos da SNI nas últimas décadas, em especial no campo da imunologia, sua fisiopatologia ainda permanece desconhecida (8).

Alterações imunológicas têm sido detectadas em pacientes com SNI (9). Foram relatadas alterações na expressão de citocinas/quimiocinas tais como interleucina IL-2, IL-10 (4), IL-4 (10), e IL-8 (11, 12) em células TCD8⁺ (13, 14) e TCD4⁺ (4, 15, 16) nos pacientes com SNI. Fiser e colaboradores (1991) demonstraram alterações no perfil de células CD4⁺ e CD8⁺ (3), enquanto Hinoshita (1990) e Suranyi (1993) apontaram para a IL-2 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α como possíveis fatores patogênicos nos mecanismos de lesão renal da SNI (17, 18). A infusão de TNF- α em camundongos portadores de SN provocou aumento dose-dependente da proteinúria e piora do quadro clínico dos animais (19). O aumento significativo nos níveis plasmáticos de TNF- α em pacientes com SNI, bem como concentrações plasmáticas elevadas de IL-2, de seu receptor solúvel (sIL-2R) e de

IFN- γ durante a recidiva de pacientes com síndrome nefrótica corticossensível sugerem um padrão de resposta imune do tipo pró-inflamatório ou Th1 (20). Por outro lado, alguns estudos sugerem que haja um desequilíbrio entre os eixos Th1 e Th2 da resposta imunológica na SNI (6, 21), com tendência ao predomínio de resposta Th2 (21-24). No entanto, ainda não foi avaliado se a célula Th17, produtora de IL-17, também exerceria um papel pró-inflamatório na SNI.

Tendo em vista que a atividade da SNI e sua evolução possam estar associadas a alterações no perfil de citocinas nas diferentes subpopulações leucocitárias, este estudo investigou a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias em subpopulações de linfócitos. Além disso, foi avaliado se o perfil de citocinas nas células do sangue periférico de pacientes com SNI variou de acordo com a atividade da doença, ou seja, com os níveis de proteinúria no momento da coleta do sangue.

PACIENTES E MÉTODOS

Caracterização dos pacientes e controles

Foi realizado um estudo transversal, utilizando amostra de conveniência, que incluiu 44 indivíduos com SNI (idade média $10,9 \pm 0,7$) em acompanhamento regular na Unidade de Nefrologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFMG, no período de abril de 2010 a março de 2012. O critério diagnóstico para SN foi baseado no *International Study of Kidney Disease in Children* (25). Pacientes com síndrome nefrótica congênita ou secundária foram excluídos do estudo.

Os pacientes com SNI foram subdivididos conforme os níveis de proteinúria no momento da coleta. Os pacientes com proteinúria em urina de 24 horas igual ou

superior a 200mg/24 horas foram alocados no grupo denominado de proteinúria elevada (PE, n=17, idade média $11,3 \pm 1,0$) e aqueles cuja proteinúria foi inferior a 200 mg/24 horas foram considerados de proteinúria reduzida (PR, n=27, idade média $10,8 \pm 0,9$). O grupo controle foi constituído por crianças saudáveis, pareadas em sexo e idade com os pacientes, sem alterações ao exame clínico e que não apresentavam histórico de nefropatias, doenças crônicas, alergias ou infecções recentes (CON, n=8, idade média $12,1 \pm 0,9$).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis por todos os sujeitos da pesquisa. Ressalta-se ainda que, em nenhum momento, o protocolo de estudo interferiu com qualquer prescrição ou recomendação médica e foi devidamente respeitado o direito de recusa por parte dos responsáveis ou dos sujeitos em participar da pesquisa.

Protocolo do estudo

Os pacientes foram submetidos aos seguintes exames de rotina, que fazem parte do protocolo de seguimento da Unidade de Nefrologia Pediátrica do HC-UFMG: no sangue, dosagem de proteínas totais, colesterol total, triglicérides, ureia e creatinina e, na urina de 24 horas, dosagem de proteína. Na urina de amostra única, dosagem de proteína e creatinina. A taxa de filtração glomerular (RFG) foi estimada usando a fórmula de Schwartz (26).

Em relação aos pacientes com SNI, as coletas de sangue para avaliação dos parâmetros imunológicos foram concomitantes à coleta dos exames de sangue e urina de 24 horas rotineiramente realizados, conforme mencionado acima. Os controles saudáveis realizaram as coletas de sangue em uma única ocasião, específica para avaliação dos parâmetros imunológicos.

Coleta e processamento de amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA e heparina. As amostras coletadas em tubos com EDTA foram utilizadas, até no máximo 24 horas após a coleta, para análise *ex vivo* das populações e subpopulações de leucócitos por citometria de fluxo.

As amostras coletadas em tubos heparinizados foram utilizadas, até no máximo 24 horas após a coleta, para a realização de cultura de células e subsequente análise de citocinas intracitoplasmáticas.

Contagem de leucócitos

Para realização do leucograma global foi utilizado o contador automático de células CELM CC-550® (CELM, Barueri, SP, Brasil). A determinação das diferentes populações leucocitárias (leucograma diferencial) foi realizado pela análise do esfregaço sanguíneo, após coloração com Giemsa e May-Grunwald, utilizando-se microscópio de luz (Olympus – BX41 TF - Japan) em objetiva de imersão.

Análise ex-vivo dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Para a análise dos marcadores de superfície celular em leucócitos utilizou-se o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA - USA) e modificado como a seguir: 50 microlitros de sangue foram

incubados no escuro, por 30 minutos a temperatura ambiente (t.a.), com 1-5 μ L de uma mistura de anticorpos monoclonais específicos para marcadores de superfície celular, conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE).

Foram utilizados na marcação de superfície celular os seguintes anticorpos direcionados contra proteínas humanas: anti-CD3 FITC (clone: UCHT1) e anti-CD8 FITC (clone: HIT8a) da BioLegend; anti-CD4 FITC (clone: RPA-T4) e anti-CD19 FITC (clone: HIB19) da BD Pharmingen tm; e anti CD56 PE (clone: B159), anti-CD19 PE (clone: HIB19), anti-CD4 PE (clone: L120) e anti-CD8 PE (clone: HIT8a) da BD Biosciences.

Após 30 minutos de incubação, os eritrócitos foram lisados com 2 mL de solução contendo 0,5% de de solução de lise (Optilyse-B, Immunotec-USA) e incubados no escuro, por 10 minutos, a temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 200 x g, 18°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão salina fosfatado - PBS (0,15 mol/L cloreto de sódio; 0,01 mol/L fosfato de sódio - pH 7,2 a 7,4).

Para a aquisição dos dados foi utilizado o citômetro de fluxo modelo FACScan (Becton-Dickinson, USA), sendo adquiridos 10.000 eventos usando-se o software Cell-Quest (Becton-Dickinson, USA). Para a identificação das populações celulares de interesse foram utilizados gráficos de distribuição pontual dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celulares, bem como de fluorescência, obtidos pela marcação com anticorpos monoclonais específicos.

Na análise fenotípica de leucócitos periféricos de crianças com SNI foram avaliados linfócitos B (CD3⁻CD19⁺); células com fenótipo sugestivo de células

Natural Killer (NK, CD3⁻CD56⁺), sugestivo de células T *Natural Killer* (NKT, CD3⁺CD56⁺), linfócitos T auxiliares (TCD4, CD3⁺CD4⁺) e T citotóxicos (TCD8, CD3⁺CD8⁺).

Análise do perfil de citocinas em leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Para a realização da análise do perfil de citocinas em diferentes populações celulares, alíquotas de 500 µL de sangue total foram adicionadas a 500 µL do meio de cultura RPMI-1640 (SIGMA) em dois tubos distintos. O primeiro tubo correspondeu à cultura sem estímulo, denominada cultura controle e o segundo à cultura estimulada inespecificamente com Miristato Acetato de Forbol (PMA) a 25 ng/ml e 1,0 µl de Ionomicina a 1ng/ml. Em ambas foram adicionados 10 µL de Brefeldina-A a 1mg/mL, que retém as citocinas no meio intracelular. Em seguida, as amostras foram incubadas por 4 horas, em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Após o período de incubação foi adicionado EDTA (20 nM) seguido de reincubação por 15 minutos. As amostras foram lavadas com PBS-W (PBS 0,015M pH 7,4 contendo 0,5% de soro albumina bovina e 0,1% de azida sódica) e incubadas por 30 minutos ao abrigo da luz à t.a. com anticorpos monoclonais específicos para os marcadores de superfície celular: anti-CD4 FITC, anti-CD8 FITC e anti-CD19 FITC.

Após essa etapa, foi realizada a lise eritrocitária com 2mL de solução de lise de hemácias (Optilyse-B, Immunotec-USA) por 10 minutos t.a. ao abrigo da luz, seguida de centrifugação à t.a. e posterior permeabilização dos leucócitos com solução PBS fosfatada (PBS 0,015M, pH= 7,4 contendo 0,5% de soro albumina

bovina, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina). Após a permeabilização, as células foram incubadas por 30 minutos, à t.a. e ao abrigo da luz, com os anticorpos monoclonais específicos para as citocinas: anti-TNF- α PE (clone: MAb11), anti-IL10 PE (clone: JES3-9D7), anti-IFN- γ PE (clone: 4S.B3) e anti-IL13 PE (clone: JES10-5A2) da BioLegend; anti-IL17 PE (clone: eBio64DEC17) da Biosciences; anti-IL6 PE (clone: 1936) da R&D Systems e anti-IL4 PE (clone: 8D4-8 BD) da BD Pharmingen[™]. As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros fenotípicos celulares e produção de citocinas, procedendo a aquisição de 30.000 eventos por tubo. As análises foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest.

Os dados obtidos na análise do perfil de citocinas foram expressos de acordo com a diferença (delta) entre os valores percentuais de células marcadas tanto para os receptores de superfície quanto para as citocinas citoplasmáticas de interesse, obtidos nas culturas estimuladas e não estimuladas com o PMA.

Análise estatística

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para a análise estatística dos dados. Os valores apresentados foram expressos em média e erro padrão ou mediana e intervalos interquartílicos. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste T de Student para dados não pareados foi usado para comparar médias entre dois grupos de distribuição normal enquanto a análise de variância foi usada para comparação entre três grupos. O teste de Mann Whitney comparou as medianas dos dados que apresentaram distribuição não paramétrica. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

RESULTADOS

A divisão dos pacientes com SNI conforme a proteinúria mostrou aumento significativo na excreção urinária de proteína, nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos, além de redução de albumina sérica nos pacientes com PE em relação ao PR. Os demais parâmetros clínicos e bioquímicos foram similares nos dois subgrupos (tabela 1).

As contagens de leucócitos totais e das populações leucocitárias não apresentaram diferenças significativas nas populações de leucócitos totais, monócitos, neutrófilos e linfócitos em relação ao grupo controle, tanto na comparação com os pacientes analisados em conjunto quanto com os subgrupos PE e PR (tabela 2). Também não foi observada diferença significativa no percentual de linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos do grupo controle em relação aos pacientes com SNI tomados em conjunto, bem como quando subdivididos conforme a proteinúria (tabela 2). Por outro lado, a frequência de linfócitos B, de células NK e de células NKT foi significativamente menor nos pacientes com SNI em geral comparados ao grupo controle (tabela 2). Foram verificados também menores percentuais de linfócitos B, células NK e células NKT nos pacientes com proteinúria elevada em relação aos controles, enquanto que, nos pacientes com proteinúria reduzida, apenas a frequência de linfócitos B diferiu significativamente dos controles (tabela 2).

A figura 1 compara o percentual de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e B que expressam diferentes citocinas após estimulação com PMA nos pacientes com SNI e em crianças saudáveis (grupo controle, CON). A análise de citocinas em

linfócitos T auxiliares mostrou, como única alteração significativa, maior frequência de células $CD4^+TNF-\alpha^+$ nos pacientes com SNI quando comparados ao grupo controle ($13,94 \pm 1,06\%$ versus $8,74 \pm 1,92\%$, $p < 0.05$, figura 1). Na subpopulação de linfócitos T citotóxicos, foi detectado menor percentual de células que expressam $IFN-\gamma$ nos pacientes com SNI comparados aos controles ($5,61 \pm 0,83\%$ versus $19,46 \pm 3,91\%$, $p < 0.05$, figura 1).

A figura 2 mostra o percentual de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e B que expressam diferentes citocinas após estimulação com PMA de crianças saudáveis (grupo controle, CON) em comparação com o subgrupo de pacientes nefróticos cuja proteinúria é elevada (PE) e com o subgrupo de proteinúria reduzida (PR). Na subpopulação de linfócitos TCD4, foi observado maior percentual de células que expressam $IFN-\gamma$ ($6,58 \pm 0,89\%$), $TNF-\alpha$ ($14,43 \pm 1,18\%$) e $IL-17$ ($1,58 \pm 0,32$) no subgrupo de pacientes com PE quando comparado ao grupo controle ($3,47 \pm 0,82$; $8,74 \pm 1,92\%$ e $0,55 \pm 0,18$, respectivamente, figura 2). A análise dos linfócitos T $CD8^+$ mostrou aumento significativo apenas no percentual de células que expressam $TNF-\alpha$ nos pacientes com PE ($10,37 \pm 1,75\%$) em relação ao subgrupo com PR ($6,43 \pm 0,91\%$) e aos controles ($4,72 \pm 0,90\%$) (figura 2). Por outro lado, o percentual de linfócitos T $CD8^+$ que expressa $IFN-\gamma^+$ apresentou-se significativamente menor nos subgrupos de PR ($4,75 \pm 0,78\%$) e de PE ($7,12 \pm 1,8\%$) em relação ao grupo controle ($19,46 \pm 3,91\%$) (figura 2).

DISCUSSÃO

Neste estudo foram realizadas análises de subpopulações linfocitárias e do percentual de células que expressam citocinas anti e pró-inflamatórias após estímulo inespecífico em pacientes com SNI em comparação com indivíduos saudáveis. Além disso, os pacientes com SNI foram subdivididos de acordo com os níveis de proteinúria no momento da avaliação com a finalidade de comparar a doença recidivada ou que não responde à medicação com a doença em remissão. Os principais resultados obtidos neste estudo foram a redução no percentual das subpopulações de linfócitos B, NK e NKT em pacientes com SNI em relação ao grupo controle, que foi mais evidente nos pacientes com PE e o aumento percentual de linfócitos T auxiliares que expressam citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) após estimulação inespecífica com PMA também presente no subgrupo de PE.

Diversos estudos evidenciam o papel da resposta imune na SNI (9, 27). Embora tenham sido relatadas alterações na resposta imune mediada por linfócitos T e no padrão de produção de citocinas pró-inflamatórias (28), os mecanismos imunopatogênicos da doença ainda não foram totalmente elucidados. Nesse contexto, Lama e colaboradores detectaram níveis plasmáticos elevados de IL-2, do receptor solúvel de IL-2 e de IFN- γ em crianças com SNI córtico-sensível, sugestivos de resposta pró-inflamatória (20). Em nosso estudo, também encontramos aumento do percentual de células T auxiliares expressando as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ e IL-17. A IL-17 tem sido considerada importante mediador inflamatório em diversas doenças, inclusive autoimunes (29, 30). Em relação ao

papel de IL-17 na SNI, Shao e colaboradores (2009) detectaram aumento de frequência de células T auxiliares que expressam IL-17 e maior expressão de RNA mensageiro para fatores relacionados a IL-17 que se associaram a concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 e IL-1 β em pacientes pediátricos com SNI (31). Dessa forma, o aumento do percentual de células T auxiliares que expressam IL-17, TNF- α e IFN- γ encontrado em nosso estudo corrobora um possível papel de citocinas pró-inflamatórias na fisiopatologia da SNI.

Outra questão intrigante é o fato de que, parte dos pacientes com SNI, mesmo sob uso de medicação imunossupressora, persistem com o quadro inflamatório ativo com conseqüente progressão da lesão renal, podendo evoluir para perda de função do órgão. Neste estudo, foi utilizada cultura de células estimuladas inespecificamente com PMA, que é amplamente utilizado como indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IFN- γ e TNF- α , mas que, normalmente, é ineficaz quando utilizado em células de indivíduos em uso de terapia imunossupressora (32). De modo geral, os corticosteroides inibem a estimulação do PMA sobre as células (33). No entanto, o percentual de linfócitos T auxiliares que expressam TNF- α após estímulo *in vitro* com PMA foi maior nos pacientes com SNI do que no grupo controle, a despeito do tratamento convencional com corticosteroides. Para investigar se o percentual de células que expressam citocinas pode ser modificado pela atividade da doença, foram comparados pacientes com PE e PR no momento da coleta. Nos pacientes com PE, houve aumento significativo no percentual de linfócitos T auxiliares que expressam as citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-17 após estimulação inespecífica com PMA. Esse resultado sugere que o uso de corticosteroides nesse subgrupo de pacientes não inibiu a

expressão de citocinas pró-inflamatórias nos linfócitos T auxiliares e este achado se associou à persistência e/ou recorrência da proteinúria.

