

## Actualización

# Efectos patogénicos del factor básico del crecimiento fibroblástico (bFGF) en el síndrome urémico hemolítico<sup>#</sup>

Dres. PATRICIO E. RAY\*, ANGEL ONOFRIO\*\*, JORGE SGROMO\*\*, SILVANA MAGLIO\*\*\*, IRENE MARCO\*\*\*, XUE-HUI LIU<sup>o</sup>, LIAN XU<sup>o</sup> y GUILLERMO GALLO<sup>o</sup>

Arch.argent.pediatr 1999; 97(5): 322

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una causa de insuficiencia renal aguda con anemia hemolítica y trombocitopenia.<sup>1-3</sup> En los niños pequeños, el SUH clásico está asociado primariamente con un síndrome diarreico causado por bacterias productoras de verotoxinas –toxinas Shiga (Stxs)-. Hay países con alto porcentaje de SUH: Argentina, Sudáfrica y Holanda, donde es más común en niños menores de 4 años de edad. Además, otras formas atípicas de SUH han sido descritas en asociación con agentes infecciosos, tumores, drogas y enfermedades sistémicas o congénitas en niños y adultos.<sup>4-6</sup>

Desde que el SUH fue descrito por primera vez en 1955,<sup>1</sup> muchas teorías se han propuesto para explicar su patogenia. La presencia de lesiones trombóticas microangiopáticas en los glomérulos y en las pequeñas arteriolas renales es la lesión patológica característica del SUH. Inicialmente, fue considerado la contraparte clínica del fenómeno experimental de Sanarelli-Schwartzman, en el cual se produce una acumulación de trombos de fibrina en la microcirculación renal.<sup>7</sup> Alternativa-

mente, se ha propuesto que una deficiencia de las células endoteliales vasculares en la producción de prostaciclina,<sup>8</sup> o alteraciones en los mecanismos que modulan la agregación plaquetaria<sup>9</sup> pueden ser causas patogénicas primarias en muchos casos de SUH.

Más recientemente, Karmall y col.<sup>10-11</sup> hicieron un descubrimiento clave al demostrar la asociación entre el SUH y las diarreas producidas por bacterias productoras de Stxs. Desde entonces, muchos estudios han sugerido que el daño renal está directamente relacionado con la absorción sistémica de Stxs.<sup>4,5,12-14</sup>

Las Stxs actúan a través de receptores glicolípidos específicos (glicosfingolípido-globotriaosilceramida o Gb3) que se encuentran en las membranas celulares.<sup>3,15</sup> Lingwood y col.<sup>16,17</sup> han demostrado que estos receptores están localizados en los glomérulos renales de los niños menores de 2 años de edad, pero en los glomérulos de los adultos. Por ello han sugerido que la presencia de estos receptores para las Stxs en las células endoteliales glomerulares renales puede explicar el alto riesgo de los niños pequeños para desarrollar SUH. En base a estos datos, está hoy amplia-

# El presente trabajo es una traducción libre modificada del Capítulo N° 31 del libro: *Escherichia coli* E 157: H 7 and other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains. Edited by James B. Kaper and Alison D. O'Brien, 1998. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

\* Ex Jefe de residentes del Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez" de Buenos Aires. Director de Fisiología Molecular, Children's Research Institute, Attending Physician of the Nephrology Division, Children's National Medical Center, y Associate Professor of Pediatrics at George Washington University, USA.

\*\* Médicos Jefe y Asistente de Terapia Intensiva Pediátrica, Hospital Materno Infantil de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

\*\*\* Médicos Jefe y Asistente de División de Patología, Hospital de Niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

<sup>o</sup> Research Fellows, Children's Research Institute, Children's National Medical Center, Washington, USA.

<sup>oo</sup> Jefe de la División de Patología, Hospital de Niños "Dr. Juan P. Garrahan", Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

### Abreviaturas:

<i>SUH</i> :	Síndrome urémico hemolítico
<i>Stxs</i> :	Toxinas tipo Shiga
<i>Gb3</i> :	Glicosfingolípido-globotriaosilceramida
<i>LPS</i> :	Lipopolisacáridos
<i>IL-1 β</i> :	Interleukina 1 beta
<i>TNF α</i> :	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>bFGF</i> :	Factor básico del crecimiento fibroblástico
<i>IL</i> :	Interleukina
<i>Ig A</i> :	Inmunoglobulina A
<i>HS</i> :	Heparina-setarosa
<i>Ig G</i> :	Inmunoglobulina G
<i>RVSMc</i> :	Células musculares lisas vasculares renales (renal vascular smooth muscle cells)
<i>PAI-1</i> :	Plasminogen activator, inhibitor type 1
<i>RTEc</i> :	Células epiteliales tubulares renales (renal tubular epithelial cells)

mente difundido el concepto de que las Stxs provocan daño endotelial glomerular y aumentan la adhesión de las plaquetas a la pared de los capilares, produciendo lesiones glomerulares microangiopáticas. Por lo tanto, la lesión del endotelio renal es considerada actualmente el factor patogénico más importante en el SUH clásico.

