

Marcelo Ferraz de Oliveira Souto

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
NA SÍNDROME NEFRÓTICA EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2007**

Marcelo Ferraz de Oliveira Souto

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS
NA SÍNDROME NEFRÓTICA EM
CRIANÇAS E ADOLESCENTES**

**Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde,
Área de Concentração: Saúde da
Criança e do Adolescente, da
Universidade Federal de Minas
Gerais, sob a orientação da Prof^a.
Dr^a. Ana Cristina Simões e Silva**

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

***MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA SÍNDROME
NEFRÓTICA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES***

Marcelo Ferraz de Oliveira Souto

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais,**

como requisito parcial para obtenção do grau Mestre.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Prof^ª. Ana Cristina Simões e Silva

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientadora: Prof^ª. Maria Goretti Moreira Guimarães Penido

Professora Adjunta do Departamento de Pediatria

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Prof^a Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-reitor de Pós-graduação: Prof. Jaime Arturo Ramirez

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Francisco José Penna

Vice-diretor: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

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

Coordenador: Prof. Joel Alves Lamounier

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

Coordenador: Prof. Joel Alves Lamounier

Sub-coordenador: Prof. Eduardo Araújo de Oliveira

Prof^a Ana Cristina Simões e Silva

Prof. Francisco José Penna

Prof^a Ivani Novato Silva

Prof. Lincoln Marcelo Silveira Freire

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof^a Regina Lunardi Rocha

Rute Maria Velásquez Santos (Representante Discente)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos às seguintes pessoas, que de uma ou outra forma contribuíram para a realização desse trabalho:

- Professora Ana Cristina Simões e Silva, pela dedicação e compromisso na sua função de orientadora, pelos ensinamentos, confiança e amizade.
- Professora Maria Goretti Moreira Guimarães Penido, co-orientadora nesse trabalho, pela amizade e pela postura acolhedora desde o início da minha vida acadêmica.
- Professor Luiz Sérgio Bahia Cardoso, pelo apoio incondicional ao trabalho e por compartilhar sua extensa experiência com síndrome nefrótica.
- Professores Mauro Martins Teixeira e Antônio Lúcio Teixeira Júnior, pela grande colaboração na elaboração e execução de todo o trabalho.
- Pesquisadores Remo de Castro Russo e Kátia Daniela da Silveira, pela participação na realização dos exames laboratoriais e revisão dos artigos.
- Funcionários do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG, em especial ao senhor José Oswaldo, pela ajuda na coleta das amostras.
- Professores e funcionários da Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG.
- Meus pais, Augusto e Noélia, pelo amor, confiança, dedicação, e por terem sempre investido na minha formação, mesmo nos momentos de dificuldade.
- Minha irmã Renata, pelo apoio.
- Tatiana, pelo amor, compreensão e incentivo.
- Amigos do grupo BHBel, companheiros nesses dez anos de estrada.
- Às crianças e adolescentes que participaram do estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD2AP – proteína associada a CD2

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

FP – fator de permeabilidade

FSGS – focal-segmental glomerulosclerosis (GEFS)

GEFS – glomerulosclerose focal e segmentar

GFR – glomerular filtration rate

IL – interleucina

INS – síndrome nefrótica idiopática

I- κ B – inibidor κ B

MBG – membrana basal glomerular

MCNS – minimal change nephrotic syndrome (SNLM)

MCP-1 – proteína de quimiotaxia de monócitos-1 (CCL2)

NF- κ B – fator nuclear- κ B

RANTES – regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (CCL5)

SN – síndrome nefrótica

SNCR – síndrome nefrótica córtico-resistente

SNCS – síndrome nefrótica córtico-sensível

SNI – síndrome nefrótica idiopática

SNLM – síndrome nefrótica por lesões mínimas

SRNS – steroid-resistant nephrotic syndrome (SNCR)

SSNS – steroid-sensitive nephrotic syndrome (SNCS)

TGF- β – fator de crescimento e transformação- β

Th – linfócito T *helper*

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 – Introdução	9
2 – Revisão da Literatura	16
<i>Artigo: Fisiopatologia da síndrome nefrótica em crianças e adolescentes.</i>	
3 – Objetivos	47
4 – Pacientes e Métodos	48
4.1 – Pacientes	48
4.1.1 – Critérios de Inclusão	48
4.1.2 – Critérios de Exclusão	48
4.1.3 – Aspectos Éticos	49
4.2 – Métodos	49
4.2.1 – Protocolo do Estudo	49
4.2.2 – Coleta e Processamento de Amostras	50
4.2.3 – Ensaio Imunoenzimáticos	51
4.2.4 – Análise Estatística	52
5 – Resultados e Discussão	55
<i>Artigo: Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria.</i>	
6 – Comentários Finais	79
7 – Anexos	84
7.1 – Protocolo de Tratamento da Síndrome Nefrótica Idiopática	85
7.2 – Termos de Consentimento	86
7.3 – Comprovantes de Submissão dos Artigos para Publicação	88
7.4 – Comprovante de Apresentação (pôster) em Congresso	88

1 – INTRODUÇÃO

A síndrome nefrótica (SN), caracterizada por proteinúria maciça, edema e hipoalbuminemia, é a doença glomerular mais comum em crianças e adolescentes (1). É um dos diagnósticos mais comuns em nefrologia pediátrica, com espectro evolutivo amplo, que abrange desde remissão completa do quadro até a evolução para doença renal crônica (DRC).

O tratamento utilizado é considerado empírico e apresenta eficácia variada. As decisões terapêuticas são baseadas na resposta ao uso de corticosteróides e evolução da doença (3). De fato, crianças com SN córtico-resistente (SNCR), ou seja, que não apresentam remissão da doença com o uso de corticóide, ou que não toleram sua retirada, têm uma chance muito maior de evolução para DRC do que aqueles com SN córtico-sensível (SNCS) (3, 4).

Apesar de muito estudada, a fisiopatologia da SN permanece obscura. A maioria dos estudos sugere alterações na barreira glomerular (1, 2), presença de algum fator circulante de permeabilidade (4, 5) e/ou uma disfunção do sistema imunológico (4, 5, 6, 7).

Nos últimos anos, tem sido proposto que alterações no perfil de citocinas e quimiocinas em pacientes com SN podem contribuir para proteinúria e lesão glomerular (8, 9). As citocinas são um grupo de proteínas produzidas por células de vários tecidos, com propriedades sinalizadoras, auxiliando na comunicação intercelular (5). Já as quimiocinas constituem um grupo de citocinas de baixo peso molecular cuja principal ação é o recrutamento e ativação de leucócitos em vários modelos de inflamação – daí o nome “quimiocina”, derivado da associação dos termos “quimiotaxia” e “citocina” (10, 11). Uma citocina que é freqüentemente associada à progressão de doenças renais é o

fator de crescimento e transformação- β (TGF- β) (12, 13), que tem funções fibrogênicas e pró-inflamatórias ao nível dos rins (13, 14, 15). O TGF- β induz acúmulo de monócitos e estímulo de fibroblastos ao estimular o aumento da expressão de duas quimiocinas: proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1/CCL2) e *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES/CCL5) (16, 17, 18). MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 já foram encontradas em quantidade elevada no rim em doenças glomerulares progressivas, rejeição a transplantes e nefrite intersticial (19, 20). Outra quimiocina de interesse no estudo da fisiopatologia da SN 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 (18, 19). Vários estudos têm mostrado a elevação dos níveis séricos e urinários de IL-8/CXCL8 durante episódios de recidiva da SN (5, 9, 21), enquanto que outros sugerem um papel dessa quimiocina na indução de proteinúria (8).

Os estudos mais recentes objetivam a caracterização, em nível molecular, do distúrbio imunológico da SN. Várias alterações de concentração e expressão genética de citocinas e quimiocinas já foram descritas, mas ainda não há uma hipótese que agregue todos os achados (5, 6, 9). Não há definição até o presente momento de marcadores laboratoriais capazes de caracterizar melhor a doença. Sendo assim, o prognóstico só pode ser estabelecido após a avaliação da resposta ao tratamento com corticosteróides.

Além disso, a SN tem apresentado um comportamento mais agressivo nos últimos anos, relacionado à maior incidência de GEFS e à evolução potencial para DRC. Ressalta-se que o custo sócio-econômico da abordagem terapêutica das doenças renais crônicas tende a se tornar inviável para a maioria absoluta dos países ocidentais (22, 23). Neste contexto, a determinação de biomarcadores tem mostrado resultados

promissores, correlacionando-se bem com o padrão de evolução das glomerulopatias, ou com o grau de proteinúria (12, 13, 24). Existe a perspectiva de serem exames laboratoriais importantes na abordagem de pacientes com doenças renais, principalmente no que diz respeito à modalidade terapêutica ideal e ao prognóstico (24). Dessa forma, justifica-se claramente a necessidade de um maior entendimento da fisiopatologia das nefropatias, sobretudo na infância, tendo em vista a possibilidade de definir marcadores prognósticos e, talvez até, futuramente atuar na prevenção da perda da função renal.

Dentro dessa perspectiva, esta dissertação de Mestrado está inserida em uma linha de pesquisa que aborda os marcadores imunológicos em nefropatias pediátricas, mais especificamente na SN, com o objetivo de caracterizar melhor a disfunção imunológica e de definir possíveis marcadores laboratoriais de interesse clínico.

Finalmente, é importante explicar que essa dissertação de Mestrado foi elaborada conforme o modelo aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Faculdade de Medicina, 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 do artigo: *Fisiopatologia da síndrome nefrótica em crianças e adolescentes* (artigo submetido para o periódico Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica)
3. Seção de Objetivos
4. Seção de Metodologia

5. Seção de Resultados e Discussão, apresentada sob a forma do artigo: *Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between IL8/CXCL8 and proteinuria* (artigo submetido para o periódico *Pediatric Research*)

6. Seção de Comentários Finais

Observações:

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção. As referências dos artigos seguem as normas de cada periódico específico para o qual o mesmo foi ou será submetido. As referências listadas no final de cada seção estão dispostas em ordem de citação e seguem as normas de Vancouver.

A nomenclatura utilizada para as quimiocinas nesse texto abrange os termos utilizados anteriormente (MCP-1, RANTES e IL-8) associados aos termos modernos, aceitos pela *International Union of Pharmacology* (CCL2, CCL5 e CXCL8) (25).

Referências Bibliográficas

1. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: Clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplantation*. 2004;8:344-8.
2. Haycock G. The child with idiopathic nephrotic syndrome. In: Webb NJA, Postlethwaite RJ (ed). *Clinical Paediatric Nephrology*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. 2003:341-66.
3. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (ed). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004:543-56.
4. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003;362:629-39.
5. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science*. 2004;107:125-36.
6. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:245-8.
7. Camici M. The nephrotic syndrome is an immunoinflammatory disorder. *Med Hypotheses*. 2007;68(4):900-5.
8. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2000;14:872-8.
9. 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;21:603-10.
10. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001;2:95-101.
11. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol*. 2001;2:108-15.

12. Border WA. Transforming growth factor-beta and the pathogenesis of glomerular diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1994;3:54-8.
13. August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int.* 2003;64[Suppl 87]:S99–S104.
14. Marek A, Brodzicki J, Liberek A, Korzon M. TGF-beta (transforming growth factor-beta) in chronic inflammatory conditions - a new diagnostic and prognostic marker? *Med Sci Monit.* 2002;8:RA145-51.
15. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:350-4.
16. 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;17(12):2145-52.
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;14:2072-4.
18. 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. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F703-9.
19. 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 Rev.* 1998;9:9-23.
20. Segerer S. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis.* 2003;41(Suppl 1):S15-8.

21. 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;23:260-6.
22. U.S. Renal Data System (USRDS) - Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2004.
23. Romão Jr JE, Pinto SWL, Canziani ME, Praxedes JN, Santello JL, Moreira JCM. Censo SBN 2002: Informações epidemiológicas das unidades de diálise do Brasil. *J Bras Nefrol.* 2003;25:188-99.
24. Lemley KV. An introduction to biomarkers: applications to chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:1849-59.
25. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, *et al.* International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52:145-76.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

ARTIGO DE REVISÃO

Fisiopatologia da Síndrome Nefrótica em Crianças e Adolescentes

Souto MFO¹; Teixeira MM²; Penido MGMG¹; Simões e Silva AC^{1*}.

¹ 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.

² Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

* Correspondência para Ana Cristina Simões e Silva: Av. Bernardo Monteiro, 1300, Apto. 1104 - Bairro Funcionários, Belo Horizonte, MG, Brasil, 30150-281. FAX: + 55-31-34992924, e-mail: acsilva@hotmail.com

RESUMO

A síndrome nefrótica (SN), caracterizada por proteinúria, hipoalbuminemia e edema, é a glomerulopatia mais comum em crianças. Apesar dos avanços, sua fisiopatologia permanece desconhecida. Considera-se que a SN é um distúrbio complexo e multifatorial, envolvendo agentes desencadeadores, alterações genéticas e do sistema imune. Alterações genéticas podem aumentar a susceptibilidade à SN ou provocar distúrbios de permeabilidade que se manifestam logo após o nascimento.

Várias evidências sugerem também um papel significativo do sistema imune na fisiopatologia dessa doença, com uma aparente resposta anormal dos linfócitos T, participação de citocinas e quimiocinas, com destaque para o TGF- β . Outros achados sugerem a existência de algum fator circulante de permeabilidade, provavelmente derivado do sistema imune, relacionado às recidivas pós-transplante. O estudo mais aprofundado da fisiopatologia da SN poderia proporcionar o desenvolvimento de fármacos com maior especificidade e menos efeitos adversos.

Instituição:

Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina –
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

INTRODUÇÃO

A síndrome nefrótica (SN) é definida classicamente como a combinação de proteinúria maciça, hipoproteinemia e edema^{1,2,3}. É a doença glomerular mais comum da infância, tendo uma prevalência estimada em 16 casos para cada 100000 crianças^{1,4}. Quanto à etiologia, a SN é classificada em primária e secundária. A SN primária ou idiopática é a forma mais comum na infância e pode ser decorrente de alterações genéticas primárias do rim que acometem principalmente a barreira de filtração glomerular^{1,2}. Em adultos, na maior parte dos casos, a SN é secundária, sendo causada por síndromes genéticas, doenças metabólicas, infecções, uso de medicamentos, doenças alérgicas, auto-imunes e neoplasias^{1,5}.

O quadro clínico é caracterizado por edema de início rápido, caráter gravitacional e fisiopatologia complexa, podendo associar a volume intravascular normal, aumentado ou diminuído, de acordo com o estágio do processo inflamatório^{6,7,8}. Com a evolução do quadro, aparecem transudatos, anasarca, edemas escrotal ou vulvar acentuados^{1,9}. O achado laboratorial mais significativo é a proteinúria maciça, que, nas recidivas, freqüentemente supera 1000 mg/m²/dia (proteinúria de 24 horas) e/ou 2 mg proteína/mg creatinina (relação proteína-creatinina em amostra de urina). A perda de proteína leva à diminuição significativa da proteinemia, em especial da albuminemia. Além disso, a dislipidemia é característica nesses pacientes, além da propensão a infecções (principalmente por pneumococos) e à trombose. Alguns casos podem evoluir com insuficiência renal aguda nas recidivas, devido a hipovolemia relativa^{1,2,9}.