Segundo Hammad e colaboradores (2013), a resistência ao tratamento com glicocorticoides em pacientes com SNI estaria associada à diminuição de receptores citoplasmáticos de glicocorticoides (GR) em células relacionadas à resposta imune (34). Foi mostrado que pacientes com síndrome nefrótica córtico-resistente (SNCR) apresentaram uma baixa expressão de GR em monócitos (CD14+) e linfócitos T (CD3+) quando comparados aos pacientes com síndrome nefrótica córtico-sensível e indivíduos do grupo controle (34). Similarmente, Shalaby e colaboradores (2012) classificaram os pacientes com SNI, em respondedores precoces e respondedores tardios à corticoterapia e observaram que os respondedores tardios apresentavam diminuição na expressão de receptores GR em linfócitos T (CD3+) quando comparados aos respondedores precoces e indivíduos controle (35). Considerando o papel chave dos linfócitos T auxiliares na resposta imune, é possível que a ineficácia terapêutica observada em pacientes corticorresistentes ou respondedores tardios seja devida, pelo menos em parte, à ausência de controle da resposta imunoinflamatória, que acarretaria em proteinúria persistente e piora da lesão renal.

Por outro lado, o estímulo com PMA nos linfócitos T citotóxicos de pacientes com SNI em uso de corticoterapia não foi capaz de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias. A diferença nos percentuais de linfócitos T $CD8^+IFN-\gamma^+$ entre as culturas estimuladas e não estimuladas com PMA, obtidas no grupo SNI foi menor do que aquela observada nos indivíduos do grupo CON, indicando que a corticoterapia inibiu a produção de $IFN-\gamma$ por linfócitos T citotóxicos. Esse comportamento se manteve mesmo quando os pacientes foram subdivididos nos grupos com PE e PR. No entanto, o grupo com PE apresentou um aumento na

expressão de TNF- α em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) quando comparado ao grupo controle. Esse aumento não havia sido observado quando os pacientes PE e PR estavam agrupados no grupo SNI.

Tomados em conjunto, os resultados deste estudo mostraram que a terapia imunossupressora não afetou a capacidade de produção de TNF- α pelas células T auxiliares nos indivíduos com SNI. Ressalta-se que as células T auxiliares são consideradas as principais produtoras de citocina do sistema imune (36). A incapacidade do tratamento de inibir a produção de TNF- α também ocorreu em linfócitos T citotóxicos, mas somente dos pacientes com PE. Tal achado sugere comportamento distinto do sistema imune conforme a atividade da doença e a resposta à corticoterapia. Além disso, o aumento da expressão de TNF- α pode promover maior resposta inflamatória no tecido renal, considerando-se que esta citocina é potente estimuladora da reação de fase aguda por meio da regulação positiva de várias proteínas pró-inflamatórias (quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento, etc) por ativação das vias do fator de transcrição NF- κ B (factor nuclear κ B) e da MAPK (mitogen activated proteína quinase) (37). Corroborando a hipótese prévia de Shaloub e colaboradores (1974), nossos dados sugerem que as alterações imunes que originam ou perpetuam a SNI não estão necessária e diretamente associadas a alterações nas subpopulações de linfócitos T, mas provavelmente se relacionam a modificações na expressão de citocinas nessas subpopulações celulares (38).

Recentemente têm sido testados anticorpos monoclonais anti-TNF, quiméricos (infliximab) ou humanos (adalimumab ou Golimumab), com resultados satisfatórios no tratamento da doença inflamatória intestinal (39, 40). Tais substâncias também já foram testadas, combinadas com o etanercept, um receptor

recombinante solúvel de TNF, para tratamento de artrite reumatoide (41) e outras doenças auto-imunes (42, 43). Outro potencial antagonista do TNF para o tratamento de artrite reumatóide é certolizumab pegol, um fragmento de ligante de antígeno recombinante PEGuilado de um anticorpo monoclonal humanizado que seletivamente atinge e neutraliza o TNF- α (44). Nesse sentido, estudos adicionais que visem à elucidação dos mecanismos imuno-inflamatórios na SNI assumem grande importância para a definição de novos alvos terapêuticos.

Tabela 1. Caracterização de aspectos clínicos e bioquímicos de pacientes de acordo com a proteinúria.

Parâmetros	PR (n=27)	PE (n=17)	p
Idade	10,8 ± 0,9	11,3 ± 1,0	NS
Sexo (m/f)	21/6	9/8	0,6595
Ureia (mg/dL)	24,8 [19,8-35,0]	20,0 [18,0-29,0]	0,2176
Creatinina (mg/dL)	0,50 [0,41 -0,71]	0,58 [0,44-0,99]	0,2362
Triglicerídeos (mg/dL)	73,0 [59,5-85,75]	116,0 [83,0-172,0]	0,0437
Colesterol total (mg/dL)	167,9 ± 7,8	227,2 ± 30,1	0,0382
Albumina (g/dL)	4,13 ± 0.1	3,02 ± 0,4	0,0018
Taxa de filtração glomerular†	117,9 [93,8-153,7]	92,3 [73,7-136,7]	0,1849
Proteinúria (mg/m²/24h)	60,0 [10,0-90,0]	830,0 [390,0-2805,0]	<0,0001
Medicação em uso			
Corticoide em monoterapia	5	0	
Corticoide + iECA	0	3	
Corticoide +iECA/ iECA+ARA	3	5	
iECA / iECA + ARA	5	5	
Ciclosporina em monoterapia	2	0	
Ciclosporina + iECA/iECA + ARA	1	2	
Nenhum	9	1	
Sem registro	2	1	

Valores expressos como mediana e intervalos interquartílicos, exceto para taxa de filtração glomerular expressa como média ± erro padrão, sexo e medicação em uso expressos em valores absolutos. † Taxa de filtração glomerular foi estimada usando a fórmula de Schwartz (26); NS = diferença entre os grupos não foi significativa $p < 0.05$. PR = proteinúria reduzida; PE= proteinúria elevada. iECA = inibidores da enzima conversora de angiotensina. ARA= antagonista de receptor de angiotensina.

Tabela 2 – Frequências de subpopulações de leucócitos e de linfócitos de sangue periférico em pacientes com síndrome nefrótica idiopática (SNI) como um todo ou subdivididos conforme a proteinúria (PE-proteinúria elevada e PR-proteinúria reduzida) em comparação aos valores em crianças saudáveis (CON).

	CON	SNI	PR	PE
Leucócitos totais ($\times 10^3 \text{ cel/mm}^3$)	7,1 \pm 0,7	8,1 \pm 0,4	7,8 \pm 0,4	8,6 \pm 1,0
Populações leucocitárias (%)				
Basófilos	0	0,04	0,1	0
Eosinófilos	3,7 \pm 0,7	4,9 \pm 0,6	5,5 \pm 0,9	4,0 \pm 0,5
Bastonetes	1,0 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,4	0,7 \pm 0,3
Neutrófilos	38,4 \pm 4,3	43,4 \pm 2,3	42,2 \pm 3,1	45,5 \pm 3,7
Monócitos	8,6 \pm 1,5	6,3 \pm 0,6	7,3 \pm 0,7	4,5 \pm 0,9
Linfócitos	48,3 \pm 3,5	44,4 \pm 2,2	43,8 \pm 2,7	45,3 \pm 3,7
Populações linfocitárias (%)				
Linfócitos B (CD3 ⁻ CD19 ⁺)	20,6 \pm 2,8	14,1 \pm 0,9 *	14,2 \pm 1,2 *	13,9 \pm 1,7*
Células NK (CD3 ⁻ CD56 ⁺)	7,5 [3,5-12,0]	2,5 [0,9-8,0]**	3,7 [1,8-9,4]	1,2 [0,9-3,5] **
Células NKT (CD3 ⁺ CD56 ⁺)	2,0 [0,5-3,5]	0,6 [0,3-1,7] *	0,7 [0,3-2,3]	0,6 [0,2-1,5] *
Linfócitos TCD4 (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	38,7 \pm 2,3	38,0 \pm 1,3	38,1 \pm 1,6	37,8 \pm 2,2
Linfócitos TCD8 (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	22,5 \pm 2,0	22,6 \pm 1,3	19,9 \pm 2,0	24,4 \pm 2,1

NS = diferença entre os grupos não foi significativa. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ representam diferenças significativas comparadas com o grupo controle. Resultados são expressos como média \pm erro padrão ou mediana e intervalos interquartílicos.

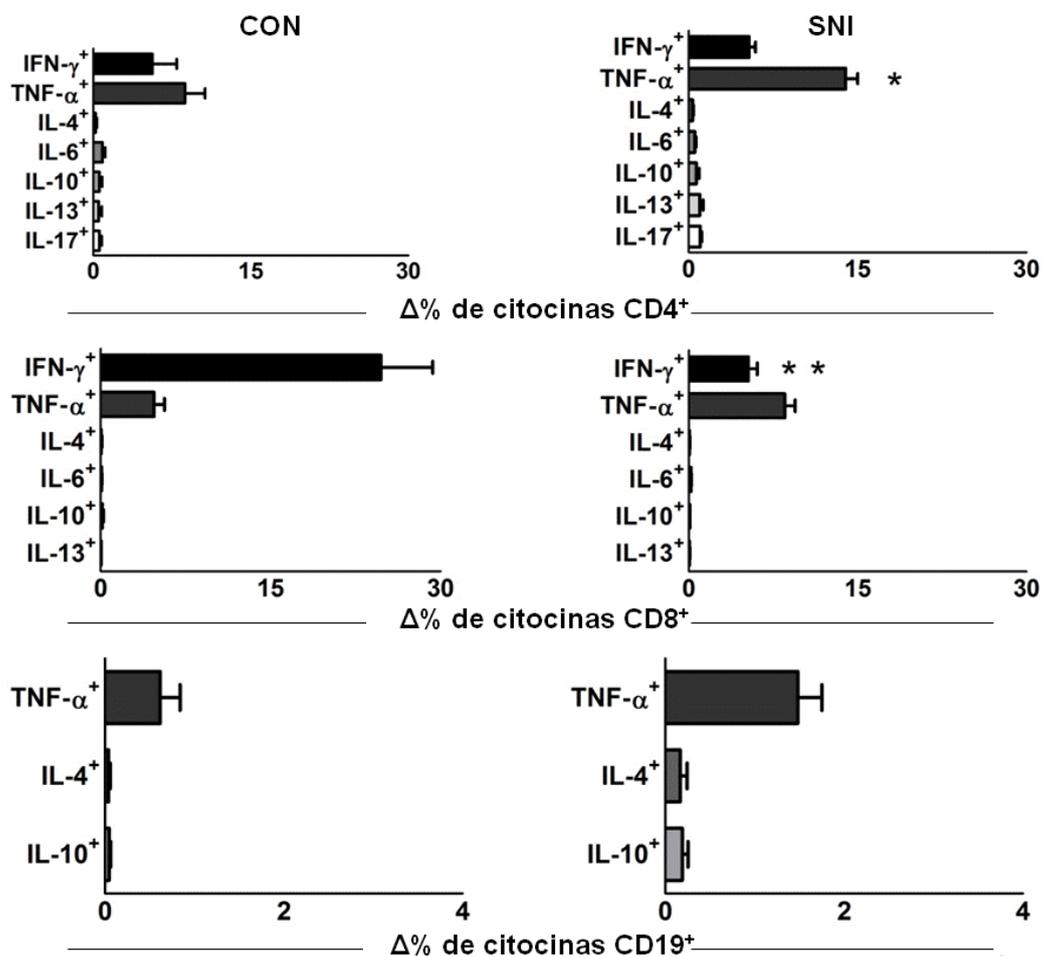


Fig 1. Análise da variação percentual ($\Delta\%$) de células com marcação intracitoplasmática de citocinas anti e pró-inflamatórias após estimulação inespecífica, *in vitro*, com PMA em pacientes com síndrome nefrótica idiopática (SNI) e grupo controle (CON). Os resultados expressos em gráficos de barras em média do percentual e erro padrão. Diferenças significativas para $p < 0,05$ e $p < 0,01$ são indicadas por * e ** respectivamente. Δ = diferença percentual entre as culturas com e sem estímulo por PMA.

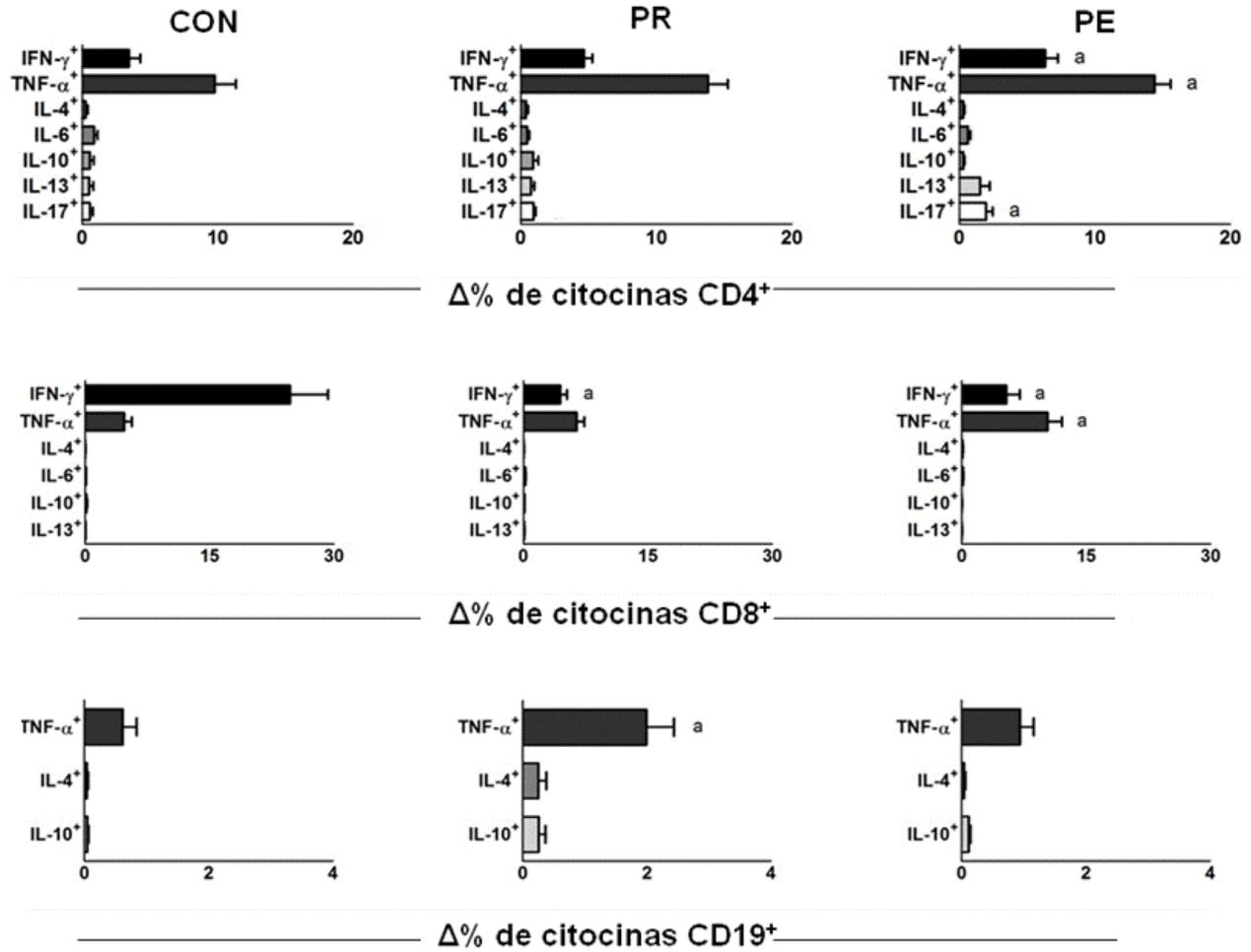


Fig 2. Análise da variação percentual ($\Delta\%$) de células com marcação intracitoplasmática de citocinas anti e pró-inflamatórias após estimulação inespecífica, *in vitro*, com PMA em pacientes com proteinúria reduzida (PR), proteinúria elevada (PE) e grupo controle (CON). Os resultados expressos em gráficos de barras em média do percentual de células e erro padrão. Δ = diferença percentual entre as culturas com e sem estímulo por PMA. Diferenças significativas em comparação com CON, $p < 0,05$ são mostrados pela letra "a".