Sin embargo, varios hallazgos clínicos y de laboratorio sugieren que, además de las Stxs, se necesitan otros cofactores para que se desarrolle el SUH. Primero, no todos los cultivos de células endoteliales humanas expuestas a Stxs pueden ser dañados por estas toxinas.<sup>18,19</sup>

Segundo, los receptores para las Stxs se encuentran localizados en muchos tejidos humanos,<sup>20</sup> pero las lesiones microangiopáticas del SUH se desarrollan primariamente en el riñón.

Tercero, el número total de receptores para las Stxs está significativamente aumentado en los riñones del adulto pero, sin embargo, éstos no desarrollan las lesiones renales típicas del SUH cuando se exponen a las Stxs.<sup>16,17</sup>

Cuarto, Boyd y col.,<sup>21</sup> usando un porcino como modelo, encontraron que no todos los receptores para las Stxs son igualmente efectivos en mediar los efectos tóxicos de éstas.

Quinto, López y col., en la Argentina, describieron que menos del 5% de los niños argentinos expuestos a las bacterias productoras de Stxs desarrollan el cuadro clínico completo del SUH.<sup>22,23</sup>

Sexto, a pesar de que se ha propuesto que la presencia de Gb3 (los receptores para las Stxs) en los eritrocitos puede desempeñar un papel protector mediante la neutralización de las Stxs circulantes<sup>23</sup> y que, por lo tanto, los niveles disminuidos de Gb3 en los eritrocitos pueden reflejar una predisposición genética para desarrollar SUH, esta hipótesis es cuestionable.<sup>21</sup> Un estudio realizado en un modelo porcino demostró que la presencia de Gb3 en los eritrocitos no siempre actúa neutralizando los efectos tóxicos de las Stxs.<sup>21</sup>

Finalmente, los autores no hemos encontrado niveles significativos de Gb3 en los glomérulos de una niña argentina de 5 años de edad durante los estadios agudos del SUH, producto de una infección con la bacteria *Escherichia coli* O157: H7 y, por lo tanto, es probable que todos los efectos tóxicos del *E. coli* 157:H7 sean mediados a través de estos receptores.

Las citoquinas y los lipopolisacáridos (LPS) son otros buenos candidatos para actuar como cofactores en la patogénesis del clásico SUH. Cultivos de células endoteliales humanas expuestas a Interleukina-1 beta (IL-1 b) y al factor de

necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) expresan más receptores para Stxs<sup>25</sup> y ambas citoquinas potencian los efectos de las Stxs en estas células.<sup>26</sup> Los niños argentinos con SUH tienen niveles altos de TNF-alfa en el plasma<sup>22</sup> y la administración de Stxs a ratones transgénicos portadores del promotor del TNF-alfa produjo la activación específica de este promotor en las células renales.<sup>27</sup> A pesar de esto, la producción endógena renal de TNF-alfa no se encontró significativamente aumentada en los riñones de estos ratones transgénicos tratados con Stxs. Niveles elevados de IL-6 se encontraron en la orina y en el plasma de niños con SUH, destacando que la IL-6 es considerada un buen marcador para monitorear el progreso del SUH.<sup>28</sup> Otra citoquina, la IL-8, aumenta el reclutamiento de células polimorfonucleares en los pacientes con SUH.<sup>29</sup> Estos hechos sugieren que las interacciones entre las Stxs, LPS y las citoquinas liberadas por leucocitos activados pueden jugar un papel relevante en la patogenia del SUH. Sin embargo, todas estas citoquinas, producidas principalmente por leucocitos, no son elaboradas en grandes cantidades por las células renales y, por lo tanto, es posible que no sean responsables de los cambios patológicos observados en los riñones de los niños afectados por el SUH.

### Nuestra hipótesis

Dado que la habilidad de las Stxs para producir daño microvascular en las células endoteliales renales es considerada un requisito específico primario para la producción del SUH, nuestra hipótesis es que citoquinas liberadas por las células endoteliales renales dañadas juegan un papel específico en la patogenia de este síndrome.

Para que esta hipótesis sea válida, nosotros presumimos que estas citoquinas deben estar presentes en altas concentraciones en la orina, plasma y riñones de los niños en los estadios agudos del SUH. Además, estos factores deben producir efectos biológicos importantes en las células del endotelio microvascular y en los glomérulos renales.

En el presente trabajo presentamos datos biológicos relevantes, demostrando que una de las citoquinas liberadas por las células endoteliales dañadas: el bFGF, puede tener un papel preponderante en la patogenia del SUH.

