

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Heloisa Reniers Vianna

**Avaliação dos Níveis Urinários de Citocinas e
Quimiocinas em Crianças e Adolescentes
Portadores de Doença Renal Crônica**

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2011

Heloisa Reniers Vianna

**Avaliação dos Níveis Urinários de Citocinas e
Quimiocinas em Crianças e Adolescentes
Portadores de Doença Renal Crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Simões e Silva.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2011

Vianna, Heloisa Reniers.
V617a Avaliação dos níveis urinários de citocinas e quimiocinas em crianças e adolescentes portadores de doença renal crônica [manuscrito]. / Heloisa Reniers Vianna. - - Belo Horizonte: 2011.
??f.: il.
Orientadora: Ana Cristina Simões e Silva.
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Insuficiência Renal Crônica. 2. Citocinas. 3. Mediadores da Inflamação. 4. Inflamação. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WS 320



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpp@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de HELOISA RENIERS VIANNA nº de registro 2009654611. Às nove horas, do dia **vinte e quatro de março de dois mil e onze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS URINÁRIOS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES PORTADORES DE DOENÇA RENAL CRÔNICA", requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Ana Cristina Simões e Silva, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Ana Cristina Simões e Silva / Orientador

Instituição: UFMG

Indicação: APROVADA

Dra. Cristina Maria Bouisson Morais Soares

Instituição: UFMG

Indicação: APROVADA

Prof. Sérgio Veloso Brant Pinheiro

Instituição: UFMG

Indicação: APROVADA

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de março de 2011.

Profa. Ana Cristina Simões e Silva / Orientador

Dra. Cristina Maria Bouisson Morais Soares

Prof. Sergio Veloso Brant Pinheiro

Profa. Ana Cristina Simões e Silva / Coordenadora

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Profa. Ana Cristina Simões e Silva
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Saúde da Criança e do Adolescente
Faculdade de Medicina/UFMG

Resumo

A Doença Renal Crônica (DRC) é um grave problema de saúde pública cuja prevalência tem aumentado nos últimos anos. Apresenta caráter progressivo e está associada à elevada morbidade e mortalidade. Inúmeros fatores estão associados à instalação e progressão da DRC, tais como obesidade, hipertensão arterial e *diabetes mellitus*. Além desses fatores, existem evidências de inflamação na fisiopatologia da DRC. Diversas citocinas e quimiocinas têm sido detectadas no plasma e urina de pacientes em estágios precoces da DRC e também relacionadas às complicações da doença. A expressão desses mediadores e a lesão renal sofrem interferência de fármacos como inibidores de enzima conversora de angiotensina, estatinas e antagonistas de receptores de citocinas. A modulação da resposta imuno-inflamatória pode se tornar alvo para tratamento da DRC. O objetivo dessa dissertação foi estudar de forma pormenorizada o perfil inflamatório da doença renal crônica na população pediátrica, portadora de DRC, assistida em um serviço terciário de Belo Horizonte bem como realizar revisão sistemática e resumir as evidências científicas do papel da inflamação na DRC, destacando-se os efeitos de citocinas e quimiocinas.

Palavras-chave: citocinas; quimiocinas; inflamação; doença renal crônica.

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is a serious public health problem whose prevalence has increased in the last few years. Its progression is associated with high morbidity and mortality. Several factors are associated with the onset and progression of CKD, such as obesity, hypertension and *diabetes mellitus*. Beyond these factors, there is evidence of inflammation in the pathophysiology of CKD. Several cytokines and chemokines have been detected in plasma and urine of patients at early stages of CKD as well as were related to CKD complications. The expression of these mediators and renal injury may be influenced by drugs such as angiotensin converting enzyme inhibitors, statins and antagonists of cytokine receptors. The modulation of immune-inflammatory response can become a target for the treatment of CKD. The aim of this dissertation was to conduct a detailed study of the inflammatory profile of chronic kidney disease in the pediatric population with this condition, treated at a tertiary service in Belo Horizonte, as well as to perform a systematic review and summarize the scientific evidence of the role of inflammation in CKD, highlighting the effects of cytokines and chemokines.

Key words: cytokines; chemokines; inflammation; chronic kidney disease.

Aos meus pacientes e todos os outros pacientes da nefrologia. Crianças, adolescentes e adultos companheiros nesta caminhada e razão de tudo...

Ao amigo Fernando que me faz tanta falta.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus pela vida, força e proteção de sempre.

Aos meus pais, Célio e Zenília, sempre incentivadores, amorosos e prestativos. Obrigada pela confiança e compreensão por tanta ausência.

À Professora Ana Cristina Simões e Silva, pela sua dedicação e brilhantismo acadêmico. Modelo a ser seguido e não apenas admirado. Obrigada pela segunda oportunidade, confiança e paciência.

À minha querida família. Alexandre, Raquel, Renata, Clara, Otávio, Adilson e Ivânia, obrigada pelo amor sincero e apoio.

À Vó Maria, aos tios Paulo Viana, Rui e Paulo da Luz e aos demais tios e primos pela torcida e admiração.

A Kátia Daniela da Silveira, Gustavo Siqueira Elmiro e Philipe Melgaço Mendes pela ajuda na realização do trabalho.

Ao Professor Marcelo de Sousa Tavares pela inestimável ajuda para a conclusão das análises estatísticas.

Ao Dr Eduardo Roberto da Silveira, exemplo de vida e de sacerdócio na medicina, e ao Dr Roberto Eduardo Salum, grande mestre na nefrologia, obrigada pela confiança, amizade e torcida de sempre.

Ao Dr Geraldo Darcy dos Santos, exemplo de educação e humanidade e que tanto acreditou na ideia deste mestrado.

Ao Dr Euler Pace Lasmar, pelos ensinamentos diários e pelo incentivo para a pesquisa.

Às minhas amigas, “fofas e queridas”, companheiras de todas as horas, obrigada pelo incentivo e por fazerem minha vida mais feliz.

Ao Lincoln, pela amizade verdadeira e incondicional.

Aos residentes de Nefrologia, à Andréia Torres e demais colegas de trabalho do Hospital Universitário São José, aos colegas da CLINEMGE e MG Transplantes por entenderem os períodos de ausência e ajudarem na conclusão desta dissertação.

Aos professores, médicas, profissionais do programa interdisciplinar e funcionários do Ambulatório de Doença Renal Crônica da UFMG pelo inestimável cuidado com as crianças e adolescentes portadores de Doença Renal Crônica e de seus familiares. À Dr^a. Cristina Maria Bouisson Morais Soares, coordenadora do ambulatório, pela disponibilidade em tudo que precisei nestes dois anos.

Aos mestres e amigos do Departamento de Farmacologia e Laboratório de Hipertensão Arterial, ICB/UFMG, onde tudo começou.

NOTA EXPLICATIVA

A apresentação da presente dissertação foi organizada sob a forma de artigos científicos, de acordo com a resolução 03/2010 aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Área de Concentração em Saúde da Criança e do Adolescente, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, disponível em http://www.medicina.ufmg.br/cpg/programas/saude_crianca/arquivos/Resolucao03-2010.pdf.

O primeiro artigo consiste em uma revisão da literatura sobre o papel da inflamação, mediada por citocinas e quimiocinas, no estabelecimento e progressão da Doença Renal Crônica (DRC). O segundo artigo avalia os níveis urinários da proteína quimiotática para monócitos do tipo 1 (MCP-1/CCL2), interleucina 8 (IL-8/CXCL8) e do fator de crescimento e transformação do tipo beta1 (TGF- β 1) em crianças e adolescentes com DRC, em acompanhamento na Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

As referências bibliográficas estão dispostas ao final de cada artigo ou seção, conforme as normas de Vancouver (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication - www.ICMJE.org).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DCV – doença cardiovascular

DM – *diabetes mellitus*

DRC – doença renal crônica

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

HAS – hipertensão arterial sistêmica

IL – interleucina

IL-8/CXCL8 - interleucina-8

IMC – índice de massa corpórea

ITU – infecção do trato urinário

MBG – membrana basal glomerular

MCP-1/CCL2 - proteína de quimiotaxia de monócitos-1

NF- κ B - fator nuclear de transcrição

NKF/DOQI – National Kidney Foundation's Disease Outcomes Quality Initiative

pmpi – por milhão de população infantil

PTH – paratormônio

RFG – ritmo de filtração glomerular

RVU – refluxo vesico-ureteral

SRA - sistema renina angiotensina

TGF- β 1 - fator de transformação do crescimento- β 1

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

<u>1.</u>	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>12</u>
1.1.	REFERÊNCIAS.....	15
<u>2.</u>	<u>REVISÃO DA LITERATURA – ARTIGO DE REVISÃO</u>	<u>18</u>
2.1.	REFERÊNCIAS.....	37
<u>3.</u>	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>49</u>
3.1.	OBJETIVO PRINCIPAL	49
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
<u>4.</u>	<u>PACIENTES E MÉTODOS.....</u>	<u>50</u>
4.1.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	50
4.2.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	51
4.3.	ASPECTOS ÉTICOS	51
4.4.	PROTOCOLO DO ESTUDO.....	51
4.5.	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	52
4.6.	ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS	53
4.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.8.	REFERÊNCIAS.....	55
<u>5.</u>	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO ORIGINAL</u>	<u>56</u>
5.1.	REFERENCES.....	72
<u>6.</u>	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>83</u>
6.1.	REFERÊNCIAS.....	88
<u>7.</u>	<u>ANEXOS.....</u>	<u>92</u>
7.1.	ANEXO I – PARECER DO COEP	92
7.2.	ANEXO II – TERMOS DE CONSENTIMENTO	93

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é atualmente definida pela presença de lesão renal, por período superior a três meses, caracterizada por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem alterações do ritmo de filtração glomerular (RFG) ou por um RFG inferior a $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, também em período superior a três meses, independente de lesão renal (1). A lesão renal é definida como anormalidade funcional ou estrutural do rim, sendo diagnosticado a partir de alterações na composição do sangue ou da urina ou nos exames de imagem. A DRC é uma síndrome clínica decorrente da lesão renal progressiva e inexorável, de etiologia diversificada e classificada em estágios 1 a 5, de acordo com a gravidade da queda da função renal, correspondendo o estágio 5 à falência renal (1).

A DRC tem aumentado, de forma epidêmica, sobretudo em função do aumento global na prevalência das principais causas de DRC como hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* (DM) e obesidade (2-4). Associado a isso, o número de pacientes com DRC terminal, que necessita terapia dialítica ou transplante renal, também tem aumentado significativamente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (4). O evidente aumento da incidência e prevalência da DRC é mais importante nos adultos devido à estreita relação entre a DRC e as co-morbidades crônico-degenerativas, como o DM e HAS, comuns nesta população (4). No entanto, o aumento também é percebido na população pediátrica (5). O número absoluto de crianças e adolescentes, portadores de DRC, é muito inferior ao número total de doentes renais; apesar disso, constitui um grupo de relevante enfoque pelo significativo impacto sobre o crescimento e o desenvolvimento, além das outras complicações inerentes à doença renal (5). Os dados sobre a DRC na

faixa etária pediátrica são escassos e limitados pela influência da sub-notificação. Estudos internacionais permitem supor que a incidência anual de DRC terminal (estágio 5) nas crianças esteja entre cinco e 15 pacientes por milhão de população infantil (pmpi) e a sua prevalência entre 22 e 62 pmpi (6-8). De maneira geral, na população adulta, estudos sugerem que a prevalência de pacientes com DRC em estágios precoces (1 a 4) seja 50 vezes maior do que a prevalência da DRC terminal (9).

As taxas de DRC terminal elevam-se com a idade tanto na população adulta quanto na pediátrica (8, 10). Na infância, a DRC apresenta diferentes etiologias que apresentam incidências e prevalências variáveis, entre os países, sugerindo diferenças ambientais, comportamentais e genéticas (8, 11-12). As causas da DRC em crianças e adolescentes diferem daquelas detectadas nos adultos. As causas congênitas de malformações do trato urinário responsabilizam-se por elevado percentual dos casos de DRC na infância seguidas pelas doenças glomerulares. Os dados de nossa Unidade de Nefrologia Pediátrica (13-14) mostram consistência com os relatos de literatura, nos quais predominam as uropatias e as glomerulopatias como principais causas de DRC nesta população (15-16).

A DRC usualmente progride, de forma persistente e inexorável, quando a lesão renal já se estabeleceu. A progressão da lesão mantém-se mesmo quando a doença inicial permanece inativa (17). Os mecanismos de lesão renal progressiva incluem a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA), ação de fatores hemodinâmicos (hipertensão, hiperfiltração e consequente sobrecarga glomerular), proteinúria, perda de podócitos, dislipidemia, fatores predisponentes genéticos ou relacionados ao baixo número de néfrons e a ação de mediadores imuno-inflamatório tais como citocinas e quimiocinas (18). As citocinas são proteínas de baixo peso molecular secretadas pelos leucócitos e outros tipos celulares que atuam como mensageiros do sistema imune. As interleucinas

(IL) são citocinas que agem em outros leucócitos e as quimiocinas são citocinas que exercem fundamentalmente a função de quimiotaxia para leucócitos e células inflamatórias (19). A movimentação é propriedade fundamental das células imunes e as quimiocinas são importantes facilitadoras desse processo (20).

Diversos autores relataram relação entre a DRC e inflamação (21-23). Mecanismos variados de inflamação e fibrose, ativados após a injúria renal inicial, parecem ser os principais responsáveis pela lesão renal progressiva (24-27). A via final comum da DRC é caracterizada pela progressiva fibrose intersticial, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda de funcionamento dos néfrons por esclerose glomerular e atrofia tubular (28). Nesse processo fisiopatológico de progressão da lesão renal tem sido, cada vez mais, detectada a participação dos mecanismos inflamatórios (21). As evidências apontam para a ativação do sistema imune tanto em estágios iniciais quanto em estágios tardios da DRC (23, 29-30). Existem evidências da participação de citocinas e quimiocinas no estabelecimento e na progressão da lesão renal, independente de sua origem (31-38).

O papel da resposta imune-inflamatória, apesar de fortemente sugerido, ainda não é totalmente conhecido na população portadora de DRC, principalmente, no que concerne à população pediátrica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar, em crianças e adolescentes portadores de DRC, os níveis urinários da proteína quimiotóxica para monócitos do tipo 1 (MCP-1/CCL2), da interleucina-8 (IL-8/CXCL8) e do fator de transformação de crescimento do tipo beta (TGF- β), mediadores inflamatórios com potencial envolvimento na instalação e evolução da doença renal (35, 39-42).

1.1. REFERÊNCIAS

1. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1416-21.
2. Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2010 Nov;268(5):456-67.
3. Hunley TE, Ma LJ, Kon V. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 May;19(3):227-34.
4. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*. 2005 Jan 22-28;365(9456):331-40.
5. Furth SL, Cole SR, Moxey-Mims M, Kaskel F, Mak R, Schwartz G, et al. Design and methods of the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) prospective cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006 Sep;1(5):1006-15.
6. Gusmano R, Perfumo F. Worldwide demographic aspects of chronic renal failure in children. *Kidney Int Suppl*. 1993 Jun;41:S31-5.
7. El-Reshaid K, Kapoor MM, Nampoory MR, El-Reshaid W, Johny KV. Pediatric dialysis and renal transplantation in Kuwait over the past 11 years. *Pediatr Nephrol*. 1999 Apr;13(3):259-64.
8. Areses Trapote R, Sanahuja Ibanez MJ, Navarro M. [Epidemiology of chronic kidney disease in Spanish pediatric population. REPIR II Project]. *Nefrologia*. 2010;30(5):508-17.
9. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis*. 2003 Jan;41(1):1-12.
10. Lash JP, Go AS, Appel LJ, He J, Ojo A, Rahman M, et al. Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study: baseline characteristics and associations with kidney function. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Aug;4(8):1302-11.
11. Deleau J, Andre JL, Briancon S, Musse JP. Chronic renal failure in children: an epidemiological survey in Lorraine (France) 1975-1990. *Pediatr Nephrol*. 1994 Aug;8(4):472-6.
12. Zilleruelo G, Andia J, Gorman HM, Strauss J. Chronic renal failure in children: analysis of main causes and deterioration rate in 81 children. *Int J Pediatr Nephrol*. 1980 Mar;1(1):30-3.
13. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Silva JM, Oliveira GR, Canhestro MR, et al. Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):2039-46.

14. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):848-55.
15. Chevalier RL, Peters CA. Congenital urinary tract obstruction: Proceedings of the State-Of-The-Art Strategic Planning Workshop-National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 11-12 March 2002. *Pediatr Nephrol*. 2003 Jun;18(6):576-606.
16. Fivush BA, Jabs K, Neu AM, Sullivan EK, Feld L, Kohaut E, et al. Chronic renal insufficiency in children and adolescents: the 1996 annual report of NAPRTCS. North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study. *Pediatr Nephrol*. 1998 May;12(4):328-37.
17. el Nahas AM, Coles GA. Progressive renal failure. *J R Coll Physicians Lond*. 1997 Jan-Feb;31(1):27-31.
18. Warady BA, Chadha V. Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol*. 2007 Dec;22(12):1999-2009.
19. Abbas AK LA. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science. 2003;5th Edition 243-74.
20. Segerer S. The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis*. 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S15-8.
21. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001 May;10(3):321-9.
22. Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol*. 2005 Jun;20(6):714-20.
23. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2004 Mar;65(3):1009-16.
24. Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2010 Apr;25(4):711-24.
25. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int*. 2006 Dec;70(11):1914-9.
26. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):213-7.
27. Fogo AB. Mechanisms of progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2007 Dec;22(12):2011-22.
28. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005 Oct;12(4):353-65.
29. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia-the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*. 2005 Apr;67(4):1216-33.

30. Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, Shimizu A, Shike T, Ishiguro C, et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):1-4.
31. Tipping PG, Holdsworth SR. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol.* 2007 May;27(3):275-85.
32. Araya CE, Wasserfall CH, Brusko TM, Mu W, Segal MS, Johnson RJ, et al. A case of unfulfilled expectations. Cytokines in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2006 May;21(5):603-10.
33. Lama G, Luongo I, Tirino G, Borriello A, Carangio C, Salsano ME. T-lymphocyte populations and cytokines in childhood nephrotic syndrome. *Am J Kidney Dis.* 2002 May;39(5):958-65.
34. 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 Aug;46(2):455-60.
35. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res.* 2008 Dec;64(6):637-42.
36. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2010 Apr;25(4):687-97.
37. Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ, Herrera-Acosta J. Tubulointerstitial damage and progression of renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2005 Dec(99):S82-6.
38. Stephan M, Conrad S, Eggert T, Heuer R, Fernandez S, Huland H. Urinary concentration and tissue messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 as an indicator of the degree of hydronephrotic atrophy in partial ureteral obstruction. *J Urol.* 2002 Mar;167(3):1497-502.
39. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, et al. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2231-42.
40. Border WA, Noble NA. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1388-96.
41. Grenda R, Wuhl E, Litwin M, Janas R, Sladowska J, Arbeiter K, et al. Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- beta1 (TGF- beta1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Dec;22(12):3487-94.
42. Cho MH, Lee HS, Choe BH, Kwon SH, Chung KY, Koo JH, et al. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol.* 2003 Jul-Aug;23(4):260-6.

2. REVISÃO DA LITERATURA – ARTIGO DE REVISÃO

Artigo de Revisão

Inflamação na Doença Renal Crônica: Papel de citocinas e quimicinas

Heloisa R Vianna¹; Marcelo S Tavares¹; Mauro M Teixeira² e Ana Cristina Simões e Silva¹.

¹Unidade de Nefrologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Palavras-chave: citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatórios, inflamação, doença renal crônica.

Declaramos ausência de conflitos de interesse.

Correspondência:

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD

Avenida Bernardo Monteiro 1300 / 1104

Belo Horizonte - Minas Gerais

Postal Code: 30150-281

E - mail: acssilva@hotmail.com

Resumo

A Doença Renal Crônica (DRC) é um grave problema de saúde pública cuja prevalência tem aumentado nos últimos anos. Apresenta caráter progressivo e está associada à elevada morbidade e mortalidade. Inúmeros fatores estão associados à instalação e progressão da DRC, tais como obesidade, hipertensão arterial e *diabetes mellitus*. Além desses fatores, existem evidências de inflamação na fisiopatologia da DRC. Diversas citocinas e quimiocinas têm sido detectadas no plasma e urina de pacientes em estágios precoces da DRC e também relacionadas às complicações da doença. A expressão desses mediadores e a lesão renal sofrem interferência de fármacos como inibidores de enzima conversora de angiotensina, estatinas e antagonistas de receptores de citocinas. A modulação da resposta imuno-inflamatória pode se tornar alvo para tratamento da DRC. O objetivo deste artigo de revisão foi resumir as evidências científicas do papel da inflamação na DRC, destacando-se os efeitos de citocinas e quimiocinas.

Palavras-chave: citocinas, quimiocinas, inflamação, doença renal crônica.

Abstract

Chronic Kidney Disease (CKD) is a serious public health problem whose prevalence has increased in the last few years. Its progression is associated with high morbidity and mortality. Several factors are associated with the onset and progression of CKD, such as obesity, hypertension and *diabetes mellitus*. Beyond these factors, there is evidence of inflammation in the pathophysiology of CKD. Several cytokines and chemokines have been detected in plasma and urine of patients at early stages of CKD as well as were related to CKD complications. The expression of these mediators and renal injury may be influenced by drugs such as angiotensin converting enzyme inhibitors, statins and antagonists of cytokine receptors. The modulation of immune-inflammatory response can become a target for the treatment of CKD. The aim of this review article was to summarize the scientific evidence of the role of inflammation in CKD, especially the effects of cytokines and chemokines.

Key words: cytokines, chemokines, inflammation, chronic kidney disease

Introdução

A Doença Renal Crônica (DRC) tem aumentado, de forma epidêmica, sobretudo em função do aumento global na prevalência das principais causas de DRC como hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* (DM) e obesidade (1-3). Associado a isso, o número de pacientes com DRC terminal, que necessita terapia dialítica ou transplante renal, também tem aumentado significativamente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (3).

Recentemente, tem-se considerado o papel da inflamação subclínica na progressão das doenças crônico-degenerativas (4-5). A inflamação é um processo fisiológico em resposta a diferentes estímulos como infecções, alterações físico-químicas e antigênicas ou danos traumáticos. A resposta inflamatória necessita ser precisamente regulada, uma vez que deficiências ou excessos dessa resposta estão diretamente relacionados com mortalidade e morbidade (6). Nesse contexto, existem evidências de ativação do sistema imune em estágios precoces e tardios da DRC (7-9). Por outro lado, alguns estudos sugerem uma relação negativa entre níveis circulantes de mediadores de inflamação e o estágio da doença (8). Sabe-se também que, em pacientes portadores de DRC terminal ou não, a presença de inflamação é um fator preditor independente de mortalidade (5, 10-12).

Há que se considerar também que a doença cardiovascular (DCV) é, atualmente, a principal causa de morbidade e mortalidade em portadores de DRC (5, 11, 13). Estudos mostram que a inflamação aumenta o risco cardiovascular e a mortalidade dos pacientes com DRC terminal (11-12). Postula-se ainda que os fatores de risco tradicionais para a DCV tais como HAS, DM, dislipidemia e obesidade não seriam suficientes para elevar de tal forma a incidência de complicações cardiovasculares nos pacientes com DRC

terminal (14). Sendo assim, o processo inflamatório, associado aos efeitos do estresse oxidativo, da resistência à insulina e da disfunção endotelial são considerados fatores de risco para DCV nos pacientes com DRC (15).

A via final comum da DRC é caracterizada pela progressiva fibrose intersticial, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda de funcionamento dos néfrons por esclerose glomerular e atrofia tubular (16). Nesse processo fisiopatológico de progressão da lesão renal tem sido cada vez mais detectada a participação dos mecanismos inflamatórios (17).

Este artigo de revisão tem por objetivo resumir as evidências científicas referentes ao possível papel de mediadores imuno-inflamatórios na fisiopatologia da DRC, com ênfase em algumas citocinas e quimiocinas com potencial envolvimento na instalação e evolução da doença renal, tais como o fator de transformação de crescimento do tipo beta ($\text{TGF-}\beta$), a proteína quimiotática para monócitos do tipo 1 (MCP-1/CCL2) e a interleucina-8 (IL-8/CXCL8).

Citocinas e Quimiocinas

Citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, secretadas pelos leucócitos e outras células do organismo, principalmente em resposta a estímulos antigênicos, que atuam como mensageiros do sistema imune. As citocinas podem receber denominações específicas que se referem ao tipo celular que predominantemente as sintetizam e aos seus mecanismos de ação. Sendo assim, as citocinas predominantemente sintetizadas por fagócitos mononucleares são denominadas monocinas, enquanto as produzidas principalmente por linfócitos são linfocinas. Citocinas que agem em outros leucócitos são denominadas interleucinas (IL). As ILs estão envolvidas na resposta e na

apresentação de antígenos, principalmente pelos linfócitos T auxiliares (18). As citocinas com função de controlar o tráfego basal e inflamatório de leucócitos por meio de quimiotaxia são chamadas de quimiocinas, ou seja, citocinas quimiotáticas. (18). A movimentação é propriedade fundamental das células imunes e as quimiocinas são importantes facilitadoras desse processo. Além da quimiotaxia, as quimiocinas apresentam efeito pró-angiogênico e promovem degranulação de leucócitos. Dessa forma, a resposta imune final consiste em uma combinação de funções biológicas (19).

As duas principais famílias de quimiocinas são as CC quimiocinas, dotadas de dois resíduos de cisteína adjacentes e as CXC quimiocinas, dotadas de resíduos de cisteína separados por um aminoácido (18). As quimiocinas podem ser classificadas em induzíveis, quando sua síntese é estimulada por qualquer fator que altere a homeostase celular; e em constitutivas, que são responsáveis pelo tráfego leucocitário basal e pela formação da arquitetura de órgãos linfóides secundários (4).

Inflamação e Doença Renal Crônica

A ativação do sistema imune, decorrente da injúria tecidual, quando ocorre de forma exacerbada, com aumento excessivo da expressão de citocinas e quimiocinas, pode favorecer a instalação e a progressão de doenças (4). A exacerbação da resposta inflamatória leva à perda de tolerância periférica aos componentes dos próprios tecidos, que se tornam antigênicos e desencadeiam inflamação local (20). A estimulação imunológica é contínua e o processo se prolonga até completa destruição tecidual (21). Assim, em consequência da ativação inicial, as citocinas agem sobre as células alvo, que podem estar localizadas em qualquer compartimento do corpo, levando a diferentes processos mórbidos tais como a DRC.

A inflamação é prevalente em pacientes portadores de DRC e progride na medida em que a lesão renal segue rumo a sua fase terminal (22-23). A prevalência da inflamação em pacientes com DRC tem variado entre as populações (24). Em aproximadamente 30-60% de todos os pacientes portadores de DRC nos Estados Unidos (EUA), Canadá e países europeus são encontrados níveis aumentados de marcadores imunoinflamatórios ao passo que, nos pacientes provenientes de países asiáticos, observa-se baixa prevalência de inflamação. Acredita-se assim que fatores genéticos, ambientais e culturais como o hábito alimentar influenciem no perfil inflamatório (11-12, 25).

É bem estabelecida a relação entre desnutrição, inflamação e aterosclerose (10, 23) e a DRC. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram totalmente elucidados. A ativação do sistema imune estimula as vias efetoras de injúria do tecido renal (19, 26). A inflamação desencadeia mecanismos de agressão ao tecido renal, determinando o comprometimento da função do órgão, além de induzir mecanismos mantenedores desse processo (24). A deterioração da função renal tem sido associada ao aumento dos níveis séricos de citocinas e de seus receptores solúveis nos diferentes estágios da DRC (15, 27). As citocinas, ao interagirem com receptores de alta afinidade, localizados na membrana celular, regulam a transcrição de inúmeros genes e levam a modificações do comportamento da célula (28).

O estado inflamatório crônico se associa à elevação dos níveis séricos de proteínas inflamatórias de fase aguda como a proteína C reativa (PCR) e de uma variedade de citocinas. Dentre as citocinas pró-inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da doença renal destacam-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (29). Além disso, a citocina pró-fibrótica TGF- β , produtos plasmáticos do sistema enzimático como os componentes do sistema complemento e da coagulação, prostaglandinas, leucotrienos e mediadores vasoativos participam do

processo de progressão da lesão renal (16, 30). Esses mediadores modulam a disfunção endotelial, adesão e migração das células circulantes do sistema imune (monócitos, leucócitos ou neutrófilos) para o interstício, além da ativação dos fibroblastos residentes (16-17).

Na população adulta, evidências de ativação do sistema imune são observadas em estágios precoces da DRC (8-9). Níveis elevados de PCR foram associados a todas as causas de mortalidade em pacientes nos estágios 3 e 4 de DRC (31-32). Foi também detectada associação entre os níveis de PCR e citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-6 (33-36).

Em crianças portadoras de DRC, secundária às mais diversas causas, a excreção urinária de endotelina (ET-1), TGF- β 1 e do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) mostrou-se significativamente elevada em relação aos controles pareados (37). O aumento da excreção desses mediadores correlacionou-se com a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e foi mais evidente nos pacientes com nefropatia obstrutiva, refletindo o impacto da lesão túbulo-intersticial sobre a função renal global (37).

Obesidade, DRC e inflamação

A obesidade é um fator de risco independente para DRC. Pacientes norte-americanos obesos têm risco quatro vezes maior de desenvolver DRC que pacientes não obesos e, nesta mesma população, a hipertensão responde por 25% dos casos de DRC (38). Sabe-se que a obesidade induz alterações fisiopatológicas que contribuem para a lesão renal (2). O acúmulo de lípidos nos macrófagos pode alterar o fenótipo dessas células e favorecer o surgimento de um ambiente pró-inflamatório responsável pelas modificações fisiopatológicas do rim associadas à obesidade (2). Eddy *et al.* mostraram que o aumento

da expressão do inibidor da ativação do plasminogênio-1 (PAI-1), induzido no tecido adiposo e nas células glomerulares de pacientes obesos, é fator de risco independente para lesão renal por diminuir a degradação de matriz protease-dependente e interferir com a migração celular (39).

Outro mecanismo provavelmente envolvido no desencadeamento da DRC, em pacientes obesos, é a formação aumentada de espécies reativas de oxigênio (40). Os níveis elevados de colesterol podem estimular a produção de superóxido que, por sua vez, contribuem para a disfunção renal observada em pacientes obesos (40). O aumento dos radicais superóxido pode elevar a produção endógena da enzima superóxido desmutase e induzir, consequentemente, lesão renal por meio da redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (41). O estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção endotelial secundária favorecem a instalação e a progressão DRC (42). Knight *et al.* mostraram que tanto a sinvastatina, uma estatina, quanto o 4-hidroxi-tempol, uma substância com ação similar à enzima superóxido desmutase, apresentaram efeitos anti-oxidantes através da diminuição da produção de 8-isoprostano em modelo animal de hipertensão e obesidade (42). Esses autores verificaram também que somente o tratamento com 4-hidróxi-tempol, e não com sinvastatina, promoveu redução da excreção urinária da quimiocina MCP-1/CCL2, sugerindo um efeito renoprotetor adicional desta substância pela modulação do processo inflamatório local em animais com obesidade e hipertensão (42).

Sistema renina-angiotensina (SRA), DRC e inflamação

O SRA exerce papel central nos processos de sinalização intracelular das citocinas possivelmente modulando a resposta inflamatória associada à progressão da doença renal e a susceptibilidade para a disfunção cardiovascular (16). Polimorfismos genéticos do

SRA e de citocinas podem determinar expressão alterada de citocinas inflamatórias e, consequentemente, promoverem a progressão da doença renal e o surgimento de alterações cardiovasculares em pacientes com DRC (24). Estas variações genéticas podem ser as responsáveis pelas diferenças observadas na progressão das disfunções renal e cardiovascular no paciente com DRC (16, 24, 43-44).

Para exemplificar a interação entre alterações genéticas do SRA e modulação da expressão de citocinas, Yvan-Charvet *et al.* detectaram aumento do RNA mensageiro para TNF- α , IL-6 e IL1- β no tecido adiposo de camundongos com superexpressão do angiotensinogênio (45). Além disso, já foi mostrado que a Angiotensina (Ang) II é capaz de ativar células tubulares ou glomerulares e induzir a liberação de TGF- β , MCP-1/CCL2 e “regulated on activation normal T cell expressed and secreted” RANTES/CCL5 (46). O SRA participa ativamente da regulação do tônus vasomotor e da proliferação celular, podendo afetar a função e estrutura renais, bem como promover alterações cardiovasculares (47). Ensaios experimentais e estudos de intervenção na DRC têm mostrado que tanto a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) quanto o bloqueio dos receptores angiotensinérgicos do tipo 1 (AT1) retardam a progressão da doença renal não só por controlarem a HAS como também por exercerem efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-oxidativos (47-49). O tratamento com antagonistas de aldosterona também tem mostrado efeitos benéficos sobre a função renal por meio da modulação de mediadores da função podocitária, do TGF- β 1, do PAI-1 e de espécies reativas de oxigênio (50-51).

Os tratamentos com inibidores da ECA e com bloqueadores do receptor AT1 da Ang-II preveniram e/ou atenuaram a regulação para cima de diversos genes pró-inflamatórios em modelo experimental de nefrectomia sub-total (46). A redução dos níveis de TGF- β 1 em modelo animal, em pacientes transplantados renais e em portadores

de nefropatia diabética também tem sido descrita após uso destas drogas (52). Amann *et al.* mostraram que o uso de inibidor de ECA, em diabéticos tipo 2 portadores de nefropatia, reduziu os níveis urinários de MCP-1/CCL2 e determinou melhora da função renal (53). O bloqueio da Ang II também se mostrou capaz de reduzir excreção urinária de albumina oxidada, sem alterar a excreção urinária total de proteínas e os níveis pressóricos (45). A excreção urinária de albumina oxidada correlacionou-se positivamente com os níveis urinários de MCP-1/CCL2 reforçando a importância da interação entre inflamação e estresse oxidativo na progressão da DRC (54).

Inflamação na Nefropatia Obstrutiva

A nefropatia obstrutiva pode lesar o tecido renal mesmo após alívio do processo obstrutivo, produzindo fibrose intersticial e atrofia tubular (55). Em geral, as lesões permanentes se devem a apoptose tubular e fibrose renal. A apoptose de células tubulares renais e a fibrose são mediadas por citocinas tais como o TGF- β 1 (55) e o TNF- α (56).

Três processos são fundamentais para a lesão renal obstrutiva: a morte celular por apoptose e outras formas, a inflamação e a fibrose intersticial (57). O estiramento mecânico dos túbulos dilatados por obstrução ao fluxo de urina promove apoptose ou transição epitélio-mesenquimal das células epiteliais tubulares. As células epiteliais lesadas produzem regulação para baixo do fator de crescimento epidermal (58) e ativam o SRA. Essas duas alterações estimulam a expressão do TGF- β 1 e a geração de espécies reativas de oxigênio, que, por sua vez, levam ao recrutamento de macrófagos intersticiais e à produção de MCP-1/CCL2, moléculas de adesão e TNF- α (57). Esta sequência de eventos resulta em atrofia tubular e lesão de capilares peritubulares e glomérulos (53, 57). Além disso, alterações fenotípicas transformam células epiteliais em miofibroblastos, que

promovem fibrose intersticial através da expansão da matriz extracelular (57). O resultado final é a perda progressiva de todas as estruturas do néfron, conforme mostrado na Figura 1.

Figura 1

O aumento da produção tubular de TGF- β 1 contribui significativamente para a fibrose túbulo-intersticial por meio de ativação do fator nuclear de transcrição NF- κ B e conseqüente deposição de matriz extracelular (59). A atividade do NF- κ B é também estimulada pela albumina, o que explica a correlação entre a proteinúria, inflamação túbulo-intersticial e fibrose renal (59). Em modelo experimental de obstrução ureteral unilateral, a inibição da ECA ou o bloqueio do receptor AT₁ atenuam a lesão renal, evidenciando o papel da Ang II na progressão da DRC nas nefropatias obstrutivas (60).

