


## Níveis de hepcidina, netrina-1, lipocalina associada a gelatinase neutrofílica e ligante de quimiocina C-C motif na urina do rim displásico multicístico

Urine hepcidin, netrin-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin and C-C motif chemokine ligand 2 levels in multicystic dysplastic kidney

### Autores

Nuran Cetin<sup>1</sup> 

Zeynep Kuskü Kiraz<sup>2</sup>

Nadide Melike Sav<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Pediatric Nephrology, Turkey.

<sup>2</sup>Eskisehir Osmangazi University, Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Turkey.

### RESUMO

**Introdução:** A hiperfiltração glomerular pode causar proteinúria e doença renal crônica no rim displásico multicístico unilateral (RDM). Nosso objetivo foi investigar os níveis de lipocalina associada à gelatinase neutrofílica na urina (NGAL), netrina-1, hepcidina e quimiocina C-C com ligante-2 (MCP-1/CCL-2) em pacientes com RDM. **Métodos:** Trinta e dois pacientes e 25 controles foram incluídos. Os níveis urinários de hepcidina, netrina-1, NGAL e MCP-1/CCL-2 foram determinados por ELISA. **Resultados:** Os pacientes apresentaram níveis séricos mais elevados de creatinina (Cr), albumina na urina e relação netrina-1/Cr com menor TFG. Houve correlação positiva entre proteína na urina/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr e netrina-1 com NGAL ( $r = 0,397$ ,  $p = 0,031$ ;  $r = 0,437$ ,  $p = 0,041$ ,  $r = 0,323$ ,  $p = 0,042$ , respectivamente). A netrina-1/Cr na urina foi correlacionada positivamente com MCP-1/CCL-2/Cr ( $r = 0,356$ ,  $p = 0,045$ ). Houve associações positivas entre a presença de proteinúria e netrina-1/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr e NGAL/Cr [Odds ratio (OR): 1,423,  $p = 0,037$ , OR: 1,553,  $p = 0,033$ , OR: 2,112,  $p = 0,027$ , respectivamente]. A análise da curva ROC mostrou que netrina-1/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr e NGAL/Cr apresentaram altos valores preditivos para determinar a proteinúria ( $p = 0,027$ ,  $p = 0,041$ ,  $p = 0,035$ , respectivamente). A hepcidina/Cr na urina foi correlacionada negativamente com a reabsorção tubular de fósforo e positivamente com a NGAL/Cr na urina ( $r = -0,418$ ,  $p = 0,019$ ;  $r = 0,682$ ,  $p = 0,000$ ; respectivamente). **Conclusões:** MCP-1/CCL-2 pode ter participação no desenvolvimento de proteinúria no RDM. A Netrina-1 pode ser um fator protetor contra lesão renal induzida por proteinúria. Heparidina/Cr na urina pode refletir danos

### ABSTRACT

**Introduction:** Glomerular hyperfiltration may lead to proteinuria and chronic kidney disease in unilateral multicystic dysplastic kidney (MCDK). We aimed to investigate the urine neutrophil-gelatinase-associated lipocalin (NGAL), netrin-1, hepcidin, and C-C motif chemokine ligand-2 (MCP-1/CCL-2) levels in patients with MCDK. **Methods:** Thirty-two patients and 25 controls were included. The urine hepcidin, netrin-1, NGAL, and MCP-1/CCL-2 levels were determined by ELISA. **Results:** The patients had higher serum creatinine (Cr) levels, urine albumin, and netrin-1/Cr ratio with lower GFR. There were positive correlations between urine protein/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr, and netrin-1 with NGAL ( $r = 0.397$ ,  $p = 0.031$ ;  $r = 0.437$ ,  $p = 0.041$ ,  $r = 0.323$ ,  $p = 0.042$ , respectively). Urine netrin-1/Cr was positively correlated with MCP-1/CCL-2/Cr ( $r = 0.356$ ,  $p = 0.045$ ). There were positive associations between the presence of proteinuria and netrin-1/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr, and NGAL/Cr [Odds ratio (OR): 1.423,  $p = 0.037$ , OR: 1.553,  $p = 0.033$ , OR: 2.112,  $p = 0.027$ , respectively]. ROC curve analysis showed that netrin-1/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr, and NGAL/Cr had high predictive values for determining proteinuria ( $p = 0.027$ ,  $p = 0.041$ ,  $p = 0.035$ , respectively). Urine hepcidin/Cr was negatively correlated with tubular phosphorus reabsorption and was positively correlated with urine NGAL/Cr ( $r = -0.418$ ,  $p = 0.019$ ;  $r = 0.682$ ,  $p = 0.000$ ; respectively). **Conclusions:** MCP-1/CCL-2 may play a role in the development of proteinuria in MCDK. Netrin-1 may be a protective factor against proteinuria-induced renal

Submetido em: 24/01/2019.

Aprovado em: 22/04/2020.

### Correspondência para:

Nuran Cetin

E-mail: nurancetin17@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-8239-JBN-2019-0022>



em túbulos proximais no RDM. O valor de NGAL/Cr urinário pode ser um preditor de danos nos túbulos por proteinúria.

**Descritores:** Hecpidinas; Netrina-1; Rim Displásico Multicístico ; Criança.

injury. Urine hepcidin/Cr may reflect proximal tubule damage in MCDK. Urine NGAL/Cr may be a predictor of tubule damage by proteinuria.

**Keywords:** Hecpidins; Netrin-1; Multicystic Dysplastic Kidney; Child.

## INTRODUÇÃO

Crianças com rim funcional solitário (RFS) têm um risco aumentado de desenvolver insuficiência renal mais tardiamente em suas vidas. O rim displásico multicístico unilateral (RDM) é uma das causas mais comuns de RFS congênito (RFS<sub>c</sub>). Devido à redução da massa renal, a hiperfiltração glomerular nos néfrons remanescentes causa glomerulosclerose, hipertensão e proteinúria no início da vida.<sup>1</sup> A lesão tubular tem sido proposta como a via comum final para a progressão crônica da doença renal.<sup>2</sup>

O aumento de fluxo do filtrado glomerular causa tensão de cisalhamento no fluido (ECF) na superfície apical das células dos túbulos proximais no néfron remanescente, enquanto a hipertrofia remanescente do néfron aumenta a demanda metabólica e causa alterações estruturais tubulares epiteliais nas células tubulares proximais.<sup>3</sup>