REFERÊNCIAS

1. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 557-73.
2. Herrod HG, Stapleton FB, Trouy RL, Roy S. Evaluation of T lymphocyte subpopulations in children with nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1983 Jun;52(3):581-5. PubMed PMID: 6603300. Pubmed Central PMCID: 1536051.
3. Fiser RT, Arnold WC, Charlton RK, Steele RW, Childress SH, Shirkey B. T-lymphocyte subsets in nephrotic syndrome. *Kidney Int*. 1991 Nov;40(5):913-6. PubMed PMID: 1762295.
4. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, et al. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Sep;24(9):1691-8. PubMed PMID: 19495805. Pubmed Central PMCID: 2785122.
5. Fodor P, Saitua MT, Rodriguez E, Gonzalez B, Schlesinger L. T-cell dysfunction in minimal-change nephrotic syndrome of childhood. *Am J Dis Child*. 1982 Aug;136(8):713-7. PubMed PMID: 6980586.
6. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, et al. A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2006 May;21(5):603-10. PubMed PMID: 16525836.
7. Mello VR GA, Martini D, Toporovski J. . Ciclosporina no tratamento da síndrome nefrótica idiopática córtico-resistente e córtico-dependente. . *J Bras Nefrol*. 2002;24((Supl 1)):11-7.
8. Cardoso LSB, Silva JMPS, Simões e Silva AC, Pinheiro SCB, Salum RG. Síndrome Nefrótica. In: Leão Eea. *Nefrologia pediátrica*. Coopmed, Belo Horizonte. *Pediatria ambulatorial*; 2013.
9. Pereira Wde F, Brito-Melo GE, Guimaraes FT, Carvalho TG, Mateo EC, Simoes e Silva AC. The role of the immune system in idiopathic nephrotic syndrome: a review of clinical and experimental studies. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society* [et al]. 2014 Jan;63(1):1-12. PubMed PMID: 24121975.
10. Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L, et al. NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *Journal of immunology*. 2004 Jan 1;172(1):688-98. PubMed PMID: 14688382.

11. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res*. 2008 Dec;64(6):637-42. PubMed PMID: 18679168.
12. Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Macrophage inflammatory protein-1beta and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2009 Aug;51(4):443-7. PubMed PMID: 19400824.
13. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int*. 2000 Oct;58(4):1797-804. PubMed PMID: 11012915.
14. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):941-9. PubMed PMID: 11231349.
15. Wang Y, Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, et al. Depletion of CD4(+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):975-84. PubMed PMID: 11231352.
16. Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, et al. Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jan;20(1):57-67. PubMed PMID: 19020006. Pubmed Central PMCID: 2615726.
17. Hinoshita F, Noma T, Tomura S, Shiigai T, Yata J. Decreased production and responsiveness of interleukin 2 in lymphocytes of patients with nephrotic syndrome. *Nephron*. 1990;54(2):122-6. PubMed PMID: 2138253.
18. Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis*. 1993 Mar;21(3):251-9. PubMed PMID: 8447300.
19. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2000 Aug;14(8-9):872-8. PubMed PMID: 10955948.
20. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2002 May;39(5):958-65. PubMed PMID: 11979339.
21. Le Berre L, Herve C, Buzelin F, Usal C, Souillou JP, Dantal J. Renal macrophage activation and Th2 polarization precedes the development of nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *Kidney Int*. 2005 Nov;68(5):2079-90. PubMed PMID: 16221207.

22. Yap HK, Cheung W, Murugasu B, Sim SK, Seah CC, Jordan SC. Th1 and Th2 cytokine mRNA profiles in childhood nephrotic syndrome: evidence for increased IL-13 mRNA expression in relapse. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Mar;10(3):529-37. PubMed PMID: 10073603.
23. Hurtado A, Johnson RJ. Hygiene hypothesis and prevalence of glomerulonephritis. *Kidney international Supplement.* 2005 Aug(97):S62-7. PubMed PMID: 16014103.
24. Lai KW, Wei CL, Tan LK, Tan PH, Chiang GS, Lee CG, et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2007 May;18(5):1476-85. PubMed PMID: 17429054.
25. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int.* 1978 Feb;13(2):159-65. PubMed PMID: 713276.
26. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics.* 1976 Aug;58(2):259-63. PubMed PMID: 951142.
27. Youn YS, Lim HH, Lee JH. The clinical characteristics of steroid responsive nephrotic syndrome of children according to the serum immunoglobulin E levels and cytokines. *Yonsei Med J.* 2012 Jul 1;53(4):715-22. PubMed PMID: 22665336. Pubmed Central PMCID: 3381495.
28. Vianna HR, Soares CM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. [Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines]. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia.* 2011 Jul-Sep;33(3):351-64. PubMed PMID: 22042353. Inflamacao na doenca renal cronica: papel de citocinas.
29. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology.* 2009;27:485-517. PubMed PMID: 19132915.
30. Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual review of immunology.* 2007;25:821-52. PubMed PMID: 17201677.
31. Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Xie YY, Wang XG, et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2009 Sep;24(9):1683-90. PubMed PMID: 19499249.
32. Becton DaCB. Activation of Immune Cells for Cytokine Production. 2014 21/08/2014. Epub
http://www.bdbiosciences.com/resources/protocols/activation_immune_cells.jsp.

33. Gordon D, Nouri AM. Comparison of the inhibition by glucocorticosteroids and cyclosporin A of mitogen-stimulated human lymphocyte proliferation. *Clin Exp Immunol*. 1981 May;44(2):287-94. PubMed PMID: 7307337. Pubmed Central PMCID: 1537353.
34. Hammad A, Yahia S, Gouida MS, Bakr A, El-farahaty RM. Low expression of glucocorticoid receptors in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013 May;28(5):759-63. PubMed PMID: 23299233.
35. Shalaby SA, El Idrissy HM, Safar RA, Hussein ST. Glucocorticoid receptors and the pattern of steroid response in idiopathic nephrotic syndrome. *Arab journal of nephrology and transplantation*. 2012 Jan;5(1):13-7. PubMed PMID: 22283861.
36. Geginat J, Paroni M, Facciotti F, Gruarin P, Kastirr I, Caprioli F, et al. The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in immunology*. 2013 Nov 15;25(4):252-62. PubMed PMID: 24183700.
37. Park H, Park SG, Kim J, Ko YG, Kim S. Signaling pathways for TNF production induced by human aminoacyl-tRNA synthetase-associating factor, p43. *Cytokine*. 2002 Nov 24;20(4):148-53. PubMed PMID: 12543078.
38. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet*. 1974 Sep 7;2(7880):556-60. PubMed PMID: 4140273.
39. Osterman MT, Haynes K, Delzell E, Zhang J, Bewtra M, Brensinger C, et al. Comparative Effectiveness of Infliximab and Adalimumab for Crohn's Disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013 Jun 28. PubMed PMID: 23811254. Pubmed Central PMCID: 3883891.
40. Danese S. IBD: Golimumab in ulcerative colitis: a 'menage a trois' of drugs. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013 Sep;10(9):511-2. PubMed PMID: 23897288.
41. Ramirez-Herraiz E, Escudero-Vilaplana V, Alanon-Plaza E, Trovato-Lopez N, Herranz-Alonso A, Morell-Baladron A, et al. Efficiency of adalimumab, etanercept and infliximab in rheumatoid arthritis patients: dosing patterns and effectiveness in daily clinical practice. *Clinical and experimental rheumatology*. 2013 Jul-Aug;31(4):559-65. PubMed PMID: 23710583.
42. Rajanayagam J, Lewindon PJ. Infliximab as rescue therapy in paediatric autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology*. 2013 Oct;59(4):908-9. PubMed PMID: 23792030.
43. Chen D, Wang XB, Zhou Y, Zhu XC. Efficacy of infliximab in the treatment for dermatomyositis with acute interstitial pneumonia: a study of fourteen cases and

literature review. *Rheumatology international*. 2013 Oct;33(10):2455-8. PubMed PMID: 23715693.

44. Deeks ED. Certolizumab pegol: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013 Jan;73(1):75-97. PubMed PMID: 23338540.

No estudo anterior verificamos que os linfócitos, principalmente os linfócitos T CD4⁺ de pacientes com SNI, produziram citocinas pró-inflamatórias, mesmo sob uso de terapia imunossupressora. Esse aumento na produção das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-17 foi significativo nos indivíduos com proteinúria mais acentuada. Diante desses resultados, fizemos os seguintes questionamentos: i) os resultados apresentados poderiam estar associados a uma alteração no perfil migratório e de ativação dos linfócitos desses pacientes? e ii) como estaria o perfil fenotípico de elementos celulares relacionados à regulação da resposta imune? Sendo assim, o estudo a seguir analisou o perfil migratório em linfócitos circulantes dos pacientes com SNI por meio da avaliação de receptores de quimiocinas e da expressão da integrina CD18. Além disso, em linfócitos T CD4⁺, foi realizada a análise de FOXP3 e CTLA-4, que são moléculas características de células T reguladoras (Treg).

5.2 ARTIGO ORIGINAL

Perfil de ativação e regulação de linfócitos circulantes em pacientes pediátricos com síndrome nefrótica idiopática

Guimarães FTL^{1,2}; Brito-Melo GEA¹; da Silva RR¹; Guimarães PSS¹; Rocha-Vieira E¹; Pinheiro SVB²; Pereira WF^{1,2}; Simões e Silva AC².

¹ Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde - CIPq, UFVJM, Rodovia MGT 367, Km 583, nº 5000, Diamantina, MG, 29000-000, Brasil

² Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina –Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Alfredo Balena, 190, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brasil.

Correspondência para Ana Cristina Simões e Silva

Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Avenida Alfredo Balena, 190, 2º andar, sala 281, Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, Brasil, 30130-100. FAX: + 55-31-34099770, TEL: + 55-31-34098073, e-mail: acssilva@hotmail.com

Suporte financeiro: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil).

RESUMO

A Síndrome Nefrótica se caracteriza pela combinação de proteinúria maciça, hipoproteinemia e edema, podendo ocorrer em decorrência de doenças sistêmicas ou ser de natureza idiopática (SNI) devido ao acometimento renal primário. Estudos clínicos e experimentais têm evidenciado a participação do sistema imune na etiopatogênese da SNI. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar o perfil das populações leucocitárias no sangue periférico, o comportamento migratório e de ativação celular, assim como o percentual de células reguladoras em linfócitos circulantes em pacientes com SNI. Para isso foi realizado um estudo transversal com crianças e adolescentes com SNI corticossensível (SNCS, n=30) e corticorresistente (SNCR, n=14) em comparação a um grupo controle constituído de crianças e adolescentes saudáveis pareados em idade e sexo com os pacientes (CON, n=10). A análise *ex-vivo* dos leucócitos do sangue periférico revelou uma redução significativa nos percentuais de linfócitos B e de células NK nos pacientes com SNCR quando comparado ao grupo CON. Já o grupo com SNCS apresentou uma redução no valor percentual de células NKT quando comparado ao grupo CON. Na análise de linfócitos T reguladores, a expressão de FoxP3 em linfócitos TCD4⁺ foi maior nos pacientes do grupo SNCS quando comparados aos grupos CON e SNCR e o percentual de células CD4⁺CTLA4⁺ foi maior nos pacientes do grupo SNCS quando comparado ao grupo SNCR. Em relação ao potencial de ativação e de migração celular, observamos uma redução na expressão da integrina CD18 em linfócitos T (CD3⁺) e em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) no grupo SNCS quando comparado ao grupo CON. A análise dos receptores de quimiocinas, no entanto, revelou um

aumento significativo no percentual de linfócitos marcados para CCR2 e CXCR4 tanto no grupo SNCS quanto no SNCR quando comparados ao grupo controle. O aumento no percentual de células marcadas para o receptor CCR5 foi observado apenas no grupo SNCR comparado ao CON. A redução da expressão de CD18 na superfície de linfócitos T e TCD8, bem como as evidências de um perfil regulador em linfócitos TCD4 presente apenas em pacientes com SNCS sugerem que o controle da resposta inflamatória nesse grupo de pacientes possa estar relacionada a alterações nesses parâmetros. O aumento na expressão de receptores de quimiocinas CCR2 e CCR4 em todos os pacientes com SNI parece estar relacionado à natureza inflamatória da doença. No entanto, apenas o grupo com SNCR apresentou um aumento na expressão de CCR5, indicando atividade inflamatória maior ainda nesse grupo de pacientes. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a capacidade de ativar mecanismos reguladores da resposta imune esteja associada à sensibilidade aos corticosteroides.

Descritores: Síndrome nefrótica, citometria de fluxo, células T reguladoras, integrinas, quimiocinas.

ABSTRACT

Nephrotic syndrome (NS) is characterized by the combination of massive proteinuria, hypoproteinemia and edema. NS may be due to systemic diseases or be considered idiopathic (INS) as a consequence of primary renal alteration. Clinical and experimental studies have evidenced the role of immune system in the etiopathogenesis of INS. In this context, the present study aimed to evaluate the profile of peripheral leukocyte populations and the migratory and regulatory behavior of circulating lymphocytes in patients with INS. For this purpose, a cross sectional study was performed, including children and adolescents with steroid-sensitive (SS, n=30) and steroid-resistant INS (SR, n=14) in comparison to age and sex matched healthy controls (CON, n=10). The *ex-vivo* analysis of blood peripheral leukocytes showed significant reduction in the percentage of B lymphocytes and NK cells in SR patients when compared to controls. Only the SS group of patients presented a decrease in the percentage of NKT cells when compared to CON group. The analysis of T regulatory lymphocytes showed that the expression of FoxP3 in TCD4⁺ lymphocytes was higher in SS group when compared to SR and CON groups and the percentage of CD4⁺CTLA4⁺ cells was higher in SS group when compared to SR group. Regarding the migratory profile, we observed a reduction in the expression of CD18 integrin in T lymphocytes (CD3⁺) and in cytotoxic T lymphocytes (CD8⁺) in the SS group when compared to CON group. However, the analysis of chemokine receptors revealed a significant increase in the percentage of lymphocytes positive to CCR2 and CXCR4 in both SS and SR groups in comparison to CON group. The

increase in the percentage of cells positive to CCR5 receptor was only detected in SR patients in comparison to CON group. The reduction of the expression of CD18 on the surface of T lymphocytes and TCD8 and the detection of regulatory molecules in TCD4 lymphocytes that occurred only in the SS group suggest that the control of inflammatory response in this group of patients may be related to these changes. The increased expression of chemokine receptors, CCR2 and CCR4, in both groups of INS (SS and SR) seems to be related to the inflammatory nature of the disease. However, only the SR group presented an increased expression of CCR5, indicating even higher inflammatory activity in this group of patients. Taken together, our results suggest that the ability to activate immune regulatory mechanisms would be associated with steroid sensitivity.

Key words: Nephrotic syndrome, flow cytometry, regulatory T cells, Integrins, chemokines.

INTRODUÇÃO

A Síndrome Nefrótica (SN) é a doença glomerular mais frequente em crianças, sendo caracterizada pela combinação de proteinúria maciça, hipoproteinemia e edema (1-6). Quanto à etiologia, a SN pode ser secundária a doenças sistêmicas ou causada por alteração renal isolada, sendo denominada de SN primária ou idiopática (SNI) (4, 5). O tratamento inicial preconizado para a SNI é a corticoterapia (4). Com base na resposta aos corticosteroides, os pacientes com SNI são classificados em corticossensíveis (SNCS), corticodependentes (SNCD) e corticorresistentes (SNCR) (5, 7). A corticossensibilidade, ou seja, a remissão da doença após uso de corticosteroides é um fator de bom prognóstico, enquanto a dependência e/ou resistência à corticoterapia associam-se à evolução desfavorável (7).

Estudos clínicos e experimentais têm evidenciado a participação do sistema imune na etiopatogênese da SNI. Foram detectadas alterações na resposta promovida por linfócitos T e suas subpopulações, TCD8⁺ (8, 9) e TCD4⁺ (10-12), na expressão de citocinas/quimiocinas, tais como IL-2, IL-10 (11), IL-4 (13) e IL-8 (14, 15), no sistema do complemento (16), no papel de macrófagos (17-19) e de células NK (20) nos pacientes com SNI.

Estudos recentes têm também mostrado que, em algumas doenças crônico-degenerativas de natureza inflamatória, a ativação da resposta imune pode estar associada a uma disfunção nas células T reguladoras (Tregs). Alterações nos percentuais de linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ foram observadas em pacientes

com artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Sjögren primária, lesão vascular mediada por anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), além de miopatias inflamatórias e esclerose sistêmica [para revisão, ver referência (21)].

