

## Moléculas do sistema renina-angiotensina e ligante 2 de quimiocina com motivo C-C (CCL2) em pacientes com doença renal crônica

Renin angiotensin system molecules and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in chronic kidney disease patients

### Autores

Isabella Viana Gomes Schettini<sup>1</sup> 

Débora Vargas Faria<sup>1</sup>

Leilismara Sousa Nogueira<sup>1</sup>

Alba Otoni<sup>1</sup> 

Ana Cristina Simões e Silva<sup>2</sup> 

Danyelle Romana Alves Rios<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro Oeste, Divinópolis, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica, Departamento de Pediatria, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Data de submissão: 10/02/2021.

Data de aprovação: 26/04/2021.

### Correspondência para:

Danyelle Romana Alves Rios.

E-mail: danyelleromana@ufsj.edu.br

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2021-0030>

### RESUMO

**Introdução:** Estudos têm mostrado que o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e a inflamação estão relacionados à progressão da lesão renal. O objetivo deste estudo foi avaliar moléculas do SRAA e o Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C (CCL2) em 82 pacientes com doença renal crônica (DRC). **Métodos:** Os pacientes foram divididos em dois grupos: pacientes diagnosticados com DRC e pacientes sem diagnóstico de DRC. Foram determinadas a taxa de filtração glomerular (TFG) e a relação albumina/creatinina (RAC), assim como os níveis plasmáticos de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)], enzima conversora de angiotensina (ECA)1, ECA2 e níveis plasmáticos e urinários de CCL2. **Resultados:** Os níveis plasmáticos de CCL2 foram significativamente mais altos em pacientes com DRC em comparação com o grupo controle. Pacientes com TFG mais baixa apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de ECA2 e CCL2 e menor relação ECA1/ECA2. Pacientes com valores de RAC mais altos apresentaram níveis plasmáticos de ECA1 mais elevados. **Conclusão:** Pacientes com DRC mostraram maior atividade de ambos os eixos do SRAA, o clássico e o alternativo, e níveis plasmáticos mais altos de CCL2. Portanto, os níveis plasmáticos de moléculas do SRAA e CCL2 parecem ser marcadores prognósticos promissores e até mesmo alvos terapêuticos para a DRC.

**Descritores:** Insuficiência Renal Crônica; Sistema Renina-Angiotensina; CCL2.

### ABSTRACT

**Introduction:** Studies have shown that the renin angiotensin aldosterone system (RAAS) and inflammation are related to kidney injury progression. The aim of this study was to evaluate RAAS molecules and chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) in 82 patients with chronic kidney disease (CKD). **Methods:** Patients were divided into two groups: patients diagnosed with CKD and patients without a CKD diagnosis. Glomerular filtration rate (GFR) and albumin/creatinine ratio (ACR) were determined, as well as plasma levels of angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], angiotensin-converting enzyme (ACE)1, ACE2, and plasma and urinary levels of CCL2. **Results:** CCL2 plasma levels were significantly higher in patients with CKD compared to the control group. Patients with lower GFR had higher plasma levels of ACE2 and CCL2 and lower ratio ACE1/ACE2. Patients with higher ACR values had higher ACE1 plasma levels. **Conclusion:** Patients with CKD showed greater activity of both RAAS axes, the classic and alternative, and higher plasma levels of CCL2. Therefore, plasma levels of RAAS molecules and CCL2 seem to be promising prognostic markers and even therapeutic targets for CKD.

**Keywords:** Renal Insufficiency, Chronic; Renin-Angiotensin System; CCL2.

### INTRODUÇÃO

O *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) define doença renal crônica (DRC) como anormalidades funcionais ou estruturais dos rins, persistindo por mais de três meses e com implicações para a saúde do paciente. A avaliação do comprometimento renal é recomendada pela avaliação

da albuminúria, principalmente como relação albumina/creatinina (RAC) em amostra isolada de urina, e pela avaliação da função renal com a taxa de filtração glomerular estimada (TFG) baseada nos valores de creatinina sérica ou nas equações disponíveis<sup>1</sup>. A DRC é considerada um grande problema de saúde pública mundial, com uma prevalência estimada

em até 15%<sup>2</sup> causando um grande impacto negativo na expectativa e na qualidade de vida dos pacientes e exigindo uma parte significativa dos recursos destinados à saúde<sup>3</sup>. No Brasil, estima-se que mais de dez milhões de pessoas tenham a doença<sup>4</sup>. Destas, cerca de 130 mil são submetidas à terapia dialítica e 82% das diálises realizadas no país são financiadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS)<sup>4,5</sup>, com um gasto anual estimado em mais de R\$ 2 bilhões<sup>6</sup>.