As células endoteliais e as células epiteliais tubulares renais secretam netrina-1, uma molécula relacionada à laminina. A netrina-1 possui massa molecular de 72 kDa, portanto, não é improvável que seja filtrada pelo glomérulo em condições normais.<sup>4</sup> A expressão da netrina-1 é induzida 3 horas após a reperusão de isquemia nas células epiteliais tubulares proximais. O nível de netrina-1 atinge o pico em 24 horas.<sup>4</sup> Foi demonstrado que a netrina-1 é expressa por células epiteliais tubulares proximais, e é determinada na urina imediatamente após a reperusão. Assim, acredita-se que a netrina-1 seja um biomarcador diagnóstico precoce de lesão renal aguda.<sup>5</sup> Inflamação e apoptose nas células epiteliais tubulares são reguladas pela netrina-1 na lesão renal aguda.<sup>6</sup>

A hepcidina é um peptídeo de baixo peso molecular (2,78 kDa), produzida pelo fígado. Altos níveis de ferro e infamação aumentam a produção hepática de hepcidina.<sup>7</sup> A excreção de hepcidina na urina é baixa em indivíduos normais.<sup>8</sup> Acredita-se que os níveis elevados de hepcidina na urina reflitam a redução de sua reabsorção nos túbulos proximais.<sup>9</sup>

A produção do ligante 2 da quimiocina com motif C-C (CCL-2, também conhecido como proteína

quimioatraente 1 dos monócitos [MCP-1]), é um fator quimiotático potente para monócitos, e também aumenta em resposta às citocinas pró-inflamatórias durante a inflamação, e vários estudos relataram a participação de MCP-1/CCL2 em doenças renais. A MCP-1/CCL2 está associada a danos túbulo-intersticiais e fibrose intersticial na nefropatia por IgA.<sup>10</sup> Também foram encontradas associações significativas entre os níveis urinários de MCP-1/CCL-2 e a expressão renal de MCP-1/CCL-2 em resposta ao acúmulo de macrófagos intersticiais na nefropatia diabética.<sup>11</sup>

As células tubulares proximais lesionadas também secretam quantidades elevadas de lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (NGAL), um membro da superfamília da lipocalina, na urina durante lesão renal isquêmica ou nefrotóxica. A NGAL é expressa em neutrófilos, mas apenas em níveis baixos no rim normal. Portanto, a NGAL tem sido sugerida como um biomarcador urinário precoce de danos renais ativos, ao invés de se usar parâmetros funcionais, como a creatinina sérica ou a taxa de filtração glomerular (TFG).<sup>12</sup>

O mecanismo exato da lesão mediada por hiperfiltração permanece incerto.<sup>13</sup> Considera-se que as alterações associadas a forças biomecânicas no glomérulo e a resposta celular a forças biomecânicas em termos de parâmetros hemodinâmicos têm participação no desenvolvimento de lesões por hiperfiltração.<sup>14</sup> Este trabalho descreve um estudo transversal envolvendo crianças com RDM unilateral acompanhadas em nosso departamento. O objetivo do estudo foi investigar os níveis de NGAL, netrina-1, hepcidina e MCP-1/CCL-2 na urina nesses pacientes com risco aumentado de lesão renal causada por hiperfiltração glomerular. Também avaliamos as associações entre esses potenciais biomarcadores, proteinúria e TFG em nossos pacientes com RDM.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### GRUPO DE ESTUDOS

Este foi um estudo de caráter transversal, conduzido em um único centro. Os participantes

foram divididos em dois grupos: pacientes com RDM e controles saudáveis. Os pacientes com RDM foram acompanhados no Ambulatório de Nefrologia Pediátrica entre setembro de 2010 e março de 2017. O RDM unilateral foi documentado por ultrassonografia renal e cintilografia com ácido dimercaptosuccínico.

Em nossa Clínica de Nefrologia Pediátrica, o diagnóstico de infecção do trato urinário (ITU) foi feito com base na presença de pelo menos 100.000 unidades formadoras de colônias/mL de um uropatógeno cultivado a partir da amostra de urina e piúria (contagem de leucócitos  $\geq 5$ , medido com campo de alta ampliação em um exame microscópico de urina), e sintomas de ITU. A infecção recorrente do trato urinário, ITU, foi definida como dois ou mais episódios de pielonefrite aguda ou pielonefrite aguda com um ou mais episódios de cistite, ou três ou mais episódios de cistite.<sup>15</sup> A hidronefrose foi definida usando o sistema de classificação da Society for Fetal Urology.<sup>16</sup> A ureterocistografia miccional (UCGM) foi realizada apenas em crianças com IRTU (infecção recidivante do trato urinário) ou cicatrizes renais à cintilografia com ácido dimercaptosuccínico.

Pacientes que apresentavam sinais e sintomas de infecção, histórico de ITU ou outras anormalidades renais (como hidronefrose ou refluxo vesicoureteral) foram excluídos do estudo. Pacientes em uso de medicamentos que poderiam prejudicar a função renal também foram excluídos.

Crianças saudáveis de acordo com a idade e o sexo foram incluídas como grupo controle. Crianças com sinais e sintomas de infecção, histórico de infecção do trato urinário, doenças inflamatórias crônicas ou anomalias renais ou do trato urinário também foram excluídas do grupo controle.

Amostras de sangue venoso periférico foram obtidas pela manhã, após o jejum noturno. A creatinina sérica (Cr), o nitrogênio ureico no sangue (NUS), os eletrólitos, a hemoglobina, os níveis séricos de ferro e ferritina, a capacidade de ligação ao ferro e a saturação da transferrina foram determinados a partir das amostras de sangue de cada paciente e criança controle. Todas as crianças com parâmetros anormais do metabolismo do ferro não foram incluídas neste estudo porque altos níveis de ferro poderiam aumentar os níveis de hepcidina. As amostras de urina matinal foram centrifugadas e os sobrenadantes foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até uso posterior. Reabsorção tubular de fosfato (TPR), excreção urinária de albumina, creatinina e proteína foram medidas em amostras matinais.

