Patricia Malafronte

Influência do polimorfismo do gene do *MCP-1* e do seu receptor *CCR2* em parâmetros clínicos e excreção urinária do *MCP-1* em pacientes com nefrite lúpica

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Nefrologia Orientadora: Dra. Viktória Woronik

> São Paulo 2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Malafronte, Patricia

Influência do polimorfismo do gene do *MCP-1* e do seu receptor *CCR2* em parâmetros clínicos e excreção urinária do *MCP-1* em pacientes com nefrite lúpica / Patricia Malafronte. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia. Orientadora: Viktória Woronik.

Descritores: 1.Nefrite lúpica 2.Genótipo 3.Citocinas 4.Proteínas quimioatraentes de monócitos 5.Receptores CCR2

USP/FM/SBD-271/08

Aos meus pais José e Mileide, pelo amor, confiança, carinho e compreensão que em mim depositaram. Pela presença sempre ativa em todos os meus sonhos e realizações.

A minha irmã Giseli e meu cunhado Walter, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos, e sobretudo pelo amor sempre presente.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Viktória Woronik pela sua amizade, orientação, competência, incentivo, compreensão e constante apoio na realização deste trabalho, mas em especial pela confiança em mim depositada e a oportunidade de trabalhar e aprender ao seu lado.

Ao Dr. José Mauro Vieira Jr., por sua co-orientação, carinho e amizade, mas principalmente pelo exemplo de compromisso com o ensino e a pesquisa.

À minha grande amiga Andréa, pelo seu carinho e por sua ajuda incondicional em todos os momentos em que precisei, mas em especial por sua eterna amizade.

Ao Dr. Rui Toledo Barros, cuja dedicação, disciplina e trabalho permanentes têm contribuído para o crescimento e o reconhecimento da Disciplina de Nefrologia do HC-FMUSP.

Ao Dr. Luis Antônio Miorin e à Dra. Yvoty Alves Santos Sens, pelo apoio e estímulo constantes, incentivando sempre o aprimoramento de minha carreira médica e acadêmica.

Às amigas de toda minha vida, Kiki, Jussara, Meire, Regina, Fabiana, Graciane, Débora, Milena, Claudinha, Ana Paula, Margarete, Cláudia e muitas outras que formam uma lista enorme de nomes, por toda compreensão, carinho, incentivo e apoio incondicional nos momentos mais difíceis dessa etapa.

Às novas amizades Cilene, Cris, Fabiana e Luciene que sempre me apoiaram e estimularam nos momentos mais difíceis da execução deste trabalho

Aos meus sócios, pela paciência, apoio e incentivo em todos os momentos da realização deste trabalho.

Ao Wagner, exemplo de generosidade e solidariedade, pelas horas dedicadas ao meu projeto, pela paciência em me ensinar os passos técnicos e, sobretudo pelo companheirismo e disponibilidade sempre.

Ao Isac de Castro pela disponibilidade e competente orientação estatística.

Aos colegas do Laboratório – LIM 16 que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do INCOR, em especial ao Dr. Alexandre Pereira, pela paciência, dedicação e ajuda incondicional na realização de parte importante e fundamental deste trabalho.

À Mirela e Márcia, pela competência, atenção e grande ajuda na execução de parte deste trabalho.

Aos colegas do ambulatório de Nefrologia, em especial Raimunda e Lalá, pelo carinho e apoio, sempre dispostas a ajudar em tudo que se mostrasse necessário.

À Eliana Gonçalves, secretária da pós-graduação da Disciplina de Nefrologia do HC-FMUSP, pelo carinho, dedicação e colaboração em todos os momentos.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INT	RODUÇÃO	1
1.1	Lupus Eritematoso Sistêmico	2
1.2	Nefrite Iúpica	3
1.3	Quimiocinas	9
1.4	Proteína Quimiotática de Monócito-1	13
1.5	MCP-1, CCR2 e Nefrite Iúpica	14
1.6	MCP-1, CCR2 e outras nefropatias	20
1.7	MCP-1 e CCR2 em patologias extra-renais	23
1.8	Polimorfismo do gene do MCP-1	25
1.9	Polimorfismo do receptor CCR2	29
2. OBJ	JETIVOS	32
2.1	Protocolo I: Estudo do genótipo	33
2.2	Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário	33
3. MÉ1	rodos	34
3.1	Protocolo I: Estudo do genótipo	35
3.2	Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário	36
3.3	Protocolo I e II: Aspectos comuns	38
3.4	Análise do polimorfismo do gene do MCP-1 e do seu receptor Co	CR2
	por reação de cadeia polimerase genômica	41
3.5	Análise Estatística	43
4. RES	SULTADOS	45
4.1	Protocolo I: Estudo do genótipo	46
4.2	Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário	66