### Investigación para la medición del bFGF

#### Pacientes

El diagnóstico de SUH fue hecho de acuerdo con el criterio clínico de Gianantonio y col.<sup>2</sup> Las

muestras de plasma y orina fueron recolectadas de 10 niños argentinos en el estadio agudo del SUH. Muestras similares fueron recolectadas en seis niños sanos admitidos en el hospital para cirugía electiva y en cinco niños con los siguientes diagnósticos: nefropatía por inmunoglobulina A (Ig A), síndrome nefrótico, pielonefritis, nefritis intersticial y hematuria. Todos los niños eran menores de cinco años de edad. Las muestras fueron guardadas a  $-20^{\circ}$  C. Las muestras renales fueron obtenidas de 10 biopsias o autopsias realizadas en niños que murieron de otras causas o con las siguientes enfermedades renales: síndrome nefrótico mínimo, nefropatía por Ig A, glomerulonefrosis focal segmentaria, necrosis tubular aguda, nefritis intersticial y pielonefritis.

#### *Caracterización de la actividad del bFGF*

Las muestras de orina fueron concentradas cinco veces con filtros Amicon, mezcladas con heparin Sepharose (HS) y extraídas con diferentes concentraciones de NaCl. La actividad biológica de estos concentrados fue evaluada en células humanas del endotelio renal, en células glomerulares mesangiales y en células del epitelio tubular renal. La presencia de bFGF en estas fracciones con actividad biológica fue confirmada mediante Western Blots usando anticuerpos específicos para el bFGF.

Los niveles de bFGF en sangre y orina fueron medidos usando equipos producidos por los fabricantes R & Systems, Minneapolis, Minn. Las concentraciones en orina se expresaron en picogramos (pg) de bFGF por gramo de creatinina.

#### *Inmunohistoquímica*

La distribución renal de bFGF fue determinada mediante técnicas inmunohistoquímicas, usando el equipo Vectasin Elite ABS (Vector Laboratory, Birmingham, Cal.) ya descritas por Ray y col.<sup>30</sup> Usamos una fracción (2,5  $\mu$ g/ml) de inmunoglobulina G (IgG) purificada de anticuerpo policlonal de conejo que reconoce en forma específica al bFGF (gentileza de Andrew Baird, Prizm Pharmaceuticals, San Diego, Cal.).<sup>31</sup> Los controles incluyeron: reemplazo del anticuerpo primario con concentraciones equivalentes de IgG no específicas, uso del anticuerpo primario luego de haber sido incubado con concentraciones altas (20 veces mayores) de bFGF humano: omisión de anticuerpo primario que reconoce al bFGF.

#### *Cultivo celular*

Las células endoteliales y musculares lisas

microvasculares de riñón de ratas, y también las células mesangiales y epiteliales tubulares humanas, fueron aisladas de los respectivos tejidos renales, siguiendo métodos que fueron descritos en trabajos anteriores por Ray y col.<sup>32-34</sup> Todas las células fueron usadas entre el segundo y octavo pasaje de cultivo. La proliferación celular fue evaluada mediante la incorporación de 3H-timidina y el conteo celular se hizo como anteriormente describimos.<sup>30,32</sup> El bFGF recombinante humano (Biosouce, Camarillo, cal.) fue usado en concentraciones óptimas de acuerdo con los resultados de trabajos previos (20 ng/ml). Para bloquear los efectos de bFGF se usó un anticuerpo neutralizante anti-bFGF.<sup>30,31</sup>

#### *Contractilidad de las células musculares lisas vasculares renales*

Las células musculares lisas renales (RVSMC) fueron cultivadas sobre la superficie de un sustrato de "silicon rubber" el cual fue preparado siguiendo la técnica descrita por Kelly y col.<sup>35</sup> Las células fueron identificadas como contraídas por la aparición de arrugas en la superficie.

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias estadísticas entre las muestras fueron determinadas por la prueba t de Student. Los valores P menores de 0,05 fueron considerados significativos.

#### **Presencia de bFGF en pacientes con SUH**

Las muestras concentradas de orina provenientes de los pacientes con SUH y separadas con concentraciones de NaCl 1,5 M fueron las que más actividad mitogénica tuvieron en los diferentes cultivos de células renales. Estas muestras estimularon el crecimiento de las células renales endoteliales, mesangiales y epiteliales, sugiriendo que un miembro de la familia del FGF estaba involucrado. Estos efectos fueron neutralizados en forma específica usando un anticuerpo neutralizante para el bFGF. Los Western blots confirmaron la presencia de bFGF en estas muestras.

En los inmunoensayos, los niños con SUH tuvieron los niveles más altos de bFGF en orina, con niveles medios de 156.000 pg/g de creatinina urinaria, mientras que todos los valores de los niños de control estuvieron constantemente por debajo de 25.000 pg/g. En los niños con SUH se encontraron también niveles muy altos de bFGF en plasma (156  $\pm$  24 pg/ml) en comparación con el plasma de los niños control (12  $\pm$  4 pg/ml; P <0,001).