O controle ou regulação da resposta imune é um processo bastante complexo e não se limita apenas à avaliação da presença ou ausência de células T $CD4^+CD25^{High}FoxP3^+$. A análise da resposta reguladora deve incluir a avaliação da expressão de moléculas inibidoras de ativação e de migração celular, bem como a avaliação de potenciais interações entre as células relacionadas à regulação da resposta imunológica. Neste contexto, é importante ressaltar a participação da molécula CTLA-4, que, ao interagir com os ligantes CD80 e CD86, provoca inibição da proliferação celular e da produção de citocinas, sendo essa uma via importante pela qual as células Tregs exercem suas funções supressoras (22-24). Mais recentemente, tem sido postulado que as células NKT poderiam auxiliar a ação das células Tregs (25). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não foram bem elucidados.

Moléculas como selectinas, integrinas, quimiocinas e seus receptores são elementos-chave no processo de recrutamento de leucócitos (26). Por exemplo, o receptor LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen 1), também conhecido como CD18, é uma proteína pertencente à família das integrinas envolvida no recrutamento de células para o foco da lesão/inflamação. Essa molécula é expressa na superfície de linfócitos T ativados e favorece a interação entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos (27). Outro mecanismo responsável pela migração de células para o foco inflamatório é a expressão de receptores de quimiocinas na superfície dos leucócitos circulantes. As quimiocinas liberadas no foco da lesão

atingem a circulação e interagem com seus respectivos receptores na superfície de células ativadas ou não, promovendo a quimiotaxia dessas células (28).

Tendo em vista as alterações da resposta imune já detectadas na SNI, torna-se plausível a hipótese de que a progressão da lesão renal do paciente possa estar associada não apenas com a ativação dos elementos pró-inflamatórios, mas também com menor controle do processo inflamatório por parte dos linfócitos Treg. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil das subpopulações linfocitárias no sangue periférico, o comportamento da ativação celular e de migração além do perfil de regulação em linfócitos circulantes de pacientes com SNI. Os pacientes com SNI foram subdivididos conforme a resposta ao tratamento com corticosteroides, SNCS e SNCR, e comparados com crianças e adolescentes saudáveis e entre si. O perfil de linfócitos reguladores foi avaliado por meio da marcação antígeno-específica para os receptores CTLA-4 e FoxP3 em linfócitos T CD4 e o potencial migratório de linfócitos periféricos por meio da análise da integrina CD18 e dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3 e CXCR4.

PACIENTES E MÉTODOS

Caracterização dos pacientes e controles

Foi realizado um estudo transversal, utilizando amostra de conveniência, que incluiu 44 pacientes pediátricos com SNI (idade média = 10,9 anos) em acompanhamento regular na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de abril de 2010 a março de 2012. O critério

diagnóstico para SNI foi baseado no *International Study of Kidney Disease in Children* (29). Pacientes com síndrome nefrótica congênita ou secundária foram excluídos do estudo.

Os pacientes com SNI foram subdivididos conforme seu padrão de resposta à corticoterapia. Os pacientes que apresentavam remissão clínica e laboratorial após o tratamento por 8 semanas com corticosteroides foram alocados no grupo corticossensível (SNCS, n=30, 21 meninos e 9 meninas, idade média = $11,6 \pm 0,9$ anos) e os que se mostraram dependentes em altas doses ou resistentes aos corticosteroides, necessitando de outras medicações como uma tentativa para conseguir o controle da doença, foram reunidos no grupo denominado SNCR (n=14, 8 meninos e 6 meninas, idade média = $9,7 \pm 0,9$ anos).

O grupo controle foi constituído por crianças saudáveis, pareadas em sexo e idade com os pacientes, sem alterações ao exame clínico e que não apresentavam histórico de nefropatias, doenças crônicas, alergias ou infecções recentes (CON, n=10, 7 meninos e 3 meninas, idade média = $12,1 \pm 0,9$ anos).

Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Foi obtido o consentimento livre e esclarecido dos responsáveis por todos os sujeitos da pesquisa. Ressalta-se ainda que, em nenhum momento, o protocolo de estudo interferiu com qualquer prescrição ou recomendação médica e foi devidamente

respeitado o direito de recusa por parte dos responsáveis ou dos sujeitos em participar da pesquisa.

Protocolo do estudo

Os pacientes foram submetidos aos seguintes exames de rotina, que fazem parte do protocolo de seguimento da Unidade de Nefrologia Pediátrica do HC-UFMG: no sangue, dosagem proteínas totais, albumina, colesterol total, triglicérides, ureia e creatinina. Na urina de 24 horas, determinação da proteinúria. Na urina de amostra única, exame de urina rotina, dosagem de proteína e creatinina. O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado usando a fórmula de Schwartz (30).

Em relação aos pacientes com SNI, as coletas de sangue para avaliação dos parâmetros imunológicos foram concomitantes à coleta dos exames de rotina mencionados acima. Os controles saudáveis realizaram as coletas de sangue em uma única ocasião, específica para avaliação dos parâmetros imunológicos.

Coleta e processamento de amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA e foram processadas em até no máximo 24 horas após a coleta, para análise *ex vivo* das subpopulações de leucócitos, dos parâmetros reguladores, migratórios e de ativação celular por citometria de fluxo.

Análise *ex-vivo* dos leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo

Para a análise dos marcadores de superfície celular em leucócitos, utilizou-se o método de imunofluorescência recomendado pela Becton Dickinson (BD, San Diego, CA - USA) e modificado como a seguir: 50µL microlitros de sangue foram incubados no escuro, por 30 minutos a temperatura ambiente (t.a.), com 1 a 5µL de uma mistura de anticorpos monoclonais específicos para marcadores de superfície celular, conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína-FITC e ficoeritrina-PE.

Os anticorpos utilizados foram anti-CD3 PE (clone: HIT3a), anti-CD18 PE (clone: 6.7), anti-CD56 PE (clone: B159), anti-CCR5 PE (clone: 3A9) da BD Biosciences; anti-CD4 FITC (clone: RPA-T4), anti-CD8 PE (clone: HIT8a), anti-CD19 FITC (clone: HIB19), anti-CCR7 PE (clone: 3D12), anti-CXCR3 PE (clone: 1C6/CXCR3), anti-FoxP3 PE (clone: 259D/C7) da BD Pharmingentm; anti-CTLA4 PE (clone: 1493), anti-CCR2 PE (clone: 48607), anti-CXCR4 PE (clone: 12G5); anti-CD3 FITC (clone: UCHT1), anti-CD8 FITC clone: (HIT8a) da BioLegend.

Após 30 minutos de incubação, os eritrócitos foram lisados com 2mL de solução de lise de hemácias (100µL de solução de lise - Optilyse-B, Immunotec-USA) e incubados, no escuro, por 10 minutos à t.a., ao abrigo da luz, seguido de centrifugação à t.a. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com 1mL de tampão salina fosfatado (PBS = 0,15mol/L cloreto de sódio; 0,01mol/L fosfato de sódio - pH 7,2 a 7,4).

O anticorpo monoclonal anti-Foxp3 foi utilizado para marcação intracitoplasmática em células CD4⁺. Foi inicialmente realizada a marcação de

superfície celular com anti-CD4 FITC, conforme descrito acima, seguida da permeabilização das células com adição de solução permeabilizante (PBS contendo 0,5% de soro albumina bovina; 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina – pH 7,2 a 7,4) por 10 minutos à t.a. e posterior incubação com o anticorpo monoclonal anti-FOXP3 PE, por 30 minutos. Após esse período, as células foram novamente lavadas com solução permeabilizante. Após esse procedimento, as amostras foram imediatamente analisadas em citômetro de fluxo modelo FACScan (Becton-Dickinson, USA), sendo avaliados 10.000 eventos por meio do software Cell-Quest, utilizado para aquisição e análise de dados. Para identificação das populações celulares de interesse foram utilizados gráficos de distribuição pontual em função do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) celulares, seguido da análise da marcação com anticorpos fluorescentes.

Na análise fenotípica de leucócitos periféricos de crianças com SNI foram avaliadas as frequências de linfócitos B ($CD3^-CD19^+$), de células com fenótipo sugestivo de linfócitos NK ($CD3^-CD56^+$) e de células com fenótipo sugestivo de linfócitos NKT ($CD3^+CD56^+$). Também foram analisados os percentuais da célula T reguladora ($CD4^+CTLA4^+$) e dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3 e CXCR4 na superfície de linfócitos.

Outra estratégia de análise, por intensidade média de fluorescência, foi utilizada para determinar a expressão da célula T reguladora ($CD4^+FoxP3^+$), além da integrina CD18 em linfócitos T ($CD3^+CD18^+$), em linfócitos T auxiliares ($CD4^+CD18^+$) e em linfócitos T citotóxicos ($CD8^+CD18^+$).

Análises estatísticas

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism, versão 5.0 (GraphPad, San Diego, CA) para a análise estatística dos dados. Os valores apresentados foram expressos em média e erro padrão ou mediana e intervalos interquartílicos. Foi verificada a normalidade da distribuição dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. O teste T de Student para dados não pareados foi usado para comparar médias entre dois grupos de distribuição normal enquanto a análise de variância foi usada para comparação entre três grupos. O teste de Mann Whitney comparou as medianas dos dados que apresentaram distribuição não paramétrica. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Parâmetros clínicos

A tabela 1 mostra as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com SNI na ocasião das coletas de sangue para a execução do estudo. A comparação dos pacientes corticossensíveis e corticorresistentes apresentou diferença significativa apenas para a albumina sérica, que foi reduzida no grupo SNCR [3,8 (1,7-4,0)] em comparação com o SNCS [4,1 (3,8-4,4)]. Os demais parâmetros avaliados não mostraram diferenças significativas no momento da coleta (tabela 1).

A presença de elevada proteinúria, identificada por valor igual ou superior a 200mg/m²/24h indicou que 32,1% dos pacientes com SNCS encontravam-se em

recidiva no momento da coleta de sangue. Nos pacientes com SNCR foi encontrado 50% dos pacientes com proteinúria elevada.

Análise fenotípica dos leucócitos do sangue periférico

A análise fenotípica dos leucócitos circulantes de pacientes com SNI revelou uma redução percentual de linfócitos B e NK nos pacientes com SNCR ($CD3^-CD19^+ = 13,10 \pm 1,34\%$ e $CD3^-CD56^+ = 2,12 \pm 0,62\%$) quando comparado ao grupo CON ($CD3^-CD19^+ = 20,57 \pm 2,81\%$ e $CD3^-CD56^+ = 7,79 \pm 0,94\%$) (figura 1). Por outro lado, o grupo SNCS apresentou redução significativa apenas no valor percentual de células NKT ($CD3^+CD56^+ = 1,27 \pm 0,28\%$) quando comparado ao grupo CON ($CD3^+CD56^+ = 2,53 \pm 0,46\%$).

Análise de linfócitos Treg ($CD4^+FoxP3^+$ e $CD4^+CTLA4^+$) no sangue periférico

A expressão de $FoxP3^+$ em células $TCD4^+$ foi significativamente aumentada nos pacientes do grupo SNCS ($16,58 \pm 1,58$) em relação aos grupos CON ($9,88 \pm 1,43$) e SNCR ($11,08 \pm 1,19$). O aumento da expressão desse marcador nas células $TCD4^+$ do grupo SNCS foi 1,67 e 1,49 vezes maior, quando comparada aos grupos CON e SNCR, respectivamente (figura 2). Em relação à outra molécula reguladora avaliada, a frequência do $CTLA4^+$ em células $TCD4^+$ se apresentou significativamente aumentada nos pacientes com SNCS ($1,15 \pm 0,26$) comparados ao grupo SNCR ($0,4 \pm 0,1$).

Análise do perfil migratório e de ativação de linfócitos do sangue periférico

A análise da expressão de CD18 em linfócitos T (CD3⁺) dos pacientes com SNI revelou redução significativa desse marcador no grupo SNCS ($6,75 \pm 0,85$) quando comparado ao grupo CON ($15,26 \pm 4,97$). Essa alteração na expressão de CD18 em linfócitos T decorreu da diminuição desse marcador em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e não em linfócitos T auxiliares (CD4⁺), conforme mostrado na figura 3.

A análise do percentual de linfócitos que expressam receptores de quimiocinas mostrou aumento significativo no percentual de células positivas para CCR2 e CXCR4 tanto no grupo SNCS (CCR2= $6,42 \pm 1,18\%$ e CXCR4= $18,29 \pm 1,47\%$) quanto SNCR (CCR2= $4,00 \pm 0,77\%$ e CXCR4= $17,47 \pm 1,47\%$) quando comparados ao grupo controle (CCR2= $2,05 \pm 0,35\%$ e CXCR4= $12,70 \pm 1,28\%$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos SNCS e SNCR em relação ao percentual de linfócitos positivos para os receptores CCR2 e CXCR4 (figura 4).

A análise do percentual de células positivas para o receptor CCR5 mostrou aumento significativo no grupo SNCR ($7,43 \pm 0,88\%$) apenas em relação ao CON ($4,45 \pm 0,68\%$), sem diferir do percentual detectado no grupo SNCS ($6,62 \pm 0,80\%$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos estudados no percentual dos linfócitos positivos para os receptores CCR7 e CXCR3.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram investigadas possíveis alterações na função reguladora através da observação do comportamento das moléculas FoxP3 e CTLA-4, além de aspectos relacionados com a ativação e migração celular, como a expressão integrina CD18 em linfócitos T, linfócitos T auxiliares e citotóxicos, bem como em receptores de quimiocinas em linfócitos do sangue periférico de crianças com SNI. Como a resistência a corticosteroides é um importante fator preditivo da evolução da doença (31), comparamos a capacidade reguladora dos pacientes com SNCS e SNCR. Nossos resultados mostraram aumento significativo na expressão de FoxP3 por células TCD4⁺ nos pacientes com SNCS em comparação ao grupo com SNCR e ao grupo CON, indicando maior capacidade de controle da resposta inflamatória nos pacientes com SNCS. Outro resultado que corrobora com a melhor capacidade de regulação dos pacientes SNCS foi o aumento da frequência do CTLA-4 em linfócitos TCD4⁺ quando comparado ao grupo SNCR. Como o grupo SNCR não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CON nas análises das duas moléculas reguladoras, indica que não houve ativação de células reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺CTLA4⁺ nesses pacientes. Conseqüentemente, é provável que a função das células efetoras do sistema imune esteja aumentada nos pacientes com SNCR devido à menor capacidade de regulação da resposta inflamatória.

As células TCD4⁺ que expressam a proteína FoxP3 são essenciais para a manutenção da auto-tolerância e homeostase imunológica, pois o FoxP3 é um fator de transcrição fundamental para o desenvolvimento da função supressora das células Treg naturais (32, 33). A proteína FoxP3 possui a capacidade de suprimir a ativação,

proliferação e a produção de citocinas de uma ampla variedade de células efetoras do sistema imune *in vivo* e *in vitro*, incluindo células TCD4⁺ e TCD8⁺, células NK e NKT, células B e células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas ou macrófagos (34, 35).

Até o momento, poucos estudos avaliaram o comportamento das células reguladoras na SNI (12, 36-38). Recentemente, Kimata e colaboradores (2013) observaram remissão da SNI no decorrer da infecção pelo vírus Influenza B sem uso de medicação. Após a resolução da infecção pelo vírus, foi observada recidiva da SNI que, posteriormente, foi tratada com sucesso com prednisolona (36). A indução da remissão, assim como a resposta à prednisolona foram associadas ao aumento do número de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ circulantes, sugerindo que tanto a infecção pelo vírus da gripe B, quanto a administração do corticosteroide, teriam aumentado o número de células Tregs circulantes nos pacientes com SNI, conduzindo assim à remissão (36). Em outro estudo, Benz e colaboradores (2010) avaliaram a presença de Foxp3⁺ intersticial em biópsias de tecido renal por imunohistoquímica e encontraram redução da proteína nos pacientes com SNI em relação ao grupo controle (19). Os resultados sugerem que a redução de células Treg Foxp3⁺ no tecido renal de pacientes com SNI poderia favorecer processos inflamatórios renais, impactando sobre a função dos podócitos. Como o estudo de Benz e colaboradores incluiu apenas pacientes com SNI que foram submetidos à biópsia renal e, portanto, com comportamento córtico-dependente e/ou resistente não foi possível comparar os achados com pacientes corticossensíveis. Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo e desses dois estudos prévios sugerem

diminuição de células reguladoras em pacientes com SNCR, o que poderia contribuir para progressão da lesão renal e pior prognóstico.