No Brasil, América do Norte e países do continente europeu, diabetes mellitus, hipertensão e doenças glomerulares são as principais causas da DRC. Os principais mecanismos de hipertensão arterial na DRC são sobrecarga salina e de volume, além do aumento da atividade do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), disfunção endotelial e inflamação<sup>1</sup>.

O SRAA é considerado um sistema endócrino, formado por peptídeos, enzimas e receptores, responsável pela regulação cardiovascular, renal e adrenal, que controla indiretamente o equilíbrio de fluidos e eletrólitos e participa ativamente na regulação do tônus vasomotor e da proliferação celular. Os efeitos do SRAA podem afetar amplamente as funções e doenças renais por meio de múltiplos mediadores e receptores<sup>7,8</sup>. Atualmente, é considerado um sistema formado por dois eixos opostos: 1) eixo clássico, iniciado pela clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I), pela ação da renina, e que é posteriormente convertido em angiotensina II (Ang II), pela enzima conversora de angiotensina 1 (ECA1); e 2) eixo alternativo ou contra-regulatório, através da clivagem de Ang II e consequente produção do heptapeptídeo angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] pela ação de uma enzima homóloga à ECA, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2)<sup>9</sup>.

O SRAA está intimamente associado a mecanismos de progressão de lesão renal. Estudos experimentais mostraram que a Ang II participa de alterações hemodinâmicas renais e processos inflamatórios e fibróticos responsáveis pela progressão de dano renal<sup>7, 10</sup>. A inibição da formação e/ou ligação da Ang II ao seu receptor AT1 (ARA) pode retardar a progressão da fibrose renal e reduzir a mortalidade e o risco de complicações cardiovasculares relacionadas à DRC<sup>10,11</sup>.

A inflamação também desempenha um papel importante no desenvolvimento da DRC, participando ativamente em mecanismos prejudiciais, ao ativar o sistema imunológico de uma maneira contínua e

exacerbada. Estudos sobre mediadores inflamatórios indicaram um papel importante para as quimiocinas na DRC<sup>8, 12</sup>. A proteína quimioatraente monócito 1 (MCP-1), também conhecida como Ligante 2 de Quimiocina com Motivo C-C (CCL2) tem sido relatada como um importante mediador inflamatório de doenças renais, sendo expressa em praticamente todos os tipos de células renais intrínsecas (células endoteliais, mesangiais, epiteliais tubulares e podócitos) na presença de lesão do tecido renal<sup>13</sup>.

Nesse sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a associação entre os níveis plasmáticos das moléculas do SRAA e os níveis plasmáticos e urinários do CCL2 com marcadores de DRC em pacientes com e sem DRC.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### DESENHO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este foi um estudo transversal realizado com pacientes que apresentavam hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus, cadastrados no Programa Hiperdia de um município de médio porte no estado de Minas Gerais, como já relatado anteriormente<sup>14</sup>. Em resumo, os pacientes foram selecionados aleatoriamente de um grupo de indivíduos hipertensos com alto risco para doenças cardiovasculares, de acordo com o escore de Framingham revisado, adotado pela Secretaria de Saúde do Estado de Minas Gerais, e pacientes com diabetes. Os 82 pacientes incluídos neste estudo foram divididos em dois grupos: (1) pacientes diagnosticados com DRC (grupo DRC), que mostraram alterações nos marcadores de função renal e (2) pacientes sem diagnóstico de DRC escolhidos aleatoriamente (grupo controle).

### COLETA DE DADOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A coleta de dados, referente à idade e sexo dos pacientes, foi realizada diretamente do programa Hiperdia no município. Amostras de 10 mL de sangue venoso foram coletadas da região antecubital em tubos secos e de EDTA do sistema Vacutainer (Becton Dickinson) após um período de jejum de 10-12h. Uma amostra da primeira urina da manhã também foi coletada em um frasco estéril pelo próprio paciente. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos em uma centrífuga CentriBio® para obter soro e plasma. Estas foram alíquotadas em tubos Eppendorf® e armazenadas a -80°C juntamente com alíquotas de urina, devidamente homogeneizadas, até o momento das medições.