Classicamente, na SN primária predominam dois tipos histológicos: SN por lesões mínimas (SNLM) e glomeruloesclerose focal e segmentar (GEFS). Na SNLM, existe pouca alteração à microscopia, observando-se proliferação mesangial discreta e

fusão dos processos podais, sem deposição de imunocomplexos³. Essas características estão presentes na maioria das crianças, porém sua frequência diminui à medida que a idade aumenta². O outro tipo, denominado GEFS, é caracterizado por esclerose de porções do tufo capilar, depósitos de imunoglobulinas e de complemento, hipertrofia glomerular, fibrose intersticial e atrofia tubular. Glomérulos afetados se misturam aos íntegros, dando uma aparência de mosaico. O tecido comprometido localiza-se predominantemente na junção córtico-medular⁹. A GEFS é responsável por 20% dos casos de SN nos adolescentes e até 50% em adultos. Sua prevalência ainda é considerada baixa na infância, embora a ocorrência de GEFS tem aumentado em todas as faixas etárias nos últimos anos^{5,10}. Essa diferenciação de acordo com o achado histológico nem sempre se correlaciona bem com a evolução clínica; uma vez que pacientes com SNLM podem apresentar má resposta ao tratamento, enquanto que alguns casos de GEFS têm evolução muito favorável, com remissão prolongada dos sintomas. Além disso, alguns pacientes inicialmente com biopsias mostrando alterações típicas de SNLM desenvolvem achados compatíveis com GEFS em biopsias subsequentes. Alguns autores consideram as duas entidades como manifestações diferentes de uma mesma doença, sendo, portanto, possível a evolução de SNLM para GEFS em alguns casos^{2,5}.

Atualmente, a literatura tem preferido classificar a SN de acordo com a resposta terapêutica, visto que o fator prognóstico mais significativo da doença é a resposta ao tratamento com corticosteróides e não as alterações histológicas encontradas¹. Por esse motivo, os pacientes hoje são classificados como SN córtico-sensível (SNCS) e SN córtico-resistente (SNCR). Nesse último grupo também se incluem os pacientes que têm recidivas rápidas após a retirada da medicação, também conhecidos como córtico-dependentes^{2,9}. O prognóstico dos pacientes com SN primária é bom na maior parte dos

casos, principalmente nas crianças, com remissão prolongada dos sintomas ou cura. Nos casos de SNCR, há freqüentemente progressão para fibrose renal e doença renal crônica. O tempo para essa evolução é muito variável. Mesmo após transplante renal, esses pacientes têm um risco acentuado de recidiva da doença^{9,11}.

Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas em relação ao conhecimento da SN, sua fisiopatologia ainda permanece obscura. 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. Acreditamos que um melhor entendimento da fisiopatologia da SN proporcionará o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e específicas. Neste contexto, discutiremos nas próximas seções, a fisiologia da filtração glomerular e alguns mecanismos propostos para o desenvolvimento da SN, a partir de uma revisão das evidências científicas mais atuais sobre o assunto.

FISIOLOGIA GLOMERULAR

Uma das funções do glomérulo é evitar a passagem de proteínas plasmáticas para o filtrado urinário. Para isso, o glomérulo forma uma barreira que é constituída pelo endotélio fenestrado vascular, a membrana basal glomerular (MBG) e a camada de podócitos.

O endotélio fenestrado vascular envolve os capilares glomerulares. Suas fenestrações permitem o contato do sangue circulante com a MBG. As células do endotélio têm grande importância na fisiopatologia de doenças renais, por produzirem diversas substâncias como proteínas da matriz extracelular, moléculas vasoativas, fatores de crescimento e citocinas, normalmente em resposta a diferentes lesões renais^{12,13,14}.

A MBG, uma estrutura em gel constituída por colágeno e glicosaminoglicanos, restringe a passagem de macromoléculas principalmente por meio de suas características elétricas. A MBG possui carga elétrica negativa e, portanto, repele proteínas como a albumina, que também se encontra carregada negativamente em pH fisiológico^{2,15}.

O podócito é uma célula altamente especializada cujo citoplasma se estende por meio de prolongamentos em forma de dedos, conhecidos como processos podais, que ficam adjacentes aos processos de podócitos vizinhos. Uma membrana ultrafina, também chamada de diafragma da fenda interpodocitária, conecta essas células com a função de limitar a passagem de macromoléculas para o filtrado glomerular^{12,13,16,17}.

O diafragma da fenda interpodocitária é uma estrutura que recobre o espaço entre os processos pediculares, semelhante a *tight-junctions*, que foi descrita em 1974¹⁸. É formado principalmente pela nefrina, uma proteína trans-membrana composta por

1241 aminoácidos¹⁹. A nefrina apresenta formato filiforme, com apenas 11 nm de espessura, e sua maior parte encontra-se fora da célula. O arranjo longitudinal das moléculas de nefrina dos diferentes podócitos assumem um formato de zíper, constituindo o diafragma da fenda. Tal conformação permite a seleção eficaz do que deve ou não ser filtrado além de exercer funções de adesão e sinalização¹³ (figura 1).

Apesar da fisiopatologia da síndrome nefrótica ainda ser mal compreendida, é evidente a importância de alterações podocitárias, principalmente nos casos resistentes a corticóide como, por exemplo, na GEFS. Mesmo na SN córtico-sensível, inicialmente atribuída apenas a alterações de cargas elétricas da MBG, têm sido descobertas alterações estruturais do epitélio adjacente.

DISFUNÇÃO DE PODÓCITOS

Alterações nos podócitos ocorrem em diversas doenças caracterizadas por proteinúria. Inúmeras mutações genéticas associadas à SN têm sido descritas nos últimos anos^{20,21}. Acredita-se também que, mesmo nos casos de SN adquirida, ou seja, sem defeitos genéticos conhecidos, o podócito esteja comprometido, dessa vez por fatores externos¹⁷.

Dessa forma, independente da alteração subjacente ser genética ou adquirida, a resposta típica do tecido é produção de fatores de crescimento e citocinas, proliferação da matriz extracelular e liberação de substâncias oxidantes¹³. Os podócitos sofrem alterações de diferenciação, caracterizadas por hipertrofia, acúmulo de vacúolos, proliferação nuclear e perda de função ou apoptose^{22,23}.

Com os estudos de microscopia eletrônica, foi verificado que na SN ocorre uma aparente “fusão” de podócitos adjacentes, que assumem morfologia achatada com desaparecimento do espaço entre os processos podais²⁴. Na verdade, essas células tomam uma disposição semelhante a escamas, com desarranjo do diafragma da fenda interpodocitária e descolamento da MBG. Nesse formato alterado, os podócitos perdem grande parte de sua capacidade de conter a passagem de macromoléculas, ocasionando perda urinária de quantidades progressivamente maiores de proteína, à medida que a lesão se perpetua².

Várias proteínas do podócito localizadas nos processos podais têm grande importância na manutenção da forma e função dessas células. Algumas parecem estar envolvidas na fisiopatologia da proteinúria, por modularem a função do diafragma da fenda interpodocitária, como as nefrinas, podocinas, proteína associada a CD2 (CD2AP), entre outras (figura 1)^{14,21}.

Após sua descrição, a nefrina permaneceu com função pouco conhecida até 1998, quando Kestilä *et al* descreveram que a SN congênita do tipo Finlandês é causada por mutações no gene NPHS1, que codifica essa proteína^{25,26}. Nas mutações mais significativas, nenhuma nefrina é expressa, e não se detecta o diafragma à microscopia. As crianças com essa alteração genética desenvolvem um quadro de síndrome nefrótica córtico-resistente de aparecimento precoce, com proteinúria em grau acentuado. É uma doença autossômica recessiva rara, exceto na Finlândia, onde apresenta uma incidência significativa (1 a cada 1000 nascidos)^{13,17}. Mesmo nos casos adquiridos de SNLM, já foram descritas alterações no número e na distribuição das moléculas de nefrina na barreira podocitária²⁷.

A podocina é uma proteína localizada na membrana celular dos podócitos, que se encontra ligada às porções citoplasmáticas da nefrina, formando um complexo proteico cuja estabilidade parece essencial para a função do diafragma da fenda interpodocitária. Mutações no gene que codifica a podocina (NPHS2) estão relacionadas a uma SN córtico-resistente familiar de herança autossômica-recessiva, com GEFS de aparecimento precoce (entre três meses e cinco anos de idade)^{28,29}. Em outros tipos de mutações, foram encontrados casos de SNLM e GEFS de aparecimento e curso clínico variáveis³⁰. Tsukaguchi *et al* descreveram também uma forma heterozigótica que aparentemente não desencadeia a SN, mas aumenta a susceptibilidade do seu portador à GEFS, com início de sintomas na idade adulta³¹.

A CD2AP é expressa em todos os tecidos e participa da interação entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos. Estudos recentes têm demonstrado sua presença nos processos podais, aparentemente com função de manter a estrutura do diafragma íntegra, ligando as moléculas de nefrina ao citoesqueleto do citoplasma^{26,32,33}.

Mutações no gene responsável pela CD2AP podem levar à predisposição para SN de aparecimento tardio³⁴.

A ação do fator de transformação e crescimento do tipo beta (TGF- β) é outro mecanismo proposto para as alterações dos podócitos. O TGF- β é um peptídeo com funções de controle da proliferação e diferenciação celular^{35,36}. Tem ações fibrogênicas, por promover o acúmulo da matriz extracelular nos tecidos^{35,37}. Yamamoto e colaboradores descreveram o aumento da expressão da proteína TGF- β em pacientes com GEFS, o que não foi observado em casos de SNLM³⁸. Esse achado poderia ser uma das explicações para a tendência maior dos casos de GEFS desenvolverem doença renal crônica, ao contrário do que ocorre na SNLM, que, em geral, tem bom prognóstico. Além disso, há também evidências da ação do TGF- β nos podócitos, induzindo alterações estruturais e apoptose³⁹.

Diante dessas evidências, postula-se que a SN é, em última instância, uma doença dos podócitos, que apresenta múltiplas etiologias.

FATOR DE PERMEABILIDADE CIRCULANTE

A existência de casos de SN adquirida, sem lesões estruturais significativas detectadas por meio de microscopia óptica, levou à hipótese de que a proteinúria poderia ser desencadeada pela ação de um fator circulante capaz de alterar a permeabilidade glomerular, que foi denominado de fator de permeabilidade (FP). Inicialmente proposto por Shaloub⁴⁰, o FP seria uma substância derivada de linfócitos T capaz de aumentar a permeabilidade do glomérulo às proteínas, mesmo em um rim sem alterações prévias. As alterações de permeabilidade induzidas por fatores circulantes foram descritas tanto em pacientes com SNLM, quanto nos casos de GEFS, mesmo naqueles com mutações genéticas^{41,42}.

Várias evidências suportam esta teoria da existência de um FP. Para exemplificar, cerca de 30-40% dos pacientes portadores de GEFS submetidos a transplante renal apresentarão recorrência da doença, algumas vezes poucas horas após o transplante^{4,11}. Mesmo em um caso relatado de SNLM que evoluiu para transplante isso também ocorreu⁴³. Essas recidivas sugerem que alguma substância circulante do paciente atuaria no rim transplantado, desencadeando novamente o quadro. Ressalta-se ainda que, quando rins de portadores de SN são transplantados em pacientes com outras nefropatias, a proteinúria não aparece, ou ocorre por curto período. Isso já foi descrito para doadores portadores de SNLM⁴⁴ e de GEFS⁴⁵. Essas evidências sugerem que, tanto na GEFS quanto na SNLM, algum fator circulante, provavelmente externo ao rim, desencadearia a doença, ou teria papel fundamental em sua fisiopatologia.

Outra evidência da existência de um FP veio de um caso descrito em 2001 no qual uma paciente, portadora de GEFS diagnosticada na gestação, transmitiu algum fator ao seu recém-nascido, que evoluiu com proteinúria. Houve total remissão após o

quarto dia de vida e a criança não teve mais sinais de comprometimento renal⁴⁶. Isso sugere a transmissão de um FP pela placenta, que perderia sua capacidade de promover proteinúria dentro de poucos dias.

A partir das hipóteses de existência de um FP, vários grupos de pesquisadores desenvolveram estudos para tentar sua identificação. Em 1975, foi demonstrada a existência de um fator, derivado de linfócitos, que podia modular a permeabilidade vascular em modelos experimentais de SN⁴⁷. Esse foi o primeiro de vários candidatos a FP, mas não era específico da SN e nem foi possível comprovar sua capacidade de induzir proteinúria em modelos animais.

Savin *et al*, em 1996, descreveram aumento de permeabilidade ao adicionarem plasma de pacientes com GEFS a preparações *in vitro* de glomérulos isolados⁴⁸. Os mesmos pesquisadores isolaram uma proteína presente no plasma dos pacientes com GEFS que produziu proteinúria em camundongos. Além disso, o efeito proteinúrico foi abolido por meio de plasmaferese, dando suporte à hipótese de se tratar de uma substância circulante⁴⁹. A ação deste possível FP também foi inibida por ciclosporina e indometacina, sugerindo sua interação com o sistema imune⁵⁰.

Outra substância candidata a FP na SN foi a hemopexina, uma glicoproteína de fase aguda com grande afinidade a compostos heme, produzida no fígado. A hemopexina foi encontrada em pacientes com SNLM e apresenta efeito proteinúrico quando infundida em ratos⁵¹. Observou-se também atividade aumentada da hemopexina em pacientes nefróticos durante as recidivas da doença⁵¹. Acredita-se que esse fator atue no endotélio vascular e na MBG, mas a sua relação com o sistema imune ainda permanece indefinida⁴¹.

Uma hipótese alternativa mais recente sugere que ao invés da presença de um FP circulante, o que ocorreria seria a perda de algum fator inibitório da proteinúria. Um

achado que corrobora essa teoria é que a adição de plasma normal a plasma de paciente com GEFS inibe o seu potencial de induzir proteinúria *in vitro*^{52,53}. O mesmo ocorre ao adicionar urina de pacientes em recidiva⁵³.

Pelo fato de não ter sido possível o isolamento de um único fator responsável pela alteração da permeabilidade glomerular, postula-se a existência de um sistema complexo de controle da permeabilidade. Os estudos sugerem que inúmeras substâncias modulariam a permeabilidade glomerular a proteínas, inclusive através de fatores inibitórios²⁴.