5. DISCUSSÃO			
5.1	Protocolo I: Estudo do genótipo	85	
5.2	Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário	91	
6. CON	ICLUSÕES	98	
7. REF	ERÊNCIAS	102	

Resumo

Malafronte P. Influência do polimorfismo do gene do MCP-1 e do seu receptor CCR2 em parâmetros clínicos e excreção urinária do MCP-1 em pacientes com nefrite lúpica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 113p.

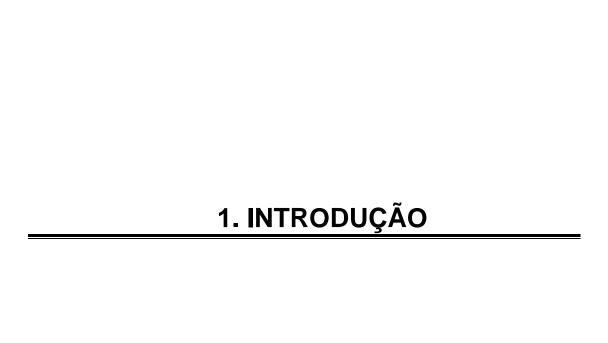
Introdução: A nefrite lúpica (NL) é o maior preditor de morbidade e mortalidade em pacientes portadores de lupus eritematoso sistêmico. Recentes estudos mostram que a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) está implicada na ativação de células inflamatórias, afetando a progressão e a severidade da NL, e que a excreção urinária do MCP-1 (uMCP-1) está aumentada em pacientes com NL em atividade. Na literatura os dados sobre o polimorfismo do gene MCP-1 A(-2518)G e do seu receptor CCR2 V(-64)I sobre a susceptibilidade para nefrite lúpica ainda estão em discussão. Objetivos: Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene MCP-1 e do seu receptor CCR2 em pacientes com NL e indivíduos saudáveis, além da associação de ambos os polimorfismos com parâmetros clínicos e histológicos nos pacientes portadores de NL. Além disso, avaliar a associação entre a excreção urinária do MCP-1 em pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade com parâmetros clínicos e histológicos. Pacientes e Métodos: As genotipagens do MCP-1 e do CCR2 foram realizadas em 197 pacientes com nefrite lúpica através da extração do DNA genômico, seguido da técnica de reação em cadeia da polimerase, utilizando-se primers específicos. A dosagem urinária do MCP-1 foi realizada em 34 pacientes com nefrite lúpica em atividade através da técnica de ELISA. Resultados: Foram estudados 197 pacientes portadores de nefrite lúpica, do sexo feminino, com idade média de 28±9,8 anos, sendo 65,5% de etnia branca e 34,5% não-branca, acompanhados em nosso ambulatório durante o período de 69±37,1 meses. Como grupo controle, utilizou-se um grupo de 220 indivíduos saudáveis do sexo feminino, pareados de acordo com idade e etnia. Quanto à distribuição do genótipo do MCP-1, evidenciouse que a fregüência do genótipo GG foi significativamente maior nos pacientes portadores de nefrite lúpica quando comparado ao grupo controle (12,7%x5,0%) (p=0,019), enquanto que o genótipo AA apresentou maior fregüência no grupo controle, porém sem significância estatística (48,7%x56,8%). Com relação aos alelos, a frequência do alelo A foi significativamente maior no grupo controle (75,9%x68%) (p=0,007) quando comparada aos pacientes com NL. Já em relação ao polimorfismo do CCR2, não foi observada nenhuma diferença na frequência do genótipo entre os dois grupos, porém foi observada maior fregüência do alelo V no grupo controle (89,8%x86,3%) (p=0,046). Não houve associação entre o genótipo e alelos do MCP-1 e do CCR2 com a função renal no início e no final do estudo, marcadores imunológicos, manifestações clínicas (SLEDAI) e a classe histológica. Porém, observou-se um predomínio significante dos flares moderado e grave nos pacientes portadores dos genótipos AA e AG (p< 0,05) em relação ao genótipo GG, enquanto que, em relação à distribuição