En los estudios de inmunohistoquímica con

anticuerpos específicos para el bFGF, encontramos que éste estaba significativamente aumentado en los riñones provenientes de los niños con SUH (registrado en fotografías).

- a) En los riñones controles, el bFGF fue detectado en las células musculares vasculares, en la cápsula de Bowman y en los vasos sanguíneos y un teñido mínimo fue hallado en el tejido renal intersticial.
- b) En los riñones de niños con SUH, el bFGF fue localizado en áreas similares pero, además, sus niveles estaban significativamente aumentados en los glomérulos y en el tejido renal extracelular que rodea a los túbulos renales dañados.

Como se esperaba, las células humanas mesangiales tratadas con bFGF proliferaron en mayores proporciones que las células de control, como lo comprobó la incorporación de timidina. Los resultados fueron: a) células de control:  $2.380 \pm 190$  cpm; células tratadas con bFGF:  $8.650 \pm 530$  cpm;  $P < 0,001$ ) y b) el recuento celular: células de control  $47.940 \pm 5.600$  células; células tratadas con bFGF:  $168.830 \pm 8.890$  células;  $P < 0,001$ .

El bFGF indujo cambios significativos en la contractilidad de las células musculares vasculares (RVSMc). Los cambios en la contractilidad de estas células renales se identifican por la aparición de arrugas en el sustrato (registrado en fotografías). La especificidad de este efecto fue demostrada bloqueando los efectos de bFGF con anticuerpos neutralizantes policlonales anti-bFGF en diluciones de 1/20.

### **Papel potencial del bFGF en la patogénesis del SUH**

El bFGF es una proteína catiónica de aproximadamente 18 kd, que pertenece a la familia de las citoquinas o de los factores de crecimiento, con alta afinidad por la heparina (heparin binding growth factors).<sup>36</sup> A diferencia de otras citoquinas, el bFGF no tiene la secuencia de péptidos necesaria para que sea secretado fuera de las células mediante vías convencionales de secreción celular. De cualquier forma, se sabe que los cambios de permeabilidad en la membrana celular relacionados con el daño celular pueden facilitar la secreción de bFGF hacia el compartimiento extracelular.

Desde el punto de vista fisiológico, el bFGF tiene una importante función biológica en el desarrollo fetal, en la neovascularización, en la curación de las heridas y en el crecimiento de las células neuronales, endoteliales y musculares lisas.<sup>36</sup> En el riñón humano fetal, el bFGF se encuentra loca-

lizado en las células endoteliales, en las membranas basales que rodean los túbulos, en el intersticio renal y en los vasos sanguíneos. Esas localizaciones sugieren que el bFGF tiene un importante papel durante el desarrollo de estas estructuras.<sup>31,37</sup>

Recientemente se ha reconocido que el bFGF tiene un papel relevante en la patogenia de ciertas enfermedades renales. Estudios experimentales con diferentes modelos animales han demostrado que niveles altos de bFGF inducen proteinuria, injuria podocítica, hiperplasia mesangial y glomerulosclerosis focal segmentaria.<sup>38-40</sup> Además, en enfermedades caracterizadas por proliferación epitelial anormal, como tumores renales<sup>41</sup> o de la vejiga,<sup>42</sup> se han encontrado altos niveles de bFGF en la orina y en el riñón, sugiriendo que el bFGF influye en el crecimiento tumoral.

Nosotros hemos encontrado niveles muy altos de bFGF con actividad biológica en el plasma, en la orina y en los tejidos renales de niños argentinos durante la etapa aguda del SUH. Algunas propiedades particulares del bFGF sugieren que éste puede ser un valioso marcador para monitorear la progresión del SUH.

Primero, porque es liberado por las células endoteliales lesionadas<sup>43</sup> y no es normalmente secretado en la circulación por lo que en niños normales las concentraciones de bFGF en el plasma y en la orina son bajas y estables.

Segundo, los niveles circulantes de bFGF durante el estadio inicial del SUH son aproximadamente 5 a 10 veces mayores que aquéllos encontrados en los pacientes de control.

Tercero, mediciones de niveles de otras citoquinas, como el TNF-alfa, son menos confiables porque tienen un rango muy amplio de distribución en la población.<sup>22-28</sup>

Cuarto, los niveles de bFGF en el plasma no varían significativamente durante los episodios agudos de diarreas, a menos que haya un proceso interno de sepsis y coagulación intravascular, una injuria grave de tejidos o un crecimiento tumoral.