ALTERAÇÕES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Há mais de 30 anos, Shaloub propôs que a SN seria uma doença sistêmica relacionada a alterações na função do sistema imune celular, especificamente de linfócitos T. Para chegar a essa conclusão, o autor se baseou na ocorrência de recidivas associadas ao sarampo, na freqüente resposta ao tratamento com corticóides e ciclofosfamida, na alta suscetibilidade desses pacientes às infecções pneumocócicas e na esporádica associação da SN com doença de Hodgkin⁴⁰. Além disso, outros achados reforçaram essa hipótese, como as recidivas durante episódios de estímulo agudo ao sistema imunológico, como infecções, crises alérgicas, uso de vacinas e estresse⁵⁴, além da detecção de doenças virais (parvovirus, SV 40, hepatite C) em pacientes com quadro clínico idêntico ao da SNLM²⁴.

Ao contrário de doenças como a nefropatia de IgA, nas quais é claro o envolvimento imune pelo achado de imunodépósitos à microscopia, na SN essa associação tem sido de caracterização mais difícil. A maioria dos estudos recentes mostra aumento sérico de interleucinas (IL): IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, e do fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) em pacientes com SNLM em recidiva, quando comparados aos em remissão e a controles^{5,54,55}. Foi também mostrado que a infusão de TNF- α em camundongos portadores de SN provoca aumento dose-dependente da proteinúria⁵⁶. Além disso, camundongos transgênicos que hiperexpressam IL-4 desenvolvem lesões renais muito semelhantes a GEFS, além de proteinúria⁵⁷.

Outra interleucina que vem consistentemente sendo associada à fisiopatologia da SN é a IL-8 (CXCL8). A IL-8 é uma quimiocina secretada por monócitos, linfócitos, endotélio e células tubulares⁵⁸. A maior parte dos estudos detectou aumento de IL-8 no sangue^{5,55} e na urina⁵⁸ de pacientes com SNLM em recidiva. Essa quimiocina atua como

um fator quimiotático para neutrófilos, mas também pode apresentar efeitos independentes na barreira glomerular⁵⁵. Há evidências de que a IL-8 altera a composição da MBG, o que poderia explicar seu mecanismo de ação na SN⁵⁹. Em um estudo, infusão dessa quimiocina em camundongos provocou proteinúria após cinco dias, e a adição de anti-IL-8 a um sobrenadante de linfócitos T de pacientes com SNLM inibiu seu efeito indutor de proteinúria^{56,59}.

Como já discutido, há evidências da existência de um FP que, de alguma forma, altera as características da barreira glomerular, permitindo a passagem de proteínas para o filtrado urinário. Na tentativa de identificação desse fator, pesquisadores conseguiram induzir proteinúria em camundongos ao infundir sobrenadante de culturas de linfócitos T de pacientes com SN^{47,60}. Outros grupos comprovaram a eficácia da plasmáfereze na redução da proteinúria e estabilização da função renal em alguns pacientes com GEFS^{11,61,62}. Dantal *et al*, estudando pacientes com recidiva pós-transplante, descobriu que o uso de colunas de imuno-adsorção de proteína A foi associado com melhora ou remissão da proteinúria⁶³. Esse achado levou esse grupo a inferir que o FP seria uma imunoglobulina, fragmento de imunoglobulina ou proteína como, por exemplo, o TGF- β ⁶³. O TGF- β , além de sua ação fibrogênica, pode estar envolvido na SN devido a seus efeitos pró-inflamatórios. Essa proteína promove, em resposta a estímulos imunes, quimiotaxia de granulócitos e macrófagos, além de liberação de citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- α ³⁷, e quimiocinas, como IL-8, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) e *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted* (RANTES)⁶⁴.

Outro grande desafio é saber de que forma atuam os linfócitos T na SN. Após um estímulo ao sistema imune, como uma infecção ou contato com alérgenos, por exemplo, ocorre a ativação de fatores de transcrição responsáveis pela resposta de linfócitos T. Dentre esses fatores, o fator nuclear- κ B (NF- κ B) é o mais importante⁶⁵.

Essa proteína regula a expressão de várias citocinas e quimiocinas, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF- α . O controle da atividade do NF- κ B é feito pelo inibidor κ -B (I- κ B). Estudos recentes mostram que a ativação do NF- κ B permanece alta durante recidivas da SNLM, apesar do funcionamento de suas vias inibitórias⁶⁶. A hipótese do envolvimento do NF- κ B na fisiopatologia da SN é fortalecida pelo fato de que tanto o corticóide quanto a ciclosporina têm ação sobre o I- κ B (figura 2)⁵⁴. Uma vez que o NF- κ B também modula a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, acredita-se que isso explicaria a íntima relação entre proteinúria e dislipidemia nesses pacientes⁶⁷.

Os linfócitos T *helper* (Th) ativados podem diferenciar-se em duas classes distintas: Th tipo 1 (Th1) e Th tipo 2 (Th2). Um dos principais responsáveis por essa diferenciação é o perfil de citocinas encontrado no local onde é encontrado o antígeno^{54,68,69}. O padrão de citocinas mais encontrado nos estudos de SN (aumento de IL-4, IL-10 e IL-13) sugeriria predomínio de resposta Th2, apesar de que TNF- α está mais associado a linfócitos Th1^{5,54,55}. Outra evidência que sugere o padrão Th2 é a associação entre SN e alergia. Vários estudos demonstraram aumento de IgE e maior incidência de doenças alérgicas em pacientes com SN^{5,70}. A presença de linfócitos Th2 em maior atividade, associados à supressão de Th1 também poderia explicar a eficácia do levamisole em alguns pacientes, uma vez que este medicamento atua invertendo essa relação entre a classe de linfócitos (figura 2)⁷¹.

Entretanto, persistem dúvidas em relação à resposta imune na SN, pois alguns trabalhos mostraram resultados distintos. Tais discrepâncias podem ser atribuídas às diferenças na metodologia de quantificação de citocinas e à heterogeneidade dos grupos estudados, já que alguns estudos se restringiram a pacientes com SNLM, outros incluíram apenas casos de GEFS, ou utilizaram pacientes com classificação indefinida, já que em casos de bom prognóstico a biópsia não está geralmente indicada^{5,55}.

Diante das evidências apresentadas, fica claro o envolvimento do sistema imune na fisiopatologia da SN, porém os mecanismos desse efeito ainda permanecem obscuros. Aparentemente, há um predomínio de linfócitos do tipo Th2, assim como nas reações alérgicas. Ressalta-se ainda que a hipótese de ação direta das citocinas e quimiocinas sobre a barreira glomerular é hoje fortemente considerada, depois da descoberta de receptores transmembrana de IL-4, IL-10, IL-13 e TNF- α nos podócitos⁵.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos grandes avanços no entendimento da fisiopatologia da síndrome nefrótica nas últimas décadas, ainda persistem inúmeras dúvidas. Atualmente, de acordo com o que está estabelecido na literatura, considera-se que a SN apresenta uma fisiopatologia complexa e multifatorial, envolvendo agentes desencadeadores (vírus, alérgenos), alterações genéticas e do sistema imune^{5,22,24}. Quanto às alterações genéticas, algumas têm potencial de desencadear a doença logo após o nascimento, outras causariam um aumento da susceptibilidade a essa síndrome^{21,23}. No que se refere ao sistema imune, uma resposta anormal dos linfócitos T tem sido descrita, sendo que citocinas (TGF- β , TNF- α) e quimiocinas (IL-8) parecem estar fortemente envolvidas no processo, por meio de mecanismos ainda pouco esclarecidos^{5,54}. É muito provável também a existência de um ou mais fatores plasmáticos, ou de um sistema circulante capaz de modular a permeabilidade glomerular a proteínas através da ação substâncias agonistas e/ou antagonistas desse processo^{41,53}. A tabela 1 resume as principais hipóteses para a fisiopatologia da SN.

Em crianças, a SN tem uma evolução favorável na maioria dos casos, embora uma porcentagem significativa dos pacientes evolua com recidivas frequentes e/ou doença renal crônica, com todas suas conseqüências^{2,9,24}. Ressalta-se ainda que o tratamento atualmente utilizado para a SN é empírico, baseando-se sobretudo na experiência acumulada com grandes séries de casos da doença^{1,3,6}. Acredita-se, então, que o conhecimento mais apurado de sua fisiopatologia poderia mudar significativamente a abordagem terapêutica. Dessa forma, estudos nessa área apresentam alta relevância, seja para detectar quais pacientes têm predisposição para

uma má evolução, ou para desenvolver tratamentos que atuem de forma mais específica no processo fisiopatológico da doença.

REFERÊNCIAS

1. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (ed). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004:543-556.
2. Haycock G. The child with idiopathic nephrotic syndrome. In: Webb NJA, Postlethwaite RJ (ed). *Clinical Paediatric Nephrology*. 3rd ed. New York: Oxford University Press. 2003:341-366.
3. Diniz JSS, Cardoso LSB, Silva JMP. Síndrome nefrótica. In: Leão E, Corrêa EJ, Viana MB, Mota JAC (ed). *Pediatria Ambulatorial*. 4^a ed. Belo Horizonte: Coopmed. 2005:648-657.
4. Schachter AD. The pediatric nephrotic syndrome spectrum: Clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplantation* 2004;8:344–348.
5. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science* 2004;107:125-136.
6. Quintaes PSL, Woronik V. Síndrome nefrótica: fisiopatologia, complicações e tratamento. In: Barros RT, Alves MAR, Dantes M, Kirsztajn GM, Sens YAS (ed). *Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento*. São Paulo: Sarvier. 2006:82-99.
7. Koomans HA. Pathophysiology of oedema in idiopathic nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18[Suppl 6]:vi30–vi32.
8. Vande Walle JGJ, Donckerwolcke RA. Pathogenesis of edema formation in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2001;16:283–293.
9. Niaudet P. Steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (ed). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004:557-573.

10. Hogg R, Middleton J, Vehaskari VM. Focal segmental glomerulosclerosis – epidemiology aspects in children and adults. *Pediatr Nephrol* 2007;22:183–186.
11. Weber S, Tönshoff B. Recurrence of focal-segmental glomerulosclerosis in children after renal transplantation: clinical and genetic aspects. *Transplantation* 2005;80: S128–S134.
12. Teixeira VC. As bases moleculares das estruturas glomerulares. In: Barros RT, Alves MAR, Dantes M, Kirsztajn GM, Sens YAS (ed). *Glomerulopatias: patogenia, clínica e tratamento*. São Paulo: Sarvier. 2006:32-47.
13. Akhtar M, Mana HA. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol* 2004;11:304-309.
14. Repetto HA. Proteinuria. *Arch Latin Nefr Ped* 2006;6:143-153.
15. Taylor GM, Neuhaus TJ, Shah V, Dillon S, Barratt TM. Charge and size selectivity of proteinuria in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Ped Nephrol* 1997;11:404-410.
16. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006;69:2131-2147.
17. Jalanko H. Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin. *Pediatr Nephrol* 2003;18:487-491.
18. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974;60:423–433.
19. Tryggvason K, Wartiovaara J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:543–549.
20. Antignac C. Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2002;109:447–449.

21. Niaudet P. Genetic forms of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1313-1318.
22. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2007;22:350-354.
23. Meyrier A. Nephrotic focal segmental glomerulosclerosis in 2004: an update. *Nephrol Dial Transplant* 2004;10:2437–2444.
24. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 2003;362:629-639.
25. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998;1:575-582.
26. Meyrier A. Mechanisms of disease: focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1:44-54.
27. Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, *et al.* Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:70-76.
28. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000;24:349–354.
29. Chesney R. The changing face of childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004;66:1294-1302.
30. Frishberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, Raas-Rothschild A. Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid-resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:400-405.

31. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, *et al.* NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002;110:1659-1666.
32. Shaw AS, Miner JH. CD2-associated protein and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001;10:19-22.
33. Wolf G, Stahl RA. CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet* 2003;362:1746–1748.
34. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, *et al.* CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003;300:1298-1300.
35. August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int* 2003;64[Suppl 87]:S99–S104.
36. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg* 2004;57:215-221.
37. Eddy AA. Immune mechanisms of glomerular injury. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (ed). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2004:575-600.
38. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, *et al.* Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996;49:461-469.
39. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253–307.
40. Shalhoub RJ. Pathogenesis of lipid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 1974;2:556–560.

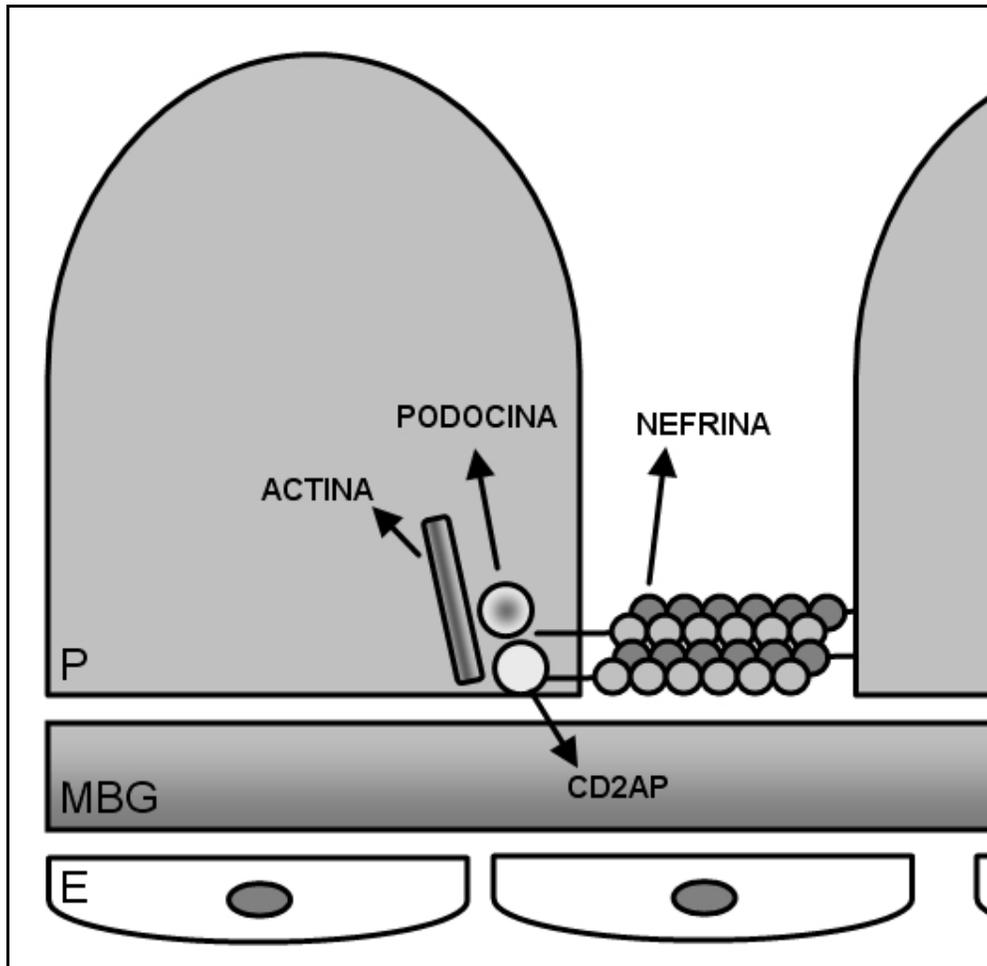
41. Brenchley PEC. Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18[Suppl 6]:vi21–vi25.
42. Becker-Cohen R, Bruschi M, Rinat C, Feinstein S, Zennaro C, Ghiggeri GM, *et al.* Recurrent nephrotic syndrome in homozygous truncating NPHS2 mutation is not due to anti-podocin antibodies. *Am J Transplant* 2007;7:256–260.
43. Jan CI, Chen A, Sun GH, Yu D-S, Yen C-Y, Chen JS, Lin YF. Recurrent minimal change disease post-allograft renal transplant. *Transplant Proc* 2003;35:2888–2890.
44. Ali AA, Wilson E, Moorhead JF, Amlot P, Abdulla A, Fernando ON, *et al.* Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment? *Transplantation* 1994;58:849-852.
45. Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C. Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:416-417.
46. Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE. Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 2001;344:386-387.
47. Lagrue G, Xheneumont S, Branellec A, Hirbec G, Weil B. A vascular permeability factor elaborated from lymphocytes. I. Demonstration in patients with nephrotic syndrome. *Biomedicine* 1975;23:37-40.
48. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, *et al.* Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med* 1996;334:878-883.
49. Sharma M, Sharma R, McCarthy ET, Savin VJ. The focal segmental glomerulosclerosis permeability factor: biochemical characteristics and biological effects. *Exp Biol Med* 2004;229:85–98.