A razão de albumina e creatinina na urina (albumina/creatinina (ACR)) local de 30-300 mg/g foi definida como microalbuminúria. A proteinúria foi definida como uma razão proteína/creatinina  $\geq 0,2$  mg/mg (maior que 0,5 para crianças de 6 a 24 meses). A taxa de filtração glomerular estimada [TFGe/mL/min/ $1,73\text{ m}^2$ ] =  $k \times \text{comprimento do corpo (cm)}/\text{nível sérico de Cr (mg/dL)}$  foi determinada pela antiga fórmula de Schwartz.<sup>17</sup>

As concentrações urinárias de NGAL, netrin-1, hepcidina e MCP-1 / CCL-2 foram determinadas usando métodos de ensaio imunossorventes ligado a enzima (ELISA) (Elabsience, Wuhan, China) com coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio  $<10\%$  (Número de catálogo do kit NGAL: E-EL-H0096; netrina-1: E-EL-H2328; hepcidina: E-EL-H0077 e MCP-1/CCL-2: E-EL-H0020). As sensibilidades dos kits ELISA foram de 0,1 ng/mL; 18,75 pg/mL; 0,1 ng/mL e 9,38 pg/mL, respectivamente. Por ser um ensaio heterogêneo, o ELISA separa alguns componentes da mistura de reação analítica adsorvendo certos componentes que são fisicamente imobilizados em uma fase sólida. As leituras e cálculos de absorvância foram realizados com o leitor de microplacas VICTOR X3 (Perkin Elmer, Waltham, Estados Unidos). Os resultados são relatados como netrina-1/creatinina (Cr) e MCP-1/CCL-2/Cr em pg/mL. Os valores de NGAL/Cr e hepcidina/Cr são relatados em ng/mL.

#### APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética local (número de aprovação 80558721/130). O consentimento informado foi obtido dos responsáveis ou pais de cada participante incluído no estudo. O protocolo do estudo foi consistente com as diretrizes éticas da Declaração de Helsinque de 1975, refletidas em uma aprovação prévia do comitê de pesquisa em seres humanos da instituição.

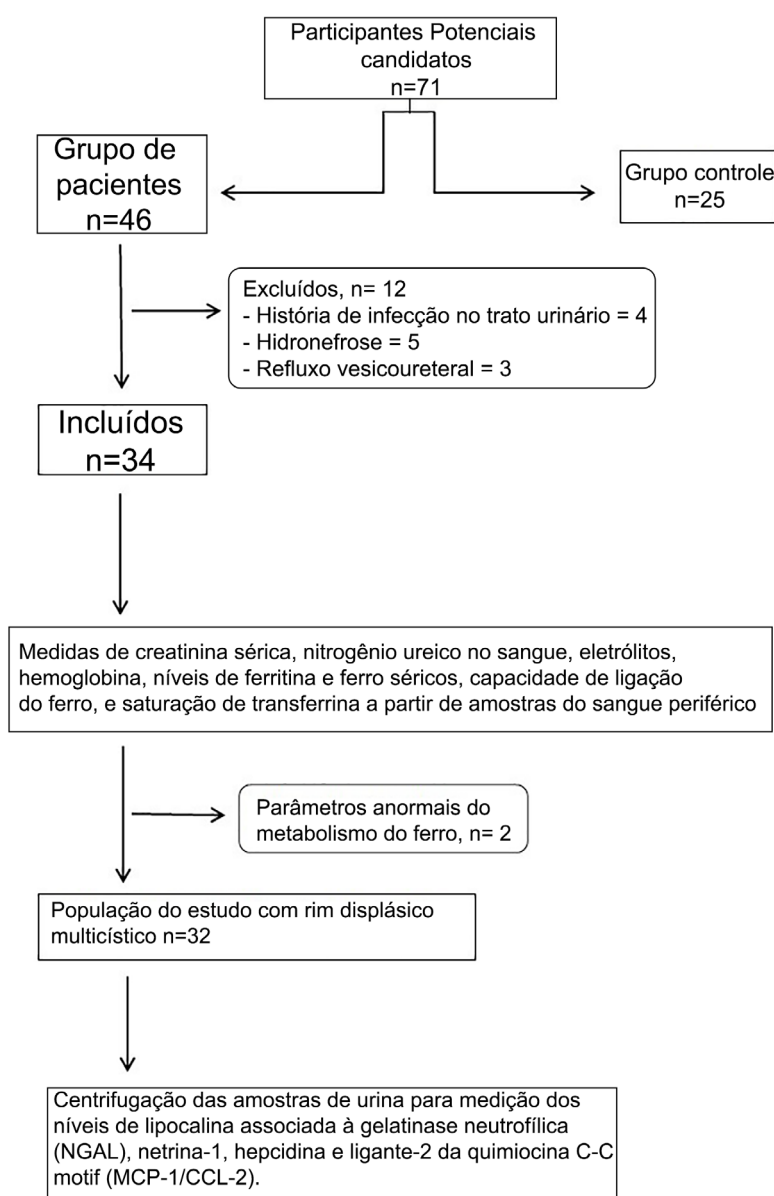
#### ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o SPSS 11.5 (SPSS Inc, Chicago, IL). Os valores foram relatados como média e DP para variáveis contínuas com distribuição normal, mediana e intervalo interquartil (IQR). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade dos dados. As médias foram comparadas usando o teste-t de amostra independente para os dados com distribuição normal. Dados sem distribuição normal foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. As correlações entre

variáveis foram avaliadas usando-se o teste de Pearson ou Spearman, conforme apropriado. As variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. Fizemos uma regressão linear para explorar a relação entre biomarcadores urinários e TFGe como variável dependente. Realizamos uma análise de regressão logística para determinar a influência desses biomarcadores urinários na presença de proteinúria e microalbuminúria em pacientes com RDM. A análise de características operacionais do receptor (ROC) foi usada para determinar os valores de corte e a sensibilidade/especificidade de NGAL/Cr. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS

Quatorze dos 46 pacientes com RDM em nossa clínica de nefrologia pediátrica foram excluídos por não atenderem aos critérios. Dos 14 pacientes excluídos, 4 tinham histórico de ITU. Detectamos hidronefrose em 5 pacientes. Três dos quatro pacientes submetidos à UCGM apresentaram RVU. Dois pacientes foram excluídos por deficiência de ferro. No total, 32 pacientes com RDM e 25 crianças saudáveis foram incluídos neste estudo. A descrição do fluxo de recrutamento de participantes é mostrada como um diagrama na Figura 1.