Finalmente, a diferencia de otras citoquinas derivadas de los leucocitos, el bFGF tiene diferentes efectos en las paredes de los vasos sanguíneos y en los glomérulos renales, dependiendo ello de si estas células endoteliales han sido previamente lesionadas o no.<sup>38,39,44</sup> Estos hallazgos demuestran que el bFGF juega un papel específico durante la injuria vascular.

El bFGF se une a los proteoglicanos de heparán sulfato renales localizados en la superficie de las células renales o en las membranas basales o células del intersticio renal.<sup>45</sup> Hemos demostrado

previamente que el riñón es un importante lugar de depósito de bFGF, especialmente en los glomérulos renales y en los vasos rectos ascendentes.<sup>30</sup> Sin embargo, en algunas enfermedades renales, el bFGF también se encuentra ligado a receptores de baja afinidad en el intersticio renal,<sup>30</sup> donde puede inducir fibrosis. La matriz del tejido intersticial extracelular renal protege al bFGF de la degradación proteolítica y sirve como un reservorio, uniéndose al bFGF, cuando es liberado en altas concentraciones después de una injuria celular.<sup>45,46</sup> Algunas enzimas proteolíticas pueden liberar bFGF del tejido intersticial renal. La más caracterizada de todas estas enzimas es la plasmina, que induce la degradación de colágeno y libera complejos biológicamente activos de bFGF-HSPG.<sup>45</sup> Estos estudios sugieren que hay un ajustado balance entre las enzimas proteolíticas –que son activadas en el SUH– y la actividad del bFGF y viceversa.

Actualmente se pueden deducir varios mecanismos para explicar cómo el bFGF influye en la patogenia del SUH. Puede desencadenar cambios en la cascada de la coagulación estimulando la síntesis de plasminógeno o del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Altos niveles de PAI-1 se han encontrado en la circulación<sup>47,48</sup> y en los glomérulos renales<sup>49</sup> en niños con SUH. En estas localizaciones, el PAI-1 favorece la acumulación de fibrina en los capilares glomerulares. Así, el bFGF puede modular los mecanismos fibrinolíticos glomerulares que tienen un papel crucial en el SUH. El bFGF también puede estimular el crecimiento de las células glomerulares mesangiales. Caletti y col. han demostrado que las lesiones patológicas más comunes que se encuentran en los estadios crónicos del SUH son: la glomerulonefritis mesangial proliferativa y la glomerulosclerosis focal segmentaria. Ellos especularon que estas lesiones pueden ser dos diferentes etapas de un mismo proceso dinámico: hiperplasia mesangial que posteriormente lleva a la glomerulosclerosis. Como las células mesangiales expresan Gb3,<sup>50</sup> ellas también pueden ser un blanco directo de las Stxs. Estas células glomerulares mesangiales son activadas y también liberan bFGF.<sup>38</sup> La expresión de la alfa-actina del músculo liso (smooth muscle alfa-actin) es considerada un marcador del fenotipo de las células mesangiales activadas<sup>51</sup> y el bFGF induce la expresión de dicho marcador en los miocitos cardíacos.<sup>52</sup> Es probable que el bFGF tenga un efecto similar en las células glomerulares mesangiales. Además, el bFGF estimula la proliferación de células mesangiales confluentes e incrementa la

contractilidad de las células musculares microvasculares renales. La habilidad del bFGF para estimular la proliferación de células mesangiales cultivadas en altas concentraciones (“confluentes”) es una propiedad biológica importante del bFGF. Es probable que estas condiciones de cultivo reflejen el estado de las células glomerulares mesangiales en el glomérulo renal (in vivo).

Otras citoquinas como el TNF-alfa, IL-6, endotelina o angiotensina II tienen efectos proliferativos mucho más modestos que el bFGF en experimentos realizados en células mesangiales “confluentes”.<sup>32</sup> Nuestros hallazgos también sugieren que el bFGF puede inducir cambios en la microcirculación renal durante los estadios agudos del SUH. Sin embargo, los hallazgos de la contractilidad vascular in vitro deben ser interpretados con precaución porque cuando el bFGF es inyectado en ratas, éste reduce la presión sanguínea<sup>52</sup> e induce vasodilatación coronaria.<sup>53</sup> Más estudios son necesarios para determinar el papel fisiológico del bFGF en la microcirculación renal. No obstante, cuando todos estos estudios son considerados en el contexto de la patogénesis del SUH, ellos sugieren que el bFGF puede tener un papel muy relevante en este síndrome.

El bFGF se acumula alrededor de los túbulos dañados. Cultivos de células tubulares epiteliales renales (RTEc) expresan receptores Stxs y es posible que ellas sean muy sensibles a los efectos citotóxicos de las Stxs.<sup>19</sup> Por ello, es tentador especular que las RTEc pueden ser uno de los blancos primarios de las Stxs y que la inducción de injuria tubular renal por las Stxs puede jugar un papel más relevante en el SUH que lo que previamente se había considerado.<sup>19</sup> A favor de esta hipótesis, Lindgren y col.<sup>55</sup> encontraron que después de una ingestión oral de Stxs, ratones que expresaban un número abundante de receptores para las Stxs en las células tubulares renales pero no en los glomérulos renales desarrollaban daños tubulares importantes que llevaron a la progresión de la insuficiencia renal sin cambios microangiopáticos.