50. Glasscock RJ. Circulating permeability factors in the nephrotic syndrome: a fresh look at an old problem. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:541–543.
51. Cheung PK, Klok PA, Baller JF, Bakker WW: Induction of experimental proteinuria in vivo following infusion of human plasma hemopexin. *Kidney Int* 2000;57:1512-1520.
52. Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Ge XL, Savin VJ. Components of normal serum block the focal segmental glomerulosclerosis factor activity in vitro. *Kidney Int* 2000;58:1973–1979.
53. Marszal J, Saleem MA. The bioactivity of plasma factors in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2006;104:e1-5.
54. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D. Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:245-248.
55. 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;21:603-610.
56. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2000;14:872-878.
57. Ruger BM, Erb KJ, He Y, Lane JM, Davis PF, Hasan Q. Interleukin-4 transgenic mice develop glomerulosclerosis independent of immunoglobulin deposition. *Eur J Immunol* 2000;30:2698-2703.
58. 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;23:260-266.

59. Garin EH, West L, Zheng W. Effect of interleukin-8 on glomerular sulfated compounds and albuminuria. *Pediatr Nephrol* 1997;11:274-279.
60. Koyama A, Fujisaki M, Kobayashi M, Igarashi M, Narita M. A glomerular permeability factor produced by human T cell hybridomas. *Kidney Int* 1991;40:453-460.
61. Artero ML, Sharma R, Savin VJ, Vincenti F. Plasmapheresis reduces proteinuria and serum capacity to injure glomeruli in patients with recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1994;23:574-581.
62. Yokoyama H, Wada T, Furuichi K. Immunomodulation effects and clinical evidence of apheresis in renal diseases. *Ther Apher Dial* 2003;7:513-519.
63. Dantal J, Godfrin Y, Koll R, Perretto S, Naulet J, Bouhours JF, *et al.* Antihuman immunoglobulin affinity immunoabsorption strongly decreases proteinuria in patients with relapsing nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1709-1715.
64. 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;14:2072-2074.
65. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004;1:343-350.
66. Sahali D, Pawlak A, Le Gouvello S, Lang P, Valanciute A, Remy P, *et al.* Transcriptional and post-transcriptional alterations of IkappaBalpha in active minimal-change nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1648-1658.
67. Delvin EE, Merouani A, Levy E. Dyslipidemia in pediatric nephrotic syndrome: causes revisited. *Clin Biochem* 2003;36:95-101.
68. Gutcher I, Becher B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* 2007;117:1119-1127.

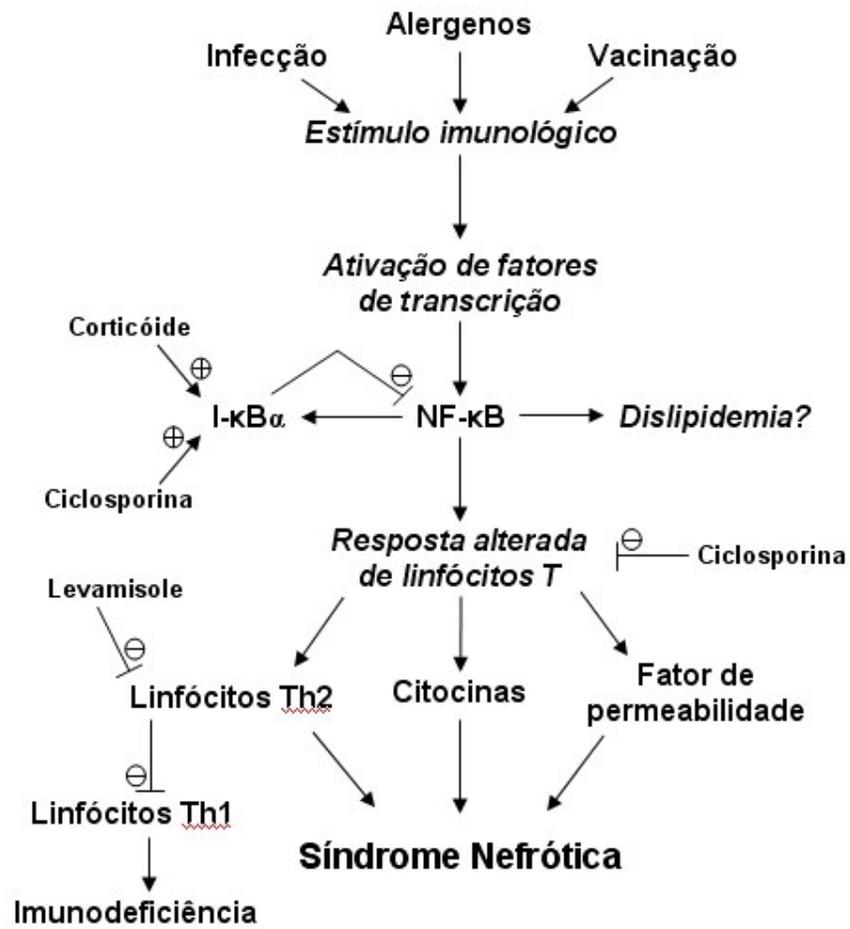
69. Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000;14:1693-1711.
70. Lin CY, Lee BH, Lin CC, Chen WP. A study of the relationship between childhood nephrotic syndrome and allergic diseases. *Chest* 1990;97:1408-1411.
71. Szeto C, Gillespie KM, Mathieson PW. Levamisole induces interleukin-18 and shifts type 1/type 2 cytokine balance. *Immunology* 2000;100(2):217-24.

Figura 1. Esquema da estrutura da barreira de filtração glomerular



P: podócito; MBG: membrana basal glomerular; E: célula endotelial

Figura 2. Fluxograma das possíveis alterações imunes na síndrome nefrótica



Adaptado de *Grimbert et al (2003)*⁵⁴

Tabela 1: Hipóteses para a fisiopatologia da síndrome nefrótica (SN).

Alterações glomerulares	<ol style="list-style-type: none"> 1. Distúrbios genéticos dos podócitos e MBG (nefrina, podocina, CD2AP, etc) 2. Hipertrofia, “fusão” e apoptose de podócitos 3. Proliferação mesangial e fibrose (TGF-β)
Fator de Permeabilidade Circulante	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fator derivado de linfócitos T 2. Hemopexina 3. Perda de fatores inibitórios da permeabilidade
Alterações do Sistema Imune	<ol style="list-style-type: none"> 1. Citocinas: IL-1, IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TNF-α 2. Quimiocinas: IL-8 (CXCL-8) 3. TGF-β 4. Estímulo aumentado do NF-κB

3 – OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar, em crianças e adolescentes com SNI, os níveis plasmáticos e urinários de citocinas e quimiocinas que poderiam estar relacionadas à fisiopatologia dessa doença.

3.1 – Objetivos Específicos

- Medir a concentração plasmática de TGF- β_1 , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em pacientes portadores de SNI e em crianças e adolescentes saudáveis pareados para idade e sexo (grupo controle);
- Medir a concentração em urina de 24 horas de TGF- β_1 , IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 e RANTES/CCL5 em pacientes portadores de SNI;
- Comparar as concentrações encontradas entre pacientes e controles, e entre grupos de pacientes, de acordo com a resposta à medicação e com os níveis de proteinúria.

4 – PACIENTES E MÉTODOS

4.1 – Pacientes

Nesse estudo foram avaliados crianças e adolescentes com diagnóstico de SNI, que estavam em acompanhamento clínico na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG.

4.1.1 – Critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes que tinham o diagnóstico estabelecido de SNI segundo critérios estabelecidos pelo International Study of Kidney Disease in Children (1), em acompanhamento regular na Unidade de Nefrologia Pediátrica do, HC-UFMG no período de janeiro de 2005 a janeiro de 2007. Todos os pacientes incluídos no estudo aderiram ao protocolo de seguimento clínico-laboratorial e ao esquema terapêutico proposto pela referida unidade (anexo 1), que está de acordo com a literatura científica (2).

Em relação ao grupo controle foram incluídos crianças e adolescentes saudáveis, pareados em relação ao sexo e idade e que se encontravam em acompanhamento clínico regular nos Ambulatórios de Pediatria Geral do HC-UFMG. A inclusão definitiva do paciente no estudo ocorreu apenas mediante consentimento livre e esclarecido (anexo 2, Termo de consentimento).

4.1.2 – Critérios de exclusão

Os pacientes que apresentavam doenças concomitantes, processos infecciosos agudos, co-morbidades, SN secundária, SN congênita e presença de DRC estágios 3-5

foram excluídos do estudo. Também foram excluídos pacientes com síndrome nefrítica associada e aqueles cujo período de acompanhamento não permitiu a definição do diagnóstico.

Em relação ao grupo controle, foram critérios de exclusão a existência ou suspeita de doença crônica, a presença de afecção aguda no momento da coleta e o uso de medicamentos capazes de interferir com o sistema imune, ou a recusa em participar do estudo.

4.1.3 – Aspectos Éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG aprovou o estudo (Parecer nº ETIC 064/05). Todos os pacientes e seus responsáveis foram esclarecidos sobre a natureza do estudo por meio da leitura e análise do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 2). Os pacientes nefróticos e as crianças e adolescentes saudáveis foram incluídos no estudo somente mediante concordância e assinatura do termo de consentimento por parte do responsável e do próprio paciente conforme a idade. O protocolo de pesquisa não interferiu com qualquer recomendação ou prescrição médica. Ressalta-se ainda que o seguimento clínico-laboratorial e a abordagem terapêutica dos pacientes foram assegurados, mesmo no caso de recusa em participar do estudo.

4.2 – Métodos

4.2.1 – Protocolo do estudo

Trata-se de um estudo transversal com amostra de conveniência, perfazendo um total de 33 pacientes (20 do sexo masculino).

Os pacientes foram divididos em dois grupos, de acordo com a resposta terapêutica: córtico-sensível, os pacientes com resposta rápida e prolongada ao corticóide (**SS**, n = 12) e córtico-resistente/dependente, grupo esse que engloba crianças que não respondem ao corticóide, ou que não toleram retirada do mesmo (**SR**, n = 21).

As crianças e adolescentes portadores de SNI foram também subdivididos de acordo com os níveis de proteinúria na época da coleta: grupo com proteinúria \leq 200mg/24h (proteinúria reduzida, **LP**, n = 15) e com níveis $>$ 200mg/24h (proteinúria acentuada, **HP**, n = 18). Os pacientes foram submetidos aos seguintes exames, que fazem parte do protocolo de seguimento da Unidade de Nefrologia Pediátrica do HC-UFMG: no sangue, dosagem de albumina, colesterol total, triglicérides, uréia, creatinina, ácido úrico. Na urina de 24 horas, proteína e creatinina. Na urina de amostra única, exame bioquímico e sedimentoscopia. O ritmo de filtração glomerular (RFG) foi estimado usando a fórmula de Schwartz (3).

4.2.2 – Coleta e Processamento de Amostras

As amostras de sangue foram colhidas em tubo estéril contendo citrato como anti-coagulante. As amostras foram, então, transportadas em embalagem com gelo e processadas em até 30 minutos após a coleta. Foi utilizada centrífuga refrigerada (Jouan BR4i) a 4°C, com o seguinte protocolo: foi feito inicialmente um ciclo a 700 g por 10 minutos; o plasma sobrenadante foi, a seguir, transferido para tubo estéril, que, por sua vez, foi centrifugado a 1300 g por 20 minutos para sedimentar plaquetas (4). Depois desta etapa, o plasma foi alíquotado em amostras de 0,5 ml, que foram armazenadas em freezer -80°C até a data do ensaio.

Por questões éticas, as amostras de urina de 24 horas foram coletadas apenas nos pacientes portadores de SNI. Após homogeneização, 10 ml de urina foram

recondicionados em tubo estéril. As amostras foram, então, centrifugadas a 1300 g por 20 minutos. Alíquotas de 1,5 ml foram também conservadas em freezer a -80°C.

4.2.3 – Ensaio Imunoenzimáticos

Os níveis plasmáticos e urinários de TGF- β_1 , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 e IL-8/CXCL8 foram medidos usando kits de ensaio imuno-enzimático (enzyme-linked immunoassay - ELISA) produzidos pelo laboratório R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA). Foram seguidas as instruções do fabricante para cada kit. As amostras foram analisadas em duplicata.

O protocolo de ELISA utiliza um anticorpo monoclonal específico para determinação de cada citocina ou quimiocina estudada, fornecido pelo fabricante.

Ensaio de MCP-1/CCL2 (plasma e urina), RANTES/CCL5 (urina) e IL-8/CXCL8 (plasma e urina)

Resumidamente, os anticorpos de captura específicos (fornecido no kit) foram diluídos em tampão fosfato (PBS) e adicionados a cada poço de placas de poliestireno (96 poços). As placas foram, então, incubadas a 4°C por 12 horas. Em seguida, foram submetidas a quatro ciclos de lavagem com PBS e Tween 20 a 0,05% (Sigma). As placas foram então bloqueadas com albumina sérica bovina (BSA) 1% e PBS, e incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Um novo procedimento de lavagem foi feito, como descrito acima. Em seguida, as amostras foram adicionadas às placas e incubadas por 12 horas a 4°C, sendo depois submetidas a novos ciclos de lavagem. Os anticorpos de detecção, diluídos em PBS, foram adicionados, e foi feita incubação por duas horas em temperatura ambiente, com novo procedimento de lavagem em seguida. O reagente de cor (fenilenediamina) foi adicionado a cada poço e as placas deixadas no escuro por 15 minutos. A reação foi parada com a adição de 1M H₂SO₄ aos poços. A

absorbância foi lida em um leitor de placas (Emax, Molecular Devices, MN, EUA), ajustado no comprimento de onda de 492nm.