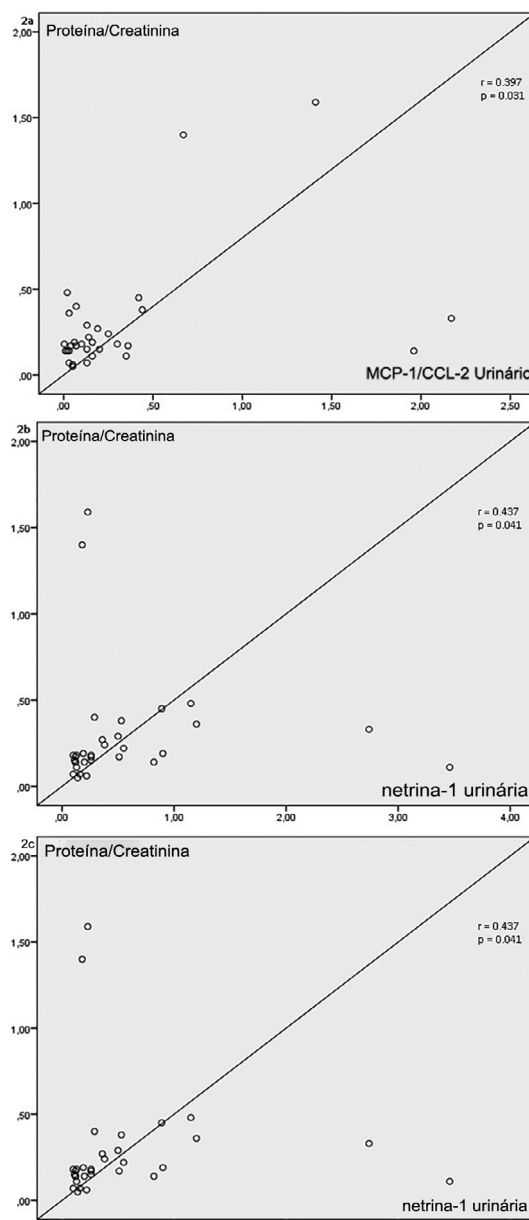


**Figura 1.** Fluxograma da seleção dos pacientes.

Os dados demográficos e laboratoriais dos pacientes e do grupo controle estão mostrados na Tabela 1. Os níveis séricos de creatinina e RAC foram maiores nos pacientes do grupo de estudo do que no grupo controle [ $0,53 \pm 0,23$  versus  $0,4 \pm 0,13$  mg/dL,  $p = 0,031$ ;  $11,4$  ( $4,6-23,72$ ) versus  $6,35$  ( $2,92-10,9$ ) mg/g,  $p = 0,037$ , respectivamente]. A TFGe foi menor nos pacientes do que nos controles ( $140,6 \pm 28,33$  versus  $175,8 \pm 29,69$  mg/dL, respectivamente,  $p = 0,000$ ). A relação urinária de netrina-1/Cr foi maior nos pacientes do que nos controles ( $p = 0,041$ ).

A análise de correlação mostrou uma correlação negativa entre a relação pontual de proteína/Cr na urina e a % RTF ( $r = -0,43$ ,  $p = 0,003$ ). Correlações positivas significativas foram detectadas entre a relação pontual de proteína/Cr na urina e MCP-1/CCL-2 urinária com netrina-1/Cr ( $r = 0,397$ ,  $p = 0,031$ ;  $r = 0,437$ ,  $p = 0,041$ , respectivamente, Figuras 2a e 2b). Também foi encontrada uma correlação positiva significativa entre netrina-1/Cr e a MCP-1/CCL-2/Cr urinária ( $r = 0,356$ ,  $p = 0,045$ , Figura 2c). A relação NGAL/Cr na urina foi correlacionada positivamente com a proteína/Cr na urina pontual, e a hepcidina/Cr na urina ( $r = 0,323$ ,  $p = 0,042$ ;  $r = 0,682$ ,  $p = 0,000$ , respectivamente, Figuras 3a e 3b). A hepcidina/Cr na urina foi correlacionada negativamente com % RTF ( $r = -0,418$ ,  $p = 0,019$ ). A TFG não se correlacionou com a RAC ou a relação de proteína/creatinina na urina ( $r = 0,07$ ,  $p = 0,704$ ;  $r = -0,016$ ,  $p = 0,931$ , respectivamente).

Onze pacientes (34,4%) apresentaram proteinúria. A comparação dos dados laboratoriais de pacientes com proteinúria e pacientes não proteinúricos revelou níveis mais altos de NGAL/Cr na urina nos pacientes proteinúricos do que nos pacientes não proteinúricos [ $0,22$  ( $0,19-0,42$ ) versus  $0,17$  ( $0,09-0,34$ ) ng/mg de creatinina, respectivamente,  $p = 0,034$ ].

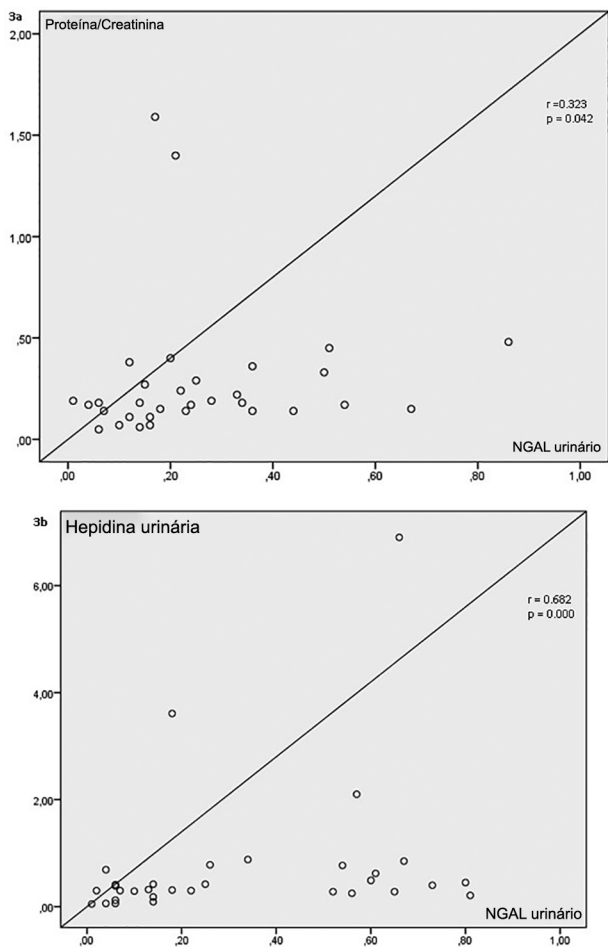


**Figura 2.** (a) Correlação entre a razão proteína/creatinina e MCP-1/CCL2, (b) Correlação entre a razão proteína/creatinina e netrina-1 urinária, (c) Correlação entre netrina urinária e MCP-1/CCL2.