Inflamação nas Glomerulopatias

A relação entre glomerulopatia e inflamação está bem estabelecida na literatura (8, 15, 22, 54, 61). As doenças glomerulares determinam deterioração mais rápida da função renal quando comparadas a outras etiologias de DRC (62-63). Todos os tipos celulares, presentes no glomérulo, contribuem para a progressão da lesão glomerular (64). Inicialmente, a inflamação induz agregação plaquetária e infiltração leucocitária. Posteriormente, há um influxo de linfócitos e macrófagos mediado pelo aumento da produção de citocinas e quimiocinas, oriundas tanto das células infiltrativas quanto das células glomerulares intrínsecas (64). As células mesangiais podem ser ativadas por

processos imunológicos e apresentarem consequente alteração fenotípica, transformando-se em fibroblastos capazes de liberar proteases, citocinas e mediadores oxidativos (28), tais como IL-1, MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, fator de crescimento derivado de plaquetas, óxido nítrico, TGF- β (46, 65). Tais mudanças fenotípicas das células alvo participam da glomeruloesclerose e da fibrose túbulo-intersticial. A lesão das células endoteliais também contribui para a glomeruloesclerose (26, 66) por meio de aumento da expressão de PAI-1 moléculas de adesão intracelular-1 (ICAM-1), IL-1, TNF- α , IL-8/CXCL8 e MCP-1/CCL2 (67-68). Dessa forma, a via final comum da DRC secundária às glomerulopatias também é caracterizada pela fibrose intersticial progressiva, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda de funcionamento dos néfrons por esclerose glomerular e atrofia tubular (16) (Figura 1).

Existem evidências clínicas e experimentais que corroboram o papel das citocinas e quimiocinas na instalação e progressão da DRC nas doenças glomerulares (69-70).

Em modelo animal de glomerulopatia, Border *et al.* mostraram papel do TGF- β 1 na proliferação celular mesangial e posterior instalação da fibrose (71). Vários estudos mostraram que o uso de antagonista de receptor de IL-1 melhora a lesão renal em modelo experimental de glomerulopatia crescêntica (69, 72-73).

Em relação às evidências clínicas, Honkanen *et al.* mostraram excreção urinária elevada de TGF- β 1 em pacientes com glomerulopatia membranosa, a correlação positiva dos níveis desta citocina com índices morfológicos de cronicidade e sua diminuição após tratamento imunossupressor (74). Expressão aumentada de TNF- α foi detectada em crescentes e em células epiteliais tubulares de pacientes portadores de glomerulopatias proliferativas (75-77). A expressão de IL-1 também se mostrou aumentada na glomerulopatia crescêntica humana e experimental (70, 76, 78). A excreção urinária

aumentada de IL-8/CXCL8 foi observada em pacientes portadores de doença glomerular (77, 79). Esta elevação correlacionou-se à excreção urinária de proteínas em pacientes com síndrome nefrótica primária (79) e mostrou-se reduzida durante a remissão da proteinúria (79) e nos pacientes submetidos à pulsoterapia (77).

Citocinas e Quimiocinas como biomarcadores da Doença Renal Crônica

IL-1 - A família da IL-1 consiste em duas citocinas pró-inflamatórias, IL-1 α e IL-1 β e um agente anti-inflamatório natural, o antagonista do receptor solúvel de IL-1 (IL-1Ra). A relação entre os níveis plasmáticos de IL-1 e IL-1Ra exerce papel significativo na susceptibilidade e gravidade de inúmeras doenças (80). Estudos mostram que esta relação prediz a evolução de doenças cardiovasculares, bem como o estabelecimento de glomerulopatias (65) e mortalidade na DRC (81). A IL-1 é também considerada um mediador da fibrose túbulo-intersticial (82). O aumento da expressão de IL-1 foi detectado em biópsias renais de pacientes com vasculite (70) e no tecido renal remanescente de ratos submetidos à nefrectomia subtotal (46). Além disso, a administração de antagonistas de IL-1 inibiu a fibrose túbulo-intersticial em modelo animal de DRC (69).

IL-6 - A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células incluindo monócitos e células renais mesangiais (83). IL-6 induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos e a produção de proteínas de fase aguda como PCR e fibrinogênio (44, 84). Além disso, esta citocina estimula a proliferação de células renais mesangiais e exerce papel fundamental na glomerulopatia proliferativa mesangial (84). Alguns estudos têm sugerido a participação de IL-6 na fisiopatologia da nefrite lúpica, principalmente pela indução da produção de anticorpos nefritogênicos (85) e pela

proliferação mesangial (86-87). No entanto, Li *et al.*, ao avaliarem uma coorte de pacientes com lúpus, não evidenciaram aumento significativo de IL-6 nos casos com nefrite ativa quando comparados aos pacientes sem nefrite (88).

IL-8 - A primeira citocina quimioatraente a ser descoberta foi a IL-8/CXCL8, considerada, por isso, um marco na história da imunologia (89-90). A IL-8/CXCL8 pertence à subfamília de quimiocinas CXC e exerce predominantemente efeito quimioatraente para neutrófilos. A excreção urinária de β_2 -microglobulina, IL-6 e IL-8/CXCL8 relaciona-se à atividade inflamatória renal na nefrite lúpica (77, 91). Há evidência da elevação urinária de IL-8/CXCL8, em pacientes portadores de nefrite lúpica ou nefropatia por imunoglobulina A (IgA) (77). Observou-se redução dos níveis urinários de IL-8/CXCL8 nos períodos de remissão da nefrite lúpica (77). Por outro lado, o estudo de Li *et al.* não confirmou este achado, pois, apesar de haver elevação dos níveis de IL-8/CXCL8 em pacientes com lúpus, não foi detectada diferença entre os casos com e sem comprometimento renal (88). Yokoyama *et al.* mostraram o envolvimento de IL-8/CXCL8 na fase aguda da nefropatia por IgA caracterizada pela proliferação endocapilar (92). No entanto, Huang *et al.* sugeriram a participação da IL-8/CXCL8 nas fases avançadas por IgA, ao mostrarem níveis urinários aumentados em comparação com estágios precoces da doença e controles sadios (93). Foi também detectado que a IL-8/CXCL8 urinária eleva-se em fases iniciais da nefropatia diabética (9) e contribui para a progressão da doença renal policística autossômica dominante por meio da ativação MAP quinase p38 (94). Existem ainda evidências clínicas e experimentais de que essa quimiocina influencie a permeabilidade glomerular (79, 95). Garin *et al.* verificaram que a administração IL-8/CXCL8 produz proteinúria, em animais, possivelmente através do aumento da permeabilidade glomerular (95). Em pacientes pediátricos, Cho *et al.* detectaram níveis séricos e urinários aumentados de IL-8/CXCL8 em portadores de

síndrome nefrótica por lesão mínima em recidiva (96). Similarmente, Souto *et al.* mostraram uma correlação positiva entre a excreção de IL-8/CXCL8 e de proteína na urina de crianças com síndrome nefrótica primária (79).

TNF- α - O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória cuja produção é estimulada pela Ang II e associa-se à fibrose intersticial pela diferenciação de miofibroblastos e ativação do NF- κ B (97). A infusão de TNF- α , em coelhos, resulta em acometimento glomerular com acúmulo de células inflamatórias e fibrina (98) e, em ratos, induz lesão glomerular por aumentar os níveis de endotoxina e anticorpo anti-membrana basal glomerular (99). Em modelo experimental de glomerulopatia crescêntica, tanto a deficiência genética de TNF- α (100) quanto a inibição farmacológica dessa citocina (101) atenuam o desenvolvimento das lesões glomerulares. Em crianças com síndrome nefrótica por lesões mínimas observou-se também aumento da excreção urinária de TNF- α (96).

TGF- β - Os TGF- β s pertencem à superfamília TGF- β composta por três isoformas homólogas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são codificadas por diferentes genes. O TGF- β 1 é a isoforma predominantemente expressa pelo sistema imunológico (102-103). Yu *et al.* demonstraram efeitos fibrogênicos de todas as três isoformas do TGF- β sobre as células renais, porém o TGF- β 1 medeia os efeitos do TGF- β 2 e do TGF- β 3 (104). O TGF- β 1 é classicamente conhecido por sua contribuição à progressão da lesão renal através da expansão da matriz extracelular e fibrose tecidual (52, 105). O TGF- β 1 induz a produção de PAI-1, regula o crescimento e diferenciação celulares, promove a produção de matriz extracelular (16), além de interagir com vias de sinalização intracelular da Ang-II que estimulam a fibrose intersticial renal e progressão da DRC (106-107). Níveis urinários aumentados de TGF- β 1 foram observados em crianças com nefropatias obstrutivas (108). Foram detectados aumentos da expressão e dos níveis séricos e urinários dessa citocina em pacientes com glomeruloesclerose focal e segmentar (105,

109-110) e nefropatia diabética (111). O efeito benéfico de anticorpos anti-TGF- β 1 em modelos de uropatia obstrutiva e glomerulopatias corroboram o papel do TGF- β 1 na progressão da DRC (71).

MCP-1. O MCP-1/CCL2 é uma quimiocina da família CC, que recruta células da linhagem monócitos-macrófagos, estimula a liberação de histamina pelos basófilos e atua tanto nas fases iniciais, quanto na progressão da lesão túbulo-intersticial renal (19, 112). O MCP-1/CCL2 induz fibrose túbulo-intersticial através do recrutamento e ativação de macrófagos que liberam, então, TGF- β 1. Recentemente, foram demonstradas as significativas correlações entre o número de fibroblastos intersticiais, o número de macrófagos também intersticiais e a excreção urinária de MCP-1/CCL2 na DRC (113). Existem inúmeras evidências do papel dessa quimiocina na DRC de diversas etiologias (114-116).

Em ratos com obstrução ureteral unilateral, a excreção urinária de MCP-1/CCL2 está aumentada e correlaciona-se ao grau de obstrução (114). A presença de deposição de colágeno dos tipos III e IV na região mesangial e a infiltração intersticial de monócitos/macrófagos em modelo experimental de uropatia obstrutiva indicam o papel de MCP-1/CCL2 em sua fisiopatologia (60).

Estudos também corroboram a ação da quimiocina MCP-1/CCL2, induzida por TGF- β , na deposição de matriz extracelular e na proteinúria de pacientes portadores de alterações glomerulares, tais como a síndrome nefrótica córtico-resistente e a nefropatia diabética (117-118). No fluido inicial coletado do túbulo proximal de ratos diabéticos, observou-se aumento da liberação de MCP-1/CCL2 que foi bloqueado por anticorpos anti-TGF- β (119). Postula-se que a albuminúria ativa a expressão tubular de quimiocinas no túbulo proximal através de mecanismo NF- κ B dependente (120-121). Wang *et al.*

também sugeriram papel da albuminúria após evidenciarem produção de MCP-1/CCL2 por células tubulares (122). Alguns estudos têm indicado que o bloqueio do MCP-1/CCL2 atenua a nefrite intersticial, a lesão tubular e a fibrose induzidas pela proteinúria (123). Níveis urinários de MCP-1/CCL2 estão aumentados em diabéticos tipo 2 quando comparados à população geral, e este aumento mostrou-se progressivo considerando-se os estágios de nefropatia (9). Nas doenças glomerulares, houve redução de macrófagos e dos os níveis urinários de MCP-1/CCL2 durante a fase de remissão induzida por corticóide (113). O MCP-1/CCL2 mostrou-se também elevado na fase crônica da nefropatia por IgA na qual ocorre proliferação mesangial e infiltração celular intersticial (92).

Em relação às doenças auto-imunes, a deficiência de MCP-1/CCL2 e de seu receptor atenua a manifestação de doença em modelos animais (124). Tal achado é corroborado pelos estudos realizados em pacientes com nefrite lúpica (125-126). Os níveis urinários de MCP-1/CCL2 em pacientes com nefrite lúpica encontravam-se marcadamente elevados e relacionados com sua expressão intrarenal (127-130). O artigo de revisão de Li *et al.* sugere que o MCP-1/CCL2 urinário possa ser considerado um biomarcador da nefrite lúpica por apresentar-se significativamente elevado nos pacientes com acometimento renal (88). Nesse contexto, Rovin *et al.* sugerem que o MCP-1/CCL2 urinário possa ser um biomarcador em pacientes com lúpus, independente da presença de comprometimento renal e do uso de imunossupressão (115).

Conclusão

O custo sócio-econômico da abordagem terapêutica da DRC tende a se tornar inviável. A descoberta de abordagens diagnósticas e terapêuticas alternativas para a DRC

cada vez mais se impõe. Nesse contexto, a pesquisa de biomarcadores tem assumido grande importância. Diante das evidências clínicas e experimentais, é incontestável o papel da inflamação na DRC. Dessa forma, é fundamental o entendimento dos efeitos de quimiocinas e citocinas na instalação e progressão da lesão renal, tendo em vista a possibilidade de definir novos marcadores prognósticos e, talvez até, alvos terapêuticos alternativos e mais eficientes. No entanto, apesar de grande avanço no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que relacionam a resposta imuno-inflamatória à DRC, muitos aspectos ainda precisam ser elucidados.

2.1. REFERÊNCIAS

1. Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med.* 2010 Nov;268(5):456-67.
2. Hunley TE, Ma LJ, Kon V. Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010 May;19(3):227-34.
3. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet.* 2005 Jan 22-28;365(9456):331-40.
4. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):108-15.
5. Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008 May;19(3):329-45.
6. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.
7. Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(4):1216-33.
8. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1009-16.
9. Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, Shimizu A, Shike T, Ishiguro C, et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):1-4.
10. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 11:28-31.
11. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):648-58.
12. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Riella MC, Stenvinkel P. Inflammation, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: a global perspective. *Blood Purif.* 2002;20(5):454-8.
13. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;3(2):505-21.
14. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2000 Jul;58(1):353-62.
15. Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2010 Apr;25(4):711-24.
16. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005 Oct;12(4):353-65.
17. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 May;10(3):321-9.

18. Abbas AK LA. Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science. 2003;5th Edition 243-74.
19. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):95-101.
20. Moss RB, Moll T, El-Kalay M, Kohne C, Soo Hoo W, Encinas J, et al. Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Dec;4(12):1887-96.
21. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005 Dec;68(6):2918-29.
22. Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol*. 2005 Jun;20(6):714-20.
23. Kalantar-Zadeh K, Stenvinkel P, Pillon L, Kopple JD. Inflammation and nutrition in renal insufficiency. *Adv Ren Replace Ther*. 2003 Jul;10(3):155-69.
24. Rao M, Wong C, Kanetsky P, Girndt M, Stenvinkel P, Reilly M, et al. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. *Kidney Int*. 2007 Sep;72(5):549-56.
25. Wong JS, Port FK, Hulbert-Shearon TE, Carroll CE, Wolfe RA, Agodoa LY, et al. Survival advantage in Asian American end-stage renal disease patients. *Kidney Int*. 1999 Jun;55(6):2515-23.
26. Lee LK, Meyer TW, Pollock AS, Lovett DH. Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney. *J Clin Invest*. 1995 Aug;96(2):953-64.
27. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int*. 2006 Jan;69(2):213-7.
28. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13 Suppl 1:10-5.
29. Streetz KL, Wustefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001 Jun;47(4):661-73.
30. Klahr S, Morrissey J. Progression of chronic renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2003 Mar;41(3 Suppl 1):S3-7.
31. Menon V, Greene T, Wang X, Pereira AA, Marcovina SM, Beck GJ, et al. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2005 Aug;68(2):766-72.
32. Knight EL, Rimm EB, Pai JK, Rexrode KM, Cannuscio CC, Manson JE, et al. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2004 Jul;15(7):1897-903.
33. Srivaths PR, Silverstein DM, Leung J, Krishnamurthy R, Goldstein SL. Malnutrition-inflammation-coronary calcification in pediatric patients receiving chronic hemodialysis. *Hemodial Int*. 2010 Jul;14(3):263-9.
34. Hasuike Y, Nonoguchi H, Ito K, Naka M, Kitamura R, Nanami M, et al. Interleukin-6 is a predictor of mortality in stable hemodialysis patients. *Am J Nephrol*. 2009;30(4):389-98.

35. Choudhary N, Ahlawat RS. Interleukin-6 and C-reactive protein in pathogenesis of diabetic nephropathy: new evidence linking inflammation, glycemic control, and microalbuminuria. *Iran J Kidney Dis.* 2008 Apr;2(2):72-9.
36. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM, Giovannini L, et al. C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron.* 2002 Aug;91(4):594-600.
37. Grenda R, Wuhl E, Litwin M, Janas R, Sladowska J, Arbeiter K, et al. Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- beta1 (TGF- beta1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol Dial Transplant.* 2007 Dec;22(12):3487-94.
38. Kramer H, Luke A, Bidani A, Cao G, Cooper R, McGee D. Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am J Kidney Dis.* 2005 Oct;46(4):587-94.
39. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):2999-3012.
40. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 May;24(5):816-23.
41. Peixoto EB, Pessoa BS, Biswas SK, Lopes de Faria JB. Antioxidant SOD mimetic prevents NADPH oxidase-induced oxidative stress and renal damage in the early stage of experimental diabetes and hypertension. *Am J Nephrol.* 2009;29(4):309-18.
42. Knight SF, Yuan J, Roy S, Imig JD. Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Jan;298(1):F86-94.
43. Balakrishnan VS, Guo D, Rao M, Jaber BL, Tighiouart H, Freeman RL, et al. Cytokine gene polymorphisms in hemodialysis patients: association with comorbidity, functionality, and serum albumin. *Kidney Int.* 2004 Apr;65(4):1449-60.
44. Wong C, Kanetsky P, Raj D. Genetic polymorphisms of the RAS-cytokine pathway and chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2008 Jul;23(7):1037-51.
45. Yvan-Charvet L, Massiera F, Lamande N, Ailhaud G, Teboul M, Moustaid-Moussa N, et al. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. *Endocrinology.* 2009 Mar;150(3):1421-8.
46. Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, Shahsafaei A, Kato S, Lee KW, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 2000 Oct;58(4):1664-76.
47. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). *Lancet.* 1997 Jun 28;349(9069):1857-63.
48. Hisada Y, Sugaya T, Yamanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, et al. Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(5):627-35.
49. Kato S, Luyckx VA, Ots M, Lee KW, Ziai F, Troy JL, et al. Renin-angiotensin blockade lowers MCP-1 expression in diabetic rats. *Kidney Int.* 1999 Sep;56(3):1037-48.