Ensaio de TGF- β_1 no plasma

Para essa citocina foi utilizado kit do tipo Quantikine® (R&D Systems). O kit fornece placas de poliestireno já preenchidas com anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 . As amostras de plasma foram submetidas inicialmente ao procedimento específico de ativação do TGF- β , da seguinte forma: foi adicionado a cada amostra 20 μ L HCl e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a amostra acidificada foi neutralizada usando 20 μ L de NaOH/HEPES. As amostras foram, então, adicionadas aos poços, apropriadamente diluídas com diluente fornecido no kit, e depois incubadas em temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, os poços foram submetidos a quatro ciclos de lavagem com tampão de lavagem. O conjugado específico, que consiste de anticorpo anti-TGF- β_1 conjugado a peroxidase, foi adicionado a cada poço, sendo a placa incubada por uma hora em temperatura ambiente. Foi realizado em seguida novo ciclo de lavagens. O próximo passo foi adicionar aos poços a solução de substrato, contendo peróxido de hidrogênio e tetra-metil-benzidina. As placas foram, então, deixadas por 15 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. Em seguida, foi adicionada a cada poço a solução de parada, e foi medida a densidade óptica usando leitor de placas, ajustado no comprimento de onda de 450nm (Emax, Molecular Devices, MN, EUA).

4.2.4 – Análise Estatística

Os dados foram expressos como mediana ou média \pm desvio padrão, quando apropriado. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Comparações de médias foram feitas por meio de análise de variância, seguida pelo teste de Newman-Keuls. O

teste de Mann Whitney foi utilizado para comparar medianas entre dois grupos e o teste de Kruskal Wallis para comparações múltiplas de medianas. O teste de Spearman foi utilizado para avaliação de correlações.

Referências Bibliográficas

1. (no authors listed) International Study of Kidney Disease in Children: Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. *Kidney Int.* 1978;13:159-65.
2. Niaudet P. Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (ed). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2004:543-56.
3. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics*. 1976;58:259-63.
4. Reinhold D, Bank U, Buhling F, Junker U, Kekow J, Schleicher E, *et al.* A detailed protocol for the measurement of TGF-beta1 in human blood samples. *J Immunol Methods*. 1997;209:203-6.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation
between interleukin 8 and proteinuria**

Running Title: Immune mediators in nephrotic syndrome

Marcelo F.O. Souto¹; Antônio L. Teixeira²; Remo C. Russo³; Maria-Goretti M.G. Penido¹; Kátia D. Silveira³; Mauro M. Teixeira³; and Ana C. Simões e Silva^{1*}.

¹ Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina – UFMG, Belo Horizonte, MG, 30130-100, Brazil.

³ Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brazil.

*Correspondence to Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD

Av. Bernardo Monteiro, 1300, Apto. 1104 - Bairro Funcionários, Belo Horizonte, MG, Brazil, 30150-281. Phone: +55-31-78148682, FAX: + 55-31-3499-2651, e-mail: acsilva@hotmail.com

Financial support: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) and PRONEX (Programa de Grupos de Excelência-FINEP, Brazil).

Category of study: Translational Investigation

Word count of abstract: 199 words. **Word count of manuscript:** 3431 words.

ABSTRACT

The pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome (INS) remains unknown. Several findings suggest a role for the immune system. This study aimed to evaluate the profile of circulating and urinary immune mediators in INS by measuring plasma and urinary levels of TGF- β_1 , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and IL-8/CXCL8 in pediatric patients with INS and in age-matched healthy controls. Patients were classified according to their response to treatment with corticosteroids: steroid-sensitive (SS, $n = 12$), or steroid-resistant (SR, $n = 21$); as well as according to their proteinuria levels: patients with $\leq 200\text{mg}/24$ hours (LP, $n = 15$), and $> 200\text{mg}/24$ hours (HP, $n = 18$). Immune mediators were measured by Elisa. Plasma TGF- β_1 levels in SR patients were approximately 3.7-fold higher than control values ($p < 0.05$). Urinary IL-8/CXCL8 was 3.4-fold higher in HP group than in LP group ($p < 0.05$), and its levels had a positive correlation with individual proteinuria values ($p < 0.05$). No changes in MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 levels were detected. Our findings suggest that both TGF- β_1 and IL-8/CXCL8 could be involved in the pathogenesis of INS, the first being related to the progression of the disease and worse prognosis, and the latter associated with glomerular inflammation and local changes in permeability.

Key words: Nephrotic syndrome; Transforming growth factor- β (TGF- β); Interleukin-8 (IL8/CXCL8); Proteinuria.

Abbreviations:

ECM – Extracellular matrix

ESRD – End-stage renal disease

FSGS – Focal segmental glomerulosclerosis

GBM – Glomerular basement membrane

GFR – Glomerular filtration rate

HP – High proteinuria group

IL-8/CXCL8 – Interleukin-8

INS – idiopathic nephrotic syndrome

LP – Low proteinuria group

MCNS – Minimal change nephrotic syndrome

MCP-1/CCL2 – Monocyte chemoattractant protein-1

RANTES/CCL5 – Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted

SR – Steroid-resistance group

SRNS – Steroid-resistant nephrotic syndrome

SS – Steroid-sensitive group

SSNS – Steroid-sensitive nephrotic syndrome

TGF- β_1 – Transforming growth factor- β_1

INTRODUCTION

Idiopathic nephrotic syndrome (INS), characterized by heavy proteinuria, edema and hypoalbuminemia, is the most common glomerular disease in childhood (1). Common histological variants are minimal change nephrotic syndrome (MCNS) and focal-segmental glomerulosclerosis (FSGS) (2). The main predictive factor for disease evolution is not histological diagnosis, but the response to treatment with corticosteroids (1,3). Indeed, children with steroid-resistant nephrotic syndrome (SRNS) have higher chance to develop end-stage renal disease (ESRD) than those with steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) (1,2,3).

The pathogenesis of INS is not yet fully understood. Many studies have proposed a role for the immune system (2,4,5,6), and this hypothesis is supported by a favorable response to anti-inflammatory drugs (2), a relation between relapses and viral infections or allergic reactions (5), the recurrence of the disease in transplanted patients (1) and an association with immunological disorders (2).

More recently, it has been proposed that alterations in the cytokine and chemokine profile of INS patients might contribute to proteinuria and glomerular damage (7,8). Cytokines are a group of proteins produced by several kinds of cells that function as soluble mediators with intercellular signaling functions (4). Chemokines constitute a large family of low-molecular-weight cytokines whose main action is the recruitment and activation of leukocyte subsets in various models of inflammation—hence, the word “chemokine” is a contraction of the terms “chemoattractant” and “cytokine” (9,10).

A cytokine that is often associated with the progression of kidney disease is transforming growth factor- β (TGF- β) (11,12), which exhibits fibrogenic and

proinflammatory properties at renal level (12,13,14). TGF- β also induces accumulation of monocytes and stimulation of fibroblasts by increasing the expression of two C-C-chemokines: monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES/CCL5) (15,16,17). Studies have found increased levels of MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 in progressive glomerular diseases, allograft rejection and interstitial nephritis (18,19). Another mediator of interest when studying the INS pathogenesis is interleukin-8 (IL-8/CXCL8), a chemokine produced by endothelial cells and macrophages that attracts neutrophils and lymphocytes to the inflammation site (17,18), and may be involved in the pathogenesis of proteinuria in INS (7,20).

In this context, the present study aimed to evaluate the profile of circulating and urinary inflammatory mediators in INS patients. We specifically measured plasma and urinary levels of TGF- β_1 , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and IL-8/CXCL8 in pediatric patients with INS and in age-matched healthy controls in order to disclose possible changes that might contribute to the pathogenesis of this syndrome.

SUBJECTS AND METHODS

Patients with nephrotic syndrome

The present cross-sectional study used a convenience sample of children and adolescents with INS, recruited from the Pediatric Nephrology Unit of our institution, from 2005 to 2007. Our Pediatric Nephrology Unit, established in 1980, currently follows up about 300 children with INS. Diagnostic criteria for NS were based on the International Study of Kidney Disease in Children (21). Patients with congenital or secondary nephrotic syndrome were excluded from the study.

We classified INS patients in two groups, according to their response to treatment with corticosteroids: steroid-sensitive (SS, $n = 12$), if complete remission of INS was obtained with an eight-week course of corticosteroids, or steroid-resistant (SR, $n = 21$), if no remission or only partial remission occurred with steroids (3).

Nephrotic children were also divided according to their proteinuria levels at the time of blood and urinary sampling, and classified in the following way: patients with proteinuria $\leq 200\text{mg}/24$ hours (low proteinuria, LP, $n = 15$), and proteinuria $> 200\text{mg}/24$ hours (high proteinuria, HP, $n = 18$) (2,3).

Controls

The control group consisted of sex and age-matched healthy subjects from our Pediatric Primary Care Center. Healthy status was determined through the subjects' medical history and either a parental report or self-report to rule out the presence of chronic or acute diseases.

Ethical aspects

The Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais approved the study. Informed consent was obtained from parents of all included subjects. The research protocol did not interfere with any medical recommendations or prescriptions. Subject follow-up was guaranteed even in cases of refusal to participate in the study.

Study protocol

Blood sampling: Blood samples of all subjects were collected into sterile citrate tubes simultaneously with routine exams. Citrated tubes were immediately immersed in ice, and processed within 30 minutes after collection. Cells were sedimented by

centrifugation at 700 g for 10 minutes at 4°C; then supernatant plasma was collected and re-spun for another 20 minutes at 1300 g to sediment platelets (22). Cell-free plasma was aliquoted into 0.5 ml samples and stored at -80°C until measurements.

From patients with INS, we also measured urea, creatinine, albumin, cholesterol, triglycerides and uric acid. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the Schwartz formula (23).

Urine sampling: Twenty-four-hour urine samples were collected from the patients with INS. After homogenization, 10 ml of the collected urine were centrifuged at 4°C for 20 minutes at 1300 g. Cell-free urine was aliquoted into 0.5 ml tubes and stored at -80°C until measurements.

Cytokines and chemokines measurements: Levels of plasma and urinary TGF- β_1 , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and IL-8/CXCL8 were measured by specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), following manufacturer's instructions, as described elsewhere (24). Urine chemokine levels were standardized to urine creatinine measured in the same spot urine and expressed as pg/mg cr. All samples were assayed on duplicate. For measurement of TGF- β_1 , we used a Quantikine® kit, and the samples were activated before the assay. The detection limits were 6 pg/ml for TGF- β_1 , 8 pg/ml for MCP-1/CCL2, 2 pg/ml for RANTES/CCL5, and 6 pg/ml for IL-8/CXCL8.

Statistical Analysis

The values are expressed as medians or means and standard deviation, when appropriate. Analysis of variance, followed by the Newman-Keuls test, was used for multiple comparisons of means. The Mann Whitney test was used to compare medians

between two groups and Kruskal Wallis test for multiple medians comparisons. Spearman test was used to test correlations. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Subject characteristics and casual measurements.

Control group ($n = 13$) included six boys and seven girls ranging in age from 6.1 to 13.5 years. The mean values of weight, height, body mass index, systolic and diastolic pressures, and renal function parameters were within normal range (Table 1).

As mentioned before, INS patients were divided according to steroid-responsiveness (SS or SR) and 24-hour proteinuria (LP or HP). The clinical features of each group are shown in Tables 1 and 2. No differences were detected in age, sex distribution, blood pressure, weight, height, body mass index, nitrogen waste levels (urea and creatinine), and glomerular filtration rate among INS groups and controls ($p > 0.05$, Table 1). However, as also shown in Table 1, triglycerides and total cholesterol levels were higher, while albumin levels were lower, in the SR group when compared to SS patients ($p < 0.05$). Also, total cholesterol was significantly higher, and albumin significantly lower in the HP group when compared to LP group ($p < 0.05$, Table 2).

Plasma and urinary levels of cytokines and chemokines according to steroid responsiveness. There were no significant differences between SS, SR or controls concerning plasma concentrations of IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 (Table 3). In contrast, plasma TGF- β_1 levels were 3.7-fold higher in SR when compared to controls ($p < 0.05$, see Table 3 and Figure 1). Additionally, plasma TGF- β_1 levels were slightly

but not significantly increased in SR patients when compared to SS group (Table 3 and Figure 1). On the other hand, urinary concentrations of IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 did not differ between SR and SS patients (Table 3).

Plasma and urinary levels of cytokines and chemokines according to proteinuria. As shown in Table 4, plasma concentrations of TGF- β_1 , IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 were not significantly different when groups LP, HP and controls were compared. Urinary concentrations of MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 did not differ between HP and LP patients (Table 4). However, the urinary measurements showed a significant elevation of IL-8/CXCL8 levels in INS patients with high proteinuria (HP group), reaching values 3.4-fold higher than LP group ($p < 0.05$, see Table 4 and Figure 2). Additionally, urinary levels of IL-8/CXCL8 positively correlated to proteinuria ($p < 0.05$, Figure 3).

DISCUSSION

The pathogenesis of INS remains obscure. The immune system is thought to play a pivotal role, and there is a lot of evidence that support this theory (2,4,5,6). In 1974, Shalhoub (25) developed a hypothesis that INS was an immune disorder, with increased levels of a lymphocyte-derived permeability factor. Since then, several groups have studied possible factors that could be responsible, at least in part, for the physiological abnormalities of INS (4,26). In this study, we specifically focused on the evaluation of blood and urinary concentrations of TGF- β_1 , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 and IL-8/CXCL8 in children with INS, since previous reports

described alterations of these immune mediators in diverse renal diseases, including glomerulopathies (8,12,15,19,27).

Steroid resistance in children with INS is considered a stronger factor for a poor prognosis than histological findings (28). In this context, it has been suggested that TGF- β might contribute to the progression of renal disease, leading to accumulation of extracellular matrix (ECM) and tissue fibrosis (12,15). High TGF- β expression and an elevation in its urinary concentration were previously detected in patients with FSGS, but not in those with MCNS (15,27,29). In our study, plasma TGF- β_1 was found to be elevated in children with SRNS when compared to healthy controls. It was also higher than the levels of SSNS patients, although the difference was not statistically significant. Increased TGF- β could lead to progressive renal function deterioration in those patients. When groups were divided according to proteinuria levels, no difference was found, suggesting that TGF- β_1 increase seemed not to be related to protein loss.

Since TGF- β_1 is known to induce production of MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5, chemokines that have been associated to ECM deposition and proteinuria (16,17,19), we evaluated its levels in INS patients. However, we did not find differences in plasma and urinary levels of these mediators.