## VARIÁVEIS DO ESTUDO

*VARIÁVEL DE RESPOSTA: NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANG-(1-7), ECA1, E ECA2 E NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS DE CCL2*

As medições dos níveis de proteína plasmática de Ang-(1-7), ECA1, ECA2 e níveis plasmáticos e urinários de CCL2 foram realizadas por ELISA quantitativo, usando kits MyBioSource: Kits ELISA de Angiotensina Humana 1-7 (ANG1-7), Enzima Conversora de Angiotensina Humana I (ECA1), Enzima Conversora de Angiotensina Humana II (ECA2) e kits de Sistemas de P&D Quantikine® ELISA MCP-1/CCL2 Humano, respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, estes kits aplicam a técnica de imunoenensaio enzimático utilizando anticorpos monoclonais, conjugado de antígeno-HRP e substrato para enzima HRP, que formam um complexo colorido. A intensidade da cor é medida espectrofotometricamente a 450 nm em um leitor de microplaca. Uma curva padrão é traçada relacionando a intensidade da cor à concentração de padrões. A concentração dos analitos em cada amostra é interpolada a partir desta curva padrão.

A variável “relação ECA1/ECA2” foi obtida dividindo as variáveis contínuas ECA1 e ECA2.

## VARIÁVEIS EXPLICATIVAS: DIAGNÓSTICO DE DRC

O diagnóstico de DRC (estágio 3 ou superior) foi definido por TFG < 60mL/min/1,73m<sup>2</sup> e/ou RAC ≥ 30 mg/g em duas avaliações consecutivas com um intervalo de três meses. A dosagem de creatinina sérica foi determinada por teste cinético colorimétrico, utilizando o Kit K067 da Bioclin®. A TFG foi estimada pela equação da Colaboração em Epidemiologia de Doença Renal Crônica (CKD-EPI, do inglês Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) e categorizada em TFG <60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup> ou TFG ≥60 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>. A albuminúria foi medida usando um método turbidimétrico com o Kit K078 da Bioclin®. A RAC foi calculada a partir das medições de albumina e creatinina em amostras de urina, e foi categorizada em RAC ≥30 e RAC <30.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram descritas usando mediana e intervalo interquartil (IQ) ou média e desvio padrão, e as variáveis categóricas usando proporções. A normalidade dos dados foi avaliada por análise de histograma. Variáveis categóricas foram comparadas usando o teste qui-quadrado e variáveis contínuas

pelo teste t ou teste de Mann-Whitney. A correlação entre TFG e RAC (variáveis contínuas) com níveis plasmáticos de Angiotensina (1-7), ECA1 e ECA2 e níveis plasmáticos e urinários de CCL2 foi avaliada usando o teste de correlação de Spearman. Foram consideradas diferenças significativas para valores de  $p < 0,05$  e análises estatísticas foram realizadas usando o software STATA (versão 14.0) para Windows.

## ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São João Del-Rei, CAAE: 30836414.1.0000.5545. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento informado.

## RESULTADOS

A maioria dos pacientes de ambos os grupos era do sexo masculino e a idade média dos pacientes com DRC era significativamente maior quando comparada ao grupo controle. A TFG média e a RAC mediana para pacientes com DRC foram 50,0±16,3 mL/min/1,73m<sup>2</sup> e 18,6 (2,5-86,3) e do grupo controle, 74,8±9,7 e 2,6 (1,0-5,3), respectivamente.

Os níveis plasmáticos de Ang 1-7, ECA1, ECA2 e os níveis urinários de CCL2 não foram estatisticamente diferentes entre os grupos DRC e controle. Somente os níveis plasmáticos de CCL2 foram significativamente mais altos em pacientes com DRC quando comparados com o grupo controle (Tabela 1).