**TABELA 1.** DADOS DEMOGRÁFICOS E LABORATORIAIS DE PACIENTES E CONTROLES.

	Pacientes (n = 32)	Grupo controle (n = 25)	p
Idade (anos)	7.5 (3.25-13)	8 (5-9.5)	0.881
Sexo feminino (n, %)	19 (59.4%)	9 (36%)	0.082
Fósforo (mg/dL)	$4.9 \pm 0.89$	$5 \pm 0.76$	0.561
Creatinina (mg/dL)	$0.53 \pm 0.23$	$0.4 \pm 0.13$	0.031
RTF (%)	$94.6 \pm 3.98$	$94.3 \pm 2.66$	0.213
RAC (mg/g)	11.4 (4.6-23.72)	6.35 (2.92-10.9)	0.037
Razão proteína/creatinina(mg/mg)	0.18 (0.12-0.33)	0.15 (0.11-0.18)	0.511
TFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	$140.6 \pm 28.33$	$175.8 \pm 29.69$	0.000
Netrina-1 urinária (pg/mg creatinina)	0.26 (0.13-0.55)	0.14 (0.11-0.21)	0.041
Hepcidina urinária (ng/mg creatinina)	0.35 (0.26-0.67)	0.45 (0.25-0.56)	0.502
MCP-1/CCL-2 urinária (pg/mg creatinina)	0.13 (0.04-0.33)	0.08 (0.03- 0.24)	0.543
NGAL urinário (ng/mg creatinina)	0.2 (0.13-0.36)	0.22 (0.13-0.35)	0.672

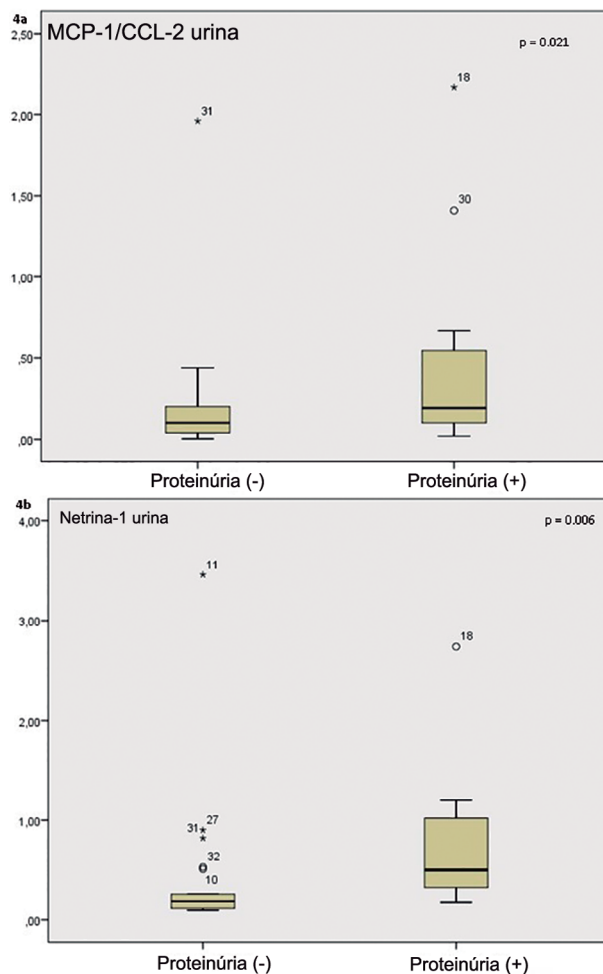
Valores relatados como média  $\pm$  DP ou mediana (intervalo interquartil). RTF: reabsorção tubular de fosfato; RAC: relação albumina/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular, MCP/CCL: proteína quimioatraente de monócitos/ligante de quimiocina C-C motif; NGAL: lipocalina associada à gelatinase neurofílica. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significativos.



**Figura 3.** (a) Correlação entre a razão proteína/creatinina e NGAL urinário. (b) Correlação entre a hepcidina urinária e NGAL.

As taxas urinárias de MCP-1/CCL-2 e netrina-1 foram maiores em pacientes proteinúricos do que em pacientes não proteinúricos [0,29 (0,26-0,32) versus 0,12 (0,05-0,21) pg/mg de creatinina,  $p = 0,021$ ; 0,5 (0,29-1,15) versus 0,19 (0,12-0,38) pg/mg de creatinina,  $p = 0,006$ , respectivamente, Figura 4a e 4b).

A análise da curva ROC mostrou que o valor de corte da razão NGAL/Cr urinária para a previsão de proteinúria foi de 0,27 ng/mg de creatinina, com sensibilidade de 91,1% e especificidade de 95,1%. A área sob a curva (ASC  $\pm$  SE) foi de  $0,729 \pm 0,088$  [intervalo de confiança de 95% (IC): 0,558-0,901,  $p = 0,035$ ]. A análise da curva ROC revelou que a MCP-1/CCL-2/Cr na urina apresentava alto valor preditivo para determinação da proteinúria, com sensibilidade de 74,1% e especificidade de 65,8% (ASC  $\pm$  SE:  $0,654 \pm 0,072$ , valor de corte: 0,24 pg/mg de creatinina, IC 95%: 0,608-0,831,  $p = 0,041$ ). A netrina-1/Cr na urina foi preditora de proteinúria, com sensibilidade de 81,8% e especificidade de 71,4% (ASC  $\pm$  SE:  $0,797 \pm 0,079$ , IC95%: 0,643-0,950, valor de corte: 0,185 pg/mg creatinina,  $p = 0,027$ ).



**Figura 4.** (a) Os pacientes sem proteinúria tinham níveis urinários mais altos de MCP-1/CCL2 e (b) níveis urinários mais altos de netrina-1.

Os fatores associados à presença de proteinúria nos pacientes foram investigados por análise de regressão logística. Foram encontradas associações positivas significativas entre a presença de proteinúria urinária e netrin-1/Cr, MCP-1/CCL-2/Cr e NGAL/Cr [odds ratio (OR): 1,423,  $p = 0,037$ , OR: 1,553,  $p = 0,033$  e OR: 2,112,  $p = 0,027$ , respectivamente). Os resultados detalhados estão mostrados na Tabela 2.