Es probable que algunos niños expuestos a Stxs desarrollen formas incompletas de SUH con injuria tubular renal pero sin evidencias clínicas de anemia hemolítica microangiopática. Ray y col. hemos demostrado que el bFGF liberado de las membranas basales tubulares renales dañadas<sup>30</sup> está involucrado en la regeneración tubular renal. De cualquier forma, una excesiva acumulación de bFGF puede llevar a la fibrosis intersticial renal.<sup>56,57</sup>

Finalmente, la acumulación de bFGF en el riñón

no es una propiedad exclusiva de la patogenia del SUH. Otros trabajos científicos han demostrado que el daño endotelial renal cumple un factor patogénico preponderante en otras enfermedades renales como la progresión de la insuficiencia renal,<sup>58</sup> el rechazo de los trasplantes renales,<sup>59</sup> la nefropatía diabética<sup>60</sup> y la nefropatía asociada al virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV 1).<sup>30</sup> Sin embargo, la liberación rápida de grandes cantidades de bFGF en la circulación en un niño previamente sano es un hecho específico del SUH. Es posible que aprendiendo más acerca del papel que el bFGF tiene en estas circunstancias, podamos adquirir mejor conocimiento acerca del papel del bFGF en la patogenia de otras enfermedades pediátricas.

Un estudio reciente ha demostrado que cierta proteína liberada por células tumorales tiene la propiedad de unirse al bFGF y de modificar su actividad biológica. Esta proteína –que se llama “FGF binding protein”– podría constituir la base de nuevos tratamientos por los cuales se podría modular la actividad biológica del bFGF en el riñón.<sup>61</sup> Además, como el bFGF es una citoquina con alta afinidad biológica por la heparina –uno de los primeros tratamientos experimentados en niños con SUH– es posible que se puedan generar péptidos similares a la heparina que puedan bloquear la actividad del bFGF sin producir efectos anticoagulantes.

## RESUMEN

Hemos encontrado altos niveles de bFGF en la orina, en el plasma, en los glomérulos y en los tejidos medulares intersticiales renales en niños argentinos que cursaban la etapa aguda del SUH. Es posible que algunos cambios patológicos renales y algunos síntomas clínicos en los niños afectados por el SUH puedan ser parcialmente mediados por la persistente actividad del bFGF acumulado en el tejido renal. Este hallazgo puede tener importancia desde el punto de vista clínico, pues nuevas drogas con actividad neutralizante del bFGF podrían tener efectos terapéuticos para prevenir la progresión de la enfermedad renal. De cualquier forma, por el momento se necesitan más estudios de investigación para definir el papel específico del bFGF durante los estadios agudo y crónico del SUH y para demostrar si el bFGF puede ser usado como marcador para predecir la evolución clínica del SUH o la progresión de este síndrome.

## Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el National Institute

of Health (Grants RO-1 DK 49419 y RO-1 HL 55605); por fondos del Children's Research Institute, Washington, D.C., EE.UU. y por la Fundación Argentina para el Desarrollo Infantil, Buenos Aires, Argentina. ■