Pacientes com TFG mais baixa tinham níveis plasmáticos de ECA2 e CCL2 mais elevados e uma relação de ECA1/ECA2 mais baixa. Pacientes com valores de RAC mais altos tinham níveis plasmáticos de ECA1 mais elevados. Não houve correlação estatisticamente significativa entre TFG e RAC e os outros marcadores avaliados (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo avaliar os componentes do SRAA, os níveis plasmáticos e urinários de CCL2, e os marcadores de DRC. Os níveis plasmáticos de CCL2 foram significativamente mais altos em pacientes com DRC em comparação com o grupo controle e foi encontrada uma correlação negativa estatisticamente significativa entre os a TFG e os níveis plasmáticos de ECA2 ( $\rho = -0,31$ ) e CCL2 ( $\rho = -0,32$ ) e uma correlação positiva estatisticamente significativa entre

**TABELA 1** COMPARAÇÃO DE MARCADORES SOCIODEMOGRÁFICOS E DO SRAA ENTRE OS GRUPOS DRC E CONTROLE (N = 82)

Variável	Grupo DRC (n=41)	Grupo controle (n=41)	Valor de p
Idade (anos)	64,6 ± 11,0	53,9 ± 13,6	<0,01*
Gênero [n(%)]			0,824
Masculino	19 (46%)	18 (44%)	
Feminino	22 (54%)	23 (56%)	
Ang 1-7 plasmática (pg/mL)	68,8 (23,3-179,9)	100,1 (25,9-212,0)	0,74
ECA1 plasmática (pg/mL)	58,7 ± 25,3	53,1 ± 21,8	0,29
ECA2 plasmática (pg/mL)	16,4 (0,0-43,3)	4,2 (0,0-25,5)	0,26
CCL2 plasmático (pg/mL)	148,7 (114,6-187,5)	116,7 (92,0-145,0)	<0,05*
CCL2 urinário (pg/mL)	225,3 (145,3-420,4)	175,5 (71,8-295,2)	0,17
ECA1/ECA2	1,8 (1,2-4,4)	2,5 (0,9-9,4)	0,44

Média ± DP ou mediana (25% -75%). TFG: Taxa de Filtração Glomerular. RAC: Relação albumina-creatinina. Ang-1-7: Angiotensina 1-7. ECA1: Enzima conversora de angiotensina 1. ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2. CCL2: Ligante 2 de quimiocina (motif C-C). DRC: Doença Renal Crônica. \*p <0,05.

**TABELA 2** CORRELAÇÃO ENTRE TFG E RAC COM NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ANGIOTENSINA 1-7, ECA1, ECA2, E NÍVEIS PLASMÁTICOS E URINÁRIOS DE CCL2

Variáveis	Coefficiente de Correlação	Valor de p
TFG x Ang 1-7	-0,01	0,88
TFG x ECA1	-0,05	0,64
TFG x ECA2	-0,31	<0,01*
TFG x CCL2 plasmático	-0,32	<0,01*
TFG x CCL2 urinário	-0,08	0,54
TFG x ECA1/ECA2	0,33	<0,01*
RAC x Ang 1-7	-0,18	0,10
RAC x ECA1	0,27	<0,01*
RAC x ECA2	0,06	0,53
RAC x CCL2 plasmático	-0,07	0,59
RAC x CCL2 urinário	0,12	0,35
RAC x ECA1/ECA2	-0,19	0,15

TFG: Taxa de filtração glomerular. RAC: Relação albumina creatinina. Ang-1-7: Angiotensina 1-7. ECA1: Enzima conversora de angiotensina 1. ECA2: Enzima conversora de angiotensina 2. CCL2: Ligante 2 de quimiocina (motif C-C). \*p <0,05.

a TFG e ECA1/ECA2 ( $\rho=0,33$ ) e entre a RAC e os níveis plasmáticos de ECA1 ( $\rho=0,27$ ).

O CCL2 é uma quimiocina da família CC, que recruta células da linhagem monócito-macrófago, estimula a liberação de histamina pelos basófilos e atua tanto em estágios iniciais quanto durante a progressão da lesão túbulo-intersticial renal<sup>8</sup>, sendo considerado um mediador crítico de lesão renal<sup>15, 16</sup>. Estudos têm demonstrado que esta quimiocina está presente em grandes quantidades nos rins de pacientes com doenças glomerulares, rejeições de transplantes, nefrite intersticial, ou mesmo apenas na presença de

proteinúria<sup>17, 18</sup>. Além disso, a inibição farmacológica do CCL2 foi capaz de reduzir a inflamação e melhorar a função podocitária na nefropatia diabética<sup>19</sup>, bem como recuperar a função renal em pacientes com diabetes mellitus que tiveram albuminúria<sup>20, 21</sup>.