The involvement of a circulating permeability factor in the pathogenesis of proteinuria has been suggested by several findings. In patients with FSGS, proteinuria often recur after receiving a normal kidney transplant (30), although kidneys with FSGS were successfully transplanted in other subjects with total remission of the disease (31). Also, there have been reports in scientific literature of successfully treated FSGS by plasmapheresis (32), and induction of proteinuria in a newborn of a mother with FSGS (33). A potential candidate for a permeability factor is IL-8/CXCL8. Most studies that assessed this chemokine in INS found increased serum levels in patients during relapse,

and normal concentrations in remission (7,8,34). IL-8/CXCL8 was also found to have effects on the metabolism of the glomerular basement membrane (GBM), possibly increasing glomerular permeability (7). Infusion of this chemokine in rats induced proteinuria, an effect that could be reversed by the infusion of anti-IL-8/CXCL8 neutralizing antibodies (7). In our study, plasma levels of IL-8/CXCL8 were not significantly different between groups, although the urinary levels were increased in INS patients with high proteinuria. Increased urinary IL-8/CXCL8 was also described in patients with lupus nephritis and IgA nephropathy (35). On the other hand, in the same study, the levels of this chemokine remained unchanged in nephritic patients compared to controls (35). Although, it should be mentioned that all nephritic patients were in remission (35). More recently, Cho et al reported for the first time high concentrations of IL-8/CXCL8 in the urine and plasma of pediatric patients with MCNS during relapse (36). Accordingly, in our study, the increase of this chemokine was independent of histology or response to corticosteroids, and was also related to urinary protein excretion. Moreover, urinary levels of IL-8/CXCL8 were positively correlated to proteinuria. This finding cannot be attributed merely to the increased permeability itself, because the same was not found for MCP-1/CCL2 or RANTES/CCL5, proteins with similar functions and molecular weights (9,10).

We are aware of the limitations associated with the cross-sectional design of our study. The main possible weakness was the use of a convenience sample, which makes homogeneity among the selected groups very difficult to obtain, since the levels of proteinuria and the use of immunosuppressive drugs may interfere with cytokine and chemokine measurements. Nevertheless, some aspects of the study may increase the strength of our findings, such as the utilization of strictly defined inclusion and

exclusion criteria and a well-established protocol for the measurements of cytokines and chemokines (24).

In summary, we found increased TGF- β_1 in SRNS, suggesting that this cytokine may play a role in the progression of this renal disease, a complication that is more common in patients with resistance to steroid treatment. Moreover, TGF- β_1 could be a marker of a worse prognosis in INS, a hypothesis that needs further testing. We also detected increased urinary IL8/CXCL8 in children with high proteinuria, with a positive correlation with urinary protein levels, what could be related to the effect of this chemokine on GBM and protein excretion, as described by other groups (7). Since plasma levels of IL8/CXCL8 were not different between groups, this result probably indicates an inflammatory process localized to renal tissue. Finally, our findings suggest that both TGF- β_1 and IL8/CXCL8 could be involved in the pathogenesis of INS, the first being related to the progression of the disease and worse responsiveness to steroids, and the latter being associated with glomerular permeability alterations.

REFERENCES

1. Schachter AD 2004 The pediatric nephrotic syndrome spectrum: Clinical homogeneity and molecular heterogeneity. *Pediatr Transplantation* 8:344–348
2. Eddy AA, Symons JM 2003 Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 362:629-639
3. Niaudet P 2004 Steroid-sensitive idiopathic nephrotic syndrome in children. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P (eds). *Pediatric Nephrology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 543-556
4. van den Berg JG, Weening JJ 2004 Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 107:125-136

5. Grimbert P, Audard V, Remy P, Lang P, Sahali D 2003 Recent approaches to the pathogenesis of minimal-change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18:245-248
6. Camici M 2007 The nephrotic syndrome is an immunoinflammatory disorder. *Med Hypotheses* 68:900-905
7. Garin EH 2000 Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 14:872-878
8. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, Garin EH 2006 A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 21:603-610
9. Mackay CR 2001 Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2:95-101
10. Gerard C, Rollins BJ 2001 Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-115
11. Harris RC, Neilson EG 2006 Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 57:365-380
12. August P, Suthanthiran M 2003 Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int* 64[Suppl 87]:S99-S104
13. Liu Y 2006 Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69:213-217
14. Reidy K, Kaskel FJ 2007 Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 22:350-354
15. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, Vlachojannis JG 2002 Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 17(12):2145-2152

16. Wang SN, Hirschberg R 1999 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* 14:2072-2074
17. Qi W, Chen X, Polhill TS, Sumual S, Twigg S, Gilbert RE, Pollock CA 2006 TGF-beta1 induces IL-8 and MCP-1 through a connective tissue growth factor-independent pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F703-709
18. Mukaida N, Harada A, Matsushima K 1998 Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:9-23
19. Segerer S 2003 The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis* 41(Suppl 1):S15-8
20. Garin EH, West L, Zheng W 1997 Effect of interleukin-8 on glomerular sulfated compounds and albuminuria. *Pediatr Nephrol* 11:274-279
21. (no authors listed) 1978 International Study of Kidney Disease in Children: Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. *Kidney Int* 13:159-165
22. Reinhold D, Bank U, Buhling F, Junker U, Kekow J, Schleicher E, Ansorge S 1997 A detailed protocol for the measurement of TGF-beta1 in human blood samples. *J Immunol Methods* 209:203-206
23. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Spitzer A 1976 A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 58:259-263
24. Sousa-Pereira SR, Teixeira AL, Silva LC, Souza AL, Antunes CM, Teixeira MM, Lambertucci JR 2006 Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2

- cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol* 28:473-478
25. Shalhoub RJ 1974 Pathogenesis of lipoid nephrosis: a disorder of T-cell function. *Lancet* 2:556–560
26. Brenchley PEC 2003 Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 18[Suppl 6]:vi21–vi25
27. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA 1996 Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 49:461-469
28. Schwartz MM, Evans J, Bain R, Korbet SM 1999 Focal segmental glomerulosclerosis: prognostic implication of the cellular lesion. *J Am Soc Nephrol* 10:1900-1907
29. Strehlau J, Schachter AD, Pavlakis M, Singh A, Tejani A, Strom TB 2002 Activated intrarenal transcription of CTL-effectors and TGF-beta1 in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 61:90-95
30. Weber S, Tönshoff B 2005 Recurrence of focal-segmental glomerulosclerosis in children after renal transplantation: clinical and genetic aspects. *Transplantation* 80: S128–S134
31. Rea R, Smith C, Sandhu K, Kwan J, Tomson C 2001 Successful transplant of a kidney with focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 16:416-417
32. Yokoyama H, Wada T, Furuichi K 2003 Immunomodulation effects and clinical evidence of apheresis in renal diseases. *Ther Apher Dial* 7:513-519.

33. Kemper MJ, Wolf G, Muller-Wiefel DE 2001 Transmission of glomerular permeability factor from a mother to her child. *N Engl J Med* 344:386-387.
34. Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM 1995 Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol* 100:475-479
35. Wada T, Yokoyama H, Tomosugi N, Hisada Y, Ohta S, Naito T, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K 1994 Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int* 46:455-460
36. Cho MH, Lee HS, Choe BH, Kwon SH, Chung KY, Koo JH, Ko CW 2003 Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol* 23:260-266

Table 1. Subject characteristics, blood and urine measurements, renal biopsy and current treatment in nephrotic patients according to corticosteroid responsiveness and in age-matched healthy controls.

Characteristics and measurements	SR Group (n = 21)	SS Group (n = 12)	Controls (n = 13)	p
Age (years)	11.9 ± 3.6	11.6 ± 5.0	10.5 ± 2.3	NS
Sex (%; male : female)	62 : 38	58 : 42	46 : 54	NS
Systolic BP (mmHg)	106 ± 14	101 ± 14	100 ± 6	NS
Diastolic BP (mmHg)	72 ± 13	67 ± 15	59 ± 6	0.07
Weight (kg)	41.4 ± 12.6	39.4 ± 17.1	41.0 ± 8.0	NS
Height (cm)	141.6 ± 16.4	143.2 ± 27.0	144.6 ± 10.3	NS
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 10.9	18.9 ± 8.9	19.6 ± 3.2	NS
Urea levels (mg/dl)	27.5 ± 13.7	20.6 ± 5.8	-	NS
Creatinine levels (mg/dl)	0.63 ± 0.25	0.56 ± 0.16	0.50 ± 0.10	NS
Triglycerides (mg/dl)	145 [106-187]*	76 [62-98]	-	<0.05
Total Cholesterol (mg/dl)	227 [160-355]*	142 [128-167]	-	<0.05
Albumin (g/dl)	3.2 [2.8-4.0]*	4.3 [4.0-4.6]	-	<0.05
Uric Acid (mg/dl)	5.2 ± 1.2	4.7 ± 1.0	-	NS
Glomerular filtration rate†	145 ± 45	158 ± 26	174 ± 26	NS
Biopsy	16	7	-	
MCD	0	1	-	
FSGS	10	6	-	
DMP	6	0	-	
Medication				
Steroid	15	5	0	
ACEi	12	6	0	
None	2	3	13	
Proteinuria group (%; HP: LP)	71 : 29**	25 : 75	-	<0.05

Values are expressed as mean ± SD for all variables, except for triglycerides, cholesterol and albumin where medians, 25% and 75% percentiles are shown, and for biopsy and medication data, where the number of occurrences is shown.

* $p < 0.05$, Mann Whitney test; ** $p < 0.05$, Fisher's test.

† Glomerular filtration rate was estimated using the Schwartz formula (23).

SR: steroid resistant; SS: steroid sensitive; NS: non-significant; BMI: body mass index;

MCD: minimal change disease; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis; DMP:

diffuse mesangial proliferation; ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitor.

Table 2. Subject characteristics, blood and urine measurements, renal biopsy and current treatment in nephrotic patients according to proteinuria levels and in age-matched healthy controls.

Characteristics and measurements	HP Group (<i>n</i> = 18)	LP Group (<i>n</i> = 15)	Controls (<i>n</i> = 13)	<i>p</i>
Age (years)	12.3 ± 3.5	11.3 ± 4.8	10.5 ± 2.3	NS
Sex (%; male: female)	50 : 50	73 : 27	46 : 54	NS
Systolic BP (mmHg)	106 ± 15	102 ± 13	100 ± 6	NS
Diastolic BP (mmHg)	71 ± 15	69 ± 13	59 ± 6	NS
Weight (kg)	40.6 ± 12.9	40.7 ± 16.0	41.0 ± 8.0	NS
Height (cm)	140.7 ± 16.1	143.9 ± 25.3	144.6 ± 10.3	NS
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 12.2	20.4 ± 8.3	19.6 ± 3.2	NS
Urea levels (mg/dl)	26.2 ± 14.4	23.5 ± 8.2	-	NS
Creatinine levels (mg/dl)	0.63 ± 0.25	0.57 ± 0.19	0.50 ± 0.10	NS
Triglycerides (mg/dl)	135 [104-183]*	84 [64-159]	-	<0.05
Total Cholesterol (mg/dl)	212 [162-390]*	145 [131-176]	-	<0.05
Albumin (g/dl)	3.1 [2.1-4.0]*	4.2 [4.0-4.6]	-	<0.05
Uric Acid (mg/dl)	4.9 ± 1.2	5.0 ± 1.2	-	NS
Glomerular filtration rate†	142 ± 44	159 ± 32	174 ± 26	NS
Biopsy	14	9	-	
MCD	0	1	-	
FSGS	9	7	-	
DMP	5	1	-	
Medication				
Steroid	13	7	0	
ACEi	12	6	0	
None	1	4	13	
Steroid responsiveness (%; SR : SS)	83 : 17**	40 : 60	-	<0.05

Values are expressed as mean ± SD for all variables, except for triglycerides, cholesterol and albumin where medians, 25% and 75% percentiles are shown, and for biopsy and medication data, where number of occurrences is shown.

**p* < 0.05, Mann Whitney test; ** *p* < 0.05, Fisher's test.

† Glomerular filtration rate was estimated using the Schwartz formula (23).

HP: high proteinuria; LP: low proteinuria; BMI: body mass index; MCD: minimal change disease; FSGS: focal segmental glomerulosclerosis; DMP: diffuse mesangial proliferation; ACEi: angiotensin converting enzyme inhibitor; NS: non-significant.

Table 3. Cytokines and chemokines measurements in nephrotic patients according to corticosteroid responsiveness and in age-matched healthy controls.

ELISA measurements	SR Group (<i>n</i> = 21)	SS Group (<i>n</i> = 12)	Controls (<i>n</i> = 13)
Blood			
TGF- β_1 (ng/ml)	10.8 [4.2-20.1]*	4.3 [2.6-6.2]	2.9 [1.4-5.0]
IL-8/CXCL8 (pg/ml)	210 [144-259]	282 [263-338]	259 [183-340]
MCP-1/CCL2 (pg/ml)	109 [92-125]	84 [59-217]	38 [9-355]
Urine			
IL-8/CXCL8 (pg/mg cr)	20 [13-73]	38 [12-54]	-
MCP-1/CCL2 (pg/mg cr)	97 [54-263]	115 [72-180]	-
RANTES/CCL5 (pg/mg cr)	26 [6-48]	30 [22-37]	-

* $p < 0.05$ (steroid resistant patients vs. controls, Kruskal Wallis test).

Values are expressed as medians, 25% and 75% percentiles.

SR: steroid resistant; SS: steroid sensitive; TGF- β_1 : Transforming growth factor- β_1 ; IL-

8/CXCL8: Interleukin-8; MCP-1/CCL2: Monocyte chemoattractant protein-1;

RANTES/CCL5: Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted; mg cr:

milligrams of creatinine.

Table 4. Cytokines and chemokines measurements in nephrotic patients according to proteinuria levels and in age-matched healthy controls.

ELISA measurements	HP Group (<i>n</i> = 18)	LP Group (<i>n</i> = 15)	Controls (<i>n</i> = 13)
Blood			
TGF- β_1 (ng/ml)	7.4 [3.4-20.1]	5.1 [3.0-6.2]	3.0 [1.7-6.4]
IL-8/CXCL8 (pg/ml)	225 [125-267]	272 [187-366]	259 [183-340]
MCP-1/CCL2 (pg/ml)	100 [92-200]	100 [34-175]	42 [9-400]
Urine			
IL-8/CXCL8 (pg/mg cr)	54 [15-73]*	16 [12-38]	-
MCP-1/CCL2 (pg/mg cr)	95 [52-275]	127 [84-191]	-
RANTES/CCL5 (pg/mg cr)	19 [2-37]	31 [27-43]	-

* $p < 0.05$ (high proteinuria vs. low proteinuria, Mann Whitney test).

Values are expressed as medians, 25% and 75% percentiles.

SR: steroid resistant; SS: steroid sensitive; TGF- β_1 : Transforming growth factor- β_1 ; IL-

8/CXCL8: Interleukin-8; MCP-1/CCL2: Monocyte chemoattractant protein-1;

RANTES/CCL5: Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted; mg cr:

milligrams of creatinine.