alélica do MCP-1 e ao CCR2, não se notou diferença estatística. Não se evidenciou diferenca estatística entre as curvas de sobrevida renal funcional dos pacientes portadores de nefrite lúpica e os genótipos do MCP-1 e CCR2 e seus respectivos alelos. Notou-se diferença estatística na variação da creatinina sérica ao longo do seguimento (p<0,001). Foram também estudados 34 pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade, do sexo feminino, com idade média de 28,4 ± 9,9 anos, sendo 26,5% pacientes de etnia branca e 73,5% de etnia não-branca. A dosagem do MCP-1 urinário foi realizada no início do quadro e após 3 e 6 meses de seguimento. Em relação ao uMCP-1, houve um aumento significante do mesmo no início do quadro renal quando comparado com 3 e 6 meses de tratamento (p<0,05). Evidenciou-se um aumento do uMCP-1 nos pacientes que apresentavam creatinina plasmática inicial > 1,2mg/dl (p<0,05), porém não houve associação entre uMCP-1 e a creatinina após 6 meses de tratamento. Não se observou associação entre os níveis de uMCP-1 com as manifestações clínicas (SLEDAI), classe histológica e marcadores imunológicos, exceto quanto ao anticorpo antifosfolípide, pois houve excreção aumentada do uMCP-1 em pacientes com anticorpo antifosfolípide positivo no início do quadro (p<0,05). Notou-se valores elevados do uMCP-1 nos pacientes que apresentaram flares grave e moderado em relação ao flare leve (p<0,05). Quanto à distribuição genotípica do MCP-1 em relação ao uMCP-1, foi observado uma associação do uMCP-1 em pacientes portadores dos genótipos AG e AA quando comparados ao genótipo GG (p<0,05). Já em relação à distribuição genotípica e alélica do CCR2, não se notou nenhuma diferença na frequência dos mesmos e a dosagem de uMCP-1. Conclusões: Houve uma significante associação do genótipo GG do polimorfismo do MCP-1 em pacientes portadoras de NL na população estudada, além de uma associação entre os níveis do uMCP-1 com a severidade do flare renal e a função renal nas pacientes portadoras de NL.

Summary

Malafronte P. Influence of MCP-1 gene polymorphism and its receptor CCR2 polymorphism in clinical parameters and urinary excretion of MCP-1 with lupus nephritis patients [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 113p.

Introduction: Lupus Nephritis (LN) contributes substantially to morbidity and mortality in patients with systemic lupus erythematosus. Literature data show monocyte chemoattractant protein (MCP-1) is implicated in the activation of inflamatory cells and has been suggested to affect the progression and severity of lupus nephritis and urinary MCP-1 levels (uMCP-1) are increased in LN patients during active renal disease. Literature data about genotype polymorphism of MCP-1 A(-2518)G and of its receptor CCR2 V(-64)I and susceptibility to LN is still open to discussion. Objectives: The aim of our protocol was to study association of the genotype polymorphism of MCP-1 and CCR2 with LN compared to a healthy matched population and study association these polymorphisms with clinical and histological parameters in LN patients. Moreover, investigate the relationship of uMCP-1 on the onset. severity and resolution of LN flare. Patients and Methods: Genomic DNA was extracted from peripheral leukocytes from 197 LN patients and MCP-1 and CCR2 genomic variants were detected by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme-fragment analysis. uMCP-1 levels were mesured by enzyme-linked immunosorbent assay from 34 LN flare patients. Results: One hundred and ninety seven (197) female patients with histological diagnosis de LN undergoing follow up in our institution and 220 ethnically matched healthy controls were enrolled in this Epidemiological characteristics of the LN group were: age 28±9.8 years, race 65.5% of caucasians and 34.5% of Brazilian afro-south-latins. Baseline values were collected at the onset of LN and final values in their last follow up (69±37.1 months). There was a significant association of the GG genotype polymorphism of MCP-1 with LN patients compared to controls (12.7%x5.0%) (p=0.019), while the allele A distribution was associated with healthy controls (75.9%x68%) (p=0.007). Considering CCR2 -64 V/I polymorphism genotype there was a association of the allele V with the control group compared to LN (89.8%x86.3%) (p=0.046). Analyzing genotype polymorphism of MCP-1 and CCR2 there weren't correlation with renal function, immunological markers, clinical manifestations (SLEDAI) or histological classes of LN. There was a significant association of the AA and AG genotypes polymorphism of MCP-1 with moderate and severe renal flares compared to GG genotype polymorphism of MCP-1 (p< 0.05). Kaplan-Meier analysis of the renal survival curves with respect to the studied genotypes did not show any influence in the progression of renal disease. There was a significant association of the creatinine onset and on follow up (p<0.001). Thrity four (34) female patients with criteria for active LN and histological diagnosis were enrolled and treated for six months. Each patient was evaluated once a month and uMCP-1 bimonthly. Epidemiological characteristics of the group showed: age 28.4±9.9 years and race 26.5% caucasians and 73.5% Brazilian afro-south-latins. uMCP-1 excretion at onset (T0) of LN was significantly increased when compared to uMCP-1 measured on the third (T3) and sixth months (T6) (p<0.05). Analyzing uMCP-1 values on T0 there was a correlation with creatinine (p<0,05), but not with, clinical manifestations histological classes of LN or immunological markers, except in patients with positive antiphospholipid autoantibodies demonstrated increased of uMCP-1 (p<0.05). Otherwise, uMCP-1 levels were associated with seriousness of nephritis flares, severe and moderate over mild (p<0.05). Considering MCP-1 polymorphism genotype there was association of the AA and AG genotypes with increased uMCP-1 in patients with active renal disease (p<0.05). **Conclusions:** There is a significant association of the GG genotype of MCP-1 -2518 A/G polymorphism with LN in our population. uMCP-1 levels in LN is associated with flare seriousness and renal function.