Vários estudos avaliaram a associação entre os níveis urinários e plasmáticos de CCL2 e DRC de diferentes etiologias. Rovin *et al.* (1996)<sup>22</sup> mostraram que o CCL2 estava presente na urina de pacientes com doenças glomerulares. Além disso, pacientes com glomerulopatias inflamatórias apresentavam níveis mais elevados de CCL2 urinário que estavam diretamente relacionado à proteinúria. Outro dado relevante desse estudo foi que o CCL2 urinário ainda estava biologicamente ativo, uma vez que, em um ensaio de micro-quimiotaxia, a migração de monócitos foi aumentada<sup>22</sup>. Na nefropatia diabética, o CCL2 urinário estavam diretamente relacionado ao risco de progressão da DRC em pacientes com macroalbuminúria. No entanto, o CCL2 plasmático não mostrou diferença neste cenário<sup>23</sup>.

Em nosso estudo, os níveis plasmáticos de CCL2 foram mais altos entre pacientes com DRC, confirmado pela associação entre a diminuição da TFG e o aumento do CCL2 plasmático. Por outro lado, não houve diferença em relação aos níveis urinários de CCL2. Outros estudos também identificaram uma correlação inversamente proporcional entre CCL2 urinário<sup>24</sup> ou CCL2 plasmático<sup>25, 26</sup> e TFG. Embora nosso estudo tenha mostrado uma alta concentração de CCL2 plasmático, este nem sempre é alto na DRC<sup>27, 28</sup>. Os níveis urinários de CCL2 são frequentemente mais altos nestes pacientes, especialmente nos casos em que as lesões tubulointersticiais são mais avançadas<sup>27, 28</sup>. Como exemplo, no estudo de Rovin et

al. (1996)<sup>22</sup>, o CCL2 urinário não se associou ao CCL2 plasmático, mas foram detectados níveis mais elevados em pacientes com lesões glomerulares graves do que naqueles com lesões menos graves. A não observação de uma diferença na concentração urinária de CCL2 pode ser justificada pelo estágio da DRC dos pacientes incluídos neste estudo. De acordo com o KDIGO<sup>1</sup>, a faixa de TFG utilizada neste estudo inclui as categorias “Redução leve” a “Redução moderada a severa”. Quanto à classificação de acordo com a RAC, os pacientes são incluídos nas faixas “Normal a levemente aumentada” e “Moderadamente aumentada”.

É importante mencionar que ainda não há evidências conclusivas se o aumento nos níveis plasmáticos dessas quimiocinas está relacionado ao aumento em sua produção ou exclusivamente à diminuição em sua depuração, devido ao seu peso molecular<sup>29</sup>. Além disso, embora o CCL2 tenha se mostrado um marcador relevante de DRC, os valores de referência para quimiocinas plasmáticas e urinárias como biomarcadores imunológicos precoces de lesão renal em pacientes com glomerulopatias de diferentes causas ainda não estão disponíveis na literatura.

Vianna et al.(2011)<sup>8</sup> sugeriram que o aumento nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DRC pode ser causado pela redução da função renal, sobrecarga de volume, estresse oxidativo, níveis reduzidos de antioxidantes e aumento da atividade do SRAA.

Nosso estudo mostrou que pacientes com valores mais baixos de TFG apresentavam níveis plasmáticos mais altos de ECA2 ( $p < 0,01$ ). Estes resultados corroboram o estudo de Roberts et al.(2013)<sup>30</sup> mostrando que pacientes com DRC, em estágio de pré-diálise, ou pacientes com transplante renal tinham níveis elevados de ECA2 se comparados com aqueles submetidos à hemodiálise. Como explicação, os autores sugeriram que a circulação de ECA2 pode aumentar no início do curso da DRC e pode ser seguida por uma diminuição relativa. Vale mencionar que nenhum dos pacientes de nosso estudo estava em fase de diálise. Além disso, o estudo de Soro-Paavonen et al. (2012)<sup>31</sup> também relatou que pacientes com diabetes tipo 1 e microalbuminúria tinham níveis elevados de ECA2 quando comparados àqueles que não apresentavam microalbuminúria.