50. Nagase M, Fujita T. Aldosterone and glomerular podocyte injury. *Clin Exp Nephrol*. 2008 Aug;12(4):233-42.
51. Bomback AS, Klemmer PJ. Renal injury in extreme obesity: the important role of aldosterone. *Kidney Int*. 2008 Nov;74(9):1216; author reply -7.
52. August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl*. 2003 Nov(87):S99-104.
53. Amann B, Tinzmann R, Angelkort B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1. *Diabetes Care*. 2003 Aug;26(8):2421-5.
54. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Apr;284(4):F863-9.
55. Miyajima A, Chen J, Lawrence C, Ledbetter S, Soslow RA, Stern J, et al. Antibody to transforming growth factor-beta ameliorates tubular apoptosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2000 Dec;58(6):2301-13.
56. Misseri R, Meldrum DR, Dinarello CA, Dagher P, Hile KL, Rink RC, et al. TNF-alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Feb;288(2):F406-11.
57. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2010 Apr;25(4):687-97.
58. Chung KH, Chevalier RL. Arrested development of the neonatal kidney following chronic ureteral obstruction. *J Urol*. 1996 Mar;155(3):1139-44.
59. Takase O, Marumo T, Imai N, Hirahashi J, Takayanagi A, Hishikawa K, et al. NF-kappaB-dependent increase in intrarenal angiotensin II induced by proteinuria. *Kidney Int*. 2005 Aug;68(2):464-73.
60. Satoh M, Kashihara N, Yamasaki Y, Maruyama K, Okamoto K, Maeshima Y, et al. Renal interstitial fibrosis is reduced in angiotensin II type 1a receptor-deficient mice. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Feb;12(2):317-25.
61. Liao TD, Yang XP, Liu YH, Shesely EG, Cava sin MA, Kuziel WA, et al. Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2008 Aug;52(2):256-63.
62. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Silva JM, Oliveira GR, Canhestro MR, et al. Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):2039-46.
63. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):848-55.
64. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med*. 2006;57:365-80.
65. Atkins RC. Interleukin-1 in crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1995 Aug;48(2):576-86.

66. Malek AM, Greene AL, Izumo S. Regulation of endothelin 1 gene by fluid shear stress is transcriptionally mediated and independent of protein kinase C and cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 1;90(13):5999-6003.
67. Hirschberg R, Wang S. Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005 Jan;14(1):43-52.
68. Vielhauer V, Eis V, Schlondorff D, Anders HJ. Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res*. 2004;27(4):226-38.
69. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Vannice JL, Atkins RC. Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established crescentic glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int*. 1995 May;47(5):1303-9.
70. Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, Ritz E, Waldherr R. In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1993 Mar;43(3):682-92.
71. Border WA, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature*. 1990 Jul 26;346(6282):371-4.
72. Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Zarama M, Vannice JL, Atkins RC. Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist. *Kidney Int*. 1993 Feb;43(2):479-85.
73. Tang WW, Feng L, Vannice JL, Wilson CB. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis. *J Clin Invest*. 1994 Jan;93(1):273-9.
74. Honkanen E, Teppo AM, Tornroth T, Groop PH, Gronhagen-Riska C. Urinary transforming growth factor-beta 1 in membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Dec;12(12):2562-8.
75. Takemura T, Yoshioka K, Murakami K, Akano N, Okada M, Aya N, et al. Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Arch*. 1994;424(5):459-64.
76. Tesch GH, Yang N, Yu H, Lan HY, Foti R, Chadban SJ, et al. Intrinsic renal cells are the major source of interleukin-1 beta synthesis in normal and diseased rat kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Jun;12(6):1109-15.
77. 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 Aug;46(2):455-60.
78. Matsumoto K, Dowling J, Atkins RC. Production of interleukin 1 in glomerular cell cultures from patients with rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Am J Nephrol*. 1988;8(6):463-70.
79. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res*. 2008 Dec;64(6):637-42.
80. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Aug-Oct;13(4-5):323-40.

81. Balakrishnan VS, Jaber BL, Natov SN, Cendoroglo M, King AJ, Schmid CH, et al. Interleukin-1 receptor antagonist synthesis by peripheral blood mononuclear cells in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1998 Dec;54(6):2106-12.
82. Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1 β induces human proximal tubule cell injury, α -smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):31-40.
83. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1243-54.
84. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1988 May 23;232(2):347-50.
85. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol.* 1991 Jul 1;147(1):117-23.
86. Horii Y, Iwano M, Hirata E, Shiiki M, Fujii Y, Dohi K, et al. Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl.* 1993 Jan;39:S71-5.
87. Iwano M, Dohi K, Hirata E, Kurumatani N, Horii Y, Shiiki H, et al. Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. *Clin Nephrol.* 1993 Jul;40(1):16-21.
88. Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes EV, Sobel ES, Segal MS, et al. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2006 Jul;5(6):383-8.
89. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, et al. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9233-7.
90. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Dec 16;149(2):755-61.
91. Tsai CY, Wu TH, Yu CL, Lu JY, Tsai YY. Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron.* 2000 Jul;85(3):207-14.
92. Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Kobayashi K, et al. Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leukoc Biol.* 1998 Apr;63(4):493-9.
93. Huang F, Horikoshi S, Kurusu A, Shibata T, Suzuki S, Funabiki K, et al. Urinary levels of interleukin-8 (IL-8) and disease activity in patients with IgA nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2001;15(1):30-4.
94. Yoo KH, Sung YH, Yang MH, Jeon JO, Yook YJ, Woo YM, et al. Inactivation of Mx1 induces IL-8 secretion activation in polycystic kidney. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr 27;356(1):85-90.
95. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2000 Aug;14(8-9):872-8.

96. Cho MH, Lee HS, Choe BH, Kwon SH, Chung KY, Koo JH, et al. Interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha are increased in minimal change disease but do not alter albumin permeability. *Am J Nephrol*. 2003 Jul-Aug;23(4):260-6.
97. Guo G, Morrissey J, McCracken R, Tolley T, Klahr S. Role of TNFR1 and TNFR2 receptors in tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 2):F766-72.
98. Bertani T, Abbate M, Zoja C, Corna D, Perico N, Ghezzi P, et al. Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit. *Am J Pathol*. 1989 Feb;134(2):419-30.
99. Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A, et al. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J Immunol*. 1989 May 1;142(9):3083-90.
100. Timoshanko JR, Sedgwick JD, Holdsworth SR, Tipping PG. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Jul;14(7):1785-93.
101. Karkar AM, Smith J, Pusey CD. Prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis by blocking tumour necrosis factor-alpha. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Mar;16(3):518-24.
102. Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther*. 2003 May;98(2):257-65.
103. Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:137-61.
104. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int*. 2003 Sep;64(3):844-56.
105. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Dec;17(12):2145-52.
106. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*. 2001 Sep;38(3 Pt 2):635-8.
107. Zoja C, Corna D, Camozzi D, Cattaneo D, Rottoli D, Batani C, et al. How to fully protect the kidney in a severe model of progressive nephropathy: a multidrug approach. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Dec;13(12):2898-908.
108. Furness PD, 3rd, Maizels M, Han SW, Cohn RA, Cheng EY. Elevated bladder urine concentration of transforming growth factor-beta1 correlates with upper urinary tract obstruction in children. *J Urol*. 1999 Sep;162(3 Pt 2):1033-6.
109. 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 Feb;49(2):461-9.
110. 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 Jan;61(1):90-5.
111. Rivarola EW, Moyses-Neto M, Dantas M, Da-Silva CG, Volpini R, Coimbra TM. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res*. 1999 Dec;32(12):1525-8.

112. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Savage CO, et al. The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008 Aug;74(4):495-504.
113. Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, et al. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Hum Pathol.* 2010 May;41(5):672-8.
114. Stephan M, Conrad S, Eggert T, Heuer R, Fernandez S, Huland H. Urinary concentration and tissue messenger RNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 as an indicator of the degree of hydronephrotic atrophy in partial ureteral obstruction. *J Urol.* 2002 Mar;167(3):1497-502.
115. Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Feb;16(2):467-73.
116. Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A, Pantzaki A, Bantis C, Dovas S, et al. Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton).* 2009 Sep;14(6):613-20.
117. Wang SN, Hirschberg R. Tubular epithelial cell activation and interstitial fibrosis. The role of glomerular ultrafiltration of growth factors in the nephrotic syndrome and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 1999 Sep;14(9):2072-4.
118. 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 Mar;290(3):F703-9.
119. Wang SN, Hirschberg R. Growth factor ultrafiltration in experimental diabetic nephropathy contributes to interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000 Apr;278(4):F554-60.
120. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C, Corna D, Tomasoni S, Benigni A, et al. Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am J Kidney Dis.* 2000 Dec;36(6):1226-41.
121. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1608-15.
122. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DC. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Oct;8(10):1537-45.
123. Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14(6):1496-505.
124. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med.* 1999 Dec 20;190(12):1813-24.
125. Kelley VR, Rovin BH. Chemokines: therapeutic targets for autoimmune and inflammatory renal disease. *Springer Semin Immunopathol.* 2003 May;24(4):411-21.

126. Rovin BH, Phan LT. Chemotactic factors and renal inflammation. *Am J Kidney Dis.* 1998 Jun;31(6):1065-84.
127. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, et al. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int.* 1996 Mar;49(3):761-7.
128. Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, et al. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1842-9.
129. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000 Oct;58(4):1492-9.
130. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest.* 1995 Dec;73(6):804-9.

Tabela 1 – Resumo dos principais estudos experimentais sobre citocinas e quimiocinas na DRC.

Autor	Ref	Modelo	Citocina	Avaliação
Lan 1993	72	Animal	IL-1	Glomerulonefrite anti-membrana basal glomerular.
Tang 1994	73	Animal	IL-1	Glomerulonefrite anti-membrana basal glomerular.
Wang 1997	122	“In vitro”	MCP-1	Efeito da albumina na produção de MCP-1 por células tubulares.
Tesch 1997	76	“In vitro”	IL-1	Perfil IL-1 em células renais de modelo animal de glomerulonefrite.
Border 1997	71	Animal	TGF- β 1	Ação do TGF- β 1 e de seu antagonista na glomerulonefrite aguda.
Lan 1995	69	Animal	IL-1	Papel da IL-1 e do seu antagonista específico na glomerulonefrite.
Hisada 1999	48	Animal	MCP-1	Efeito em camundongos knockout e wild-type para receptor AT1 da Ang-II.
Kato 1999	49	Animal	MCP-1	Efeito de iECA e BRA em modelo animal de DM.
Taal 2000	46	Animal	MCP-1, TGF- β 1, IL-1, TNF- α	Achados teciduais após inibição do SRA em modelo animal de ablação de massa renal.
Donadelli 2000	120	Animal	MCP-1/NF-kB	Efeito do iECA na redução do MCP-1 em modelo animal proteinúrico.
Wang 2000	119	“In vitro”	TGF- β 1	Fibrose e proteinúria em modelo celular de DM.
Zoja 2002	107	Animal	TGF- β 1	Efeito de iECA, BRA e estatina em modelo de glomerulonefrite e nefrectomia unilateral.
Stephan 2002	114	Animal	MCP-1	Nefropatia obstrutiva parcial e total.
Qi 2006	118	“In vitro”	TGF- β 1, MCP-1, IL-8	Ação do TGF- β 1 no MCP-1 e IL-8 em células de túbulo renal proximal.
Liao 2008	61	Animal	CCR2/MCP-1	Papel na lesão renal em ratos hipertensos knockout para CCR2.
Knight 2010	42	Animal	MCP-1	Associação com anti-oxidante e estatina em modelo animal de obesidade e HAS.

Ref: referência bibliográfica; Ang-II: angiotensina II; iECA (inibidor enzima conversora de angiotensina); SRA: sistema renina angiotensina; DM: *diabetes mellitus*, BRA (bloqueador de receptor AT1 da angiotensina); HAS: hipertensão arterial sistêmica.

Tabela 2 – Resumo dos principais estudos clínicos sobre citocinas e quimiocinas na DRC.

Autor	Ref	n	Idade (anos)	Citocina	Avaliação
Noronha 1993	70	22	10-74	TNF- α /IL-1	Ação local e sérica na DRC por vasculite.
Wada 1994	77	96	4-82	IL-8	GPT primária e secundária; aguda ou não.
Norris 1995	130	48	Adultos	MCP-1	Nefrite lúpica.
Yamamoto 1996	109	53	Adultos	TGF- β 1/PAI-1	Ação local na glomerulonefrite e NP diabética.
Wada 1996	127	42	Adultos	MCP-1	Ação no LES e na nefrite lúpica.
Honkanen 1997	74	64	25-69	TGF- β 1	Progressão da DRC na GPT ou enxerto renal.
Rivarola 1999	111	23	19-57	TGF- β 1	Relação com proteinúria no DM.
Yokoyama 1998	92	49	16-70	MCP-1/IL-8	Nefropatia por IgA.
Wada 2000	129	45	41-82	MCP-1	DM.
Tsai 2000	91	27	Adultos	IL-6/IL-8	Nefrite lúpica.
Huang 2001	93	27	19-55	IL-8	Nefropatia IgA
Tashiro 2002	9	24	Adultos	MCP-1/IL-8	Proteinúria, NP diabética e suas fases.
Goumenos 2002	105	25	51 $\pm$ 16	TGF- β 1	GPT/síndrome nefrótica com função renal normal.
Strehlau 2002	110	53	Crianças	TGF- β 1	GPT e necrose tubular aguda.
Panichi 2002	36	103	50 $\pm$ 6,3	IL-6	DRC pré-dialítica.
Amann 2003	53	22	62,4 $\pm$ 10,9	MCP-1	Função renal e proteinúria após uso de iECA no DM.
Agarwal 2003	54	16	53 $\pm$ 9	MCP-1	Efeito após uso de BRA na GPT e DM.
August 2003	52	98	Adultos	TGF- β 1	Pacientes Afro-americanos e brancos em HD.
Cho 2003	96	19	2-15	IL-8/TNF- α	Doença de lesões mínimas.
Tucci 2004	128	134	Adultos	MCP-1	Polimorfismo do MCP-1 no LES e relação com a NL.
Rovin 2005	115	33	Adultos	MCP-1/IL-8	Nefrite lúpica.
Grenda 2007	37	303	11,5 $\pm$ 3,9	TGF- β 1	DRC estágios II-IV.
Eardley 2008	112	110	20-87	MCP-1	Perfil do MCP-1 e proteinúria na fase inicial da DRC.
Souto 2008	79	32	Crianças	TGF- β 1/IL-8	GPT/síndrome nefrótica com função renal normal.
Choudhary 2008	35	60	Adultos	IL-6	Nefropatia diabética.
Stangou 2009	116	33	18-65	MCP-1/IL-6	Nefropatia por IgA.

Ref: referência bibliográfica; DRC: doença renal crônica; GPT: glomerulopatia; NP: nefropatia; LES: lúpus eritematoso sistêmico; DM: *diabetes mellitus*; IgA: imunoglobulina A; iECA (inibidor enzima conversora de angiotensina); BRA: bloqueador receptor angiotensina 1; HD: hemodiálise; NL: nefrite lúpica.

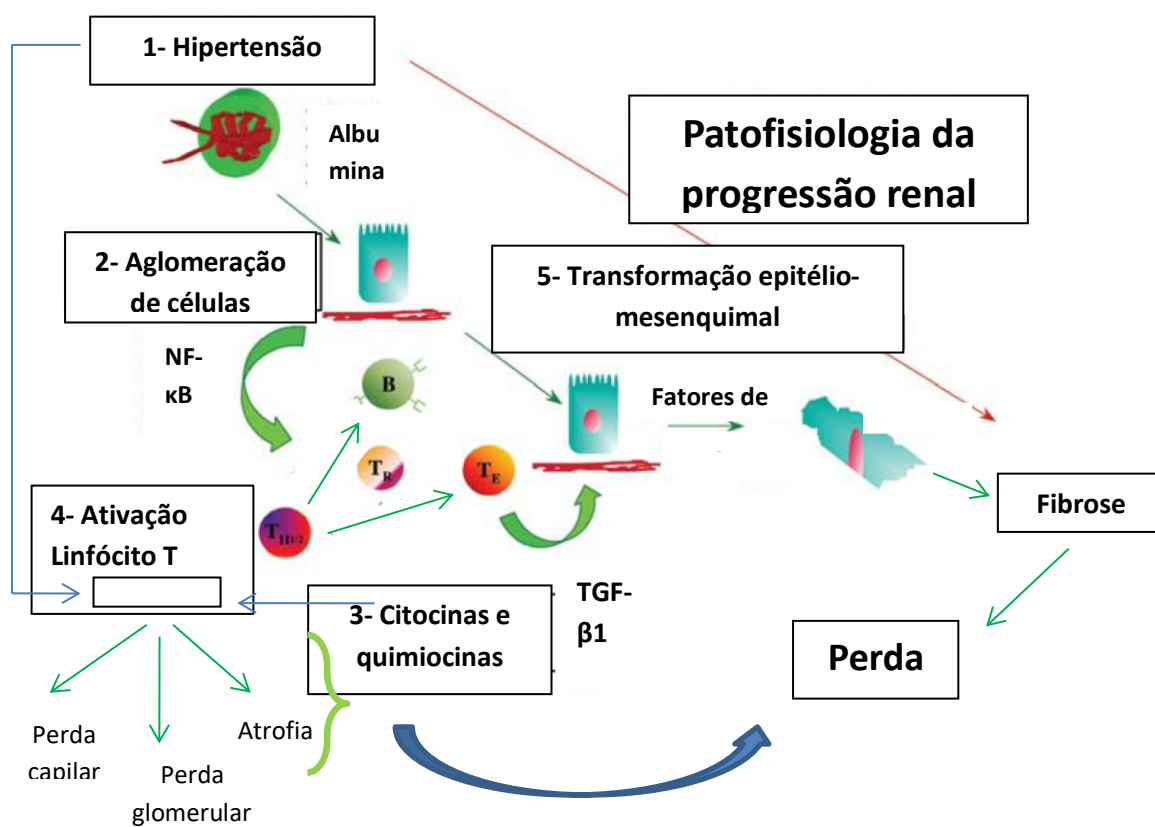


Figura 1 – Células e mediadores envolvidos na progressão da DRC (adaptado de Chavalier 2010⁵⁷ e Mezzano 2001¹⁰⁶).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os níveis urinários de IL-8/CXCL8, TGF- β 1 e MCP-1/CCL2 em crianças e adolescentes portadores de DRC em tratamento conservador.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se existe diferença entre os níveis urinários de citocinas em pacientes portadores de DRC secundária a doenças glomerulares e a malformações do trato urinário.
- Verificar se existe correlação entre os níveis urinários de citocinas e o estágio da DRC.
- Verificar se existe correlação entre os níveis urinários de citocinas e a presença de proteinúria e a detecção de hipertensão arterial.
- Verificar se o tratamento com bloqueadores do sistema renina angiotensina modificou os níveis urinários de citocinas.
- Verificar se existe correlação entre os níveis urinários de citocinas e variáveis clínicas e laboratoriais nos pacientes com DRC secundária a doenças glomerulares e decorrente de malformações do trato urinário.
- Verificar se existe diferença entre as associações e correlações observadas nas análises com os níveis urinários absolutos das citocinas e quimiocinas e estes mesmos níveis relacionados à creatinina urinária.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram inicialmente avaliadas 97 crianças e adolescentes, com idade entre 2 e 18 anos, portadores de DRC e que estavam em acompanhamento regular no Programa Interdisciplinar de Abordagem Pré-Dialítica da Unidade de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (UNP-HC) da UFMG, durante o período de coleta (2009 a 2010). Desses 97 pacientes, 19 foram excluídos do estudo (vide critérios de exclusão, item 4.2) e 11 se recusaram em participar, totalizando, portanto, 67 pacientes. Dentre os 67 pacientes, foram selecionados 42 casos cuja DRC se deveu à presença de malformações congênitas do trato urinário (n=31) e doenças glomerulares (n=11). Os 25 casos restantes não foram incluídos no estudo devido à heterogeneidade das causas de DRC e de, em oito casos, não ter sido estabelecida a etiologia da DRC.