O CTLA-4, outra importante molécula reguladora, tem sido apontado como a molécula-chave para a função de células Treg ativadas (aTreg) CD25^{hi}Foxp3^{hi}, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (39). O CTLA-4 pode suprimir células T antígeno-ativadas pela indução da enzima indolamina 2, 3-dioxigenase e pela remoção das moléculas CD80 e CD86 presentes na superfície das células dendríticas, internalizando-as e degradando-as nas vesículas lisossomais das células T (40-42). Ao perder CD80/CD86, as células apresentadoras tornam-se incapazes de fornecer o sinal co-estimulatório às células T efetoras via CD28 (41, 43-45). A célula CTLA-4⁺ também possui capacidade reguladora ao inibir outras células, como acontece ao produzir TGF- β , com consequente inibição da resposta imune. Embora a presença do CTLA4 não seja suficiente para o isolamento das células Treg, ele é tipicamente expresso em células T efetoras após a ativação (39) e a sua deficiência prejudica a função supressiva das células Treg *in vivo* e *in vitro* em ratos (40). Dessa forma, o aumento do percentual de células TCD4⁺CTLA4⁺, associado ao aumento na expressão de células TCD4⁺Foxp3⁺ corroboram a hipótese de que os pacientes sensíveis à corticoterapia possuem maior capacidade de regular a resposta imune e esta característica poderia contribuir, pelo menos em parte, pelo melhor prognóstico da SNCS comparado à SNCR.

Este estudo também buscou caracterizar os processos de migração e ativação celulares através da verificação do comportamento da integrina CD18, em subpopulações linfocitárias. Os resultados mostraram redução na expressão de CD18

em linfócitos T citotóxicos nos pacientes com SNCS em relação ao CON. Em estudo recente, utilizando modelo experimental de síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina em ratos, Pereira e colaboradores (2013) detectaram aumento na expressão de CD18 em linfócitos T citotóxicos, assim como em células NK, sugerindo maior atividade migratória dos linfócitos T citotóxicos e das células NK para o tecido renal (46). O aumento sugerido de células T no tecido renal foi também observado por Benz e colaboradores (2010), que encontraram aumento de células CD3⁺ intersticiais em biópsias renais de pacientes com SNI (19). Em nosso estudo, a redução da expressão do CD18 em células citotóxicas nos pacientes SNCS, nos leva a crer que a medicação imunossupressora foi eficiente para inibir a ativação e migração desta célula para o local da infecção, auxiliando na redução do processo inflamatório neste grupo de pacientes.

Também foram observadas alterações no percentual das células do sistema imunes analisadas. Houve redução no percentual de linfócitos B (CD3⁻CD19⁺) nos pacientes com SNCR quando comparados ao grupo CON. Lama e colaboradores (2002) encontraram resultado distinto, detectando aumento de linfócitos B (CD3⁻CD19⁺) circulantes em pacientes com SNCS e SNCR comparados aos controles (47), enquanto Benz e colaboradores (2010) observaram aumento significativo de células B glomerulares em biópsias renais de pacientes com glomeruloesclerose focal e segmentar em comparação aos pacientes com SN por lesões mínimas e ao grupo controle (19). Assim como os linfócitos B, o presente estudo também encontrou redução significativa da população NK (CD3⁻CD56⁺) no grupo SNCR. Em estudo que avaliou células NK no sangue periférico de crianças com SNI, Musial e colaboradores

(2010) encontraram menor expressão da cadeia zeta nas células NK de pacientes em recidiva da doença (21). Esses autores sugerem que a expressão diminuída da cadeia zeta pode contribuir para a ocorrência de recidivas, caracterizando alteração da resposta imune na SNI, particularmente das células citotóxicas (21). Em outro estudo, a proporção de células NK aumentou significativamente no grupo com proteinúria acentuada comparado com controles, diferindo dos achados do presente estudo (47). Como a população de linfócitos NK exerce função citotóxica com relevante participação durante a resposta inata em infecções virais, a redução encontrada, pode estar associada ao maior risco de infecções virais, como o aumento observado da ocorrência de recidivas associadas ao Sarampo e na alta suscetibilidade a infecções pneumocócicas pelos pacientes com SNI (48). No entanto, diversos estudos associando infecções por Sarampo (48) e Influenza B (36) relataram remissão da doença após infecção. Em resumo, o perfil de células nos pacientes com SNI pode variar conforme a atividade da doença (remissão ou recidiva), seu padrão histopatológico, a presença de infecções concomitantes, a resposta ao tratamento e a medicação em uso no momento da avaliação.

Outro resultado observado neste estudo foi a redução significativa do percentual de células NKT no sangue periférico nos indivíduos do grupo SNCS. É possível que a redução dessa população linfocitária, associada ao aumento dos receptores de quimiocinas, bem como ao aumento de parâmetros relacionados com regulação de linfócitos T, observados em nosso estudo, esteja associada uma migração celular direcionada que, no foco da lesão, auxilia o controle da resposta inflamatória nos indivíduos SNCS. Segundo Hongo e colaboradores (2012) em seu

estudo utilizando modelo combinado de transplante de medula e de coração, o aumento de células NKT e de células Foxp3⁺ nos tecidos de órgãos transplantados reduz a incidência de rejeição a transplantes (26). Alterações na expressão de receptores co-estimuladores negativos e de citocinas anti-inflamatórias pelas células Tregs e por outros subconjuntos de células T, de uma forma dependente de IL-4, resultou em tolerância aos transplantes de medula óssea e de coração (25). Sendo assim, é possível levantar a hipótese de que a queda de linfócitos NKT circulantes possa ser decorrente da migração dessas células para o tecido renal inflamado, e juntamente com linfócitos T reguladores, exerça uma função relevante no controle da resposta inflamatória e conseqüentemente na melhora clínica dos pacientes SNSC quando comparado aos indivíduos SNCR. No entanto, essa é apenas uma especulação baseada em estudos prévios e necessitam de análises adicionais, tais como as análises imunohistoquímicas de biópsias de indivíduos de ambos os grupos.

O presente estudo também avaliou o perfil de receptores de quimiocinas nas células inflamatórias dos pacientes com SNI, uma vez que a ligação das quimiocinas aos seus receptores resulta na ativação das integrinas, com conseqüente firme adesão e rolamento celular que favorecem migração direcionada dos leucócitos para microambientes específicos (49). O receptor de quimiocina CCR2, receptor da proteína-1 quimiotática de monócitos (CCL2 ou MCP-1), apresentou-se aumentado nos pacientes com SNCS e SNCR em relação ao grupo CON. Esse receptor é expresso principalmente pelas células inflamatórias e pelas células estromais e a sua expressão é aumentada por meio de estímulos pró-inflamatórios e lesões dos tecidos (50, 51). Recentemente, foi sugerido que a MCP-1 pode desencadear a expressão de

uma nova proteína, chamada *novel zinc-finger protein*, que induz o estresse do retículo endoplasmático, levando à autofagia e controle da resposta inflamatória através da inibição do fator nuclear- κ B (NF κ B), que é considerado um fator essencial para inflamação (52) e que já foi associado à SNI (12, 53).

Diversos estudos mostraram níveis elevados de MCP-1/CCL2 em doenças glomerulares progressivas, rejeição de transplante renal e nefrite intersticial (26, 54). Recentemente, Vianna e colaboradores detectaram aumento de MCP-1/CCL2 no plasma e na urina de pacientes com doença renal crônica secundária à glomerulosclerose focal e segmentar (55). Esse aumento na frequência de receptores CCR2 na SNI pode indicar que a maior possibilidade de interação de MCP-1 com seu receptor CCR2 contribua para o processo inflamatório presente na doença. Esta via, MCP-1/CCR2, foi recentemente reconhecida como um novo alvo terapêutico para tratamento de outras doenças, pois a interferência na interação de MCP-1 com seu receptor CCR2 mostrou efeitos benéficos contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (50, 56, 57). Além disso, estudos recentes utilizando moléculas capazes de inibir a interação MCP-1/CCR2 mostraram efeito anti-inflamatório em modelos experimentais de diferentes doenças, como esclerose múltipla, isquemia-reperfusão renal e nefropatia diabética (58-60). Dessa forma, a inibição da via MCP-1/CCR2 poderá vir a ser um alvo terapêutico para a SNI.

Outro receptor que se apresentou significativamente aumentado nos pacientes com SNI em relação ao CON foi o CXCR4, ligante do SDF-1 α ou CXCL12, uma molécula com potente atividade quimiotática para linfócitos. O aumento deste receptor, expresso por células hematopoiéticas, está associado a uma maior

quimiotaxia juntamente com seu ligante o SDF-1 α (61, 62). Segundo o estudo de Lotan e colaboradores (2008), que analisaram biópsias em diferentes doenças renais, o influxo de leucócitos para os rins doentes não ocorreu por meio da interação SDF-1 α /CXCR4 (63). O referido estudo mostrou ainda que, na síndrome nefrótica por lesões mínimas e na glomerulosclerose focal e segmentar, o ligante SDF-1 α e seu receptor CXCR4 foram encontrados em maior intensidade nos túbulos distais e dutos coletores e, em pequena quantidade ou ausente, nos túbulos proximais, no interstício e nos glomérulos.

Outro receptor de quimiocinas avaliado foi o CCR5 cujo ligante principal é a quimiocina CCL5 ou RANTES. Níveis elevados de RANTES/CCL5 também já foram associados a doenças glomerulares progressivas, rejeição ao transplante renal e nefrite intersticial (26). No presente estudo, os pacientes com SNCR apresentaram aumento do receptor CCR5 em relação ao grupo CON. As vias de sinalização do receptor CCR5 poderiam contribuir para a lesão renal mais acentuada nos pacientes com SNCR. Neste sentido, em estudo sobre vias de sinalização celular no tecido renal, Sakai e colaboradores (2002) detectaram que a progressão da lesão renal na glomerulopatia crescêntica utilizou a via de sinalização do receptor CCR5 que se associou à fosforilação da proteína quinase p38 MAPK e ativação do NF- κ B (64).

A SNI altera claramente parâmetros imunológicos do sangue periférico. A redução da expressão de moléculas de adesão, como CD18 em linfócitos TCD8⁺, e a maior expressão de células Treg CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺CTLA4⁺ em pacientes como SNCS indicam maior atividade migratória para o tecido inflamado e melhor controle da inflamação. Em contrapartida, a ativação dos receptores de quimiocinas indica maior

recrutamento de leucócitos, ação e liberação de citocinas e quimiocinas frente ao processo inflamatório. Dessa forma, os aumentos de CCR2 e CXCR4 para ambos os grupos com SNI pode contribuir para inflamação no tecido renal. Por outro lado, apenas os pacientes com SNCR apresentaram maior expressão do receptor CCR5, o que poderia estar associado à progressão da lesão renal neste subgrupo. As diferenças no perfil imunológico de pacientes com SNCS e SNCR podem estar associadas ao comportamento da doença e seu prognóstico, além de abrirem perspectivas para a avaliação de novos biomarcadores e alvos terapêuticos.

Tabela 1. Caracterização de aspectos clínicos e bioquímicos dos pacientes com SNI subdivididos conforme a resposta aos corticosteroides.

Parâmetros	SNCS n=28	SNCR n=16	<i>p</i> <0,05
Idade	11,6	9,7	-
Sexo (% meninos:meninas)	70:30	57:43	-
Recidiva (%)	32,1	50,0	-
Remissão (%)	67,9	50,0	-
Ureia (mg/dL)	22,0 [19-32]	26,0 [20-70]	NS
Creatinina (mg/dL)	0,5 [0,4-0,8]	0,5 [0,4-0,7]	NS
Triglicerídeos (mg/dL)	73 [58-148]	86 [65-168]	NS
Total colesterol (mg/dL)	155 [141-217]	172 [134-248]	NS
Albumina (g/dL)	4,1 [3,8-4,4]	3,8 [1,7-4,0]	0,0304
Taxa de filtração Glomerular†	113,5 ± 7,6	104,9 ± 13,1	NS
Proteinúria (mg/m ² /24h)	97 [33-274]	275 [42-3330]	NS
Medicação em uso			
Corticoide somente	4	1	-
Corticoide + ciclofosfamida/ciclosporina +iECA	1	3	-
Corticoide +iECA/ iECA+ARA	5	3	-
iECA / iECA + ARA	6	3	-
Ciclosporina somente	2	1	-
Ciclosporina + iECA/ iECA + ARA	0	2	-
Nenhum	9	1	-
Sem registro	1	2	-

Valores expressos como mediana [percentil 25 - percentil 75]; para todas as variáveis, exceto para razão de filtração glomerular expressa como média ± erro padrão. † Razão de filtração glomerular foi estimada usando a fórmula de Schwartz (30). SNCS = síndrome nefrótica córtico-sensível, SNCR = síndrome nefrótica córtico-resistente. iECA = inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARA = antagonista de receptor de angiotensina.

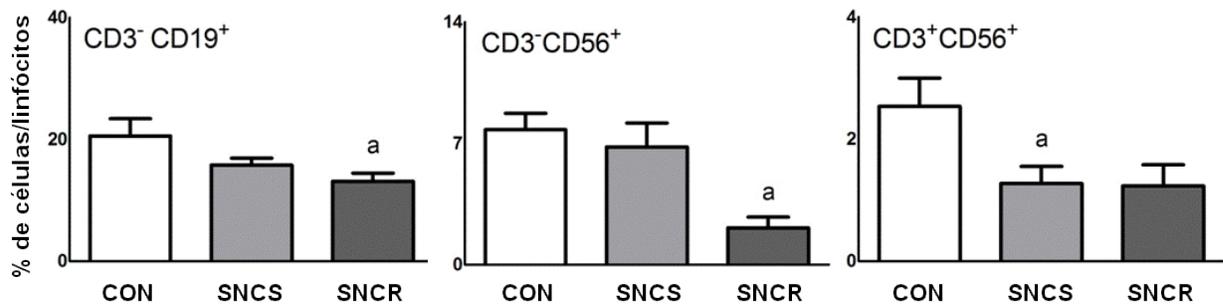


Figura 1. Análise do balanço celular em linfócitos do sangue periférico de crianças com SNI: percentual de linfócitos B (CD3⁻CD19⁺), de células sugestivas de NK (CD3⁻CD56⁺) e de NKT (CD3⁺CD56⁺) de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides. Diferenças significativas comparadas com CON p < 0.05 estão representadas pela letra “a”.

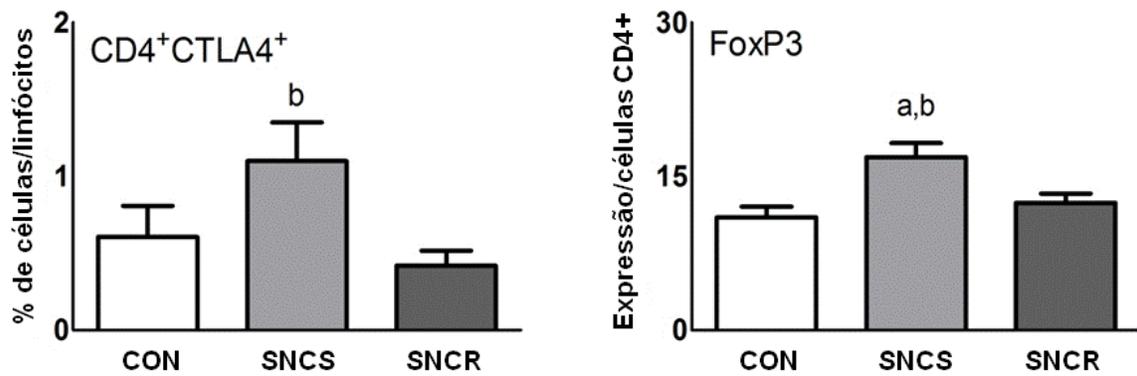


Figura 2. Análise de células T reguladoras em linfócitos TCD4⁺ do sangue periférico de crianças com SNI de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides. Diferenças significativas comparadas em relação ao grupo CON estão representadas pela letra “a” e diferenças significativas entre SNCS e SNCR estão representadas pela letra “b”. $p < 0.05$.

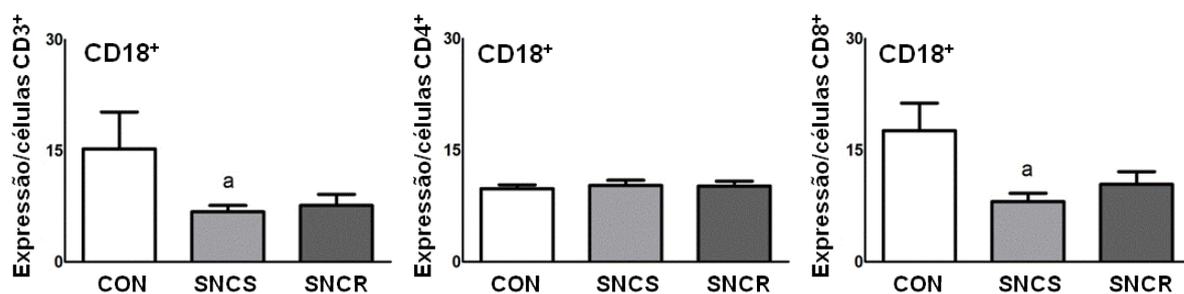


Figura 3. Análise da expressão de CD18 em células T, CD4 e CD8 em linfócitos do sangue periférico de crianças com SNI, de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides. Diferenças significativas comparadas com CON $p < 0.05$ estão representadas pela letra “a”.