A ECA2 pertence ao chamado eixo SRAA contra-regulatório formado por ECA2/Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)]/Receptor Mas. A ECA2 converte Ang II em Ang-(1-7), que é responsável por mediar

ações renais importantes<sup>32, 33</sup>, atuando por meio do receptor Mas. A ligação de Ang-(1-7) ao receptor Mas leva à vasodilatação e efeitos anti-hipertensivos, anti-inflamatórios e antifibróticos<sup>12</sup>. Tanto a ECA2 quanto a Ang-(1-7) podem influenciar o SRAA nos rins, modulando ou mesmo contrabalançando a atividade excessiva do eixo clássico do SRAA (34). Com o aumento na ECA2 plasmática, um aumento da Ang-(1-7) também era esperado. No entanto, não foi observada diferença nos níveis plasmáticos de Ang-(1-7) em pacientes com DRC e controles. Estudos clínicos e experimentais revelaram um aumento na concentração de ECA2 sérica, mas com uma redução paralela da expressão de ECA2 no rim<sup>35, 36</sup>. Este achado foi observado no cenário de diabetes associado à doença renal. Além disso, nenhuma diferença nas concentrações de Ang-(1-7) foi observada nestes estudos<sup>37</sup>. Uma possível explicação para a ausência de aumento nos níveis de Ang-(1-7) é que a elevação da concentração de ECA2 pode não estar associada ao aumento em sua atividade. Portanto, a conversão de Ang II em Ang-(1-7) não aumentou<sup>37</sup>. Deve-se mencionar, entretanto, que os níveis plasmáticos de Ang II não foram medidos no presente estudo.

Outra explicação possível para o aumento dos níveis plasmáticos de ECA2 em pacientes com DRC é a necessidade de proteger os rins dos efeitos deletérios da Ang II. Assim, a ECA2 pode exercer efeitos renoprotetores. Esta possibilidade é ainda apoiada pela correlação entre valores de TFG mais baixos com relações ECA1/ECA2 mais baixas.

A análise de correlação das variáveis também mostrou que pacientes com valores mais altos de RAC apresentavam níveis mais elevados de ECA1 ( $p < 0,01$ ), sugerindo que a excreção de albumina na urina foi acompanhada pelo aumento da expressão da ECA1, que está intimamente ligada à produção de Ang II que, por sua vez, produziu lesão renal.

Como descrito acima, nossos resultados mostraram que a diminuição da função renal pode levar a alterações significativas na fisiologia do sistema renina angiotensina em seus diferentes aspectos. Sugerimos que níveis aumentados de ECA2 podem ocorrer como uma forma de contrabalançar os efeitos deletérios da ECA1 e da angiotensina II sobre a função renal. A albuminúria que pode ser observada a partir do aumento da RAC é fortemente indicativa de lesão glomerular renal com aumento da permeabilidade glomerular possivelmente devido à lesão microvascular dentro ou nas proximidades da cápsula de Bowman; estes achados concomitantes

com o aumento dos níveis de ECA1 sugerem um possível efeito da Ang II neste processo, mas tais evidências precisam de mais investigação uma vez que no presente estudo a dosagem de Ang II não foi realizada.

O sistema renina-angiotensina desempenha um papel importante na regulação da filtração glomerular. Uma diminuição no fluxo plasmático renal é seguida por um aumento na resistência da arteríola eferente glomerular, de modo que a pressão de perfusão e a filtração glomerular permaneçam constantes. Além disso, se a diminuição do fluxo plasmático renal for mais pronunciada, as prostaglandinas vasodilatadoras, cuja síntese é estimulada pela Ang II, dilatam as arteríolas aferentes, que suportam a filtração glomerular<sup>38</sup>. Como o SRAA, outras moléculas vasoativas também podem estar envolvidas neste processo, o que sugere a necessidade de investigação de outros mecanismos moleculares que possam estar envolvidos na progressão de lesão renal.

Cabe mencionar que este estudo tem algumas limitações. Primeiro, o número reduzido de participantes pode ter levado a um poder de estudo limitado e número reduzido de variáveis coletadas. Além disso, os pacientes com DRC eram significativamente mais velhos do que o grupo controle. Sabe-se que a prevalência da DRC aumenta com o avanço da idade, principalmente devido à senescência celular, que culmina em redução do número de néfrons, e alteração na atividade do SRAA e na resposta vasoativa<sup>39, 40</sup>. Assim, a idade pode ser um fator de confusão importante que não foi levado em consideração na análise realizada. O estudo foi baseado na determinação única de marcadores biológicos e não em medições repetidas ao longo do tempo.