Os critérios para diagnóstico e estadiamento da DRC foram estabelecidos pelo *National Kidney Foundation's Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF/DOQI) (1). A DRC foi definida pela presença de lesão renal, por período superior a três meses, caracterizada por anormalidades estruturais ou funcionais do rim, com ou sem alterações do RFG ou por um RFG menor que 60 ml/min/1.73 m² persistente por mais de três meses, independentemente de lesão renal. Foram definidos cinco estágios, de acordo com a gravidade do comprometimento da função renal, correspondendo o estágio 5 à falência renal.

4.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos os pacientes que apresentavam outras doenças crônicas, além da DRC, que poderiam interferir no perfil inflamatório como insuficiência cardíaca descompensada, DM, doenças pulmonares, doenças hepáticas, síndrome de imunodeficiência adquirida e doenças auto-imunes. Pacientes que apresentavam estado febril ou se encontravam em vigência de infecção do trato urinário (ITU) ou outro processo infeccioso agudo também não foram submetidos ao protocolo do estudo.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG aprovou o estudo através do Parecer ETIC 572/07, anexo I. Todos os pacientes capazes e/ou seus responsáveis foram esclarecidos sobre a natureza do estudo por meio da leitura e análise do termo de consentimento livre e esclarecido, anexo II. As crianças e adolescentes portadores de DRC 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.

4.4. PROTOCOLO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, com amostra de conveniência, formada pelos pacientes portadores de DRC secundária às doenças glomerulares e às malformações do trato urinário, assistidos pelo Programa Interdisciplinar de Abordagem Pré-Dialítica da UNP-HC da UFMG, entre 2009 e 2010, e que aceitaram participar do estudo.

Os pacientes foram submetidos aos exames clínicos e às avaliações laboratoriais periódicas, de acordo com o protocolo utilizado pelo Programa Interdisciplinar de Abordagem Pré-Dialítica da UNP-HC da UFMG (2-3). Em resumo, o protocolo de avaliação consistiu na realização periódica de exame físico convencional que sempre inclui obtenção de dados antropométricos e mensuração da pressão arterial (4). Na avaliação laboratorial periódica foram rotineiramente realizados os seguintes exames: hemograma, gasometria venosa, dosagens séricas de uréia, creatinina, ácido úrico, sódio, potássio, cloreto, cálcio, fosfato, magnésio, PTH, colesterol total e frações, triglicérides, albumina, avaliação da cinética do ferro, exame de urina rotina e, em alguns casos, proteinúria de 24 horas, relação proteína/creatinina em amostra de urina e urocultura. Outros exames foram solicitados de acordo com a doença de base ou complicações desenvolvidas pelos pacientes.

Após assinatura do termo de consentimento, os pacientes foram submetidos, em única ocasião e simultaneamente aos exames laboratoriais de rotina, à coleta de amostra de urina para determinação das concentrações de citocinas e de creatinina, conforme detalhado a seguir.

4.5. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta de urina foi realizada, no período da manhã, em coletor plástico estéril. Após homogeneização, 10 ml de urina foram recondicionados em tubo estéril inserido no gelo. As amostras foram imediatamente transportadas ao laboratório e centrifugadas a 1300 g por 20 minutos, sob refrigeração constante (4°C). Aliquotas de 1,5 ml foram obtidas e conservadas em freezer a -80°C para posterior análise. Todo o processo desde a coleta de urina até a obtenção das alíquotas de 1,5 ml teve duração inferior a 30 minutos.

4.6. ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

Os níveis urinários de IL-8/CXCL8, TGF β 1 e MCP-1/CCL2 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 utilizou um anticorpo monoclonal específico para determinação de cada citocina estudada, fornecido pelo fabricante.

Em linhas gerais, os anticorpos de captura, específicos para cada citocina (fornecidos pelo 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 (específicos para cada citocina, diluídos em PBS, foram adicionados, e foi feita incubação por duas horas em temperatura ambiente, seguida de novo procedimento de lavagem. A seguir, o reagente de cor (fenilenediamina) foi adicionado a cada poço e as placas foram 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.

Especificamente para a determinação das concentrações de TGF β 1, 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 urina foram submetidas inicialmente ao procedimento específico de ativação do TGF β 1, 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 pelo 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 450 nm (Emax, Molecular Devices, MN, EUA).

As concentrações urinárias de citocinas foram expressas em valores absolutos (pg/ml) e valores relativos à creatinina urinária medida simultaneamente na mesma amostra de urina (pg/mg cr). Os limites de detecção para cada citocina foram de: 6 pg/mL (IL8), 6 pg/mL (TGF β 1), 8 pg/mL (MCP1). As determinações de IL8, TGF β 1 e MCP1 foram realizadas em um único ensaio para eliminar variações inter-ensaio. A variação intra-ensaio foi inferior a 3%.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software SPSS, versão 18.0 (Chicago, IL, USA), e o GraphPad Prism, versão 5.0 (USA), foram utilizados para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como

medianas e intervalos interquartílicos ou médias $\pm$ desvio padrão, quando apropriado. A normalidade de distribuição dos dados, em cada grupo, foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk. O teste T de Student, para dados não pareados, foi utilizado para a comparação de médias, enquanto os testes de Mann Whitney e de Kruskal Wallis foram utilizados para comparação de medianas entre dois grupos ou mais grupos, respectivamente. Os testes de Spearman e Pearson foram utilizados para avaliação de correlações. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4.8. REFERÊNCIAS

1. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt 1):1416-21.
2. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Silva JM, Oliveira GR, Canhestro MR, et al. Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):2039-46.
3. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):848-55.
4. The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics*. 2004 Aug;114(2 Suppl 4th Report):555-76.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGO ORIGINAL

Original Article

Urinary cytokines in pediatric chronic kidney disease

Heloisa R Vianna¹; Katia D Silveira²; Gustavo S Elmiro¹; Philipe M Mendes¹; Mauro M Teixeira²; Marcelo S Tavares¹; Ana Cristina Simões e Silva¹.

¹Pediatric Nephrology Unit, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

²Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

KEY WORDS: Cytokines, Chemokines, MCP-1/CCL2, Inflammation, Biological Markers, Chronic Kidney Disease

Acknowledgements. This study was partially supported by CNPq (Brazilian National Research Council) and FAPEMIG. GSE and PMM were recipients of CNPq fellowships. Dr. AC Simões e Silva and Dr MM Teixeira received a research grant from the Brazilian Research Council (CNPq).

Conflicts of interest: none

Correspondence:

Ana Cristina Simões e Silva, MD, PhD
Avenida Bernardo Monteiro 1300 / 1104
Belo Horizonte - Minas Gerais
Postal Code: 30150-281
E - mail: acssilva@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2), transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) and interleukin-8 (IL-8/CXCL8) in pediatric patients with chronic kidney disease (CKD) stages 2-4. These cytokines were measured in 42 CKD patients by enzyme-linked immunoassay in spot-urine samples. Patients were divided according to primary CKD etiology: glomerular disease (group 1, n=11) and urinary tract malformation (group 2, n=31). Group 1 presented significantly higher absolute urinary levels of MCP-1/CCL2 than group 2. No significant differences in urinary TGF- β 1 and IL-8/CXCL8 levels were found in the comparison between groups. Patients with glomerular diseases exhibited negative correlations between urinary concentration of MCP-1/CCL2 (absolute and standardized for creatinine) and serum albumin, and positive correlation between IL-8/CXCL8 (absolute and standardized for creatinine) and body mass index z-score ($p<0.05$). Also in group 1, total serum cholesterol and triglycerides were positively correlated with MCP-1/CCL2 levels standardized for creatinine ($p<0.05$). In group 2, negative correlations were found between estimated glomerular filtration rate (GFR) and IL-8/CXCL8 (absolute and standardized for creatinine), and MCP-1/CCL2 (absolute and standardized for creatinine) and serum triglycerides ($p<0.05$). Differences in urinary cytokine concentrations might be related to CKD etiology and to disease-associated alterations such as dyslipidemia.

KEY WORDS: Cytokines, Chemokines, MCP-1/CCL2, Biological Markers, Inflammation, Chronic Kidney Disease

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD), defined as the presence of kidney damage determined by structural or functional abnormalities and impaired glomerular filtration rate (GFR), has a significant impact on children [1-2]. In the last report of the National Institutes of Health (NIH) task force on research priorities in chronic kidney disease in children, Chesney *et al.* [3] pointed out the need for research in secondary prevention efforts in order to identify CKD patients at early stages in the natural history of the disease and to observe which group will progress faster. Identification of modifiable risk factors or novel biological markers of CKD in children will help decrease the burden of CKD and may yield further insights into the treatment before the onset of multiple co-morbidities.

In this regard, inflammation emerges as an independent predictor factor of mortality in CKD patients [4-8]. Among inflammatory mediators, many studies have been indicating a role for cytokines in CKD pathogenesis [9-11]. Cytokines are a group of proteins produced by several kinds of cells that function as soluble mediators with intercellular signaling functions [12]. 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—the word “chemokine” is a contraction of the terms “chemoattractant” and “cytokine” [13-15].

A cytokine that is often associated with the progression of kidney disease is transforming growth factor-beta (TGF- β 1) [16-18], which exhibits fibrogenic and pro-inflammatory properties in the kidney [19]. Our research group have recently reported an elevation in spot-urine TGF- β 1 measurements in patients with reduced DMSA-scan uptake due to urinary tract malformations, suggesting a potential role for this cytokine in the fibrogenesis process of congenital nephrouropathies [20]. One of the actions of TGF-

β 1 is to induce the accumulation of monocytes and stimulation of fibroblasts by increasing the expression of the C–C chemokine named monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) [17]. Studies have found increased levels of MCP-1/CCL2 in glomerular diseases, allograft rejection and interstitial nephritis [15, 21]. Another inflammatory mediator of interest is interleukin-8 (IL-8/CXCL8), a chemokine produced by endothelial cells and macrophages that attracts neutrophils and lymphocytes to the inflammation site [17, 21]. Our group and others have suggested its involvement in the pathogenesis of proteinuria in nephrotic syndrome [22-23]. Therefore, this study aimed to evaluate urinary levels of these cytokines in children and adolescents with pre-dialysis CKD as an attempt to identify non-invasive biomarkers possibly related to the primary etiology of CKD or other disease-associated alterations.

SUBJECTS AND METHODS

Study Design

The present cross-sectional study included children and adolescents with conservatively managed CKD patients, followed-up at the Pediatric Nephrology Unit of our institution from 2009 to 2010. Diagnostic criteria for CKD were based on the National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Practice classification [24].

Inclusion and exclusion criteria

After informed consent, this study initially included all children and adolescents with conservatively managed CKD at stages 2 to 4 that were followed-up at our institution from 2009 to 2010. Children and adolescents that refused to participate, those without a well-defined etiology for CKD and with other chronically affected major systems were automatically excluded from the study. Patients with acute illness (infections or clinical instabilities, for instance) were not scheduled for urine collection during the period of the

acute disease. Therefore, eleven patients with CKD due to glomerular diseases and 31 patients with CKD secondary to congenital urinary tract malformations were studied.

Ethical Aspects

The Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais approved the study. Informed consent was obtained from the parents and, when appropriate, also from the patients included in the study. The research protocol did not interfere with any medical recommendations or prescriptions. Urine samples were only drawn simultaneously to other routine urine exams. The follow-up of the CKD patients was guaranteed even in cases of refusal to participate in the study.

Study Protocol

We allocated CKD patients into two groups according to etiology of CKD. The groups were: patients with a glomerular disease confirmed by renal biopsy (n=11), and patients with congenital urinary tract malformations confirmed by image evaluation (n=31). The age limits were from two to 18 years. Urine samples for the cytokines and chemokines analyses were drawn simultaneously to other routine urine exams. Other blood and urine tests were already part of the routine protocol for conservatively managed CKD patients at our Pediatric Nephrology Unit, as detailed described elsewhere [25-26]. After the initial investigation, patients were followed according to a systematic protocol. The visits were scheduled at intervals of approximately 3 months, and a complete physical examination was performed on each occasion and included measurement of blood pressure, height, weight and calculation of body mass index (BMI). Laboratory evaluation was also performed at approximately 3-month intervals, depending on the clinical condition of each patient. Glomerular filtration rate was estimated at each medical visit by adopting

the original Schwartz formula [27] and the recently modified Schwartz formula [28]. Conditions associated with CKD, such as anemia, hypertension, acidosis, renal osteodystrophy, and malnutrition were carefully managed during conservative treatment. The prescribed diet provided at least 100% of the estimated average requirement for energy for chronological age and at least 100% of the reference nutrient intake for protein for height age, based on the dietary reference values for a general population [29]. Supplements of electrolytes, vitamin D and erythropoietin were given according to blood tests and standard recommendations [30-31]. Antihypertensive drugs were used for patients with blood pressure persistently above the 95th percentile [32].

Clinical Characteristics and Casual Measurements

Clinical characteristics, casual measurements and laboratorial tests were evaluated at the same time of urine collection for the measurements of immune mediators by reviewing medical records or at medical visit. The clinical variables analyzed were gender, age, etiology and stage of CKD, height, weight, BMI, systolic and diastolic blood pressure. Concerning laboratorial tests, serum levels of creatinine, hemoglobin, albumin, cholesterol, triglycerides, total calcium, phosphorus, bicarbonate, parathormone (PTH) and uric acid were analyzed. Estimated GFR was calculated by Schwartz formula [27] and also by the recently modified Schwartz formula [28]. The stage of CKD was based on this calculation [24]. Blood pressure was classified as normal blood pressure, pre-hypertension and hypertension according to the Forth Task Force guidelines [32]. Cole's classification was adopted to evaluate BMI [33]. The protein:creatinine ratio in spot-urine was used as an screening test for proteinuria, which was classified as present (protein: creatinine ratio > 0.20) or absent (protein: creatinine ratio ≤ 0.20) [34].

Urine Sampling

After informed consent, all subjects were submitted to urine collection for the measurement of immune mediators. Urine sampling occurred at only one occasion, simultaneously to other routine exams. A single urine sample was collected from 7.30 AM to 9.00 AM into sterile dry tubes, which were immediately placed on ice and transported to our research laboratory. The centrifugation procedures and the storage of urine samples occurred almost immediately after urine collection. A total of 10 mL of the collected urine were centrifuged at 4°C for 20 min at 1300 g. Cell-free urine was aliquoted into 0.5 mL tubes and stored at 80°C until the measurements.

Cytokines measurement

Urinary levels of MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8 and TGF- β 1 were measured by specific enzyme-linked immunoassay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN), following the manufacturer's instructions, as described elsewhere [22]. Urine cytokine levels were expressed as absolute concentrations (pg/ml) as well as concentrations standardized for urine creatinine measured in the same spot urine and expressed as pg/mg cr. All samples were assayed in duplicate at a single assay to avoid interassay variation. Our intra-assay variation for the ELISA measurements was below 3%. For measurement of TGF- β 1, we used a Quantikine kit (R&D Systems, Minneapolis, MN), and the samples were activated before the assay. The detection limits were 6 pg/mL for TGF- β 1, 5 pg/mL for MCP-1/CCL2 and 6 pg/mL for IL-8/CXCL8.

Statistical Analysis

The software SPSS, release 18.0 (Chicago, IL, USA), and GraphPad Prism, release 5.0 (USA), were used for statistical analysis. Values were expressed as medians or means and standard deviation, when appropriate. The normality of the distribution was evaluated by the Shapiro Wilk test for each group. Unpaired student t test was used for mean comparisons, while the Mann Whitney and Kruskal Wallis tests were used to compare medians between two and three or more groups, respectively. Pearson and Spearman tests were used to evaluate correlations. The level of significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

A total of 42 CKD patients were included in the analysis and divided into two groups according to the primary etiology of renal disease. Of 42 children and adolescents, 11 had glomerular disease (Group 1) and 31 had CKD secondary to congenital urinary tract malformations (Group 2). The causes of glomerular disease were focal segmental glomerulosclerosis (n=7), mesangioproliferative glomerulopathy (n=2), diffuse mesangial sclerosis (n=1) and membranoproliferative glomerulopathy (n=1). Urinary tract malformations included vesicoureteral reflux (n=15), posterior urethral valve (n=11), and ureteropelvic junction obstruction (n=5). The main clinical, demographical and laboratorial characteristics of patients are depicted in Table 1. Both groups were comparable concerning the majority of characteristics, except for gender, total serum cholesterol levels, serum albumin and the use of renin angiotensin system (RAS) inhibitors. As expected, males were predominant in the group of patients with urinary tract malformations (group 2). In this way, patients with glomerular diseases (group 1) presented lower serum albumin levels and higher total serum cholesterol concentration

than group 2 (table 1). Serum triglyceride levels showed a tendency to be higher in group 1 ($p=0.07$). Almost all CKD patients of group 1 ($n=9$, 82%) were under treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) and/ or angiotensin receptor blockers (ARB) at the time of urine collection. On the other hand, in group 2, only 11 patients (35%) were receiving these drugs at the time of urine sampling ($p<0.05$, table 1).

Table 1

Urinary levels of IL-8/CXCL8, TGF- β 1 and MCP-1/CCL2 according to primary etiology of CKD

The absolute urinary concentrations of IL-8/CXCL8 and TGF- β 1 and the concentrations standardized for creatinine in both groups are shown in Table 2. No significant differences were detected between all comparisons in these groups.