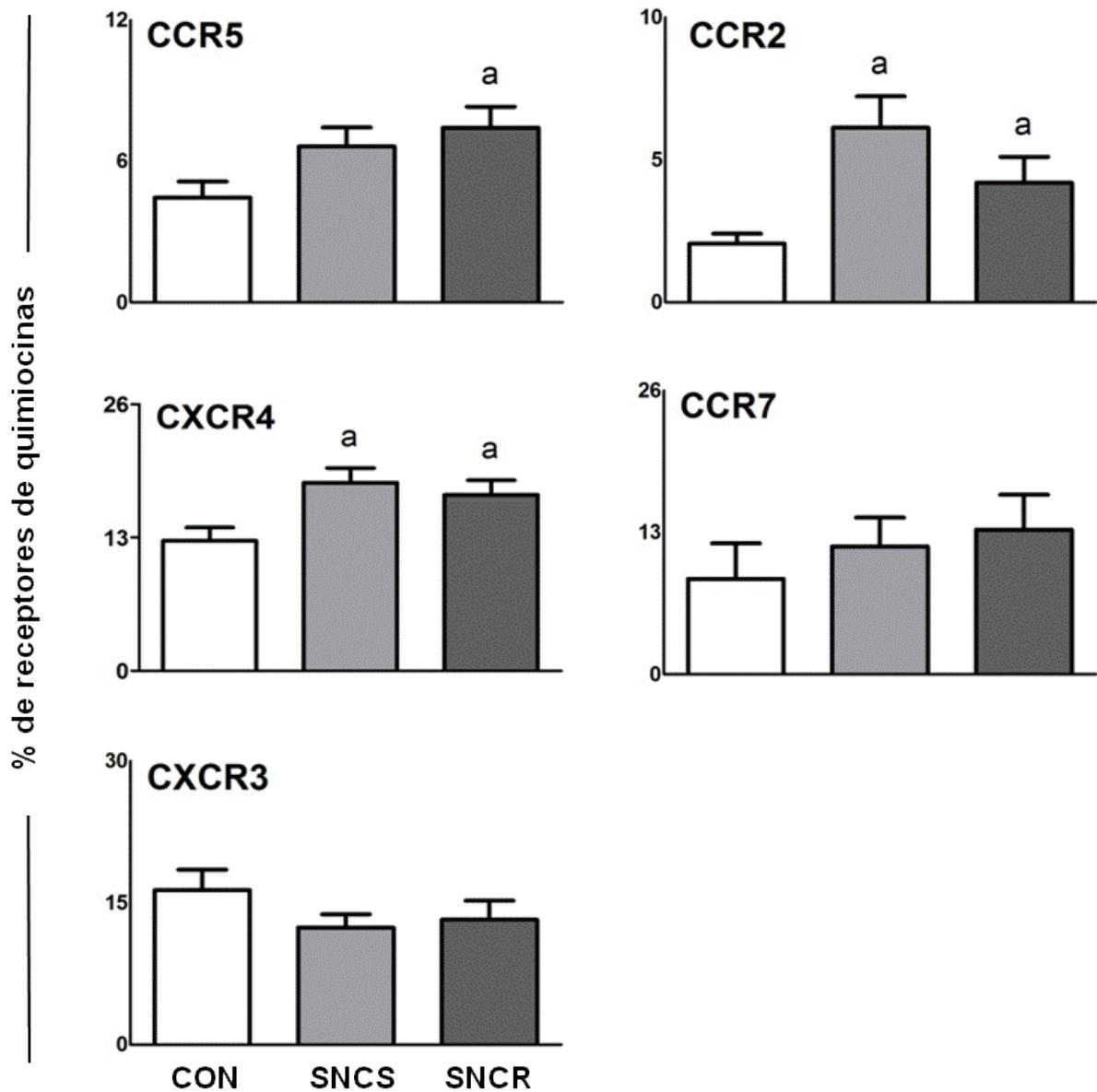


Figura 4. Análise da frequência de células positivas para receptores de quimiocinas no sangue periférico de linfócitos de crianças com SNI de acordo com a resistência à terapia com corticosteroides. Diferenças significativas comparadas com CON $p < 0.05$ estão representadas pela letra "a".

REFERÊNCIAS

1. Diniz JSS CL, Silva JMP. Síndrome nefrótica. In: Coopmed, editor. *Pediatria Ambulatorial*. 4a ed. Belo Horizonte 2005. p. 648-57.
2. McEnery PT, Strife CF. Nephrotic syndrome in childhood. Management and treatment in patients with minimal change disease, mesangial proliferation, or focal glomerulosclerosis. *Pediatr Clin North Am*. 1982 Aug;29(4):875-94. PubMed PMID: 7050865. Epub 1982/08/01. eng.
3. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplant*. 2004 Aug;8(4):344-8. PubMed PMID: 15265159. Pubmed Central PMCID: 1450337.
4. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Wilkins LW, editor. *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia 2004. p. 543-56.
5. Haycock G. The child with idiopathic nephrotic syndrome. In: Press U, editor. *Clinical Paediatric Nephrology*. 3rd ed. New York: Oxford: University Press; 2003. p. 341-66.
6. Quintaes PSL WV. Síndrome nefrótica: fisiopatologia, complicações e tratamento. . In: Sarvier, editor. *Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento* 2006.
7. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. *Pediatric Nephrology*. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 557-73.
8. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int*. 2000 Oct;58(4):1797-804. PubMed PMID: 11012915.
9. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Role of CD8(+) cells in the progression of murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):941-9. PubMed PMID: 11231349.
10. Wang Y, Wang Y, Feng X, Bao S, Yi S, Kairaitis L, et al. Depletion of CD4(+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int*. 2001 Mar;59(3):975-84. PubMed PMID: 11231352.
11. Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, et al. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Sep;24(9):1691-8. PubMed PMID: 19495805. Pubmed Central PMCID: 2785122.
12. Le Berre L, Bruneau S, Naulet J, Renaudin K, Buzelin F, Usal C, et al. Induction of T regulatory cells attenuates idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc*

Nephrol. 2009 Jan;20(1):57-67. PubMed PMID: 19020006. Pubmed Central PMCID: 2615726.

13. Valanciute A, le Gouvello S, Solhonne B, Pawlak A, Grimbert P, Lyonnet L, et al. NF-kappa B p65 antagonizes IL-4 induction by c-maf in minimal change nephrotic syndrome. *Journal of immunology*. 2004 Jan 1;172(1):688-98. PubMed PMID: 14688382.

14. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res*. 2008 Dec;64(6):637-42. PubMed PMID: 18679168.

15. Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Macrophage inflammatory protein-1beta and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 2009 Aug;51(4):443-7. PubMed PMID: 19400824.

16. Lenderink AM, Liegel K, Ljubanovic D, Coleman KE, Gilkeson GS, Holers VM, et al. The alternative pathway of complement is activated in the glomeruli and tubulointerstitium of mice with adriamycin nephropathy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2007 Aug;293(2):F555-64. PubMed PMID: 17522263.

17. Wang Y, Wang YP, Zheng G, Lee VW, Ouyang L, Chang DH, et al. Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int*. 2007 Aug;72(3):290-9. PubMed PMID: 17440493.

18. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang Y, Lee VW, et al. IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jun;21(6):933-42. PubMed PMID: 20299353. Pubmed Central PMCID: 2900959.

19. Benz K, Buttner M, Dittrich K, Campean V, Dotsch J, Amann K. Characterisation of renal immune cell infiltrates in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jul;25(7):1291-8. PubMed PMID: 20386928.

20. Musial K, Ciszak L, Kosmaczewska A, Szteblich A, Frydecka I, Zwolinska D. Zeta chain expression in T and NK cells in peripheral blood of children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2010 Jan;25(1):119-27. PubMed PMID: 19830460.

21. Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, Amoura Z. Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2011 Oct;10(12):744-55. PubMed PMID: 21621000.

22. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *Journal of immunology*. 2004 Apr 15;172(8):4676-80. PubMed PMID: 15067041.

23. Serra P, Amrani A, Yamanouchi J, Han B, Thiessen S, Utsugi T, et al. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 2003 Dec;19(6):877-89. PubMed PMID: 14670304.
24. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jul 22;105(29):10113-8. PubMed PMID: 18635688. Pubmed Central PMCID: 2481354.
25. Hongo D, Tang X, Dutt S, Nador RG, Strober S. Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1581-9. PubMed PMID: 22174155. Pubmed Central PMCID: 3286219.
26. Segerer S. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S15-8. PubMed PMID: 12612944.
27. Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annual review of biomedical engineering*. 2005;7:151-85. PubMed PMID: 16004569.
28. Guernon J, Combadiere C. Role of chemokines polymorphisms in diseases. *Immunology letters*. 2012 Jul 30;145(1-2):15-22. PubMed PMID: 22698179.
29. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int*. 1978 Feb;13(2):159-65. PubMed PMID: 713276.
30. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*. 1976 Aug;58(2):259-63. PubMed PMID: 951142.
31. Leão Eea. Nefrologia pediátrica. In: Coopmed, editor. *Pediatria ambulatorial*. Belo Horizonte2013.
32. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61. PubMed PMID: 12522256.
33. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*. 2003 Apr;4(4):330-6. PubMed PMID: 12612578.
34. Langier S, Sade K, Kivity S. Regulatory T cells: the suppressor arm of the immune system. *Autoimmunity reviews*. 2010 Dec;10(2):112-5. PubMed PMID: 20807589.

35. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*. 2007 Mar;13(3):108-16. PubMed PMID: 17257897.
36. Kimata T, Tsuji S, Kino J, Kitao T, Yamanouchi S, Kaneko K. Close association between proteinuria and regulatory T cells in patients with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2013 Apr;28(4):667-9. PubMed PMID: 23263711.
37. Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Xie YY, Wang XG, et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2009 Sep;24(9):1683-90. PubMed PMID: 19499249.
38. Liu LL, Qin Y, Cai JF, Wang HY, Tao JL, Li H, et al. Th17/Treg imbalance in adult patients with minimal change nephrotic syndrome. *Clinical immunology*. 2011 Jun;139(3):314-20. PubMed PMID: 21450528.
39. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*. 2009 May;30(5):636-45. PubMed PMID: 19464986.
40. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008 Oct 10;322(5899):271-5. PubMed PMID: 18845758.
41. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011 Apr 29;332(6029):600-3. PubMed PMID: 21474713. Pubmed Central PMCID: 3198051.
42. Simone R, Pesce G, Antola P, Rumbullaku M, Bagnasco M, Bizzaro N, et al. The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses. *BioMed research international*. 2014;2014:215763. PubMed PMID: 24605322. Pubmed Central PMCID: 3925529.
43. Rudd CE. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nature reviews Immunology*. 2008 Feb;8(2):153-60. PubMed PMID: 18219311.
44. Karshovska E, Weber C, von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease. *Thrombosis and haemostasis*. 2013 Jun 20;110(3). PubMed PMID: 23783401.
45. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A. Chemokines in health and disease. *Experimental cell research*. 2011 Mar 10;317(5):575-89. PubMed PMID: 21223965. Pubmed Central PMCID: 3063402.
46. Pereira WdF. Análises bioquímicas, biométricas, histológicas e imunológicas em ratos com síndrome nefrótica induzida pela doxorrubicina Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas; 2013 (Tese).

47. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2002 May;39(5):958-65. PubMed PMID: 11979339.
48. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet.* 1974 Sep 7;2(7880):556-60. PubMed PMID: 4140273.
49. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular immunology.* 2013 Aug;55(1):49-58. PubMed PMID: 23253941.
50. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clinical science.* 2009 Aug;117(3):95-109. PubMed PMID: 19566488.
51. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research.* 2009 Jun;29(6):313-26. PubMed PMID: 19441883. Pubmed Central PMCID: 2755091.
52. Kolattukudy PE, Niu J. Inflammation, endoplasmic reticulum stress, autophagy, and the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 pathway. *Circulation research.* 2012 Jan 6;110(1):174-89. PubMed PMID: 22223213. Pubmed Central PMCID: 3265021.
53. Szilagy K, Podracka L, Franke NE, Mojzis J, Mirossay L. A new link between steroid resistance, glucocorticoid receptor and nuclear factor kappa B p65 in idiopathic nephrotic syndrome. *Neuro endocrinology letters.* 2009;30(5):629-36. PubMed PMID: 20035271.
54. Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine & growth factor reviews.* 1998 Mar;9(1):9-23. PubMed PMID: 9720753.
55. Vianna HR, Soares CM, Silveira KD, Elmiro GS, Mendes PM, de Sousa Tavares M, et al. Cytokines in chronic kidney disease: potential link of MCP-1 and dyslipidemia in glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 2013 Mar;28(3):463-9. PubMed PMID: 23161207.
56. Frangogiannis NG, Dewald O, Xia Y, Ren G, Haudek S, Leucker T, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2007 Feb 6;115(5):584-92. PubMed PMID: 17283277.
57. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation research.* 2004 Oct 29;95(9):858-66. PubMed PMID: 15514167.
58. Brodmerkel CM, Huber R, Covington M, Diamond S, Hall L, Collins R, et al. Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2

antagonist, INCB3344. *Journal of immunology*. 2005 Oct 15;175(8):5370-8. PubMed PMID: 16210643.

59. Kang YS, Cha JJ, Hyun YY, Cha DR. Novel C-C chemokine receptor 2 antagonists in metabolic disease: a review of recent developments. *Expert opinion on investigational drugs*. 2011 Jun;20(6):745-56. PubMed PMID: 21466412.

60. Sayyed SG, Ryu M, Kulkarni OP, Schmid H, Lichtnekert J, Gruner S, et al. An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes. *Kidney Int*. 2011 Jul;80(1):68-78. PubMed PMID: 21508925.

61. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):845-8. PubMed PMID: 9933168.

62. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, et al. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3354-60. PubMed PMID: 11369624.

63. Lotan D, Sheinberg N, Kopolovic J, Dekel B. Expression of SDF-1/CXCR4 in injured human kidneys. *Pediatr Nephrol*. 2008 Jan;23(1):71-7. PubMed PMID: 17972109.

64. Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, et al. p38 MAPK phosphorylation and NF-kappa B activation in human crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Jun;17(6):998-1004. PubMed PMID: 12032188.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a SNI venha sendo estudada há décadas, sua etiopatogenia ainda não está esclarecida. Tem sido destacado o caráter inflamatório da doença, evidenciado pelo sucesso no tratamento com corticoides e outros imunossupressores em parte dos pacientes, além da identificação de alterações em populações e subpopulações leucocitárias, bem como em citocinas e quimiocinas tanto em modelos animais que simulam a doença quanto em humanos.

Tendo em vista a ausência de consenso em relação à etiopatogenia da SNI, a proposta desta Tese foi a realização de uma abrangente investigação do perfil fenotípico e funcional de células do sistema imune de pacientes com SNI, tendo resultado na produção de dois artigos originais.

O primeiro artigo buscou investigar a distribuição das subpopulações leucocitárias em pacientes com SNI, através da determinação da frequência de linfócitos T auxiliares, T citotóxicos e linfócitos B que expressam citocinas anti e pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-17, após estímulo inespecífico *in vitro* com o mitógeno miristato acetato de forbol (PMA). Essa estratégia de análise permitiu avaliar o comportamento celular desses indivíduos frente a um desafio imune inespecífico e demonstrou como principais resultados o aumento na produção de TNF- α em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) mesmo em uso de corticoterapia e a redução na produção de IFN- γ nos linfócitos T citotóxicos dos pacientes com SNI, independente dos níveis de proteinúria. Ao agruparmos os pacientes em razão da proteinúria, os pacientes com proteinúria elevada (PE) apresentaram aumento no percentual das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e

IL-17 em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) quando comparado ao grupo controle. Somente os pacientes com PE apresentaram aumento na expressão de TNF- α em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) em comparação ao controle. Dessa forma, essa primeira investigação conclui que ocorreu uma resposta pró-inflamatória mais acentuada, mediada tanto por linfócitos T auxiliares quanto T citotóxicos nos pacientes com proteinúria persistente, mesmo em uso de medicação anti-inflamatória.