1.1 Lupus Eritematoso Sistêmico

Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença multissistêmica de etiologia desconhecida que se caracteriza pela produção excessiva de auto-anticorpos. A deposição tissular desses complexos antígeno-anticorpos circulantes levam à liberação de mediadores inflamatórios e ao influxo de células inflamatórias, expressando-se clinicamente em diversos órgãos¹.

O diagnóstico de LES é estabelecido pelo preenchimento de critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos pela *American Rheumatism Association* (ARA) em 1971 e modificado em 1982 ² (Quadro 1). São necessários no mínimo quatro desses critérios, de modo simultâneo ou seqüencial, para o diagnóstico de LES.

Quadro 1 - Critérios da *American Rheumatism Association* para o diagnóstico de LES (modificado 1982)

Rash malar

Rash discóide

Fotossensibilidade

Úlceras da mucosa oral

Artrite não deformante

Serosite (pleurite, pericardite)

Doença renal (proteinúria persistente, hematúria, cilindrúria)

Acometimento do sistema nervoso central

Alterações hematológicas (anemia, leucopenia, plaquetopenia)

Alterações imunológicas (células LE, anti-dsDNA, anti-Sm ou VDRL falso-positivo)

Fator anti-núcleo positivo

NOTA: Anti-dsDNA=anticorpo anti-ácido desoxirribonucléico de dupla hélice, anti-Sm=anticorpo anti-antígeno de Smith, VDRL= *Venereal Disease Research Laboratories*.

A incidência do LES na população varia de 1,8 a 7,6 casos/100.000/ano e a prevalência varia de 14,6 a 50,8 casos por 100.000 habitantes³. Em 90-95% das vezes acomete mulheres em idade fértil (15 - 40 anos), sugerindo a participação hormonal na patogênese da doença. Há predomínio do LES na raça negra, nos pacientes que apresentam certos haplótipos do sistema antígeno do complexo maior de histocompatibilidade (HLA) (HLA-B8, DR2, DR3, E DQW1), nos indivíduos da mesma família e nos pacientes com deficiências congênitas de frações do sistema complemento (C1q, C2 e C4), sugerindo a participação de fatores genéticos⁴. Fatores ambientais como luz solar, radiação ultravioleta e certas medicações também podem predispor ao desenvolvimento do LES ³,4.

1.2 Nefrite lúpica

A doença renal é uma manifestação clínica freqüente, sendo diagnosticada em 50-75% dos pacientes portadores de LES. Tal constatação pode ocorrer tanto no momento do diagnóstico quanto no decorrer do seguimento clínico. A prevalência real da nefropatia, entretanto, deve ser maior que 90%, pois um estudo mostrou que a realização de biópsia renal em pacientes sem qualquer evidência clínica dessa complicação pode revelar alterações glomerulares, especialmente depósitos de imunoagregados à microscopia de imunofluorescência⁴.

O comprometimento renal contribui direta e indiretamente, devido a complicações da terapia, para a morbidade e mortalidade dos pacientes portadores de LES. A perda da função renal ocorre em até 30% dos casos acometidos, sendo que a presença de doença renal é o preditor mais importante de morbidade e mortalidade nesses pacientes⁵.