**TABELA 2.** ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA AVALIANDO FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE PROTEINÚRIA EM PACIENTES.

	Odds ratio	95% IC	p
Creatinina sérica	0.539	0.304 - 1.690	0.487
TFGe	0.748	0.618 - 0.999	0.867
Netrina-1	1.423	1.243 - 4.823	0.037
Hepcidina	0.568	0.849 - 3.663	0.128
MCP-1/CCL2	1.553	1.386 - 6.432	0.033
NGAL	2.112	2.105 - 8.225	0.027

IC: intervalo de confiança; TFGe: taxa estimada de filtração glomerular; MCP/CCL: proteína quimioatraente de monócitos/ ligante de quimiocinas C-C motif; NGAL: lipocalina associada à gelatinase neutrofílica. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## DISCUSSÃO

Investigamos os níveis urinários de hepcidina, netrina-1, NGAL e MCP-1/CCL-2 em crianças com RDM. Nossos resultados revelaram que os pacientes com RDM apresentaram uma relação netrina-1/Cr na urina mais alta quando comparados aos controles saudáveis. As razões de MCP-1/CCL-2/Cr, netrina-1/Cr e NGAL/Cr na urina mostraram associações significativas com a presença de proteinúria.

A hipertrofia compensatória no rim remanescente contribui para a albuminúria e uma redução da TFG. A microalbuminúria é considerada uma manifestação de dano do endotélio vascular glomerular. A maior quantidade de albumina filtrada devido a lesão glomerular pode exceder a capacidade de reabsorção de albumina nos túbulos. Outra possibilidade é que as alterações na reabsorção tubular de albumina possam participar do desenvolvimento da microalbuminúria.<sup>18</sup>

A literatura atual mostra resultados conflitantes quanto à associação entre hiperfiltração glomerular e microalbuminúria em crianças. Por exemplo, Schreuder et al. mostraram que havia microalbuminúria em 23% dos 66 pacientes com RFSc.<sup>19</sup> Por outro lado, Cachat et al. investigaram a associação entre microalbuminúria e fração de filtração em RFS e encontraram associação muito baixa em pacientes com TFG normal.<sup>20</sup> No presente estudo, detectamos microalbuminúria em metade dos nossos pacientes, mas não conseguimos encontrar uma associação significativa entre microalbuminúria e TFG. Esse resultado pode corroborar a possibilidade de a microalbuminúria ser causada por disfunção tubular proximal ou por outros fatores não identificados em crianças com RDM.

A medição da função renal geralmente é focada na TFG. A determinação do valor real é bastante problemática, onerosa e difícil na prática diária. Portanto, o uso do valor estimado da TFG é recomendado como método alternativo.<sup>21,22</sup>

A medida do valor da TFG depende do nível sérico de creatinina, que reflete a massa muscular, que varia amplamente entre os indivíduos.<sup>23</sup> Além disso, vários estudos descreveram a hiperfiltração como resultado do aumento da pressão capilar nos glomérulos.<sup>24,25</sup> Em nosso estudo, a TFG foi significativamente maior no grupo controle. Utilizamos a TFG com base no nível sérico de creatinina. Além disso, não avaliamos a massa muscular em nosso grupo de estudo. Este resultado pode ser devido a diferenças individuais entre crianças.

A proteinúria é vista como um importante preditor da atividade e progressão das doenças renais. A própria proteinúria também pode levar à progressão de danos renais e à redução da TFG em pacientes com massa reduzida de néfrons. Assim, sugerem-se intervenções terapêuticas para reduzir a proteinúria e retardar a progressão da doença renal crônica e a redução da TFG.<sup>26</sup> Vários estudos experimentais demonstraram uma associação positiva entre albuminúria e expressão tubular de MCP-1/CCL-2.<sup>27,28</sup> MCP-1/CCL-2, que é produzido por células epiteliais mesangiais e tubulares, expresso por monócitos/macrófagos ativados, células T e células natural killers. O MCP-1/CCL-2 desempenha um papel importante na infiltração de leucócitos no rim e no desenvolvimento de fibrose túbulo-intersticial.<sup>29</sup> A inibição da superprodução de MCP-1/CCL2 causada pela exposição à albumina mostrou restaurar a disfunção de podócitos em ratos.<sup>30</sup> A literatura atual mostra correlações significativas entre os níveis de MCP-1/CCL-2 na urina e de proteínas em pacientes com nefrite lúpica ou glomerulonefrite primária.<sup>31,32</sup> Vários estudos também avaliaram os níveis urinários de MCP-1/CCL2 em crianças com patologias renais. Por exemplo, Wang et al. revelaram que os níveis urinários de MCP-1/CCL-2 estavam associados à proteinúria, mas não aos níveis séricos de Cr e NUS em crianças com nefrite na púrpura de Henoch-Schonlein.<sup>33</sup> Wasilewska et al. sugeriram que a proteinúria permanente e a fibrose renal progressiva poderiam levar ao aumento dos níveis de MCP-1/CCL-2 na urina em crianças com proteinúria glomerular.<sup>34</sup> Bartoli et al. mostraram que os níveis urinários de MCP-1/CCL2 estavam significativamente maiores em crianças com RDM quando comparados ao grupo controle. Eles sugeriram que a inflamação renal crônica por monócitos locais é um fator preponderante no desenvolvimento de dano renal progressivo.<sup>35</sup> Em nosso estudo, encontramos uma associação significativa entre a MCP-1/CCL-2 urinária e a proteinúria, mas não com TFG ou creatinina sérica. A maior razão de MCP-1/CCL-2/Cr na urina pode ser causada por proteinúria em crianças com RDM. Portanto, a razão MCP-1/CCL-2/Cr na urina pode ser um preditor de proteinúria independente da TFG.

A Netrina-1, que tem massa molecular de 72 KDa, não é filtrada pelo glomérulo em condições normais.