Os resultados encontrados no primeiro artigo nos levaram ao questionamento sobre uma possível associação com alterações no perfil migratório e de ativação em linfócitos, assim como no perfil de elementos celulares relacionados à regulação da resposta imune nesses pacientes. O principal ponto foi investigar se os pacientes com SNI estariam apresentando uma resposta imune exacerbada em função dos da elevação de marcadores relacionados com migração e ativação celular de linfócitos T ou se haveria alguma disfunção nos mecanismos de controle da inflamação, principalmente aquele mediado por linfócitos T reguladores (Treg).

Diante dessas indagações, avaliamos o perfil migratório em linfócitos circulantes dos pacientes com SNI por meio da avaliação de receptores de quimiocinas e da expressão da integrina CD18. Além disso, foi realizada a análise das moléculas FOXP3 e CTLA-4 em linfócitos T CD4⁺, buscando caracterizar o perfil regulador desses pacientes.

O principal resultado apresentado nesse artigo demonstra o aumento da expressão de FoxP3 em linfócitos TCD4⁺ nos pacientes do grupo SNCS quando comparados aos grupos CON e SNCR, indicando uma melhor resposta supressora associada à medicação. Também se destaca a redução na expressão da integrina

CD18 em linfócitos T (CD3⁺) e em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) no grupo SNCS quando comparado ao grupo CON, sugerindo uma resposta positiva da medicação sobre esses pacientes, com redução da migração e ativação do sistema imune.

A redução da expressão de CD18 na superfície de linfócitos T totais e TCD8, bem como as evidências de um perfil regulador em linfócitos TCD4 presente apenas em pacientes com SNCS sugerem que o controle da resposta inflamatória possa desempenhar um papel chave na progressão clínica da doença.

ANEXOS

Anexo 1 – Parecer COEP-UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

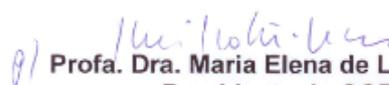
Parecer nº. ETIC 064/05

Interesse: Profa. Ana Cristina Simões e Silva
Depto. de Pediatria - FMUFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 19 de outubro de 2005, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Avaliação dos níveis circulantes e urinários do fator de transformação e crescimento do tipo beta (TGF-BETA) em crianças e adolescentes com síndrome nefrótica** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

Anexo 2 – Parecer CEP-UFVJM



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Comitê de Ética em Pesquisa/CEP



Ofício: 182/09
Diamantina, 07 de Outubro de 2009.

A Sua Senhoria, o Senhor
Prof. Dr. Gustavo Eustaquio Brito Alvim de Melo
Departamento de Farmacologia/FCBS
Assunto: parecer consubstanciado Projeto

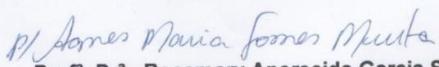
Prezado Pesquisador,

O projeto protocolado sob o registro provisório nº. 014/09 e intitulado: "Análise do perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico de pacientes com Síndrome Nefrótica Idiopática", foi reavaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e, tendo em vista a apresentação das adequações sugeridas por este Comitê e a conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, recebeu o parecer **APROVADO**. Seu número de registro definitivo é 046/09.

O referido estudo permitirá analisar o perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico de pacientes com Síndrome Nefrótica Idiopática, onde serão utilizadas amostras de sangue venoso de 30 pacientes atendidos no setor de pediatria do Hospital das Clínicas da UFMG.

Deverá ser apresentado relatório de pesquisa a este Comitê um ano após a aprovação do projeto.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Rosamary Aparecida Garcia Stuchi
Coordenadora CEP/UFVJM

Campi I e II - Reitoria - Diamantina - MG - Brasil
Rua da Glória - nº 187 - Centro - CEP: 39100-000 - Diamantina - MG - Brasil - PABX: (38) 3531-1811
Campus Avançado do Mucuri - Teófilo Otoni - MG - Brasil
Av. Dr. Luiz Boali Porto Salman - s/nº - Ipiranga - CEP: 39801-000 - Teófilo Otoni - MG - Brasil - PABX: (33) 3522-6037

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes portadores de síndrome nefrótica e seus responsáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO (para pacientes portadores de síndrome nefrótica e seus responsáveis)

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “Análise do Perfil Fenotípico de Leucócitos do Sangue Periférico de Pacientes com Síndrome Nefrótica Idiopática”, para a qual você foi escolhido por fazer parte do grupo acompanhado pelo setor de Nefrologia Pediátrica do HC/UFMG e sua participação não é obrigatória. Você também poderá desistir de participar a qualquer momento e retirar seu consentimento.

Esta pesquisa será desenvolvida no Hospital das Clínicas da UFMG e na UFVJM para estudarmos parâmetros sanguíneos relacionado com a sua resistência imunológica e verificar se tais parâmetros apresentam-se alterados quando ocorre piora ou melhora do funcionamento do rim em crianças e adolescentes com síndrome nefrótica. Portanto, pretende-se verificar uma possível relação entre as alterações sanguíneas e a forma da doença (se é mais branda ou mais forte), bem como a resposta ao tratamento e a piora do funcionamento dos rins.

Sua participação consiste em permitir a coleta de sangue de seu filho (ou de sua filha), através de punção de veia periférica realizada em jejum no dia de uma consulta agendada ou no dia de coleta no laboratório. Todo o processo será realizado por profissionais treinados, dentro das Normas de Biossegurança e os riscos, embora mínimos, são aqueles inerentes ao processo de coleta. O sangue será utilizado na pesquisa e depois será descartado ou guardado até o final da execução desse projeto. Garantimos ainda que a identidade e a privacidade do paciente serão mantidas e os resultados desse estudo somente serão utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina, o que contribuirá para o avanço do conhecimento acerca da referida doença.

Finalmente, será resguardado o direito de recusa em participar do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que o paciente continuará a receber o tratamento convencional para a síndrome nefrótica, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo será conduzido pelos Drs. Ana Cristina Simões e Silva, do Hospital das Clínicas da UFMG, Gustavo Eustáquio Alvin Brito de Melo e Msc. Fábio Tadeu Lourenço Guimarães da UFVJM.

Eu, paciente que sofro de síndrome nefrótica, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue para dosar parâmetros imunológicos sanguíneos. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, mãe, (ou pai ou responsável) pelo paciente, entendi tudo que foi explicado sobre a pesquisa e concordo que meu filho (ou minha filha ou outro grau de parentesco) participe do estudo sobre parâmetros imunológicos no sangue.

Dou meu consentimento para que seja coletado sangue de meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) para medir parâmetros imunológicos. Confirmo que meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) foi selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia dessa autorização.

Nome do paciente: _____ Assinatura: _____

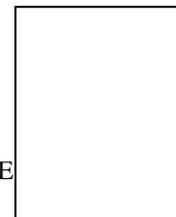
Nome do responsável: _____ Assinatura: _____

Grau de parentesco: _____

Data e local: _____

Pesquisadores responsáveis: Ana Cristina Simões e Silva/Fábio T. L. Guimarães/Gustavo E
Informações

Rua da Glória 187 - Centro - Caixa Postal 38 CEP 39.100-000 - Diamantina / MG
Telefax.: (38) 3532-1235 Prof. Gustavo Melo/Fábio Guimarães - E-mail: gbrito1998@yahoo.com



Anexo 4 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes saudáveis e seus responsáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO (para pacientes saudáveis e seus responsáveis)

Você está sendo convidado(a) para participar da pesquisa “Análise do Perfil Fenotípico de Leucócitos do Sangue Periférico de Pacientes com Síndrome Nefrótica Idiopática”, sabemos que seu filho (ou sua filha) não tem problema de rins e é sadio (a). Mas, gostaríamos de pedir autorização para medirmos a quantidade dessas substâncias no sangue de seu filho (ou de sua filha). Estamos querendo comparar a quantidade dessas substâncias que tem no sangue de seu filho (ou de sua filha) com a quantidade que tem no sangue de pacientes com síndrome nefrótica. Sua participação no estudo não é obrigatória. Você também poderá desistir de participar a qualquer momento e retirar seu consentimento.

Esta pesquisa será desenvolvida no Hospital das Clínicas da UFMG e na UFVJM para estudarmos parâmetros sanguíneos relacionado com a resistência imunológica e verificar se tais parâmetros apresentam-se alterados quando ocorre piora ou melhora do funcionamento do rim em crianças e adolescentes com síndrome nefrótica. Portanto, pretende-se verificar uma possível relação entre as alterações sanguíneas e a forma da doença (se é mais branda ou mais forte), bem como a resposta ao tratamento e a piora do funcionamento dos rins.

Sua participação consiste em permitir a coleta de sangue de seu filho (ou de sua filha) através de punção de veia periférica realizada em jejum no dia de uma consulta agendada ou no dia de coleta no laboratório. Todo o processo será realizado por profissionais treinados, dentro das Normas de Biossegurança e os riscos, embora mínimos, são aqueles inerentes ao processo de coleta. O sangue será utilizado na pesquisa e depois de analisado será descartado ou guardado até o final da execução desse projeto. Garantimos ainda que a identidade e a privacidade do paciente serão mantidas e os resultados desse estudo somente serão utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina, o que contribuirá para o avanço do conhecimento acerca da referida doença.

Finalmente, será resguardado o direito de recusa em participar do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que o paciente continuará a receber sua assistência médica.

Este estudo será conduzido pelos Drs. Ana Cristina Simões e Silva, do Hospital das Clínicas da UFMG, Gustavo Eustáquio Alvin Brito de Melo e Msc. Fábio Tadeu Lourenço Guimarães da UFVJM .

Eu entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue para medir parâmetros imunológicos no sangue. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, mãe, (ou pai ou responsável) pelo paciente, entendi tudo que foi explicado sobre a pesquisa e concordo que meu filho (ou minha filha ou outro grau de parentesco) participe do estudo sobre alteração de parâmetros imunológicos no sangue.

Dou meu consentimento para que seja coletado sangue e urina de meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) para medir parâmetros imunológicos no sangue. Confirmando que meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) foi selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia dessa autorização.

Nome do paciente: _____ Assinatura: _____

Nome do responsável: _____ Assinatura: _____

Grau de parentesco: _____

Data e local: _____

Pesquisadores responsáveis: Ana Cristina Simões e Silva/Fábio T. L. Guimarães/Gustavo E. B. A. Melo
Informações

Rua da Glória 187 - Centro - Caixa Postal 38 CEP 39.100-000 - Diamantina / MG
Telefax.: (38) 3532-1235 Prof. Gustavo Melo/Fábio Guimarães - E-mail: gbrito1998@yahoo.com

Anexo 5 – Esquema de tratamento dos pacientes com SNI

UNIDADE DE NEFROLOGIA PEDIÁTRICA – HC/UFMG

PROTOCOLO DE SÍNDROME NEFRÓTICA POR LESÕES MÍNIMAS E GLOMERULOESCLEROSE SEGMENTAR E FOCAL

1- DEFINIÇÃO:

- A Síndrome nefrótica caracteriza-se por proteinúria maciça, hipoproteinemia e graus variados de edema. Frequentemente, estão presentes hiperlipedemia e lipidúria.
- Características de síndrome nefrótica por lesões mínimas (SNLM): início entre 1 a 6 anos, ausência de hematuria e hipertensão arterial persistentes, função renal e complemento normais, ausência de doença sistêmica e corticossensibilidade.
- Características de síndrome nefrótica com lesões complexas: hematuria persistente, hipertensão arterial, comprometimento da função renal, sinais ou sintomas de doença sistêmica, hipocomplementenemia, história de doença renal grave na família, idade de início acima de 8 anos ou abaixo de 1 ano e corticoresistência.

2- DIAGNÓSTICO:

NO EPISÓDIO INICIAL DEVERÃO SER SOLICITADOS:

- Proteinúria de 24 horas E relação proteína/creatinina em amostra única de urina (> 50 mg/kg/dia ou relação proteína/creatinina em amostra única de urina > 2,0);
- Proteínas totais e frações (Proteína total < 5,0 g/dl e albumina < 2,5 mg/dl);
- Colesterol total (> 200mg/dl) e triglicérides (>170 mg/dl);
- Urina rotina (albuminúria, cilindros graxos, corpos graxos ovalados);
- Ácido úrico;
- Glicemia;
- Função renal (uréia e creatinina);
- Hemograma (eosinofilia na GESF e em parasitoses);
- Exame parasitológico de fezes (pacientes com esquistossomose podem apresentar lesão glomerular com síndrome nefrótica; afastar estrogiloidíase antes da corticoterapia)
- Complemento sérico (C3 e C4) – reduzido na glomerulonefrite membranoproliferativa, LES, glomerulonefrite por shunt, glomerulonefrite por endocardite;
- FAN;
- Sorologias (HBsAg, anti-HCV, VDRL, HIV, IgG e IgM anti-toxoplasmose).

NAS RECIDIVAS, SOLICITAR:

- Proteinúria de 24 horas E relação proteína/creatinina em amostra única de urina;
- Proteínas totais e frações;
- Função renal (Uréia e creatinina);
- Colesterol total e triglicérides;
- Urina rotina;
- Avaliar a possibilidade de outros exames para descartar infecção, se necessário.

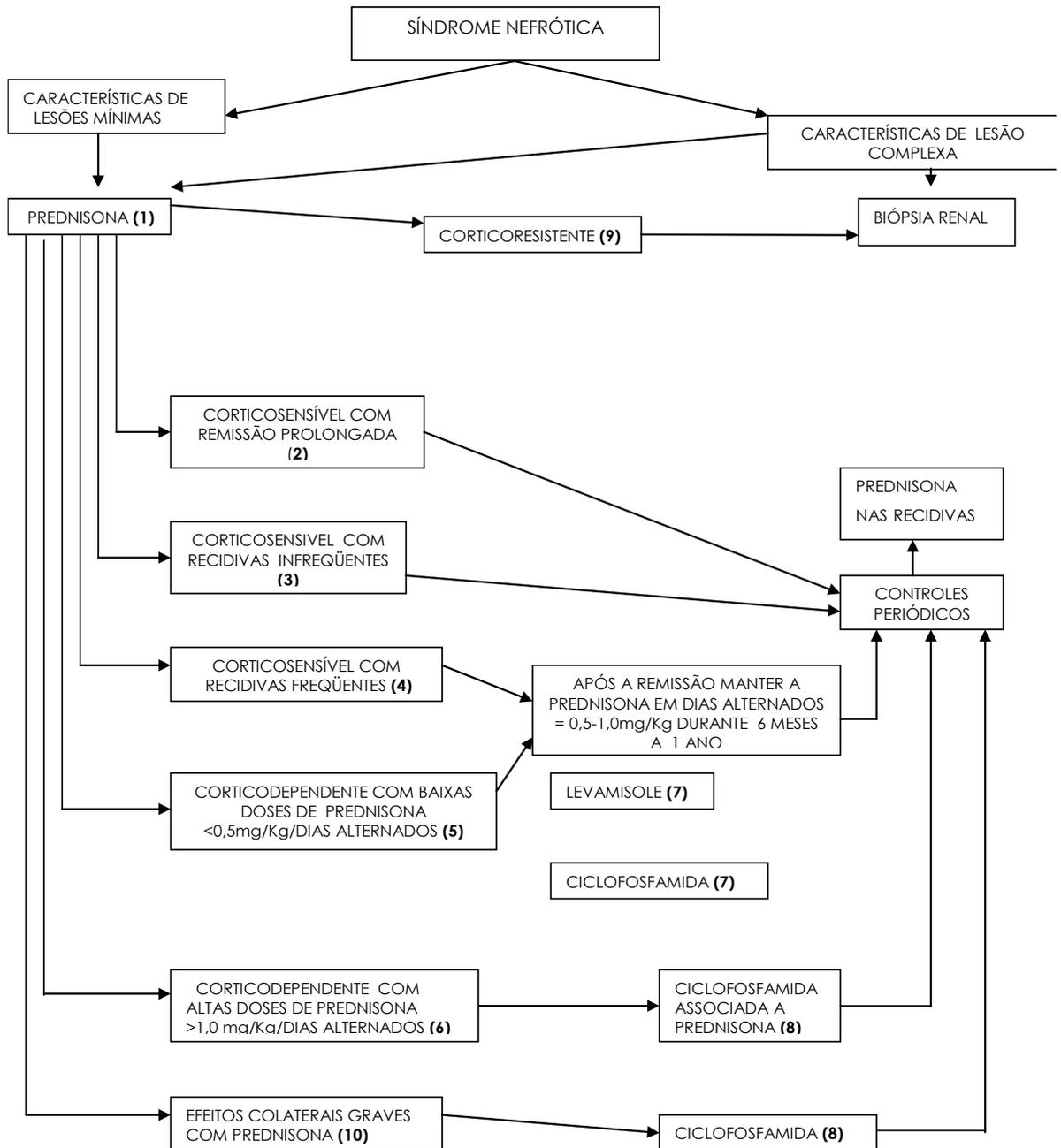
BIÓPSIA RENAL:

- Deverá ser realizada em crianças com lesão complexa. Os casos que apresentam apenas hematuria microscópica ou hipertensão leve ou idade acima de 8 anos podem ser submetidos a tratamento inicial com prednisona e observada a resposta.