De acordo com os critérios do ARA, a nefrite lúpica é definida pela presença de proteinúria persistente acima de 500mg/dia e/ou pela presença de cilindros celulares no sedimento urinário, desde que descartadas outras causas de alterações na urinálise como, por exemplo, infecções do trato urinário e efeito de drogas.

A nefropatia do LES caracteriza-se pela heterogeneidade na apresentação histológica, pela freqüente superposição das várias lesões e pelo potencial de transformação de uma classe em outra, o que, em diversos relatos, ocorre em 15 a 40% dos pacientes⁶.

A classificação da nefrite lúpica, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelecida em 1982, revisada e modificada em 1995, baseia-se nos achados histológicos de microscopia óptica e imunofluorescência⁷ (Quadro 2).

Em 2003, uma conferência de patologistas renais e nefrologistas estudaram e propuseram uma nova classificação com pequenas modificações, sinalizando, no entanto, para a interação entre a clínica e os aspectos histopatológicos⁸ (Quadro 3).

Quadro 2 - Classificação da nefrite lúpica de acordo com a Organização Mundial de Saúde (revisada e modificada 1995)

- I Glomérulo normal (por MO, IF, ME)
- II Alterações mesangiais puras
 - a) MO normal, depósitos mesangiais à IF ou à ME
 - b) Hipercelularidade mesangial e depósitos à IF ou à ME
- III Glomerulonefrite segmentar e focal
 - a) Lesões ativas necrosantes
 - b) Lesões ativas e esclerosantes
 - c) Lesões esclerosantes
- IV Glomerulonefrite difusa (mesangial grave, proliferação endocapilar ou mesangiocapilar e/ou depósitos subendoteliais extensos)
 - a) Sem lesões segmentares
 - b) Com lesões ativas necrosantes
 - c) Com lesões ativas e esclerosantes
 - d) Com lesões esclerosantes
- V- Glomerulonefrite membranosa
 - a) Glomerulonefrite membranosa pura
 - b) Associada a lesões da classe II (a ou b)
- VI- Glomerulonefrite esclerosante

NOTA: MO=microscopia óptica, IF= imunofluorescência, ME= microscopia eletrônica.

FONTE: Churg GJ. Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases. 1995

Quadro 3 - Classificação da nefrite lúpica proposta pela Sociedade Internacional de Nefrologia e pela Sociedade de Patologia Renal (2003)

Classe I: Alterações mesangiais mínimas

Glomérulos normais à MO, porém com depósitos imunes na IF

Classe II: Alterações proliferativas mesangiais

Hipercelularidade mesangial de qualquer grau, ou expansão da matriz mesangial pela MO, com depósitos imunes no mesângio. Podem existir poucos e isolados depósitos subepiteliais e subendoteliais visíveis pela IF ou ME, porém com MO normal

Classe III: GN lúpica focal

GN focal, segmentar ou global, endo ou extracapilar, ativa ou inativa, que envolve < 50% dos glomérulos, com depósitos focais subendoteliais, com ou sem alterações mesangiais

Classe III (A) – com lesões ativas: GN proliferativa focal

Classe III (A/C) - com lesões ativas e crônicas : GN proliferativa focal e esclerosante

Classe III (C) – com lesões crônicas e inativas com esclerose glomerular: GN esclerosante focal

Classe IV: GN lúpica difusa

GN difusa, segmentar ou global, endo ou extracapilar, ativa ou inativa, que envolve > 50% dos glomérulos, com depósitos difusos subendoteliais, com ou sem alterações mesangiais. Essa classe é dividida em difusa segmentar quando > 50% dos glomérulos apresentam lesões segmentares, e difusa global, quando > 50% dos glomérulos apresentam lesões globais.

Classe IV-S (A): GN proliferativa difusa segmentar, com lesões ativas

Classe IV-G (A): GN proliferativa difusa global, com lesões ativas

Classe IV-S (A/C): GN proliferativa e esclerosante difusa segmentar, com lesões ativas e crônicas

Classe IV-S (C): GN com lesões crônicas e inativas com esclerose segmentar

Classe IV-G (C): GN com lesões crônicas e inativas com esclerose global

Classe V: GN lúpica membranosa

Presença de depósitos globais ou segmentares subepiteliais, ou sua sequela morfológica à MO, IF e ME, com ou sem alterações mesangiais. A classe V pode ocorrer em associação com a classe III ou IV.