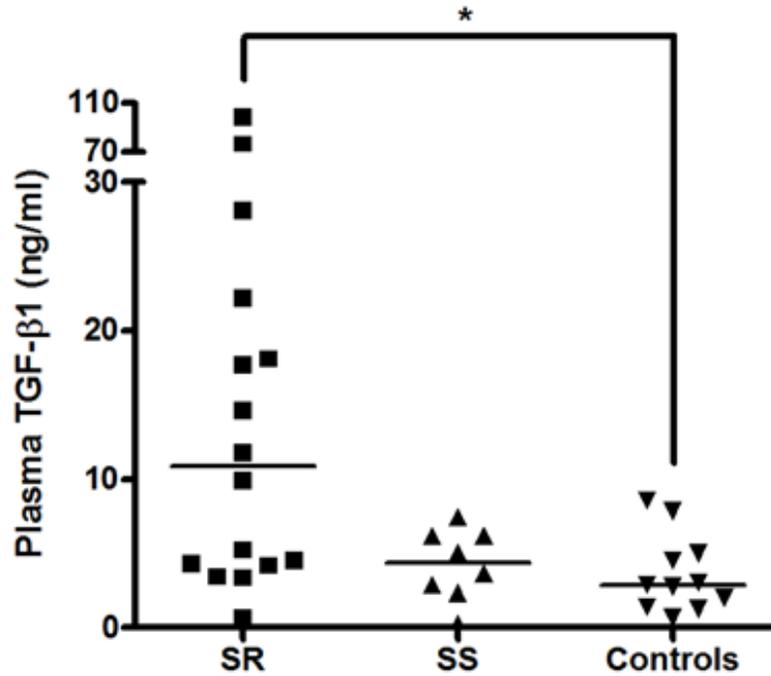


Figure 1. Comparison between plasma TGF- β_1 levels in steroid resistant (SR, ■), steroid sensitive (SS, ▲) nephrotic patients and age-matched healthy controls (Controls, ▼).

* $p < 0.05$ (SR vs. controls, Kruskal Wallis test).

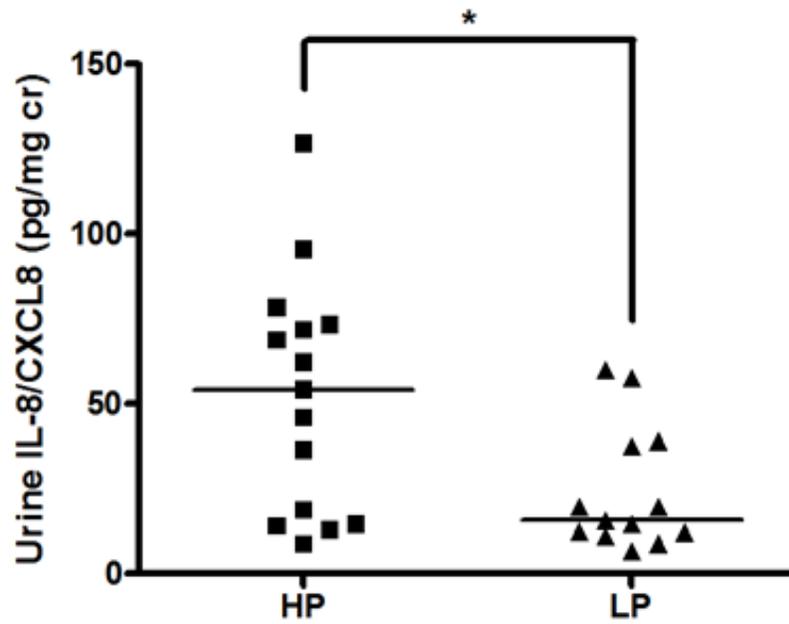


Figure 2. Comparison between urinary interleukin 8 (IL-8/CXCL8) levels in nephrotic patients with high proteinuria (HP, ■) and low proteinuria (LP, ▲).

* $p < 0.05$ (Mann-Whitney test)

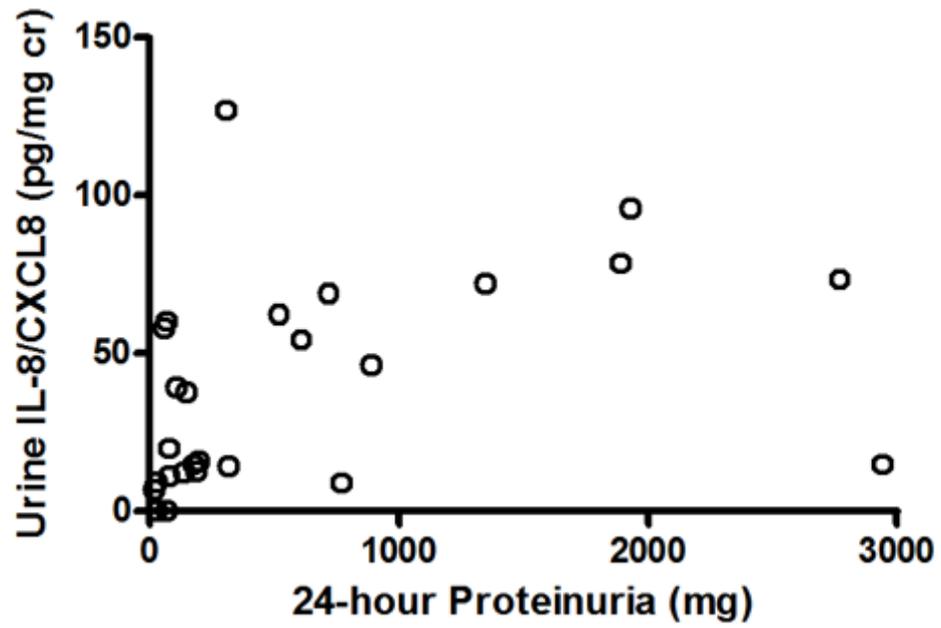


Figure 3. Correlation between urinary interleukin 8 (IL-8/CXCL8) levels and 24-hour proteinuria in patients with idiopathic nephrotic syndrome.

* $p < 0.05$, $r = 0.558$ (Spearman test).

6 – COMENTÁRIOS FINAIS

O TGF- β atua localmente no tecido renal em vários tipos de nefropatias progressivas, sendo descrito como um dos principais atores na proliferação da matriz extracelular, estímulo de fibroblastos e fibrose tecidual (1, 2).

Na SN, estudos têm demonstrado aumento da expressão e concentração de TGF- β no tecido renal, o que foi descrito principalmente em pacientes com a forma histológica GEFS (3, 4, 5). Ressalta-se ainda que o aumento da expressão dessa citocina em modelos animais leva a glomerulosclerose (6). Acredita-se também que, além da deposição de matriz mesangial, o TGF- β estimule lesão tubular, com transformação mesenquimal (2).

Os resultados desse estudo mostraram níveis circulantes aumentados de TGF- β em pacientes com SNCR, um grupo que caracteristicamente tem pior prognóstico. Esse aumento parece não estar relacionado apenas ao tipo histológico, visto que ambos os grupos (SS e SR) tinham 50% dos pacientes com GEFS. Esses achados sugerem que essa citocina pode ser um dos fatores associados à pior evolução observada nesses pacientes.

O envolvimento de um fator de permeabilidade circulante na fisiopatologia da SN foi sugerido por vários autores (7, 8, 9). Um candidato em potencial é a IL-8/CXCL8, que foi detectada em níveis elevados no sangue de pacientes em recidiva (9, 10, 11). É proposto seu papel na permeabilidade protéica renal, como demonstrado em estudos experimentais, nos quais foram detectados efeitos sob a MBG (9). Além disso, a infusão de IL8/CXCL8 em camundongos provocou proteinúria, efeito que pôde ser bloqueado ao adicionar anticorpos anti-IL8/CXCL8 (9).

No nosso estudo, IL8/CXCL8 foi encontrada em níveis elevados na urina de pacientes com proteinúria mais acentuada. Wada *et al* descreveu achado semelhante em pacientes com recidiva de nefrite lúpica e nefropatia por IgA (12). Nesse estudo, os pesquisadores encontraram níveis normais na SNLM e GEFS, porém só foram estudados pacientes em remissão (12). A primeira descrição de aumento urinário de IL8/CXCL8 em pacientes com SN foi feita por Cho *et al*, que estudaram crianças com SNLM durante as recidivas. Esses autores encontraram aumento dos níveis urinários, mas também séricos dessa quimiocina (13). No nosso estudo, entretanto, foram estudados portadores de SNI com histologia variada, e níveis aumentados foram encontrados na urina, com correlação positiva com os níveis de proteinúria. No plasma, as concentrações foram semelhantes entre os grupos. Isso pode sugerir uma ação predominantemente localizada da IL8/CXCL8 no tecido renal, havendo possível relação com o mecanismo da proteinúria.

Entender a fisiopatologia da SN ainda é um desafio. Achados diversos nos campos da genética e imunologia sugerem uma síndrome multifatorial, tendo como pilares alterações genéticas de podócitos, disfunção do sistema imune e fatores circulantes de permeabilidade (8, 14, 15). Esse espectro fisiopatológico poderia explicar a dificuldade de se desenvolver uma terapia definitiva, e a grande variabilidade de quadro clínico e evolução, o que é característico dessa doença.

Os resultados desse estudo sugerem a participação do TGF- β e da IL-8/CXCL8 na fisiopatologia da SN, como descrito acima. Novos estudos deverão ser realizados para avaliar os efeitos desses achados em longo prazo, determinando o potencial dessas proteínas como marcadores ou até mesmo como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos. Esse tipo de descoberta poderia ajudar na decisão terapêutica, visto que, atualmente, a escolha do tratamento leva em consideração a apresentação e evolução da

doença. O conhecimento prévio, desde o momento do diagnóstico, se a doença evoluirá de forma mais agressiva, levaria a equipe de saúde a escolher opções terapêuticas compatíveis com essa informação, beneficiando o paciente.

Finalmente, vale ressaltar que esse trabalho representa o início de uma linha de pesquisa focada nas alterações imunológicas das doenças renais, com o intuito de trazer informações que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de evolução dessas doenças, abrindo novas perspectivas para a terapêutica futura.

Referências Bibliográficas

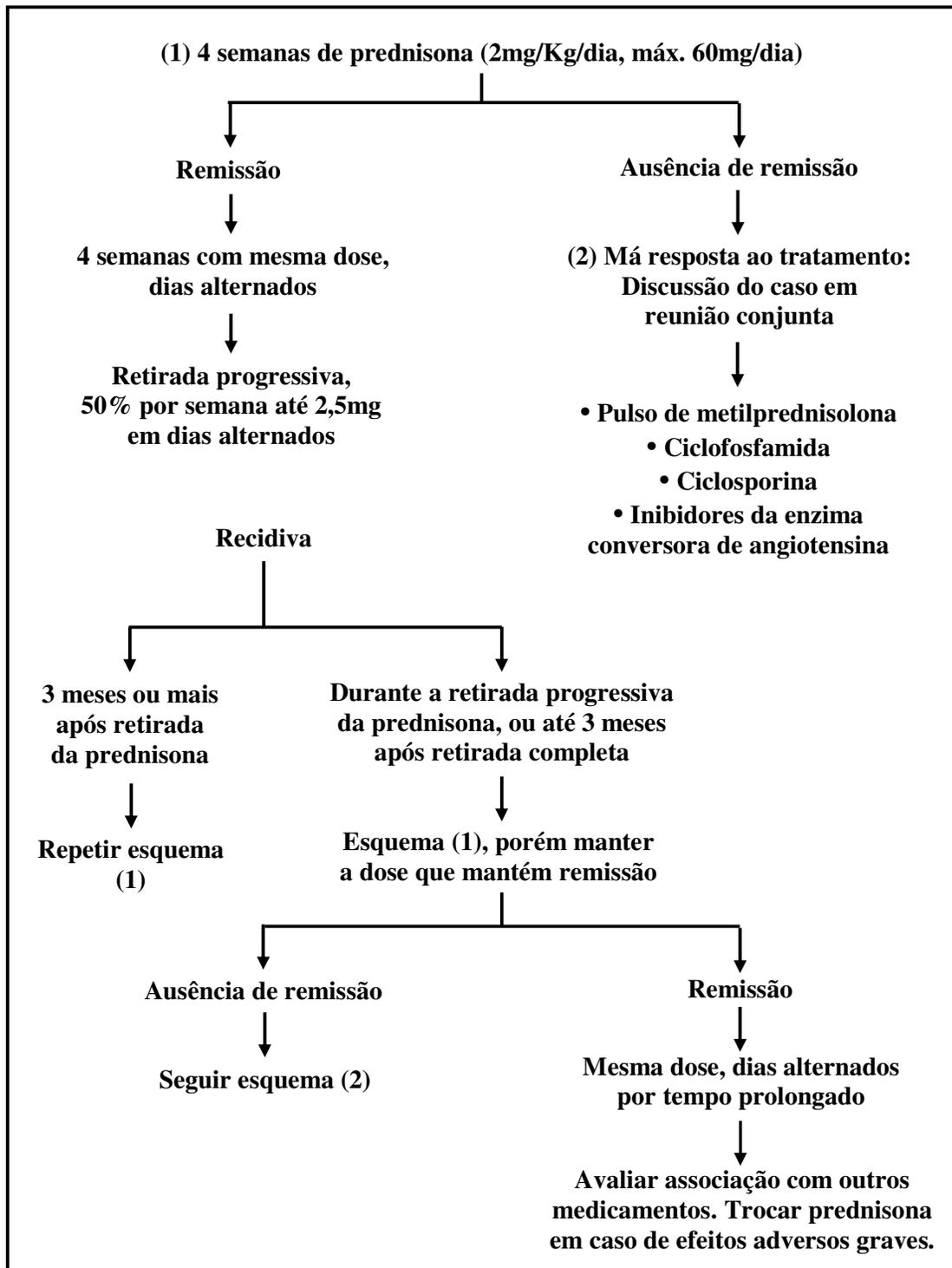
1. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006;69:213–217.
2. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 2006;57:365–380.
3. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, *et al.* Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(12):2145-52.
4. Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, *et al.* Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int* 1996;49:461-469.
5. Strehlau J, Schachter AD, Pavlakis M, Singh A, Tejani A, Strom TB. Activated intrarenal transcription of CTL-effectors and TGF-beta1 in children with focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2002;61:90-5.
6. Reidy K, Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2007;22:350-4.
7. Brenchley PEC. Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18[Suppl 6]:vi21–vi25.
8. van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science*. 2004;107:125-36.
9. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2000;14:872-8.

10. 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;21:603-10.
11. Neuhaus TJ, Wadhwa M, Callard R, Barratt TM. Increased IL-2, IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) in steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Immunol.* 1995;100:475-9.
12. Wada T, Yokoyama H, Tomosugi N, Hisada Y, Ohta S, Naito T, *et al.* Detection of urinary interleukin-8 in glomerular diseases. *Kidney Int.* 1994;46:455-60.
13. 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;23:260-6.
14. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet.* 2003;362:629-39.
15. Camici M. The nephrotic syndrome is an immunoinflammatory disorder. *Med Hypotheses.* 2007;68(4):900-5.