Table 2

On the other hand, absolute urinary concentrations of MCP-1/CCL2 were significantly higher in patients with glomerular diseases [409.8 (0-3076) pg/ml] if compared to the group of urinary tract malformations [64.2 (0-261.7) pg/ml], $p<0.05$, Figure 1A]. However, when the concentrations of MCP-1/CCL2 were standardized for creatinine, the difference between both groups remained, but did not reach statistical significance [829.3 (0-2695) pg/mg cr in group 1 versus 236.6 (0-608.9) pg/mg cr in group 2, $p=0.11$, Figure 1B].

Figure 1A and 1B

Urinary levels of IL-8/CXCL8, TGF- β 1 and MCP-1/CCL2 according to CKD stage

As shown in table 3, the absolute urinary concentrations and the concentrations standardized for creatinine of TGF- β 1, IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 were not significantly different according to CKD stage based on estimated GFR by Schwartz formula (27). No differences in cytokine measurements were also obtained by adopting the recently modified Schwartz formula (28) to classify CKD stages (data not shown).

Table 3

Urinary levels of IL-8/CXCL8, TGF- β 1 and MCP-1/CCL2 according to the use of RAS blockers, the presence of hypertension and the detection of proteinuria.

No differences were observed in urinary cytokine levels (both absolute and standardized for creatinine) when patients receiving or not ACEIs and/ or ARBs were compared (table 4). Likewise, no significant differences were detected in urinary cytokine levels (both absolute and standardized for creatinine) when analyzing patients with controlled versus uncontrolled arterial hypertension. Similarly, urinary cytokine measurements did not significantly differ in CKD patients with versus without proteinuria at the time of urine collection (table 4).

Table 4

Association of IL-8/CXCL8, TGF- β 1 and MCP-1/CCL2 urinary levels with clinical features in patients with glomerular diseases (group 1)

The absolute urinary concentrations and the concentrations standardized for creatinine of MCP-1/CCL2 were negatively correlated with serum albumin levels in group 1 ($p=0.047$ and $p=0.038$, respectively, table 5). On the other hand, only urinary

MCP-1/CCL2 concentrations standardized for creatinine were positively correlated with serum total cholesterol ($p=0.003$) and triglycerides ($p=0.003$, table 5).

Urinary IL-8/CXCL8 concentrations (absolute and standardized for creatinine) were positively correlated with BMI z-score ($p<0.05$, for both correlations, table 5). No other significant correlations were found between urinary cytokines and clinical features in this group (table 5).

Table 5

Association of IL-8/CXCL8, TGF- β 1 and MCP-1/CCL2 urinary levels with clinical features in patients with urinary tract malformations (group 2)

Both absolute and standardized for creatinine levels of IL-8/CXCL8 were negatively correlated with estimated GFR, despite the used formula (table 6). GFR was estimated by conventional Schwartz formula [27] as well as by the modified formula recently proposed for CKD patients [28]. It should be mentioned these two formulas were highly correlated in our CKD series (Pearson r coefficient=0.98, $p<0.0001$).

In contrast to group 1, serum triglycerides were negatively correlated to MCP-1/CCL2 levels both absolute and standardized for creatinine ($p<0.05$, table 6). No other significant correlations were found between urinary cytokines and clinical features (table 6).

Table 6

DISCUSSION

Recent studies have shown strong clinical and epidemiological evidence supporting an association between inflammation and the progression of CKD or the occurrence of clinical complications [8, 35-36]. Therefore, this study aimed to evaluate

urinary levels of cytokines in children and adolescents with CKD stage 2 to 4 as an attempt to identify non-invasive biomarkers possibly related to the primary etiology of CKD or other disease-associated alterations. Our results showed that urinary levels of MCP-1/CCL2 were higher in CKD patients with glomerular diseases if compared to cases of urinary tract malformations. Furthermore, urinary cytokine excretion seemed to be associated to diverse clinical and laboratorial features, according to primary CKD etiology. Taken together, these findings indicate that differences in urinary cytokine concentrations might be related to the pathogenesis of CKD and to other disease-associated alterations, such as dyslipidemia.

To our best knowledge, there is very little information available concerning the role of TGF- β 1, IL-8/CXCL8 and MCP-1/CCL2 in pediatric patients with CKD. In this regard, Grenda *et al.* showed that children with CKD exhibit significantly elevated urinary excretion of TGF- β 1 in comparison to healthy children and the levels of this cytokine were most enhanced in patients with obstructive uropathies [37]. Other studies also supported a role for TGF- β 1 in the fibrogenic process of urinary tract malformations [20, 36, 38]. Regarding IL-8/CXCL8, many studies have found elevated urinary excretion of this chemokine in acute pyelonephritis [39-41], VUR [42-43] and glomerular diseases [22-23]. However, none of them included CKD patients at stages 2 to 4. In our study, no significant differences in urinary TGF- β 1 and IL-8/CXCL8 levels were found in the comparison between CKD patients with glomerular diseases and with urinary tract malformation. A possible explanation for this finding could be a similar expression of both mediators despite the primary etiology of CKD.

On the other hand, our findings with MCP-1/CCL2 suggest a role for this chemokine in glomerular diseases. Other studies have also associated this chemokine to glomerulopathies and tubulointerstitial lesions [44-45]. Wada and co-workers found urinary MCP-1/CCL2 levels significantly elevated in adult patients with diabetic

nephropathy and advanced tubulointerstitial lesions, whereas serum MCP-1/CCL2 levels remained similar to those of healthy volunteers [44]. Furthermore, these authors detected MCP-1-positive cells in renal interstitium of patients with diabetic nephropathy [44]. Patients with active proteinuric forms of chronic glomerulonephritis have higher urine excretion of MCP-1/CCL2 and of TGF- β 1 than healthy controls [45]. The highest levels of urinary MCP-1/CCL2 were detected in patients with persistent renal failure and a correlation between MCP-1/CCL2 and the severity of tubulo-interstitial fibrosis was also found [45]. Accordingly, within the glomeruli, it was detected MCP-1/CCL2 overexpression in both crescent glomerulonephritis and nephrotic conditions [46-47]. Adult patients with immunoglobulin A (IgA) nephropathy also exhibited increased urinary levels of MCP-1/CCL2 when compared to healthy controls [48]. In pediatric lupus nephritis, it was recently shown that increased urinary, but not plasma, MCP-1/CCL2 levels correlated well with disease activity [49].

MCP-1/CCL2 is a potent mononuclear cell chemoattractant produced by a variety of mesenchymal cells, including glomerular cells [50]. Local recruitment of monocytes is considered the predominant mechanism by which MCP-1/CCL2 contributes to the renal damage; however, CCR2 expression has been demonstrated in other cell types, both *in vitro* [51] and *in vivo* [52], indicating that the MCP-1/CCR2 system has other effects beyond monocyte accrual. Notably, MCP-1/CCL2 binding to the CCR2 receptor induces both chemotaxis and proliferation in epithelial, endothelial, and vascular smooth muscle cells [50], suggesting a role of the MCP-1/CCR2 system in conferring a proliferative and migratory phenotype in cells other than monocytes. Consequently, we hypothesized that the association between MCP-1/CCL2 and glomerular diseases could be related not only to the glomerular injury *per se* but also to other disease-associated alterations such as proteinuria, hypertension and dyslipidemia. When our patients with glomerular diseases

were compared to cases of urinary tract malformation, it was found significant differences in serum albumin and serum cholesterol concentrations. However, the occurrence of increased protein:creatinine ratio and of uncontrolled hypertension did not reach statistical difference in the comparison between both groups. Therefore, we have checked the correlation between all cytokine measurements and the presence of uncontrolled hypertension and of elevated protein:creatinine ratio in the whole group of CKD patients. Nor the presence of uncontrolled hypertension neither the detection of elevated protein:creatinine ratio at the time of urine sampling associated to changes in urinary excretion of MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8 and TGF- β 1.

In contrast, when patients with glomerular diseases were separated from cases of urinary tract malformations, it was found positive correlations between urinary MCP-1/CCL2 and serum lipid profile (total cholesterol and triglycerides) and between IL-8/CXCL8 and BMI z-score. In this regard, it is well known that cellular lipid overload, or “lipotoxicity,” is a well-documented phenomenon that contributes to organ dysfunction, including renal disease [53]. MCP-1/CCL2 can be produced by adipose tissue and/or inflammatory cells, reaching increased levels in patients with the metabolic syndrome [50, 54]. This chemokine also contributes to insulin resistance, promotes free fatty acid uptake by cells, increases lipoprotein levels, and promotes atherogenesis and thrombogenesis [50, 54], effects that may directly or indirectly affect renal structure and function. Increased IL8/CXCL8 levels have been recently found in overweight children if compared to healthy controls [55]. These findings suggest that a complex interaction between leukocyte recruitment and obesity-related alterations probably play a role toward the progression of CKD in glomerular diseases.

Another intriguing result is the detection of a negative correlation between urinary MCP-1/CCL2 and serum albumin. One possibility is that reduced albumin was directly

associated with heavy proteinuria. Thus, the real connection would be between MCP-1/CCL2 and urinary protein excretion. Indeed, immunohistochemistry studies have shown that glomerular podocytes are the predominant glomerular cell type overexpressing MCP-1/CCL2 in various proteinuric conditions, such as diabetic, hypertensive, and membranous nephropathies [46, 56]. In addition, other studies have shown that blockade/loss of MCP-1/CCL2 has antiproteinuric effects in both experimental diabetic nephropathy [57] and crescentic glomerulonephritis [58], also suggesting a link between MCP-1/CCL2 and proteinuria. Unfortunately, we were not able in supporting this hypothesis since we did not measure 24-hour urinary protein excretion at the same time of cytokine measurements in the majority of our patients. In addition, previous immunosuppression, the current use of RAS inhibitors and primary disease activity might also interfere with cytokine measurements. An alternative explanation for the negative correlation between albumin and MCP-1/CCL2 could be related to the possibility that reduced albumin indicated a compromised nutritional status rather than urinary protein loss. In this regard, it is well established that malnourished patients have an exacerbated inflammatory response [59-60]. As a result, urinary excretion of inflammatory mediators, such as MCP-1/CCL2, might be increased. Although this possibility is unlikely since weight for-age and height-for-age z scores remained similar in both groups of our CKD patients, as previously reported [25].

The urinary cytokine profile in patients with congenital urinary tract malformation was different. These patients showed negative correlations between estimated GFR and IL-8/CXCL8, while MCP-1/CCL2 and TGF- β 1 measurements were not correlated with this parameter. IL-8/CXCL8 is a chemokine produced by epithelial cells of the renal tract in response to inflammatory stimuli and has been shown to increase during acute urinary tract infection (UTI) [39-41]. In addition, Galanakis and co-workers presented convincing

evidence that urine IL-8 concentrations remain elevated in infants with VUR even in the absence of UTI and that a cutoff of 5 pg/mol IL-8/CXCL8 standardized for creatinine was of high sensitivity and adequate specificity for diagnosing VUR [42]. Their findings additionally suggest that the chronic inflammatory cell infiltrate associated with reflux nephropathy rather than VUR itself might offer an explanation for the secretion of IL-8/CXCL8 [42]. Recent studies confirmed a relation between urinary IL-8/CXCL8 levels and the development of renal parenchyma scarring [41, 43]. Sheu and co-workers reported that children younger than 2 years of age with the highest IL-8/CXCL8 concentrations during the acute phase of pyelonephritis as well as children with reflux grades III or greater were at a high-risk for developing renal scarring in the future [41]. Accordingly, urinary IL-8/CXCL8 was significantly higher in patients with renal scarring than in those without scars and there was a significant correlation between this chemokine concentrations and renal scar grade [43]. Therefore, our findings also suggest that the decline of GFR in CKD patients with urinary tract malformation might be related to renal scarring, acute pyelonephritis episodes and renal inflammation elicited by local release of IL-8/CXCL8.

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, the present and previous treatment of primary renal disease and the disease activity at the time of urine collection 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 with very low intra-assay variability [20, 22].

In conclusion, urinary cytokine measurements seemed not to be very useful in distinguishing the primary etiology of CKD, but the profile of urinary excreted cytokines might be related to disease-associated alterations. Increased concentrations of MCP-1/CCL2 were associated to dyslipidemia and hypoalbuminemia, which are laboratorial characteristics of glomerular diseases. This finding might suggest a link between monocyte recruitment and the physiopathological changes observed in glomerulopathies. On the other hand, high urinary IL-8/CXCL8 levels were correlated to the decline of GFR in patients with urinary tract malformations, thus suggesting that the local release of this chemokine might contribute to renal parenchyma damage and the progression of CKD. Further longitudinal and prospective studies are needed to investigate the role of cytokine measurements in the progression of CKD.

5.1. REFERENCES

1. Warady BA, Chadha V (2007) Chronic kidney disease in children: the global perspective. *Pediatr Nephrol* 22:1999-2009.
2. Mak RH (2007) Chronic kidney disease in children: state of the art. *Pediatr Nephrol* 22:1687-1688.
3. Chesney RW, Brewer E, Moxey-Mims M, Watkins S, Furth SL, Harmon WE, Fine RN, Portman RJ, Warady BA, Salusky IB, Langman CB, Gipson D, Scheidt P, Feldman H, Kaskel FJ, Siegel NJ (2006) Report of an NIH task force on research priorities in chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* 21:14-25.
4. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Lindholm B, Riella MC, Stenvinkel P (2002) Inflammation, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: a global perspective. *Blood Purif* 20:454-458.
5. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P (2002) The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant* 17 Suppl 11:28-31.
6. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C (1999) Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 55:648-658.
7. Suliman ME, Stenvinkel P (2008) Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 19:329-345.
8. Cheung WW, Paik KH, Mak RH (2010) Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 25:711-724.
9. Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Kokubo S, Kobayashi M, Takasawa K, Takeda S, Yoshimura M, Kaneko S, Wada T

- (2010) Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Hum Pathol* 41:672-678.
10. Eardley KS, Kubal C, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Savage CO, Howie AJ, Kaur K, Cooper MS, Adu D, Cockwell P (2008) The role of capillary density, macrophage infiltration and interstitial scarring in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Kidney Int* 74:495-504.
 11. Agarwal R (2003) Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F863-869.
 12. Abbas AK LA (2003) Cytokines. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders, Elsevier Science 5th Edition 243-274.
 13. Gerard C, Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-115.
 14. Mackay CR (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2:95-101.
 15. Segerer S (2003) The role of chemokines and chemokine receptors in progressive renal diseases. *Am J Kidney Dis* 41:S15-18.
 16. Liu Y (2006) Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69:213-217.
 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. Harris RC, Neilson EG (2006) Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med* 57:365-380.
 19. Border WA, Noble NA (1997) TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51:1388-1396.
 20. Vasconcelos MA, Bouzada MC, Silveira KD, Moura LR, Santos FF, Oliveira JM, Carvalho FF, Teixeira MM, Simões e Silva AC, Oliveira EA (2011) Urinary levels of TGF β -1 and of cytokines in patients with prenatally detected nephrouropathies. *Pediatric Nephrology* in press.
 21. Mukaida N, Harada A, Matsushima K (1998) Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:9-23.
 22. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, Simoes e Silva AC (2008) Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res* 64:637-642.
 23. Garin EH (2000) Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 14:872-878.
 24. Hogg RJ, Furth S, Lemley KV, Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, Balk E, Lau J, Levin A, Kausz AT, Eknoyan G, Levey AS (2003) National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification. *Pediatrics* 111:1416-1421.
 25. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Silva JM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, Simoes e Silva AC, Oliveira EA (2008) Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. *Pediatr Nephrol* 23:2039-2046.
 26. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, Simoes e Silva AC, Oliveira EA (2009) Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant* 24:848-855.
 27. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A (1976) A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 58:259-263.
 28. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, Furth SL (2009) New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:629-637.
 29. (2003) Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Planning THE NATIONAL ACADEMIES PRESS

30. Levin A, Rocco MV (2006) KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for anemia in chronic kidney disease - Foreword. *American Journal of Kidney Diseases* Vol: 47 S9 - S145.
31. Langman CB, Salusky IB (2005) K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children with Chronic Kidney Disease - Foreword. *American Journal of Kidney Diseases* Vol: 46 S6 - S121.
32. (2004) The fourth report on the diagnosis, evaluation, and treatment of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 114:555-576.
33. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 320:1240-1243.
34. Leung AK, Wong AH (2010) Proteinuria in children. *Am Fam Physician* 82:645-651.
35. Hunley TE, Ma LJ, Kon V (2010) Scope and mechanisms of obesity-related renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19:227-234.
36. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC (2010) Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol* 25:687-697.
37. Grenda R, Wuhl E, Litwin M, Janas R, Sladowska J, Arbeiter K, Berg U, Caldas-Afonso A, Fischbach M, Mehls O, Sallay P, Schaefer F (2007) Urinary excretion of endothelin-1 (ET-1), transforming growth factor- beta1 (TGF- beta1) and vascular endothelial growth factor (VEGF165) in paediatric chronic kidney diseases: results of the ESCAPE trial. *Nephrol Dial Transplant* 22:3487-3494.
38. Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K (2009) Urinary transforming growth factor beta1 in children and adolescents with congenital solitary kidney. *Pediatr Nephrol* 24:753-759.
39. Zaki Mel S (2008) Interleukin 8 is a surrogate marker for rapid diagnosis of bacteriuria. *Immunol Invest* 37:694-703.
40. Mohkam M, Karimi A, Karimi H, Sharifian M, Armin S, Dalirani R, Abdollah Gorgi F (2008) Urinary interleukin-8 in acute pyelonephritis of children: a before-after study. *Iran J Kidney Dis* 2:193-196.
41. Sheu JN, Chen SM, Meng MH, Lue KH (2009) The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *Pediatr Infect Dis J* 28:885-890.
42. Galanakis E, Bitsori M, Dimitriou H, Giannakopoulou C, Karkavitsas NS, Kalmanti M (2006) Urine interleukin-8 as a marker of vesicoureteral reflux in infants. *Pediatrics* 117:e863-867.
43. Gokce I, Alpay H, Biyikli N, Unluguzel G, Dede F, Topuzoglu A (2010) Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in patients with vesicoureteral reflux and renal parenchymal scar. *Pediatr Nephrol* 25:905-912.
44. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Takeda SI, Takasawa K, Yoshimura M, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Naito T, Matsushima K, Yokoyama H (2000) Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 58:1492-1499.
45. Bobkova IN, Chebotareva NV, Kozlovskaya LV, Varshavskii VA, Golitsyna EP (2006) [Urine excretion of a monocytic chemotactic protein-1 and a transforming growth factor beta1 as an indicator of chronic glomerulonephritis progression]. *Ter Arkh* 78:9-14.
46. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, van Es LA, Daha MR, Bruijn JA (1995) Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clin Nephrol* 44:148-155.
47. Eddy AA, Warren JS (1996) Expression and function of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental nephrotic syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 78:140-151.
48. Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A, Pantzaki A, Bantis C, Dovas S, Economidou D, Leontsini M, Memmos D (2009) Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 14:613-620.