Classe VI: GN com esclerose avançada

> 90%dos glomérulos tem esclerose global, sem atividade inflamatória residual

NOTA: MO=microscopia óptica, IF=imunofluorescência, ME=microscopia eletrônica, A=ativa, C=crônica, S=segmentar,

G=global, GN=glomerulonefrite.

FONTE: Weening JJ. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. 2004.

A patogênese da nefrite lúpica ainda é desconhecida, mas sabe-se que ocorre uma formação de auto-anticorpos decorrente da hiperatividade de linfócitos B. Essa hiperatividade ocorre devido ao defeito regulatório de subpopulações de linfócitos T ou da ativação autógena dos linfócitos B. Esses auto-anticorpos podem ser formados contra o ácido desoxirribonucléico (DNA) de hélice simples (ss-DNA) ou de dupla hélice (ds-DNA), contra ribonucleoproteínas, histonas, e em algumas circunstâncias, contra proteínas da matriz extracelular (lamina, colágeno IV, heparan sulfato) 9,10

A deposição de imunocomplexos circulantes e/ou a formação *in situ* dos mesmos, provavelmente assume grau de importância em certos padrões histológicos de nefrite lúpica. A localização dos imunocomplexos nos glomérulos, por sua vez, é influenciada por vários fatores: tamanho, carga elétrica e avidez dos complexos, capacidade de clareamento do mesângio e fatores hemodinâmicos locais^{9,10}.

Os imunocomplexos, uma vez depositados em glomérulos, ativam a cascata do sistema complemento, a cascata da coagulação, a infiltração de leucócitos, a liberação de enzimas proteolíticas e de citocinas reguladoras tanto da proliferação glomerular quanto da síntese de matriz extracelular, desencadeando, assim, a resposta inflamatória tecidual^{9,10}.

A injúria glomerular e vascular no LES pode ser ampliada por fenômenos locais decorrentes da coagulação intravascular. Dessa forma, a participação dos anticorpos antifosfolípides poderiam potencializar a agressão imunológica, provocando alterações nas funções endoteliais e plaquetárias¹¹.

Essa infiltração de células inflamatórias é achado um histopatológico comum entre as doenças renais agudas e crônicas. Entre as células envolvidas destacam-se os macrófagos/monócitos, que desempenham um papel importante tanto no desenvolvimento, quanto na progressão das doenças renais como já bem demonstrado em modelos animais e em estudos com humanos¹². Os macrófagos/monócitos contribuem para a lesão renal através de vários mecanismos como produção de espécies reativas de oxigênio (13), além de citocinas como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina -1beta (IL-1 β) e a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1)¹⁴. O TNF-α estimula a produção de endotelina-1 mesangial, um regulador hemodinâmico glomerular, que exerce seu efeito principalmente através da contração das células mesangiais, enquanto a IL-1β estimula as células mesangiais a liberarem IL-6, um modulador da proliferação mesangial 15,16,17. O MCP-1, por sua vez, é fator fundamental da resposta inflamatória atraindo células ao local da lesão. Os macrófagos produzem o fator transformador de crescimento beta (TGF-β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), além de outros fatores de crescimento e proliferação celular, que induzem à proliferação e migração de fibroblastos, neoformação de capilares sanguíneos e síntese de componentes da matriz extracelular como fibronectina, colágeno e proteoglicanos.

Tendo em vista o papel dos macrófagos/monócitos na patogênese da lesão renal, torna-se de suma importância o estudo dos mecanismos envolvidos no recrutamento destas células.

1.3 Quimiocinas

As quimiocinas, família de citocinas quimiotáticas, contribuem para a resposta inflamatória dada a capacidade de induzirem ao recrutamento e ativarem populações de leucócitos, induzirem, também, à degranulação, além de levarem à liberação de mediadores inflamatórios de células efetoras tais como basófilos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos. Sabe-se que quimiocinas trabalhando em conjunto com selectinas e integrinas agem como orientadoras da migração leucocitária, ao mesmo tempo em que ativam leucócitos, influenciam a hematopoese e modulam a angiogênese. Já foram descritos mais de 50 quimiocinas e 17 receptores.