7 – ANEXOS

**ANEXO 1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO DA SÍNDROME NEFRÓTICA
IDIOPÁTICA**

Unidade de Nefrologia Pediátrica – Hospital das Clínicas – UFMG



ANEXO 2. TERMOS DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO

(para pacientes portadores de síndrome nefrótica e seus responsáveis)

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos uma substância do sangue e da urina chamada pelos médicos de fator de crescimento e transformação do tipo beta (TGF- β) que pode participar da piora do funcionamento do rim que pode ocorrer em crianças e adolescentes com síndrome nefrótica. Já se sabe que essa substância participa de uma série de doenças dos rins e do coração e também deve participar do problema renal que surge nos pacientes com síndrome nefrótica.

Este estudo quer, então, saber a quantidade de TGF- β que está no sangue e na urina das crianças e adolescentes com síndrome nefrótica, tentando ver se isso tem relação com a forma da doença (se é mais branda ou mais forte), a resposta ao tratamento e a piora do funcionamento dos rins.

Os exames para determinação do TGF- β no sangue serão coletados através de punção de veia periférica realizada em jejum no dia de uma consulta agendada ou no dia de coleta no laboratório. No mesmo dia, o paciente deverá trazer urina de 24 horas, que também será utilizada para dosagem do TGF- β . Estamos garantindo que a realização destes exames é gratuita, e só será autorizada após assinatura deste termo de consentimento pelo paciente ou por um de seus responsáveis.

Garantimos ainda que a identidade e a privacidade do paciente será mantida. Os resultados desse estudo somente serão utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina.

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. Marcelo F. O. Souto, Maria Goretti M. G. Penido e Ana Cristina Simões e Silva, do Hospital das Clínicas da UFMG. Há também colaboração do Dr. Luiz Sérgio Bahia.

Eu, paciente que sofro de síndrome nefrótica, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue e urina para dosar o TGF- β . 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 a quantidade do TGF- β no sangue e na urina. Dou meu consentimento para que seja coletado sangue e urina de meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) para medir as quantidades de TGF- β . 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: _____ Assinatura do pesquisador: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO
(para pacientes saudáveis e seus responsáveis)

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos uma substância do sangue e da urina chamada pelos médicos de fator de crescimento e transformação do tipo beta (TGF- β) que pode participar da piora do funcionamento do rim que pode ocorrer em crianças e adolescentes com doenças renais. Já se sabe que essa substância participa de uma série de doenças dos rins e do coração e também deve participar do problema renal que surge nos pacientes com uma doença chamada pelos médicos de síndrome nefrótica. Essa doença ataca muitas crianças e adolescentes e pode levar a perda do funcionamento dos rins.

Este estudo quer, então, saber a quantidade de TGF- β que está no sangue e na urina das crianças e adolescentes com essa síndrome nefrótica, tentando ver se isso tem relação com a forma da doença (se é mais branda ou mais forte), a resposta ao tratamento e a piora do funcionamento dos rins.

Sabemos que seu filho (ou sua filha) não tem problema de rins e é sadio. Mas, gostaríamos de pedir autorização para medirmos a quantidade da substância chamada de TGF- β no sangue de seu filho (ou de sua filha). Estamos querendo comparar a quantidade de TGF- β que tem no sangue de seu filho (ou de sua filha) com a quantidade que tem no sangue de pacientes com síndrome nefrótica.

O exame para determinação do TGF- β no sangue será coletado através de punção de veia periférica realizada em jejum no dia de uma consulta agendada ou no dia de coleta no laboratório. Estamos garantindo que a realização destes exames é gratuita, e só será autorizada após assinatura deste termo de consentimento pelo paciente ou por um de seus responsáveis.

Garantimos ainda que a identidade e a privacidade do paciente será mantida. Os resultados desse estudo somente serão utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina. 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, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo será conduzido pelos Drs. Marcelo F. O. Souto, Maria Goretti M. G. Penido e Ana Cristina Simões e Silva, do Hospital das Clínicas da UFMG. Há também colaboração do Dr. Luiz Sérgio Bahia.

Eu entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue e urina para dosar o TGF- β . 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 a quantidade do TGF- β no sangue. Dou meu consentimento para que seja coletado sangue de meu filho (minha filha ou outro grau de parentesco) para medir as quantidades de TGF- β . 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: _____ Assinatura do pesquisador: _____

**ANEXO 3. COMPROVANTES DE SUBMISSÃO DOS ARTIGOS PARA
PUBLICAÇÃO
PEDIATRIC RESEARCH**

> From: info@pedres.org
> To: acssilva@hotmail.com
> Date: Thu, 1 Nov 2007 14:05:58 -0400
> Subject: Ped Res - Manuscript Submission Confirmation
>
> Dear Prof Simões e Silva,
>
> Your submission entitled "Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria" has been received by the Pediatric Research Editorial Office.
>
> Your manuscript will be assigned to an Editor once we have received your Author Agreement/Copyright Transfer Form (available for download through Editorial Manager). Please have all authors sign and complete this form. Original signatures, not photocopies, are required. Please send the completed form to:
>
> Susan Tsujimoto, Managing Editor
> Pediatric Research, Editorial Office
> 3400 Research Forest Drive, Suite B7
> The Woodlands, TX 77381 U.S.A.
>
> Upon receipt of your completed Author Agreement/Copyright Transfer Form, your manuscript will be given a reference number and assigned to an Editor.
>
> You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.
>
> <http://pr.edmgr.com/>
>
>
> Thank you for submitting your work to Pediatric Research.
>
> Kind regards,
> Susan Tsujimoto
> Managing Editor
> Pediatric Research
>
> Pediatric Research, Editorial Office
> 3400 Research Forest Drive, Suite B-7
> The Woodlands, TX 77381
> Office: (281) 419-0645
> Fax: (281) 419-0082

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS NEFROLOGÍA PEDIÁTRICA

Por la presente CERTIFICO que hemos recibido el artículo
FISIOPATOLOGIA DE SINDROME NEFROTICA EM CRIANCAS E
ADOLESCENTES
de los autores

Souto MFO¹ MARCELO FERRAZ DE OLIVEIRA SOUTO
Teixeira MM² MAURO MARTINS TEIXEIRA
Penido MGMG¹ MARIA GORETTI MOREIRA GUIMARÃES PENIDO
Simões e Silva AC¹ ANA CRISTINA SIMÕES E SILVA
Souto MFO¹; Teixeira MM²; Penido MGMG¹; Simões e Silva AC¹.

1 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.

2 Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia,
Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte,
MG, 31270-901, Brasil.

El trabajo ha sido aceptado y se publicara en el N^o 2 del año 2007 programado para
diciembre 2007.

Buenos Aires 30 de Octubre 2007

Dr RAMON EXENI
EDITOR

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS NEFROLOGIA PEDIATRICA

ABSTRACTS

14th Congress of the International Pediatric Nephrology Association

31 August – 4 September, 2007
Budapest, Hungary



IPNA
BUDAPEST 2007



1598

Pediatr Nephrol (2007) 22:1401–1650

752 (P)

HLA Class I Associations in Taiwanese Children with Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome

YH. Chiou¹, LY. Wang², HC. Fang³, KJ. Chou³, HE. Tan⁴¹Kaohsiung Veterans General Hospital, Department of Pediatrics, Kaohsiung, Taiwan²Fooyin University, Department of Medical Technology, Kaohsiung, Taiwan³Kaohsiung Veterans General Hospital, Department of Internal Medicine, Kaohsiung, Taiwan⁴Chang Jung Christian University, Department of Health Care Administration, Tainan, Taiwan

Objectives of study: There is strong evidence that steroid-sensitive nephrotic syndrome (SSNS) is a primary immune disease. One of the most important genetic factors that control the immune response to foreign antigens resides within the human leukocyte antigen (HLA) loci on the chromosome 6. HLA associations have been frequently reported in childhood SSNS in various population. The purpose of this study was to characterize the immunogenetic background of childhood SSNS in Taiwan.

Methods: Sixty-six unrelated patients with SSNS were studied. Their mean age of onset of the disease was 3.5 years (range 1.3–12 years). Male to female was 47 to 21. We determined the HLA class I gene polymorphisms using the polymerase chain reaction-sequencing specific primer (PCR-SSP) technique. The control group consisted of 475 unrelated healthy individuals from the same geographical areas.

Results: The frequency of A11, B39, B48, B60, B62, CW4, and CW7 were significantly higher in SSNS patients compared to controls (68.2% vs 55.4%, 10.6% vs 1.7%, 4.5% vs 1.1%, 53.0% vs 30.9%, 22.7% vs 9.5%, 21.2% vs 7.6%, and 60.6% vs 31.2%, respectively; $p=0.049$, $p<0.001$, $p=0.028$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, and $p<0.001$ respectively). Significant negative associations were encountered with A2, B46, and CW12 in SSNS patients as compared to controls (34.8% vs 50.9%, 9.1% vs 23.4%, and 6.1% vs 17.5%, respectively; $p=0.014$, $p=0.008$, and $p=0.018$, respectively).

Conclusions: Our data suggested that the immunogenetic background of childhood SSNS in Taiwan was different from that in other populations. Knowledge of the genetic basis of SSNS may have important therapeutic implications in these patients.

754 (P)

Inflammatory Mediators in Pediatric Patients with Nephrotic Syndrome

M. Souto¹, M. Teixeira², A. Teixeira³, MG. Penido¹, AC. Simes e Silva¹¹Federal University of Minas Gerais, Department of Pediatrics, Belo Horizonte, Brazil²Federal University of Minas Gerais, Department of Biochemistry and Immunology, Belo Horizonte, Brazil³Federal University of Minas Gerais, Department of Internal Medicine, Belo Horizonte, Brazil

Background: Nephrotic syndrome (NS) is related to immunological factors and renal inflammatory mechanisms. Many studies showed that inflammatory mediators, especially interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), have a role in kidney injury. Changes in their urine concentration were found in lupus nephritis and IgA nephropathy. Thus, the aims of this study were to evaluate IL-8 and MCP-1 in serum and urine samples of pediatric patients with primary NS and to verify the relation between these measurements and protein excretion.

Methods: Patients were divided according to current 24-hour proteinuria into two groups: lower than 200 mg/24 hours (group 1, n=11) and higher than 200 mg/24 hours (group 2, n=14). Blood and 24-hour urine samples were collected and stored at -80 °C. IL-8 and MCP-1 were measured by ELISA standard methods.

Results: Blood IL-8 and MCP-1 did not differ between the groups. Urinary IL-8 levels (pg/mg of creatinine) were significantly elevated in patients of group 2 when compared to group 1 (51.06±9.67 vs. 20.48±5.24, $p<0.05$). Although group 2 also exhibited higher values of urinary MCP-1 (223.34±56.64 pg/mg creatinine) than group 1 (151.1±31.64 pg/mg creatinine), they did not reach statistical difference.

Conclusion: The inflammatory process in NS seems to be a local phenomenon, since blood levels of these chemokines were similar in all groups. Moreover, our findings showed a relation between IL-8 and the presence of proteinuria and suggested a role for this local inflammatory mediator in disease activity.

753 (P)

Chemokines and Cytokines during the Development of Murine Lupus Nephritis

K. Silveira¹, AC. Simes e Silva², M. Teixeira¹¹Federal University of Minas Gerais, Department of Biochemistry and Immunology, Belo Horizonte, Brazil²Federal University of Minas Gerais, Department of Pediatrics, Belo Horizonte, Brazil

Background: Little is known regarding the temporal sequence of the intrarenal generation of chemokines and cytokines or their relationships to renal dysfunction in lupus nephritis. Thus, to examine inflammatory response during the development of lupus nephritis we have used NZB/W F1 female mice as a model of lupus nephritis.

Methods: NZB/W F1 female mice were distributed into three experimental groups (n=5 per group) according to age: 3, 4.5 and 6 months. At specific time-point for each group, 24-hour urine and blood samples were collected to determine proteinuria, osmolality and creatinine levels. After sacrifice, kidneys were removed to measure chemokines and cytokines levels by ELISA (pg/100 mg of tissue).

Results: Urinary flux was significantly lower at 4.5 than at 3 and 6 months. A significant reduction in creatinine clearance and an increase in proteinuria were detected at 4.5 and 6 months when compared to 3 months. No significant changes were observed in serum and urinary osmolality. Regarding inflammation, MCP-1 significantly increased at 4.5 (262.7±50.5) and remained elevated at 6 months (334.6±87.7) when compared to 3 months values (206.6±37.9). KC was also higher at 6 than at 3 months (718.1±147.8 vs. 491.1±82.6, $p<0.05$). TNF α increased in mice at 6 when compared to 3 months (1201.5±321.4 vs. 689.1±196.7, $p<0.05$). No differences were observed for MIP, RANTES and IL-10.

Conclusion: Our study showed important differences in renal chemokines and cytokines during lupus nephritis and indicated that the knowledge of this immune network and its temporal regulation is a requirement for new therapeutic strategies.

755 (P)

The Characteristics of IgA Nephropathy Detected in School Urinary Screening

Y. Park¹, J. Choi¹, M. Park¹, S. Kim¹, Y. Kim²¹Yeungnam University, Department of Pediatrics, Daegu, South Korea²Yeungnam University, Department of Pathology, Daegu, South Korea

IgA nephropathy (IgAN) is one of common types of glomerulonephritis in children. However, progression to ESRD in patients with IgAN is not as rare as originally thought. In Korea, school urinary screening (SUS) program, an useful tool to find out abnormal urinary findings, initiated in 1998. IgAN was the most common histopathological change in children with isolated hematuria and/or proteinuria in SUS. We studied to clarify the clinical and pathologic characteristics of IgA nephropathy detected by SUS in Korea. We investigated 35 patients (symptomatic group=14 vs SUS group=21) had been diagnosed with IgAN following renal biopsy at the Yeungnam Univ. Hospital between May 1998 and May 2004. These patients were analyzed clinical nature, laboratory data and histopathologic findings (Haas classification in LM) and progress, retrospectively. Their mean age were 10.3±2.5 and 9.5±3.6, respectively, at the time of kidney biopsy. Gross hematuria and edema apt to be common in symptomatic group. There were no significant difference in serum IgA level, estimated Cr, 24-hours protein amount, light microscopic class and electron microscopic findings between two groups. Mesangial IgA deposition was significantly more intense in symptomatic group with gross hematuria. In addition to IgA deposition in capillary and immune dense deposition in intramembrane is significantly common in symptomatic group with nephrotic range proteinuria. However, progression to chronic renal failure was not noted in both groups during 32.2±28.8 and 24.8±11.2 months respectively. Also there were no difference in outcome according to treatment modalities. A longer follow-up period is needed to obtain more information on progression of IgAN with nephritic range proteinuria by disclosing IgA deposition in capillary and immune dense deposition in intramembrane.