49. Marks SD, Shah V, Pilkington C, Tullus K (2010) Urinary monocyte chemoattractant protein-1 correlates with disease activity in lupus nephritis. *Pediatr Nephrol* 25:2283-2288.
50. Yadav A, Saini V, Arora S (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 411:1570-1579.
51. Giunti S, Pinach S, Arnaldi L, Viberti G, Perin PC, Camussi G, Gruden G (2006) The MCP-1/CCR2 system has direct proinflammatory effects in human mesangial cells. *Kidney Int* 69:856-863.
52. Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RA (1999) Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int* 56:135-144.
53. Wahba IM, Mak RH (2007) Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2:550-562.
54. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2548-2556.
55. Tam CS, Garnett SP, Cowell CT, Heilbronn LK, Lee JW, Wong M, Baur LA (2010) IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. *Horm Res Paediatr* 73:128-134.
56. Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Tesch GH (2004) Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney Int* 65:116-128.
57. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int* 69:73-80.
58. Lloyd CM, Dorf ME, Proudfoot A, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC (1997) Role of MCP-1 and RANTES in inflammation and progression to fibrosis during murine crescentic nephritis. *J Leukoc Biol* 62:676-680.
59. Silverstein DM (2009) Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol* 24:1445-1452.
60. Kalantar-Zadeh K, Stenvinkel P, Pilon L, Kopple JD (2003) Inflammation and nutrition in renal insufficiency. *Adv Ren Replace Ther* 10:155-169.

Table 1 – Clinical and laboratorial characteristics of chronic kidney disease patients according to the primary etiology: glomerular disease (group 1) and urinary tract malformation (group 2)

	Group 1 (n=11)	Group 2 (n=31)	P*
Gender (male) (%)	45.4	77.41	0.040
Age (months)	157 (126-193)	130 (108-182)	0.350
eGFR [#] (ml/min/1.73m ²)	47 (30-80)	42 (26-60)	0.320
eGFR ^{##} (ml/min/1.73m ²)	38 (22-63)	34 (16-46)	0.586
Hemoglobin (g/dL)	12.0 ± 2.08	12.3 ± 1.50	0.512
Total cholesterol (mg/dL)	215 (195-476)	168 (147-201)	0.001
Triglycerides (mg/dL)	128 (96-233)	99 (78-139)	0.07
Uric acid (mg/dL)	5.95 ± 1.88	6.63 ± 1.46	0.266
Phosphorus (mg/dL)	5.4 (4.5-6.7)	4.9 (4.5-5.2)	0.390
PTH (pg/ml)	142 (57-332)	105 (45-205)	0.337
Bicarbonate (mEq/L)	21.95 ± 5.66	23.81 ± 2.86	0.390
Serum albumin (g/dL)	3.3(1.5-4.1)	4.3 (4.1-4.7)	<0.001
Hypertension (%)	5 (45.4)	6 (19.3)	0.090
Presence of proteinuria (%)	9 (81.8)	22 (70.9)	0.481
Use of RAS blockers (%)	9 (81.8)	11 (35.5)	0.008

Values are expressed as means ± standard deviation, as median and 1st and 3rd quartiles or percentages (%) between brackets.

*Unpaired t test was used for mean comparisons and chi-square test to compare percentages.

[#] Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to conventional Schwartz formula [27]

^{##} Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to recently modified Schwartz formula [28]

Table 2 – Median and interquartile range of absolute and standardized to creatinine urinary IL-8/CXCL8 and TGF- β 1 levels in patients with glomerular diseases (group 1) and urinary tract malformations (group 2).

	Group 1 (n=11)	Group 2 (n=31)	P
IL-8 (pg/mL)	0.00 (0.00-5.94)	0.00 (0.00-26.54)	0.801
IL-8 (pg/mg cr)	0.00 (0.00-5.87)	0.00 (0.00-169.93)	0.666
TGF- β 1 (pg/mL)	0.00 (0.00-26.37)	0.00 (0.00-1.61)	0.719
TGF- β 1 (pg/mg cr)	0.00 (0.00-6.62)	0.00 (0.00-0.90)	0.895

Table 3 - Median and interquartile range of absolute and standardized to creatinine urinary IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and TGF- β 1 levels in patients with chronic kidney disease (CKD) stratified according to CKD stage based on Schwartz formula (27).

	Stage 2 (n=12)	Stage 3 (n=19)	Stage 4 (n=11)	P
IL-8 (pg/mL)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-26.54)	0.00 (0.00-242.90)	0.17
IL-8 (pg/mg cr)	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-30.38)	0.00 (0.00-890.50)	0.18
MCP-1 (pg/ml)	72.45 (0.00-372.8)	113.60 (0.00-344.00)	97.13 (0.00-344.00)	0.88
MCP-1 (pg/mg cr)	151.50 (0.00-704.10)	356.50 (0.00-998.50)	219.80(0.00-593.50)	0.70
TGF- β 1 (pg/mL)	0.00 (0.00-2.07)	0.00 (0.00-2.02)	0.00 (0.00-5.83)	0.91
TGF- β 1 (pg/mg cr)	0.00 (0.00-2.17)	0.00 (0.00-0.60)	0.00 (0.00-14.37)	0.81

Multiple median comparisons were made by Kruskal Wallis test followed by Dunn's post test

Table 4 - Median and interquartile range of absolute and standardized to creatinine urinary IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 and TGF- β 1 levels in patients with chronic kidney disease (CKD) stratified according to the use of renin angiotensin system (RAS) blockers, the presence of hypertension and proteinuria.

Cytokines	Parameters	Median (p25-p75)	P
	Hypertension		
MCP-1 (pg/ml)	Present (n=11)	80.68 (0.00-442.70)	0.51
	Absent (n=30)	88.91 (0.00-278.20)	
MCP-1 (pg/mg cr)	Present (n=11)	244.80 (0.00-1133)	0.59
	Absent (n=29)	268.60 (0.00-664.90)	
IL-8 (pg/ml)	Present (n=11)	0.00 (0.00-5.94)	0.89
	Absent (n=30)	0.00 (0.00-17.77)	
IL-8 (pg/mg cr)	Present (n=11)	0.00 (0.00-5.87)	0.96
	Absent (n=29)	0.00 (0.00-13.48)	
TGF- β 1 (pg/ ml)	Present (n=11)	0.00 (0.00-5.83)	0.80
	Absent (n=30)	0.00 (0.00-1.71)	
TGF- β 1 (pg/mg cr)	Present (n=11)	0.00 (0.00-12.58)	0.69
	Absent (n=29)	0.00 (0.00-0.90)	
	Proteinuria		
MCP-1 (pg/ml)	Present (n=31)	146.50 (0.00-409.80)	0.29
	Absent (n=10)	64.22 (0.00-146.50)	
MCP-1 (pg/mg cr)	Present (n=30)	325.20 (0.00-843.40)	0.40
	Absent (n=9)	66.30 (0.00-536.90)	
IL-8 (pg/ml)	Present (n=31)	0.00 (0.00-0.00)	0.12
	Absent (n=10)	0.39 (0.00-519.70)	
IL-8 (pg/mg cr)	Present (n=31)	0.00 (0.00-0.00)	0.32
	Absent (n=9)	0.00 (0.00-101.90)	
TGF- β 1 (pg/ ml)	Present (n=31)	0.00 (0.00-2.22)	0.94
	Absent (n=10)	0.00 (0.00-2.49)	
TGF- β 1 (pg/mg cr)	Present (n=30)	0.00 (0.00-0.57)	0.84
	Absent (n=10)	0.00 (0.00-3.40)	
	Use of RAS blocker		
MCP-1 (pg/ml)	Yes (n=20)	179.40 (0.00-1628)	0.46
	No (n=22)	72.45 (0.00-331.60)	
MCP-1 (pg/mg cr)	Yes (n=19)	321.80 (0.00-885.60)	0.76
	No (n=21)	236.60 (0.00-664.90)	
IL-8 (pg/ml)	Yes (n=20)	0.00 (0.00-0.00)	0.07
	No (n=22)	0.00 (0.00-260.90)	
IL-8 (pg/mg cr)	Yes (n=20)	0.00 (0.00-0.00)	0.08
	No (n=21)	0.00 (0.00-451.90)	
TGF- β 1 (pg/ ml)	Yes (n=20)	0.00 (0.00-1.92)	0.72
	No (n=22)	0.00 (0.00-2.65)	
TGF- β 1 (pg/mg cr)	Yes (n=20)	0.00 (0.00-2.27)	0.68
	No (n=21)	0.00 (0.00-1.15)	

Table 5 – Correlations between clinical features and absolute urinary cytokine levels (pg/ml) and concentrations standardized to creatinine (pg/mg cr) in patients with glomerular diseases. P values are displayed between brackets and analyzed by Spearman correlation test.

	MCP-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/mg cr)	IL-8 (pg/ml)	IL-8 (pg/mg cr)	TGF- β 1 (pg/ml)	TGF- β 1 (pg/mg cr)
BMI z-score	0.0 (1.00)	-0.179 (0.597)	0.624 (0.04)*	0.624 (0.044)*	0.410 (0.210)	0.480 (0.135)
eGFR [#]	- 0.147 (0.667)	-0.384 (0.242)	0.029 (0.933)	0.028 (0.946)	0.116 (0.735)	0.139 (0.684)
eGFR ^{##}	-0.138 (0.687)	-0.334 (0.315)	-0.075 (0.826)	-0.075 (0.826)	0.040 (0.906)	0.087 (0.800)
Hemoglobin	-0.005 (0.989)	-0.403 (0.219)	0.235 (0.487)	0.234 (0.487)	0.443 (0.172)	0.385 (0.242)
Hematocrit	-0.083 (0.809)	-0.393 (0.231)	0.162 (0.634)	0.161 (0.634)	0.405 (0.217)	0.358 (0.279)
Albumin	-0.608 (0.047)*	-0.628 (0.038)*	0.351 (0.290)	0.350 (0.290)	-0.447 (0.168)	-0.389 (0.237)
Cholesterol	0.385 (0.242)	0.798 (0.003)*	0.075 (0.826)	0.075 (0.826)	-0.017 (0.960)	0.145 (0.672)
Triglycerides	-0.014 (0.968)	0.795 (0.003)*	-0.368 (0.266)	-0.367 (0.265)	-0.388 (0.238)	-0.249 (0.460)
Uric acid	-0.122 (0.754)	-0.504(0.166)	0.529 (0.143)	0.529 (0.143)	0.391 (0.298)	0.437 (0.239)
PTH	-0.072 (0.878)	-0.151 (0.745)	0.178 (0.702)	0.178 (0.702)	0.204 (0.661)	0.204 (0.661)

[#] Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to conventional Schwartz formula [27]

^{##} Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to recently modified Schwartz formula [28]

*p<0.05 (Spearman correlation test)

Table 6 – Correlations between clinical features and absolute urinary cytokine levels (pg/ml) and concentrations standardized to creatinine (pg/mg cr) in patients with urinary tract malformations. P values are displayed between brackets and analyzed by Spearman correlation test.

	MCP-1 (pg/ml)	MCP-1 (pg/mg cr)	IL-8 (pg/ml)	IL-8 (pg/mg cr)	TGF- β 1 (pg/ml)	TGF- β 1 (pg/mg cr)
BMI z-score	-0.051 (0.790)	-0.087(0.646)	-0.044 (0.819)	-0.059 (0.758)	-0.019 (0.922)	0.048 (0.804)
eGFR [#]	-0.058 (0.756)	-0.124 (0.504)	-0.401 (0.025)*	-0.357 (0.049)*	-0.119 (0.524)	-0.181 (0.338)
eGFR ^{##}	0.030 (0.874)	-0.059 (0.751)	-0.357 (0.048)*	-0.362 (0.045)*	-0.211 (0.253)	-0.171 (0.367)
Hemoglobin	0.010 (0.957)	-0.068 (0.713)	-0.023 (0.901)	-0.189 (0.309)	-0.112 (0.547)	0.017 (0.931)
Hematocrit	-0.027 (0.885)	-0.082 (0.658)	0.00 (0.999)	-0.165 (0.375)	-0.023 (0.903)	0.063 (0.740)
Albumin	-0.225 (0.233)	-0.191 (0.311)	-0.228 (0.226)	-0.204 (0.280)	-0.097 (0.612)	-0.182 (0.345)
Cholesterol	-0.099 (0.595)	-0.080 (0.666)	-0.127 (0.496)	-0.104 (0.576)	-0.348 (0.055)	-0.299 (0.108)
Triglycerides	-0.468 (0.008)*	-0.452 (0.010)*	-0.099 (0.596)	-0.091 (0.627)	-0.011 (0.954)	-0.028 (0.883)
Uric acid	0.048 (0.810)	0.075(0.702)	0.068 (0.730)	0.076 (0.699)	0.116 (0.557)	0.021 (0.918)
PTH	0.015 (0.937)	0.094(0.626)	0.165 (0.392)	0.192 (0.319)	0.058 (0.767)	-0.051 (0.796)

[#] Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to conventional Schwartz formula [27]

^{##} Estimated glomerular filtration rate (eGFR) according to recently modified Schwartz formula [28]

*p<0.05 (Spearman correlation test)

Figure legend

Figure 1 - Comparison of absolute urinary MCP-1/CCL2 levels (pg/ml, panel A) and urinary MCP-1/CCL2 concentrations standardized for creatinine (pg/mg cr, panel B) in CKD patients with glomerular diseases (group 1) and with urinary tract malformation (group 2). * $p < 0.05$ (Mann Whitney test).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DRC apresenta crescente prevalência, em nosso país, e elevadas morbidade e mortalidade, sendo considerada um importante problema de saúde pública tanto pelas demandas e custos que gera ao setor de saúde, quanto pelo impacto sócio-econômico negativo para o paciente e seus familiares (1). O cenário da DRC na infância é ainda mais alarmante, uma vez que a doença compromete o crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes (2-5).

Apesar de ser foco de vários estudos nos últimos anos, a etiopatogenia da DRC é complexa e ainda pouco compreendida (6-7). Os achados atualmente disponíveis não permitem uma definição clara dos mecanismos envolvidos na progressão da DRC. Neste contexto, novos estudos são necessários para o conhecimento de fatores envolvidos na instalação e progressão da DRC, com o intuito de detectar marcadores prognósticos e, quem sabe, modificar sua história natural por meio de intervenções clínicas ou farmacológicas (8)

A progressão da DRC tem sido atribuída à ativação da resposta imuno-inflamatória (9-11). A participação de citocinas e quimiocinas tem sido sugerida na patogenia da DRC secundária às uropatias obstrutivas (12-13), doenças glomerulares (14-16), nefrites intersticiais (17) e também a episódios de rejeição no transplante renal (18-19). A inflamação também tem sido considerada fator de risco independente para a mortalidade na DRC (20-21).

O presente estudo mediu, em crianças e adolescentes portadores de DRC, os níveis urinários de MCP-1/CCL2, da IL-8/CXCL8 e TGF- β 1, mediadores imuno-inflamatórios com potencial envolvimento na instalação e evolução da doença renal (22-26). Além

disso, foram avaliadas possíveis associações entre os níveis urinários desses marcadores e parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes com DRC.

O MCP-1/CCL2 é uma quimiocina envolvida primordialmente no recrutamento de monócitos (27). Estudos experimentais associaram o recrutamento de monócitos à DRC (28-29). Nesse sentido, nosso estudo mostrou níveis urinários absolutos de MCP-1/CCL2 elevados, de forma significativa, nos pacientes com DRC secundária a doenças glomerulares, em comparação aos pacientes com DRC secundária a malformações do trato urinário. Os níveis urinários de IL-8/CXCL8 e TGF- β 1, tanto em níveis absolutos quanto relativos à creatinina urinária, não mostraram diferenças significativas conforme a etiologia da DRC. Foi possível verificar também que existe correlação negativa entre as concentrações urinárias de MCP-1/CCL2 (expressa em valores absolutos e relativos à creatinina) com a albumina sérica. Talvez essa correlação possa refletir uma associação entre aumento da excreção urinária de proteína e aumento da concentração de MCP-1/CCL2. No entanto, a proteinúria, analisada como variável dicotômica pela presença de alterações na relação proteína:creatinina (presente ou ausente), não se associou a diferenças em nenhum dos marcadores medidos. Contudo, por não ter sido possível avaliar se houve correlação entre as concentrações urinárias das citocinas e os níveis de proteína em amostras de urina de 24 horas, coletadas no mesmo momento, não se pode afastar o papel da proteinúria na ativação da resposta imuno-inflamatória e consequente progressão da DRC. A presença de albumina na urina pode aumentar a expressão de quimiocinas no túbulo proximal, incluindo a expressão de MCP-1/CCL2, através de mecanismo NF- κ B dependente (30-31). Outra possibilidade seria a associação entre a desnutrição, aqui refletida pela hipoalbuminemia, e inflamação. A desnutrição, inflamação e progressão da DRC e DCV são bem estabelecidas na literatura (21, 32).

Foi verificado anteriormente que níveis aumentados de colesterol podem contribuir para a produção de superóxido, que, por sua vez, é um dos fatores responsáveis pela disfunção renal observada em pacientes obesos (33). O estresse oxidativo, a inflamação e a disfunção endotelial favorecem a instalação da DRC (34). Tais alterações apresentam relação direta com aumento da mortalidade em pacientes com DRC (9, 21, 35). No presente estudo, níveis séricos de colesterol total e triglicérides mostraram correlação positiva com as concentrações urinárias de MCP-1/CCL2 corrigidas pela creatinina. Este achado está de acordo com a redução da excreção urinária de MCP-1/CCL2 após tratamento antioxidante em modelo animal de HAS e obesidade (34).