Em conclusão, nossos resultados mostram que pacientes com DRC apresentaram maior atividade do eixo SRAA clássico com resposta compensatória do eixo alternativo, principalmente por meio do aumento dos níveis plasmáticos de ECA2. Além disso, os pacientes com DRC tinham níveis plasmáticos de CCL2 mais elevados do que os controles. Compreender os efeitos do SRA e das quimiocinas no início e durante a progressão da DRC é muito importante, uma vez que essa compreensão tem o potencial de revelar novos marcadores prognósticos e alvos terapêuticos alternativos. No entanto, apesar do grande avanço no conhecimento sobre mecanismos fisiopatológicos que relacionam a resposta inflamatória e o SRAA à DRC, muitos aspectos ainda precisam ser elucidados e estudos adicionais são necessários para este fim.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

I.V.G. Schettini, D.V. Faria e D.R.A. Rios tiveram pleno acesso a todos os dados do estudo e assumem a responsabilidade pela integridade dos dados e pela precisão da análise dos mesmos. D.R.A. Rios, A. C. Simões e Silva e A. Otoni conceberam e projetaram os experimentos. I.V.G. Schettini e D.R.A. Rios realizaram os experimentos. I.V.G. Schettini, D.V. Faria, L.S. Nogueira e D.R.A. Rios analisaram os dados. Todos os autores contribuíram com a redação do artigo.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Kidney Disease - Improving Global Outcomes (KDIGO). KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl.* 2013 Jan;3(1):1-150.
2. Levin A, Tonelli M, Bonventre J, Coresh J, Donner JA, Fogo AB, et al. Global kidney health 2017 and beyond: a roadmap for closing gaps in care, research, and policy. *Lancet* [Internet]. 2017 Oct; 390(10105):1888-917. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(17\)30788-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(17)30788-2/fulltext)
3. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA.* 2007 Nov;298(17):2038-47.
4. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2017. *Braz J Nephrol.* 2019 Jun;41(2):208-14.
5. Marinho AWGB, Penha AP, Silva MT, Galvão TF. Prevalência de doença renal crônica em adultos no Brasil: revisão sistemática da literatura. *Cad Saúde Colet.* 2017 Jul/Sep;25(3):379-88.
6. Alcalde PR, Kirsztajn GM. Gastos do Sistema Único de Saúde brasileiro com doença renal crônica. *Braz J Nephrol.* 2018 Jun;40(2):122.
7. Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med.* 2004 Feb;116(4):263-72.
8. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *J Bras Nefrol.* 2011;33(3):351-64.
9. Simoes e Silva AC, Pinheiro SVB, Pereira RM, Ferreira AJ, Santos RAS. The therapeutic potential of angiotensin-(1-7) as a novel renin-angiotensin system mediator. *Mini Rev Med Chem.* 2006 May;6(5):603-9.
10. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):2985-91.
11. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003 Jun;24(3):261-71.