As quimiocinas são proteínas de 8 a 10 kD caracterizadas pela presença de quatro resíduos de cisteína conservados na porção amino-terminal e, dependendo da presença ou não de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas, podem ser classificadas em quatro famílias^{18,19,20}. A família das α-quimiocinas caracteriza-se pelo fato dos dois primeiros resíduos de cisteína estarem separados por um aminoácido (cisteína–Xaminoácido–cisteína ou CXC), enquanto que a família das β-quimiocinas, a mais diversa e numerosa, caracteriza-se por ter os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes (cisteína–cisteína ou CC)^{18,19,20}. Já a família C é representada principalmente pela linfotactina e apresenta apenas uma cisteína, enquanto que as quimiocinas da família CX₃C, como a fractalkine, apresentam 3 aminoácidos entre as duas cisteínas (Figura 1).

	Quimiocina	Receptor	Tipo de célula
	Receptor de quimiocina MCP-3, -4; MIP-1a; RANTES MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR1 CCR3	Eosinófilo S
	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES	CCR2 CCR3	Basófilo
cc c	MCP-3, -4; MIP-1 α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES I-309 MDC, HCC-1, TECK Fractalkine	CCR1 CCR2 CCR5 CCR8 ?	Monócito
	SDF-1	CXCR4	
	MCP-3, -4; MIP- 1α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 TARC MIP- 1α , MIP- 1β , RANTES MIP- 3β (ELC) PARC, SLC, 6CKine (Exodus-2)	CCR1 CCR2 CCR4 CCR5 CCR7	Célula T ativada
	Fractalkine	CX ₃ CR1	
	IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	
c _c_	PARC, DC-CK1	?	
(Lymphotactin	?	Célula T
	SDF-1	CXCR4	
cxc c c c c c c c c c c c c c c c c c c	MCP-3, -4; MIP- 1α ; RANTES MCP-1, -2, -3, -4, -5 MCP-3, -4; eotaxin-1, -2; RANTES TARC MIP- 1α , MIP- 1β , RANTES MIP- 3α (LARC, Exodus-1) MDC, TECK	CCR1 CCR2 CCR3 CCR4 CCR5 CCR6	Célula dendrítica
	SDF-1	CXCR4	
Glutamic acid- leucine- arginine	Interleukin-8, GCP-2 Interleukin-8, GCP-2; GRO-α, -β, -γ; ENA-78; NAP-2; LIX	CXCR1 CXCR2	Neutrófilo (S)
cxxxc	MCP-1, -2, -3, -4, -5 MIP-1α, MIP-1β, RANTES	CCR2 CCR5	Cálula natural
	Mucin-like Cytoplasmic domain domain		Célula natural Killer
Cc —	Fractalkine	CX ₃ CR1	7)60
	IP-10, MIG, I-TAC	CXCR3	

FONTE: Adapatda de Luster AD. N Engl J Med. 1998.

Figura 1 - Quimiocinas e seus receptores

As α-quimiocinas que contêm a sequência ácido glutâmico-leucinaarginina precedendo a sequência CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto aquelas que não contêm essa seqüência são quimiotáticas para linfócitos.

As β -quimiocinas em geral não agem nos neutrófilos, mas atraem os monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos. Estruturalmente, as β -quimiocinas podem ser subdivididas em duas famílias as constitutivas e as induzidas. Acredita-se que as quimiocinas CC constitutivas participam dos processos habituais de migração leucocitária enquanto que as quimiocinas CC induzidas regulam o recrutamento leucocitário em reposta aos sinais imunológicos, inflamatórios e infecciosos.

A indução da migração dos leucócitos faz-se pela ligação da quimiocina aos receptores específicos da superfície da célula-alvo os quais estão acoplados à proteína G. Na família das α-quimiocinas foram identificados quatro tipos de receptores humanos (CXCR1 a CXCR4), na família das β-quimiocinas observaram-se oito receptores humanos (CCR1 a CCR8), enquanto que na família CX₃C foi identificado apenas 1 receptor humano (CX₃CR1) (Figura 1).

Os receptores de quimiocinas são expressos em diferentes linhagens de leucócitos. Alguns receptores, como o CXCR1, são predominantemente expressos nos neutrófilos, enquanto o CCR2 é expresso principalmente nos linfócitos T, monócitos, células dendríticas, células B e basófilos. Em condições específicas, os neutrófilos também podem expressar o CCR2 ²¹. Já a expressão de outros receptores de

quimiocinas depende do estado de ativação e diferenciação das células. Por exemplo, o CXCR3 é expresso em linfócitos T ativados tipo helper 1 (Th1). Alguns receptores, no entanto, são também expressos em células não hematopoiéticas, incluindo neurônios, astrócitos, células epiteliais e endoteliais, sugerindo que esse sistema de quimiocinas pode exercer outros papéis além de quimiotaxia.