## BIBLIOGRAFIA

- Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebenmann RE, Oechslin R. Hämolytisch-urämische Syndrome: bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hämolytischen Anämien. *Schweiz Med Wochenschr* 1955; 38-39: 905-909.
- Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Ruddy A, Mendilaharsu J. The hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 1964; 64: 478-491.
- Habib R, Leclerc F, Mathieu H, Royer P. Comparison clinique et anatomopathologique entre les formes mortelles et curable du syndrome hemolytique et uremique. *Arch Fr Pediatr* 1996; 26: 417-432.
- Frishberg Y, Obrig TG, Kaplan BS. Hemolytic uremic syndrome, p. 871-889. In: Holliday MA, Barrat TM, Avner E (ed), *Pediatric Nephrology*, 3<sup>rd</sup> ed. Baltimore MD: The Williams & Wilkins Co., 1985.
- Drummond KN. Hemolytic uremic syndrome. Then and now. *N Engl J Med* 1985; 312: 116-118.
- Kaplan BS, Chesney RW, Drummond KN. Hemolytic uremic syndrome in families. *N Engl J Med* 1975; 22: 1090-1093.
- Piel CF, Phibbs RH. The hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Clin North Am* 1966; 13: 295-314.
- Remuzi G, Misiani R, Marchesi D, Meca G, Livo M, Gaetano G, Donati MB. Haemolytic-uremic syndrome deficiency of plasma factors(s) regulating prostacyclin activity. *Lancet* 1978; ii: 871-872.
- Katz J, Krawitz S, Sacks PV, Levin SE, Thompson P, Levin J, Metz J. Platelet, erythrocyte and fibrinogen kinetics in the hemolytic-uremic syndrome of infancy. *J Pediatr* 1973; 83: 739-748.
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic-uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1983; 151: 619-620.
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of HUS associated with fecal cytotoxin and cytotoxin producing *E. coli* in stools. *Lancet* 1983; i: 619-620.
- Boyce TG, Swedlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157: H7 and the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1995; 10: 364-367.
- Lingwood CA. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol* 1996; 4: 147-153.
- Siegel RL. Hemolytic uremic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr* 1995; 7: 159-163.
- O'Brien AD, Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* 1987; 51: 206-220.
- Boyd B, Lingwood CA. Verotoxin glycolipid receptors in renal tissues. *Nephron* 1989; 51: 207-212.
- Lingwood CA. Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron* 1994; 66: 21-28.
- Obrig TG, Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Barley-Malones L, Daniel TO. Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem* 1993; 268: 15484-15488.
- Takeda T, Dohi S, Igarashi T, Yamanaka T, Yoshiya K, Kobayashi N. Impairment by Verotoxin of tubular function contributes to the renal damage seen in haemolytic uraemic syndrome. *J Infect Dis* 1993; 27: 339-341.

20. Pallesen G, Zeuthen J. Distribution of the Burkitt's lymphoma-associated antigen (BLA) in normal human tissue and malignant lymphoma as defined by immunohistological staining with monoclonal antibody 38.13. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987; 113: 78.
21. Boyd B, Tyreel G, Maloney M, Gyles C, Bruton J, Lingwood CA. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin 1-like disease in pigs. *J Exp Med* 1993; 177: 1745-1753.
22. López EL, Contrini MM, Devoto S, De Rosa MF, Grana MG, Genero MH, Canepa C, Gómez HF, Cleary TG. Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 594-598.
23. López EL, Contrini MM, Devoto S, De Rosa MF, Grana MG, Aversa L, Gómez HF, Genero MH, Cleary TC. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr* 1995; 127: 364-367.
24. Newburg DS, Chaturvedi P, López EL, Devoto S, Fayad A, Cleary TG. Susceptibility to hemolytic uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns. *J Infect Dis* 1993; 168: 476-479.
25. Van de Kar NCAJ, Monnens LAH, Karmali MA, van Hinsbergh VW. TNF and IL-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of HUS. *Blood* 1992; 80: 2755-2764.
26. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin on human vascular endothelial cells. *Infect Immun* 1991; 59: 4173-4179.
27. Harel Y, Silva M, Giroir B, Weinberg A, Cleary TB, Beutler BA. A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by Shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest* 1993; 92: 2110-2116.
28. Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C. Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* 1995; 6: 694-699.
29. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barrat TM. Interleukin-8 polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int* 1992; 42: 951-956.
30. Ray PE, Bruggeman LA, Weeks BS, Koop JB, Bryant JL, Owens JW, Notkins AL, Klotman PE. bFGF and its low affinity receptors in the pathogenesis of HIV-associated nephropathy in transgenic mice. *Kidney Int* 1994; 46: 759-772.
31. González AM, Hill DJ, Logan A, Maher PA, Baird A. Distribution of fibroblast growth factor (FGF-2) and FGF receptor-1 messenger RNA expression and protein presence in the mid-trimester human fetus. *Pediatr Res* 1996; 39: 375-385.
32. Ray PE, Aguilera G, Koop JB, Horikoshi S, Klotman PE. Angiotensin II receptor mediated proliferation of human fetal mesangial cells. *Kidney Int* 1991; 40: 764-771.
33. Ray PE, McCune B, Geary KM, Carey RM, Klotman PE, Gómez RA. Modulation of renin release and renal vascular smooth muscle contractility by TGF- $\beta$ 2. *Contrib Nephrol* 1996; 118: 238-248.
34. Wilson PD. Monolayer of microdissected renal tubule epithelial segments. *J. Tissue Cult Methods* 1991; 13: 137-141.
35. Kelly C, D'Amore P, Hechtman HB, Shepro D. Vasoactive hormones and cAMP effect pericyte contraction and stress fibers in vitro. *J Muscle Res* 1992; 71: 1142-1152.
36. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987; 8: 95-114.
37. Risau W, Eklon P. Production of an heparin-binding angiogenesis factor by the embryonic kidney. *J Cell Biol* 1986; 103: 1101-1107.
38. Floge J, Eng E, Young BA, Alpers CE, Barret TB, Bowen-Pope DF, Johnson RJ. Infusion of platelet-derived growth factor or basic fibroblast growth factor induces selective glomerular mesangial cell proliferation and matrix accumulation in rats. *J Clin Invest* 1993; 92: 2952-2962.
39. Floge J, Kriz W, Schulze M, Susani M, Kerjaschki D, Mooney A, Couser WG, Koch KM. Basic fibroblast growth factor augments podocyte injury and induces glomerulosclerosis in rats with experimental membranous nephropathy. *J Clin Invest* 1995; 96: 2809-2819.
40. Kirtz W, Hahnel B, Rosener S, Elger M. Long term treatment of rats with FGF-2 results in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 1995; 48: 1435-1450.
41. Fujimoto K, Ichimori Y, Kakizoe T, Okajima E, Sakamoto H, Sugimura T, Terada M. Increased serum levels of basic fibroblast growth factor in patients with renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 189: 386-392.
42. Nguyen M, Hiroyuki W, Budson AE, Richie JP, Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 241-242.
43. Ku P-T, D'Amore PA. Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene and protein expression following its release from sublethally injured endothelial cells. *J Cell Biochem* 1995; 58: 328-343.
44. Linder V, Olson NE, Clowes AW, Reidy MA. Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries. Interaction of heparin with basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest* 1992; 90: 2044-2049.
45. Klasgsbrun M, Baird A. A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity. *Cell* 1991; 67: 229-231.
46. Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O, Rifkin D. Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis. *J Cell Physiol* 1989; 140: 75-81.
47. Bergstein JM, Riley M, Bang NI. Role of plasminogen-activator type 1 in the pathogenesis and outcome of the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327: 755-759.
48. Caletti MG, Gallo GE, Gianantonio CA. Development of focal segmental sclerosis and hyalinosis in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1996; 10: 687-692.
49. Xu Y, Hagege J, Mougnot B, Sraer J-D, Rome E, Rondeau E. Different expression of the plasminogen activation system in renal thrombotic microangiopathy and the normal human. *Kidney Int* 1996; 50: 2011-2019.
50. Robinson LA, Hurley RM, Lingwood CA, Matsell DG. *Escherichia coli* verotoxin binding in human pediatric glomerular mesangial cells. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 700-704.
51. Johnson RJ, Iida H, Alpers AE, Majesky MW, Schartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown A. Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis: a smooth muscle actin is a marker of mesangial cells proliferation. *J Clin Invest* 1991; 87: 847-858.
52. Black FM, Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, Schneider MD. The vascular smooth muscle  $\alpha$  actin is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J Clin Invest* 1991; 88: 1581-1588.
53. Cuevas P, Carceller F, Ortega S, Zazo M, Nieto I, Gimenez-