12. Silva AAS, Prestes TR, Lauar AO, Finotti BB, Simoes ESAC. Renin angiotensin system and cytokines in chronic kidney disease: clinical and experimental evidence. *Protein Pept Lett.* 2017 Nov;24(9):799-808.
13. Kim MJ, Tam FWK. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. *Clin Chim Acta.* 2011 Nov;412(23-24):2022-30.
14. Alves LF, Abreu TT, Neves NCS, Morais FA, Rosiany IL, Oliveira WVJ, et al. Prevalence of chronic kidney disease in a city of southeast Brazil. *J Bras Nefrol.* 2017 Apr/Jun;39(2):126-34.
15. Kashyap S, Osman M, Ferguson CM, Nath MC, Roy B, Lien KR, et al. Ccl2 deficiency protects against chronic renal injury in murine renovascular hypertension. *Sci Rep.* 2018 Jun;8(1):8598.
16. Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Apr;294(4):F697-F701.
17. 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.
18. Kiyici S, Erturk E, Budak F, Ersoy C, Tuncel E, Duran C, et al. Serum monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion molecules in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Arch Med Res.* 2006 Nov;37(8):998-1003.
19. Boels MGS, Koudijs A, Avramut MC, Sol WMPJ, Wang G, Van Oeveren-Rietdijk AM, et al. Systemic monocyte chemotactic protein-1 inhibition modifies renal macrophages and restores glomerular endothelial glycocalyx and barrier function in diabetic nephropathy. *Am J Pathol.* 2017 Nov;187(11):2430-40.
20. Menne J, Eulberg D, Beyer D, Baumann M, Saudek F, Valkusz Z, et al. C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Feb;32(2):307-15.
21. Zeeuw D, Bekker P, Henkel E, Hasslacher C, Gouni-Berthold I, Mehling H, et al. The effect of CCR2 inhibitor CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015 Sep;3(9):687-96.
22. Rovin BH, Doe N, Tan LC. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am J Kidney Dis.* 1996 May;27(5):640-6.
23. Titan SM, Vieira Junior JM, Dominguez WV, Moreira SR, Pereira AB, Barros RT, et al. Urinary MCP-1 and RBP: independent predictors of renal outcome in macroalbuminuric diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications.* 2012 Nov/Dec;26(6):546-53.
24. Ibrahim S, Rashed L. Correlation of urinary monocyte chemoattractant protein-1 with other parameters of renal injury in type-II diabetes mellitus. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2008 Nov;19(6):911-7.
25. Fukami A, Yamagishi SI, Adachi H, Matsui T, Yoshikawa K, Ogata K, et al. High white blood cell count and low estimated glomerular filtration rate are independently associated with serum level of monocyte chemoattractant protein-1 in a general population. *Clin Cardiol.* 2011 Mar;34(3):189-94.
26. Gregg LP, Tio MC, Li X, Adams-Huet B, Lemos JA, Hedayati SS. Association of monocyte chemoattractant protein-1 with death and atherosclerotic events in chronic kidney disease. *Am J Nephrol.* 2018;47(6):395-405.
27. Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000 Aug;58(2):684-90.
28. 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.
29. Tam FWK, Ong ACM. Renal monocyte chemoattractant protein-1: an emerging universal biomarker and therapeutic target for kidney diseases?. *Nephrol Dial Transplant.* 2020 Feb;35(2):198-203.
30. Roberts MA, Velkoska E, Ierino FL, Burrell LM. Angiotensin-converting enzyme 2 activity in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2013 Sep;28(9):2287-94.
31. Soro-Paavonen A, Gordin D, Forsblom C, Rosengard-Barlund M, Waden J, Thorn L, et al. Circulating ACE2 activity is increased in patients with type 1 diabetes and vascular complications. *J Hypertens.* 2012 Feb;30(2):375-83.
32. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 May/Jun;15(4):166-9.
33. Wakahara S, Konoshita T, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, et al. Synergistic expression of angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 in human renal tissue and confounding effects of hypertension on the ACE to ACE2 ratio. *Endocrinology.* 2007 May;148(5):2453-7.
34. Sanjuliani A, Torres M, Paula L, Bassan F. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: bases fisiológicas e fisiopatológicas. *Rev HUPE.* 2011;10(3):20-30.
35. Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I, Batlle DC. Glomerular localization and expression of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-converting enzyme: implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):3067-75.
36. Mizuiri S, Hemmi H, Arita M, Ohashi Y, Tanaka Y, Miyagi M, et al. Expression of ACE and ACE2 in individuals with diabetic kidney disease and healthy controls. *Am J Kidney Dis.* 2008 Apr;51(4):613-23.
37. Yamaleyeva LM, Gilliam-Davis S, Almeida I, Brosnihan KB, Lindsey SH, Chappell MC. Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jun;302(11):F1374-84.
38. Almeida LF, Tofteng SS, Madsen K, Jensen BL. Role of the renin-angiotensin system in kidney development and programming of adult blood pressure. *Clin Sci (Lond).* 2020 Mar;134(6):641-56.
39. Stevens LA, Li S, Wang C, Huang C, Becker BN, Bombardieri AS, et al. Prevalence of CKD and comorbid illness in elderly patients in the United States: results from the kidney early evaluation program (KEEP). *Am J Kidney Dis.* 2010 Mar;55(3 Suppl 2):S23-33.
40. Amaral TLM, Amaral CA, Vasconcelos MTL, Monteiro GTR. Prevalence and factors associated to chronic kidney disease in older adults. *Rev Saúde Pública.* 2019;53:44.