No mesmo grupo de pacientes portadores de DRC por doenças glomerulares, os níveis de IL-8/CXCL8, absolutos e relativos à creatinina urinária, mostraram correlação negativa e significativa com o escore Z de índice de massa corporal (IMC). Tal associação pode-se relacionar às complexas interações entre estresse oxidativo, inflamação e DRC (36). O acúmulo celular de lípidos gera toxicidade e consequente disfunção de órgãos, dentre eles os rins (36). Em crianças obesas, já foram detectados níveis aumentados de IL-8/CXCL8 em relação aos controles saudáveis (37).

A DCV é hoje a principal causa de morbidade e mortalidade em portadores de DRC (20, 38-39). Na população pediátrica, a DCV também é a principal causa de morte quando comparada a população geral pareada para idade (40-41). Neste contexto, considerando-se que a dislipidemia e a obesidade são fatores de risco para DCV (42-43), no grupo de pacientes com glomerulopatias, nossos achados apontam para um possível papel dessas alterações na fisiopatologia da doença.

Estudos anteriores mostraram o importante papel da IL-8/CXCL8 na indução de proteinúria e sugeriram mecanismos relacionados a alterações de componentes da

membrana basal glomerular (MBG) nas doenças essencialmente glomerulares (24-25). Em nosso estudo, a IL-8/CXCL8 não se associou a maioria dos parâmetros analisados nos pacientes com glomerulopatias. No entanto, para os pacientes com malformações do trato urinário, apenas a IL-8/CXCL8 apresentou correlação negativa com o RFG, ou seja, quanto mais baixo o RFG mais elevada a quimiocina. A IL-8/CXCL8 é quimiocina produzida por células epiteliais do trato urinário em resposta a estímulo inflamatório e mostra-se elevada durante episódios de ITU (44-46). Recentemente, Galanakis *et al.* apresentaram a IL-8/CXCL8 como marcador sensível e específico para o diagnóstico de válvula de uretra posterior, independente a episódios de ITU (47). Assim, Galanakis *et al.* e outros pesquisadores têm estabelecido a relação entre IL-8/CXCL8 e cicatrizes renais (46-48). A partir de nossos achados, podemos supor que a elevação de IL-8/CXCL8 em nossos pacientes com malformações do trato urinário possa estar relacionada à presença de cicatrizes renais e/ou episódios de pielonefrite que podem contribuir para a redução do RFG nesses pacientes.

Entender a fisiopatologia da DRC ainda é um desafio. A identificação de fatores de risco modificáveis e de biomarcadores para a DRC poderá determinar diminuição de sua prevalência e de suas complicações associadas. Nosso estudo não estabeleceu mecanismos fisiopatológicos ou definiu o papel de citocinas como biomarcadores de DRC. No entanto, sugeriu a associação do MCP-1/CCL2 com hipoalbuminemia e dislipidemia, que são achados laboratoriais comuns das doenças glomerulares. Em geral, observa-se evolução acelerada da DRC ao compararmos causas glomerulares das outras etiologias da DRC (49-50). Assim, nossos dados apontam para o papel de MCP-1/CCL2 na indução da inflamação glomerular e perda da função renal. Nossos achados são corroborados por outros dados da literatura (10, 15, 29, 51-56). Não foi possível estabelecer associações entre o TGF- β 1 e os parâmetros avaliados em ambos os grupos,

mas o IL-8/CXCL8 relacionou-se à queda do RFG em pacientes com malformações do trato urinário.

Vale ressaltar que estamos cientes das limitações inerentes ao desenho de nosso estudo. Por se tratar de estudo transversal, com amostra composta pelos pacientes atendidos em nosso serviço nos anos de 2009-2010, torna-se difícil obter um grupo homogêneo, uma vez que tratamentos prévios e atuais, atividade da doença, presença de complicações podem certamente interferir com as medidas das citocinas. Por outro lado, alguns aspectos aumentam a força de nosso estudo, tais como a utilização de critérios de inclusão e de exclusão bem definidos e de um protocolo bem estabelecido para as medidas das citocinas (12, 24).

Finalmente, o presente estudo faz parte de uma linha de pesquisa que avalia o papel potencial de mediadores imuno-inflamatórios nas doenças renais, com o intuito de trazer informações que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de evolução dessas doenças. Dentro dessa perspectiva, novos estudos deverão ser realizados para avaliar o comportamento das citocinas e quimiocinas em longo prazo, determinando o seu real potencial como biomarcadores ou, até mesmo, como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos.

6.1. REFERÊNCIAS

1. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005 Dec;68(6):2918-29.
2. Postlethwaite RJ, Eminson DM, Reynolds JM, Wood AJ, Hollis S. Growth in renal failure: a longitudinal study of emotional and behavioural changes during trials of growth hormone treatment. *Arch Dis Child.* 1998 Mar;78(3):222-9.
3. Furth SL, Hwang W, Yang C, Neu AM, Fivush BA, Powe NR. Growth failure, risk of hospitalization and death for children with end-stage renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2002 Jun;17(6):450-5.
4. Bakr A, Amr M, Sarhan A, Hammad A, Ragab M, El-Refaey A, et al. Psychiatric disorders in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol.* 2007 Jan;22(1):128-31.
5. Furth SL, Cole SR, Moxey-Mims M, Kaskel F, Mak R, Schwartz G, et al. Design and methods of the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) prospective cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 Sep;1(5):1006-15.
6. August P, Suthanthiran M. Transforming growth factor beta and progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.* 2003 Nov(87):S99-104.
7. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med.* 2006;57:365-80.
8. Ruggenti P, Schieppati A, Remuzzi G. Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet.* 2001 May 19;357(9268):1601-8.
9. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004 Mar;65(3):1009-16.
10. Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, Shimizu A, Shike T, Ishiguro C, et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):1-4.
11. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2001 May;10(3):321-9.
12. Vasconcelos MA, Bouzada MC, Silveira KD, Moura LR, Santos FF, Oliveira JM, et al. Urinary levels of TGF beta-1 and of cytokines in patients with prenatally detected nephrouropathies. *Pediatr Nephrol.* 2011 Feb 18.
13. Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, Kiley SC. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2010 Apr;25(4):687-97.
14. Tipping PG, Holdsworth SR. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol.* 2007 May;27(3):275-85.
15. Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes EV, Sobel ES, Segal MS, et al. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2006 Jul;5(6):383-8.
16. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, et al. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Dec;11(12):2231-42.

17. Bottinger EP, Bitzer M. TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Oct;13(10):2600-10.
18. Gorgi Y, Sfar I, Jendoubi-Ayed S, Makhoul M, Rhomdhane TB, Bardi R, et al. Allograft renal rejection and chemokine polymorphism. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2011 Jan;22(1):18-23.
19. Ali S, Malik G, Burns A, Robertson H, Kirby JA. Renal transplantation: examination of the regulation of chemokine binding during acute rejection. *Transplantation*. 2005 Mar 27;79(6):672-9.
20. Suliman ME, Stenvinkel P. Contribution of inflammation to vascular disease in chronic kidney disease patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2008 May;19(3):329-45.
21. Pecoits-Filho R, Lindholm B, Stenvinkel P. The malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA) syndrome -- the heart of the matter. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 11:28-31.
22. Cheung WW, Paik KH, Mak RH. Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2010 Apr;25(4):711-24.
23. Eardley KS, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Bates RL, Savage CO, et al. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2006 Apr;69(7):1189-97.
24. Souto MF, Teixeira AL, Russo RC, Penido MG, Silveira KD, Teixeira MM, et al. Immune mediators in idiopathic nephrotic syndrome: evidence for a relation between interleukin 8 and proteinuria. *Pediatr Res*. 2008 Dec;64(6):637-42.
25. Garin EH. Circulating mediators of proteinuria in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2000 Aug;14(8-9):872-8.
26. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002 Dec;17(12):2145-52.
27. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):95-101.
28. Sakai N, Furuichi K, Shinozaki Y, Yamauchi H, Toyama T, Kitajima S, et al. Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease. *Hum Pathol*. 2010 May;41(5):672-8.
29. Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J Am Soc Nephrol*. 2005 Feb;16(2):467-73.
30. Donadelli R, Abbate M, Zanchi C, Corna D, Tomasoni S, Benigni A, et al. Protein traffic activates NF-kB gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am J Kidney Dis*. 2000 Dec;36(6):1226-41.
31. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int*. 1998 Jun;53(6):1608-15.
32. Zyga S, Christopoulou G, Malliarou M. Malnutrition-inflammation-atherosclerosis syndrome in patients with end-stage renal disease. *J Ren Care*. 2011 Mar;37(1):12-5.

33. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 May;24(5):816-23.
34. Knight SF, Yuan J, Roy S, Imig JD. Simvastatin and tempol protect against endothelial dysfunction and renal injury in a model of obesity and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010 Jan;298(1):F86-94.
35. Pecoits-Filho R, Sylvestre LC, Stenvinkel P. Chronic kidney disease and inflammation in pediatric patients: from bench to playground. *Pediatr Nephrol.* 2005 Jun;20(6):714-20.
36. Wahba IM, Mak RH. Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007 May;2(3):550-62.
37. Tam CS, Garnett SP, Cowell CT, Heilbronn LK, Lee JW, Wong M, et al. IL-6, IL-8 and IL-10 levels in healthy weight and overweight children. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(2):128-34.
38. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 1999 Feb;55(2):648-58.
39. Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, Lindholm B, Heimbürger O, Massy Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Mar;3(2):505-21.
40. Foley RN, Guo H, Snyder JJ, Gilbertson DT, Collins AJ. Septicemia in the United States dialysis population, 1991 to 1999. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Apr;15(4):1038-45.
41. Groothoff J, Gruppen M, de Groot E, Offringa M. Cardiovascular disease as a late complication of end-stage renal disease in children. *Perit Dial Int.* 2005 Feb;25 Suppl 3:S123-6.
42. Artham SM, Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Value of weight reduction in patients with cardiovascular disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2010 Jan;12(1):21-35.
43. Guarnieri G, Zanetti M, Vinci P, Cattin MR, Pirulli A, Barazzoni R. Metabolic syndrome and chronic kidney disease. *J Ren Nutr.* 2010 Sep;20(5 Suppl):S19-23.
44. Zaki Mel S. Interleukin 8 is a surrogate marker for rapid diagnosis of bacteriuria. *Immunol Invest.* 2008;37(7):694-703.
45. Mohkam M, Karimi A, Karimi H, Sharifian M, Armin S, Dalirani R, et al. Urinary interleukin-8 in acute pyelonephritis of children: a before-after study. *Iran J Kidney Dis.* 2008 Oct;2(4):193-6.
46. Sheu JN, Chen SM, Meng MH, Lue KH. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *Pediatr Infect Dis J.* 2009 Oct;28(10):885-90.
47. Galanakis E, Bitsori M, Dimitriou H, Giannakopoulou C, Karkavitsas NS, Kalmanti M. Urine interleukin-8 as a marker of vesicoureteral reflux in infants. *Pediatrics.* 2006 May;117(5):e863-7.

48. Gokce I, Alpay H, Biyikli N, Unluguzel G, Dede F, Topuzoglu A. Urinary levels of interleukin-6 and interleukin-8 in patients with vesicoureteral reflux and renal parenchymal scar. *Pediatr Nephrol*. 2010 May;25(5):905-12.
49. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Silva JM, Oliveira GR, Canhestro MR, et al. Clinical outcome of children with chronic kidney disease in a pre-dialysis interdisciplinary program. *Pediatr Nephrol*. 2008 Nov;23(11):2039-46.
50. Soares CM, Diniz JS, Lima EM, Oliveira GR, Canhestro MR, Colosimo EA, et al. Predictive factors of progression to chronic kidney disease stage 5 in a predialysis interdisciplinary programme. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Mar;24(3):848-55.
51. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2000 Oct;58(4):1492-9.
52. Bobkova IN, Chebotareva NV, Kozlovskaya LV, Varshavskii VA, Golitsyna EP. [Urine excretion of a monocytic chemotactic protein-1 and a transforming growth factor beta1 as an indicator of chronic glomerulonephritis progression]. *Ter Arkh*. 2006;78(5):9-14.
53. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, van Es LA, Daha MR, Bruijn JA. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clin Nephrol*. 1995 Sep;44(3):148-55.
54. Eddy AA, Warren JS. Expression and function of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental nephrotic syndrome. *Clin Immunol Immunopathol*. 1996 Feb;78(2):140-51.
55. Stangou M, Alexopoulos E, Papagianni A, Pantzaki A, Bantis C, Dovas S, et al. Urinary levels of epidermal growth factor, interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 may act as predictor markers of renal function outcome in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2009 Sep;14(6):613-20.
56. Marks SD, Shah V, Pilkington C, Tullus K. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 correlates with disease activity in lupus nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2010 Nov;25(11):2283-8.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO I – PARECER DO COEP

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

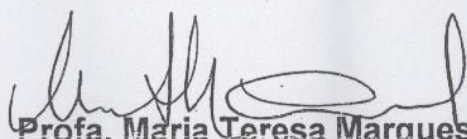
Parecer nº. ETIC 572/07

Interessado(a): Profa. Ana Cristina Simões
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de dezembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação dos níveis circulantes de citocinas e quimiocinas em crianças e adolescentes portadores de doença renal crônica"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

7.2. ANEXO II – TERMOS DE CONSENTIMENTO

Para os responsáveis por pacientes portadores de DRC entre dois e sete anos.

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos substâncias da urina chamadas, pelos médicos, de citocinas e quimiocinas além da relação destas substâncias com o funcionamento do rim e a doença renal. Alguns estudos mostram que essas substâncias podem participar dos problemas dos rins. Este estudo quer, então, saber qual é a quantidade dessas substâncias que está na urina dos pacientes com doença renal, tentando ver se isso tem relação com o funcionamento do rim.

Os exames para determinação das citocinas e quimiocinas serão realizados em amostra de urina simples. Estamos garantindo que esses exames somente serão coletados e realizados após sua autorização e assinatura deste termo de consentimento.

Garantimos ainda que a identidade e a privacidade de seu filho(a), serão resguardadas e os resultados desse estudo somente serão utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina. Finalmente, você tem o direito de recusar que seu filho(a) participe do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que ele(a) continuará a receber o tratamento convencional, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Sua realização está de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Eu, responsável pelo paciente _____, portador de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em permitir a participação do menor em epígrafe nas coletas de sangue e urina para dosar quimiocinas e citocinas. Confirmo que o paciente em questão foi selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Data e local: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Assinatura do responsável: _____

Para os pacientes portadores de DRC entre sete e 12 anos e seus responsáveis

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos substâncias na urina chamadas, pelos médicos, de citocinas e quimiocinas e a relação destas substâncias com o funcionamento do rim e a doença renal. Alguns estudos mostram que essas substâncias podem participar dos problemas dos rins. Este estudo quer, então, saber qual é a quantidade dessas substâncias que está na urina dos pacientes com doença renal, tentando ver se isso tem relação com o funcionamento do rim.

Os exames para determinação das citocinas e quimiocinas serão realizados em amostra de urina simples. Estamos garantindo que esses exames somente serão coletados e realizados após sua autorização e assinatura deste termo de consentimento.

Garantimos ainda que as suas identidade e privacidade serão resguardadas, sendo os resultados desse estudo somente utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina. Finalmente, você tem o direito de recusar em participar do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que você continuará a receber o tratamento convencional, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Sua realização está de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Eu, paciente _____, portador de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue e urina para dosar citocinas e quimiocinas. Confirmando que fui selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, responsável pelo paciente _____, portador de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em permitir a participação do menor em epígrafe nas coletas de sangue e urina para dosar quimiocinas e citocinas. Confirmando que o paciente em questão foi selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Data e local: _____ Assinatura do pesquisador: _____

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do paciente: _____

Para os pacientes portadores de DRC entre 12 e 18 anos

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos substâncias na urina chamadas, pelos médicos, de citocinas e quimiocinas e a relação destas substâncias com o funcionamento do rim e a doença renal. Alguns estudos mostram que essas substâncias podem participar dos problemas dos rins. Este estudo quer, então, saber qual é a quantidade dessas substâncias que está na urina dos pacientes com doença renal, tentando ver se isso tem relação com o funcionamento do rim.

Os exames para determinação das citocinas e quimiocinas serão realizados em amostra de urina simples. Estamos garantindo que esses exames somente serão coletados e realizados após sua autorização e assinatura deste termo de consentimento.

Garantimos ainda que serão resguardadas sua identidade e sua privacidade, sendo os resultados desse estudo somente utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina. Finalmente, você tem o direito de recusar em participar do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que você continuará a receber o tratamento convencional, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Sua realização está de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Eu, paciente _____, portador de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em participar das coletas de sangue e urina para dosar citocinas e quimiocinas. Confirmo que fui selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Data e local: _____

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Para os responsáveis por pacientes portadores de DRC entre 12 e 18 anos

Por meio deste termo de consentimento, informamos que estamos desenvolvendo uma pesquisa no Hospital das Clínicas da UFMG para estudarmos substâncias na urina chamadas, pelos médicos, de citocinas e quimiocinas e a relação destas substâncias com o funcionamento do rim e a doença renal. Alguns estudos mostram que essas substâncias podem participar dos problemas dos rins. Este estudo quer, então, saber qual é a quantidade dessas substâncias que está na urina dos pacientes com doença renal, tentando ver se isso tem relação com o funcionamento do rim.

Os exames para determinação das citocinas e quimiocinas serão realizados em amostra de urina simples. Estamos garantindo que esses exames somente serão coletados e realizados após sua autorização e assinatura deste termo de consentimento.

Garantimos ainda que serão resguardadas a identidade e a privacidade de seu(ua) filho(a), sendo os resultados desse estudo somente utilizados para aumentar os conhecimentos da medicina. Finalmente, o seu filho(a) tem o direito de recusar em participar do trabalho em qualquer etapa do mesmo, sabendo-se que ele(a) continuará a receber o tratamento convencional, tendo assim garantida sua assistência médica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG. Sua realização está de acordo com as Normas do Conselho Nacional de Saúde (Resoluções 196/96) que assegura proteção aos voluntários envolvidos em pesquisas biomédicas.

Eu, responsável pelo paciente _____, portador de doença renal, entendi tudo que foi explicado sobre essa pesquisa e concordo em permitir a participação do menor em epígrafe, nas coletas de sangue e urina, para dosar quimiocinas e citocinas. Confirmo que o paciente em questão foi selecionado de forma voluntária para participar dessa pesquisa. Eu assinei e recebi uma cópia deste termo de consentimento.

Data e local: _____

Assinatura do responsável: _____

Assinatura do pesquisador: _____