- Gallego G. Hypotensive activity of fibroblast growth factor. *Science* 1991; 254: 1208-1210.
54. Sellke FW, Wang SY, Friedman M, Harada K, Edelman ER, Grossman W, Simons M. Basic FGF enhances endothelium-dependent relaxation of the collateral-perfused coronary microcirculation. *Am J Physiol*. 1991; 276: H1208-H1210.
55. Lindgren SW, Melton AR, O'Brien AD. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21. Clinical issues in an orally infected mouse model. *Infect Immun* 1993; 9: 3832-3842.
56. Morita H, Shinzato T, David G, Mizutani A, Habuchi H, Fujita Y, Ito M, Asai J, Maeda K, Kimata K. Basic fibroblast growth factor-binding domain of heparan sulfate in human glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Lab Invest* 1994; 71: 528-535.
57. Ray PE, Liu X-H, Izevbigie EB. Basic fibroblast growth factor (bFGF) modulates renal-epithelial mesenchymal interactions. *Pediatr Res* 1997; 41: 283A.
58. Lee LK, Meyer WT, Pollock A, Lovett DH. Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J Clin Invest* 1995; 96: 953-964.
59. Fellstron BC, Larsson E. Pathogenesis and treatment perspectives of chronic graft rejection (CVR). *Immunol Rev* 1993; 134: 83-97 .
60. Zimering MB, Eng J. Increased basic fibroblast growth factor-like substances in plasma from a subset of middle-aged or elderly male diabetic patients with microalbuminuria or proteinuria. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4446-4452.
61. Czubyko F, Liaudet-Coopman EDE, Aigner A, Tuveson AT, Berchen GJ, Wellstein A. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat Med* 1997; 10: 1137-1140.

*El adelanto de la investigación científica es uno de los problemas de mayor importancia para todo país civilizado. El ayudarla es un deber social ineludible de todos los ciudadanos. El no cuidar y ayudar a los hombres de ciencia más capaces de un país es una negligencia culpable, y el quitarles la posibilidad de trabajar es una forma de suicidio nacional o de automutilación.*

Bernardo A. Houssay  
*Ciencia e Investigación* 1947; 3: 265.