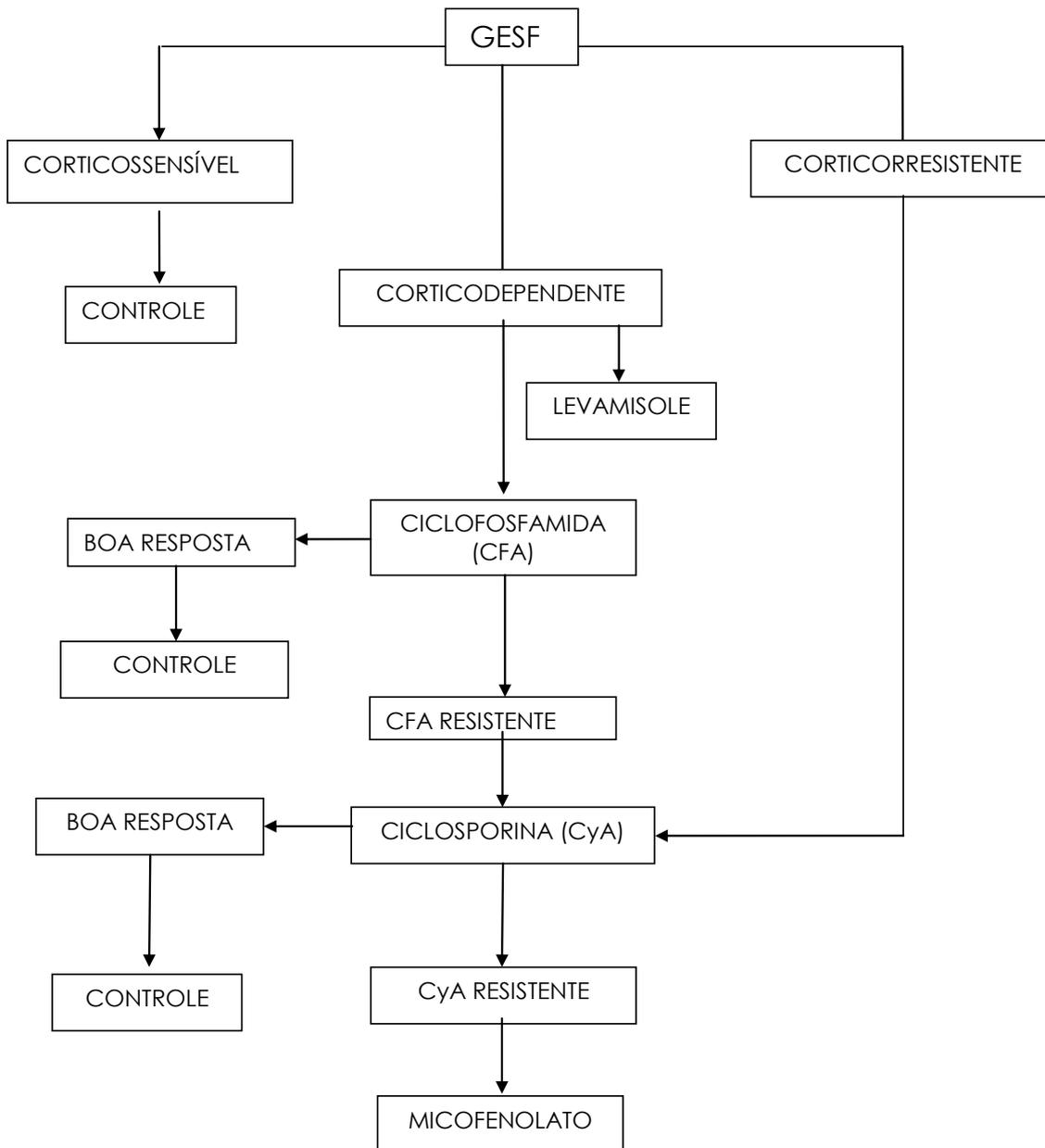
3- TRATAMENTO:**MEDIDAS GERAIS:**

- Dieta: A dieta do paciente com função renal normal deve ser hipossódica e normoprotéica. A ingestão de líquidos deve ser normal. Não se deve restringir potássio na fase oligúrica da doença, apenas em casos de hiperpotassemia. A ingestão de sódio pode ser liberada assim que houver diurese franca;
- Atividade física normal;
- Tratamento das infecções se for o caso. Investigar peritonites, pneumonia, celulite.
- Tratamento empírico de parasitoses intestinais: mebendazol + Tiabendazol em crianças menores que 15 Kg e ivermectina em crianças maiores que 15 Kg.

TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR (SOB ORIENTAÇÃO DE UM NEFROLOGISTA):
GLOMERULONEFRITE POR LESÕES MÍNIMAS



- 1- Episódio inicial: prednisona 2 mg/kg/dia, dose única pela manhã, durante 6 semanas (máximo de 60mg/dia) seguido por mais 6 semanas com a dose de 1,5 mg/kg (40 mg/m²) em dias alternados. A seguir retirada de 25% da droga, cada 15 dias, até dose de 2,5mg em dias alternados quando o tratamento será suspenso.
- 2- Corticossensível: quando o paciente apresenta-se sem proteinúria na quarta ou no máximo na oitava semana após o início da corticoterapia. Remissão prolongada: permanecem mais de um ano em remissão após retirada do corticóide.
- 3- Recidivas infreqüentes: prednisona deve ser usada como no episódio inicial, porém a duração do tratamento contínuo será de 4 semanas e 2 semanas em dias alternados. Depois, se reduz 25% da dose a cada semana. Pode ser usado o esquema descontínuo após 3 dias seguidos de proteinúria negativa (nos casos em que o paciente tiver fita para medir a proteinúria em casa).
- 4- Recidivas freqüentes: duas recidivas em 6 meses ou 4 recidivas em um ano. Após 2 anos de recidivas freqüentes, deve ser tentado o tratamento com corticoesteróides, na dose de 0,5-1,0 mg/kg em dias alternados, durante 6 meses a um ano.
- 5- Corticodependente com doses baixa de prednisona (<0,5 mg/kg em dias alternados): corticoesteróides, na dose de 0,5-1,0 mg/kg em dias alternados, durante 6 meses a um ano.
- 6- Corticodependentes em altas doses: recidiva durante a retirada da corticoterapia ou dentro de duas semanas após a suspensão da droga. Associar ciclofosfamida a prednisona e avaliar biópsia renal se não houver resposta.
- 7- Avaliar uso de levamizol: Pacientes corticodependentes. Dose de 2-3 mg/kg em dias alternados. Se não houver resposta em 3 ou 4 meses, suspender o uso. Deve-se realizar hemograma de 15/15 dias devido ao risco de leucopenia. Se o segundo hemograma normal, não é necessário exames quinzenais. Deve-se suspender a mediação se leucopenia < 4000 ou neutropenia < 1000. . Ciclofosfamida fica como 3ª opção nos corticodependentes, devendo ser evitada em adolescentes.
- 8- Ciclofosfamida (CFA): 2 mg/kg/dia durante 12 semanas ou 3mg/kg/dia durante 8 semanas, dose única pela manhã com controles quinzenais com leucograma. Dose máxima acumulada de 200mg/Kg.
- 9- Corticorresistência: quando não ocorre reversão da proteinúria com 6 a 8 semanas de corticoterapia. Aqueles pacientes ciclofosfamida resistentes serão submetidos à biópsia renal.
- 10- Efeitos colaterais a corticoterapia: avaliar ciclofosfamida.

GLOMERULUESCLEROSE SGMENAR E FOCAL

1. Corticossensível: vide SNLM
2. Corticodependente: Indicado ciclofosfamida. Caso paciente seja adolescente (Turner 2), avaliar uso de levamisole ou ciclosporina no lugar de CFA.
3. Ciclofosfamida (CFA): 2 mg/kg/dia durante 12 semanas ou 3mg/kg/dia durante 8 semanas, dose única pela manhã com controles quinzenais com leucograma. Dose máxima acumulada de 200mg/Kg.
4. Ciclofosfamida sensível: controles periódicos.
5. Levamisole: . Dose de 2-3 mg/kg em dias alternados. Se não houver resposta em 3 ou 4 meses, suspender o uso. Deve-se realizar hemograma de 15/15 dias devido ao risco de leucopenia. Se o segundo hemograma normal, não é necessário exames quinzenais. Deve-se suspender a mediação se leucopenia < 4000 ou neutropenia < 1000.
6. Ciclofosfamida resistente: trocar CFA por ciclosporina.
7. Ciclosporina (CyA – 100mg/ml): Dose inicial de 5-6 mg/Kg/dia. Tempo mínimo de uso: 2 anos. Se o paciente faz uso de corticoesteróide, iniciar retirada gradual como no esquema de SNLM. Ajustar o nível sérico de ciclosporina (colhido em C 0) entre 100-200 ng/mL.
8. Ciclosporina sensível: controles periódicos.
9. Ciclosporina resistente: Avaliar micofenolato mofetil ou sódico.
10. Micofenolato mofetil (Cellcept® 500 mg): Dose de 1200 mg/ m²/ dia, em duas doses diárias.
11. Micofenolato sódico (Mifortic® 180 mg ou 360 mg): Dose de 800 mg/m²/dia, em duas doses diárias.

OBSERVAÇÕES:

- 1) Se paciente estiver em remissão e nível sérico de ciclosporina estiver abaixo do valor de referência, manter dose em uso.
- 2) Se proteinúria ascendente, avaliar o ajuste da ciclosporina pelo nível sérico.
- 3) Em caso de nível sérico de ciclosporina baixo, avaliar não aderência, erro na administração ou colesterol elevado. Em caso de nível sérico elevado, avaliar não aderência.
- 4) Em paciente em uso de ciclosporina, monitorar magnésio devido ao risco de toxicidade.
- 5) Em caso de hipertensão arterial sistêmica não controlada com drogas, avaliar suspensão da ciclosporina.

- 6) Indicar biópsia em paciente com piora rápida da função renal para avaliar toxicidade pela ciclosporina.
- 7) Limite do clearance de creatinina para iniciar ciclosporina é maior ou igual 60ml/min/1,73 m².
- 8) Paciente em uso de ciclosporina e em surto: avaliar pulsoterapia com metilprednisolona durante 3 dias na dose de 30 mg/kg. Monitorar nível sérico de ciclosporina, pois a pulsoterapia pode aumentar este.

TRATAMENTO COMPLEMENTAR:

APENAS EM CASOS ESPECIAIS SOB ORIENTAÇÃO DE UM NEFROLOGISTA.

- No caso de anasarca refratária, congestão importante e/ou oligúria avaliar uso de:
 - Furosemida (40 mg/comprimido ou 10mg/ml ampola): 2 a 6 mg/kg/dia em 2 a 4 tomadas;
 - Hidroclorotiazida (50 mg/comprimido): 2 a 5 mg/kg/dia em 2 tomadas;
 - Espironolactona (25mg, 50mg e 100mg): 1 a 5 mg/kg/dia;
 - Albumina 5 a 10% associada a furosemida: A dose da albumina é de 1 a 2 g/kg. Deve-se administrar furosemida 1mg/kg durante a infusão de albumina ou no meio da infusão e após a infusão.

MEDIDAS RENOPROTETORAS

Utilizada em paciente corticoresistentes. Inicia-se com inibidores da enzima da conversão da angiotensina (IECA) e em caso de não resposta, associar bloqueadores de receptores da angiotensina.

- IECA:
 - Captopril (12,5 mg, 25 mg e 50 mg): dose inicial 1mg/kg/dia dividido em 3 tomadas. Dose máxima 5mg/kg/dia.
 - Enalapril (5mg, 10 mg e 20 mg): dose inicial de 0,1 mg/ kg /dia dividido em duas tomadas. Dose máxima de 0,5mg/kg/dia ou 10mg/dia.

Observar no mínimo 3 meses a resposta. Ajustar mensalmente a dose até alcança a dose máxima. Caso não apresente resposta, associar bloqueador de receptores da angiotensina.

Ajustar a dose monitorando pressão arterial, função renal e potássio sérico. Em caso de efeitos colaterais, diminuir a dose ou suspender a medicação

- Bloqueadores de receptores da angiotensina:
 - Losartan (12,5mg e 50 mg): dose inicial de 1 mg/kg/dia (máximo 50 mg/dia).

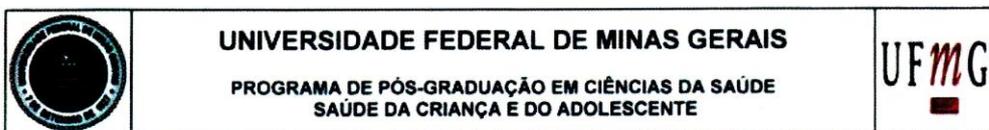
TRATAMENTO DA HIPERLIPIDEMIA:

- Sinvastatina (5mg, 10 mg, 20mg, 40 mg e 80 mg): deve ser usada em paciente acima de 10 anos de idade em pacientes com LDL > que 160 mg/dl. Dosar a CK total, AST e ALT basais. Monitorar função hepática, CK total e colesterol a cada 3 a 6 meses.

Obs: A ciclosporina aumenta o nível sérico das estatinas.

4- CONTROLES PERIÓDICOS:

- Deverão ser pedidos exame de urina rotina, proteinúria de 24 horas ou relação proteína/creatinina em amostra única de urina, colesterol, triglicérides, proteínas (total e frações), uréia e creatinina.
- As crianças corticodependentes e com recidivas freqüentes deverão ser avaliadas anualmente por oftalmologista para verificação da possibilidade de catarata.
- Os que usaram ciclofosfamida deverão realizar espermograma na época mais adequada, conforme cada caso.
- Conferir o cartão de vacinas: se a criança estiver em remissão e pelo menos 6 semanas sem usar corticosteróides, encaminhar para vacinação contra varicela e pneumococo, se não imunizada.



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO FABIO TADEU LOURENÇO GUIMARÃES

Realizou-se, no dia 31 de outubro de 2014, às 14:00 horas, sala 829, 8º andar, da Faculdade de Medicina da UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada "ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME NEFRÓTICA IDIOPÁTICA", apresentada por **FABIO TADEU LOURENÇO GUIMARÃES**, número de registro 2009711607, graduado no curso de Nutrição, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, à seguinte Comissão Examinadora formada pelos Professores Doutores: Ana Cristina Simões e Silva - Orientadora (UFMG), Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo - Coorientador (UFVJM), Débora Marques de Miranda (UFMG), Sérgio Veloso Brant Pinheiro (UFMG), Etel Rocha Vieira (UFVJM) e Wagner de Fátima Pereira (UFVJM).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Reprovada


 31/10/2014
 CONFERE COM ORIGINAL
 Centro de Pós-Graduação
 Faculdade de Medicina - UFMG

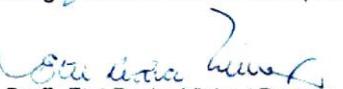
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
 Belo Horizonte, 31 de outubro de 2014.


 Profª. Ana Cristina Simões e Silva (Doutora)


 Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo (Doutor)


 Profª. Débora Marques de Miranda (Doutora)


 Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro (Doutor)


 Profª. Etel Rocha Vieira (Doutora)


 Prof. Wágner de Fátima Pereira (Doutor)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

UFMG

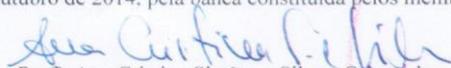
FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DO PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE CRIANÇAS COM SÍNDROME NEFRÓTICA IDIOPÁTICA

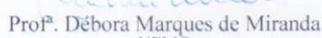
FABIO TADEU LOURENÇO GUIMARÃES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Ciências da Saúde.

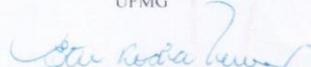
Aprovada em 31 de outubro de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof.^a Ana Cristina Simões e Silva - Orientador
UFMG


Prof. Gustavo Eustáquio Brito Alvim de Melo
UFVJM


Prof.^a Débora Marques de Miranda
UFMG


Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro
UFMG


Prof.^a Etel Rocha Vieira
UFVJM


Prof. Wágner de Fátima Pereira
UFVJM

Belo Horizonte, 31 de outubro de 2014.