Assim, é difícil identificar um efeito da netrina-1 nos glomérulos. As células epiteliais tubulares saudáveis não expressam, ou expressam apenas baixos níveis de netrina-1. Durante a lesão isquêmica, a netrina-1 produzida pelas células epiteliais tubulares proximais é secretada no lúmen do túbulo, e é excretada na urina.<sup>36</sup> Estudos recentes indicam ainda que altos níveis de netrina-1 na urina podem ser um biomarcador para a detecção precoce de lesão renal aguda.<sup>37</sup> Sabe-se que os níveis de netrina-1 na urina aumentam na doença renal crônica, bem como após lesão renal aguda.<sup>4</sup> Li et al. revelaram que os níveis de netrina-1 na urina estavam mais altos em crianças com rim obstruído do que em um grupo com hidronefrose não obstrutiva, e em crianças saudáveis.<sup>38</sup> Demonstramos uma relação netrina-1/Cr na urina mais alta em pacientes com RDM do que no nosso grupo controle saudável. Além disso, a relação netrin-1/Cr urinária esteve positivamente associada à presença de proteinúria em nossos pacientes. Esses achados sugerem que a netrina-1 urinária pode estar aumentada para proteger as células epiteliais dos efeitos nocivos da proteinúria.

A proteinúria pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento de lesão túbulo-intersticial e na diminuição da função renal a longo prazo. A reabsorção aumentada de proteínas filtradas pode causar danos tubulares proximais.<sup>39</sup> Por outro lado, os danos tubulares proximais podem causar proteinúria clínica devido à endocitose tubular comprometida da albumina.<sup>40</sup> A NGAL é um biomarcador de danos tubulares causados por alterações por tensão de cisalhamento no fluido das células tubulares proximais.<sup>41</sup> Em nosso estudo, os pacientes proteinúricos apresentaram uma relação NGAL/Cr na urina mais alta quando comparados aos pacientes não proteinúricos. O dano às células epiteliais proximais dos túbulos pode levar à proteinúria em pacientes com RDM e vice-versa. A interação entre a reabsorção de NGAL no túbulo proximal e o aumento da albumina filtrada pode aumentar a excreção urinária de NGAL em pacientes proteinúricos.<sup>42</sup> Assim, os níveis aumentados de NGAL na urina provavelmente refletem o dano no túbulo causado pela proteinúria.

A hepcidina, que é uma proteína reguladora da homeostase do ferro, é filtrada livremente através do glomérulo. A hepcidina é reabsorvida pelas células epiteliais dos túbulos proximais e sintetizada na região dos túbulos distais.<sup>43</sup> Estudos recentes indicaram que o nível de hepcidina na urina pode ser um biomarcador em potencial para lesão renal aguda.<sup>44</sup>

Por exemplo, Fufaa et al. demonstraram que o nível de hepcidina na urina poderia servir como um potencial biomarcador de invasão inflamatória de células em lesões precoces na nefropatia diabética.<sup>45</sup> Em nosso estudo, não encontramos níveis elevados de hepcidina na urina de nossos pacientes, mas encontramos uma correlação positiva entre hepcidina/Cr e NGAL/Cr na urina. Além disso, a razão hepcidina/Cr na urina foi correlacionada negativamente com os valores de RTF. A razão hepcidina/Cr na urina pode, portanto, refletir uma reabsorção tubular proximal reduzida devido a danos nas células epiteliais em pacientes com RDM.

Nosso estudo tem algumas limitações. Foi um estudo transversal com um pequeno tamanho amostral. Não medimos os níveis séricos dos potenciais biomarcadores indicados, portanto não conseguimos determinar a relação entre os níveis séricos e urinários. Não coletamos amostras de urina de 24 horas para medições. A verdadeira TFG não foi medida em nossa população de estudo. Além disso, não avaliamos os efeitos a médio e longo prazo dos potenciais biomarcadores. No entanto, este é o primeiro estudo a investigar o significado clínico de NGAL, netrina-1 e hepcidina na urina de crianças com RDM.

## CONCLUSÃO

Os resultados de nosso estudo sugerem que a razão MCP-1/CCL-2 pode desempenhar um papel no desenvolvimento de proteinúria no RDM, enquanto a netrina-1 pode ser um biomarcador indicando a presença de proteinúria. A hepcidina na urina pode refletir danos nos túbulos proximais em crianças com RDM. A relação NGAL/Cr na urina pode ser um preditor de danos nos túbulos por proteinúria. Estudos prospectivos com amostras maiores são necessários para confirmar se esses biomarcadores estão associados a dano tubular glomerular ou proximal em pacientes com RDM.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Comitê de Projetos de Pesquisa Científica da Universidade Eskisehir Osmangazi (número do projeto: 2016-1301).

## CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram para a concepção e desenvolvimento do estudo, coleta, análise e interpretação dos dados, redação do artigo ou em sua revisão crítica e aprovação da versão final.



## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

## REFERÊNCIAS

- Hegde S, Coulthard MG. Renal agenesis and unilateral nephrectomy: what are the risks of living with a single kidney?. *Pediatr Nephrol.* 2009 Mar;24(3):439-46.
- Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern Med.* 2004 Jan;43(1):9-17.
- Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012 Jun;27(6):901-9.
- Reeves WB, Kwon O, Ramesh G. Netrin-1 and kidney injury. II. Netrin-1 is an early biomarker of acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Apr;294(4):F731-8.
- Aly MH, Alnahal A, Emad G, Jumaa AA, El Shaarawy MM. Urinary netrin-1 predicts early ischemic acute kidney injury after cardiopulmonary bypass. *Egypt J Intern Med.* 2017;29(4):170-5.
- Wang W, Reeves WB, Pays L, Mehlen P, Ramesh G. Netrin-1 overexpression protects kidney from ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. *Am J Pathol.* 2009 Sep;175(3):1010-8.
- Zhang X, Jin M, Wu H, Nadasdy T, Nadasdy G, Harris N, et al. Biomarkers of lupus nephritis determined by serial urine proteomics. *Kidney Int.* 2008 Sep;74(6):799-807.
- Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood.* 2008 Nov;112(10):4292-7.
- Peters HP, Laarakkers CM, Pickkers P, Masereeuw R, Boerman OC, Eek A, et al. Tubular reabsorption and local production of urine hepcidin-25. *BMC Nephrol.* 2013 Mar;14:70.
- Ou ZL, Hotta O, Natori Y, Sugai H, Taguma Y, Natori Y. Enhanced expression of C chemokine lymphotactin in IgA nephropathy. *Nephron.* 2002;91(2):262-9.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* 2006 Jan;69(1):73-80.
- Zappitelli M, Washburn KK, Arikian AA, Loftis L, Ma Q, Devarajan P, et al. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in critically ill children: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2007;11(4):R84.
- Wang X, Johnson AC, Williams JM, White T, Chade AR, Zhang J, et al. Nephron deficiency and predisposition to renal injury in a novel one-kidney genetic model. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Jul;26(7):1634-46.
- Srivastava T, Dai H, Heruth DP, Alon US, Garola RE, Zhou J, et al. Mechanotransduction signaling in podocytes from fluid flow shear stress. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2018 Jan;314(1):F22-34.
- Mori R, Lakhanpaul M, Verrier-Jones K. Diagnosis and management of urinary tract infection in children: summary of NICE guidance. *BMJ.* 2007 Sep;335(7616):395-7.
- Nguyen HT, Herndon CD, Cooper C, Gatti J, Kirsch A, Kokorowski P, et al. The Society for Fetal Urology consensus statement on the evaluation and management of antenatal hydronephrosis. *J Pediatr Urol.* 2010;6(3):212-31.
- Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am.* 1987 Jun;34(3):571-90.
- Birn H, Christensen EI. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(3):440-9.
- Schreuder MF, Langemeijer ME, Bökenkamp A, Delemarre-Van de Waal HA, Van Wijk JA. Hypertension and microalbuminuria in children with congenital solitary kidneys. *J Paediatr Child Health.* 2008 Jun;44(6):363-8.
- Cachat F, Combesure C, Chehade H, Zeier G, Mosig D, Meyrat B, et al. Microalbuminuria and hyperfiltration in subjects with nephro-urological disorders. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28(2):386-91.
- National Kidney Foundation (NKF). K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
- Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005 Jun;67(6):2089-100.
- Huang SH, Sharma AP, Yasin A, Lindsay RM, Clark WF, Filler G. Hyperfiltration affects accuracy of creatinine eGFR measurement. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011 Feb;6(2):274-80.
- Kimura G, London GM, Safar ME, Kuramochi M, Omae T. Glomerular hypertension in renovascular hypertensive patients. *Kidney Int.* 1991 May;39(5):966-72.
- Berg UB. Differences in decline in GFR with age between males and females. Reference data on clearances of inulin and PAH in potential kidney donors. *Nephrol Dial Transplant.* 2006 Sep;21(9):2577-82.
- Abitbol CL, Chandar J, Onder AM, Nwobi O, Montané B, Zilleruelo G. Profiling proteinuria in pediatric patients. *Pediatr Nephrol.* 2006 Jul;21(7):995-1002.
- Wühl E, Schaefer F. Therapeutic strategies to slow chronic disease progression. *Pediatr Nephrol.* 2008 May;23(5):705-16.
- Hilgers KE, Hartner A, Porst M, Mai M, Wittmann M, Hugo C, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage infiltration in hypertensive kidney injury. *Kidney Int.* 2000 Dec;58(6):2408-19.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009 Jun;29(6):313-26.
- Zoja C, Corna D, Locatelli M, Rottoli D, Pezzotta A, Morigi M, et al. Effects of MCP-1 inhibition by bindarit therapy in a rat model of polycystic kidney disease. *Nephron.* 2015;129(1):52-61.
- Dong X, Zheng Z, Luo X, Ding J, Li Y, Li Z, et al. Combined utilization of untimed single urine of MCP-1 and TWEAK as a potential indicator for proteinuria in lupus nephritis: a case-control study. *Medicine (Baltimore).* 2018 Apr;97(16):e0343.
- Chanrat E, Worawichawong S, Radinahamed P, Sathirapongsasuti N, Nongnuch A, Assanatham M, et al. Urine epidermal growth factor, monocyte chemoattractant protein-1 or their ratio as predictors of complete remission in primary glomerulonephritis. *Cytokine.* 2018 Apr;104:1-7.
- Wang J, Ying Q, Zhong S, Chen Y, Di Y, Dai X, et al. Elevated urinary monocyte chemoattractant protein-1 levels in children with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *Pediatr Neonatol.* 2018 Jun;59(3):238-43.
- Wasilewska A, Zoch-Zwierz W, Taranta-Janusz K, Kolodziejczyk Z. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 excretion in children with glomerular proteinuria. *Scand J Urol Nephrol.* 2011 Feb;45(1):52-9.
- Bartoli F, Pastore V, Calè I, Aceto G, Campanella V, Lasalandra C, et al. Prospective study on several urinary biomarkers as indicators of renal damage in children with CAKUT. *Eur J Pediatr Surg.* 2019 Apr;29(2):215-22.
- Urbschat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers.* 2011 Jul;16(Suppl 1):S22-30.
- Ramesh G, Krawczeski CD, Woo JG, Wang Y, Devarajan P. Urinary netrin-1 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010 Mar;5(3):395-401.
- Li X, Liu X, Li J, Song E, Sun N, Liu W, et al. Semaphorin-3A and netrin-1 predict the development of kidney injury in children with congenital hydronephrosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2018 Feb/Apr;78(1-2):55-61.
- Zoja C, Morigi M, Remuzzi G. Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jun;14(Suppl 1):S36-41.

40. Russo LM, Sandoval RM, McKee M, Collins AB, Brown D, Molitoris BA, et al. The normal kidney filters nephrotic levels of albumin retrieved by proximal tubule cells: retrieval is disrupted in nephrotic states. *Kidney Int.* 2007 Mar;71(6):504-13.
41. Miravète M, Dissard R, Klein J, Gonzalez J, Caubet C, Pecher C, et al. Renal tubular fluid shear stress facilitates monocyte activation towards inflammatory macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jun;302(11):F1409-17.
42. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int.* 2009 Feb;75(3):285-94.
43. Kulaksiz H, Theilig F, Bachmann S, Gehrke SG, Rost D, Janetzko A, et al. The iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J Endocrinol.* 2005 Feb;184(2):361-70.
44. Ho J, Lucy M, Krokhn O, Hayglass K, Pascoe E, Darroch G, et al. Mass spectrometry-based proteomic analysis of urine in acute kidney injury following cardiopulmonary bypass: a nested case-control study. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(4):584-95.
45. Fufaa GD, Weil EJ, Nelson RG, Hanson RL, Knowler WC, Rovin BH, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 and hepcidin and early diabetic nephropathy lesions in type 1 diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant.* 2015 Apr;30(4):599-606.