O CCR2 é um receptor da família das β-quimiocinas que apresenta afinidade para CCL2/MCP-1, CCL7, CCL8 e CCL13. O mesmo tem duas isoformas a CCR2A, composta de 360 aminoácidos e localizada predominantemente no citoplasma, e a CCR2B, composta de 374 aminoácidos que se localiza preferencialmente na superfície celular, sendo que as mesmas se diferem apenas na região carboxi-terminal. A CCR2B é a isoforma predominante nos monócitos e os níveis de ambas isoformas (CCR2A e CCR2B) diminuem quando ocorre a diferenciação de monócitos em macrófagos²¹.

Embora muitos receptores de quimiocinas liguem-se a mais de uma quimiocina, os receptores CC só se ligam à quimiocinas CC, enquanto que os receptores CXC se ligam somente às quimiocinas CXC. Essa relação restrita do receptor com a quimiocina pode ter relação com as diferenças estruturais das quimiocinas, pois elas são similares nas estruturas primárias, secundárias e terciárias, embora diferentes nas estruturas quaternárias^{18,19,20}.

1.4 Proteína Quimiotática de Monócito-1

A proteína quimiotática de monócito-1, cujo receptor é o CCR2, é uma quimiocina característica da família β cuja produção é regulada por um gene localizado no cromossomo 17, na região 17q11,2-q12. Essa quimiocina tem como propriedade atrair células mononucleares, principalmente monócitos/macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, linfócitos e outras quimiocinas 18,19,20,22 .

O MCP-1 é produzido pelas células mesangiais renais 15,17 , endoteliais 23 , epiteliais tubulares 24 , musculares lisas e inflamatórias (monócitos, células T, células Natural *Killer*), em resposta à interleucina-1ß 25 , interferon- γ^{24} , angiotensina II 26 , lipoproteína de baixa densidade (LDL) 27 , imunocomplexos de IgG 28 e TNF- α^{25} , sendo que a sua expressão é inibida pela prostaglandina E 29 .

Além disso, o MCP-1 pode ativar células epiteliais tubulares humanas, induzindo a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) através da via Gi-proteína, proteína quinase C (PKC) e dependente de cálcio intracelular. Outra ação intracelular importante é a ativação do fator nuclear-κB (NF-κB), reconhecido como um fator de transcrição comumente envolvido na resposta imune e inflamatória. Em resumo, a ação quimiotática do MCP-1 pode exacerbar a resposta inflamatória renal pela indução de citocinas e expressão de moléculas de adesão nas células epiteliais tubulares humana³⁰.

1.5 MCP-1, CCR2 e Nefrite Iúpica

A nefrite lúpica apresenta-se clinicamente desde formas leves, anormalidades isoladas do sedimento urinário, formas de síndrome nefrótica e nefrítica ou, até mesmo, em quadro de insuficiência renal crônica. É tipicamente uma doença de evolução lenta, caracterizada por episódios de recidivas e períodos de remissão.

Pacientes com as formas mais leves de lesões histológicas, confinadas à região mesangial, sem sinais de proliferação endocapilar, em geral, têm sedimento urinário pouco ativo e a proteinúria, presente em um terço desses pacientes, é menor que 1g ao dia, nunca atingindo níveis nefróticos.

As alterações clínicas renais mais evidentes encontram-se entre os pacientes com glomerulonefrite proliferativa focal, constatando-se hematúria e cilindros hemáticos em metade desse grupo, enquanto a proteinúria que está sempre presente, é em nível nefrótico em aproximadamente 30% dos casos. Hipertensão arterial nesses casos é muito freqüente.

Pacientes com glomerulonefrite proliferativa difusa apresentam-se com a forma mais ativa e frequentemente mais grave, de envolvimento renal. Ao redor de 75% dos casos tem sedimento urinário ativo, e mais da metade apresenta síndrome nefrótica franca. A insuficiência renal moderada é bastante comum e pode evoluir para perda rápida de função renal até níveis dialíticos em 20% dos pacientes.

Na nefropatia membranosa do LES, o quadro clínico habitual é o de síndrome nefrótica com função renal preservada. Neste caso, o sedimento urinário ativo e a hipertensão arterial podem estar presentes de modo inconstante.

No entanto, a sua patogênese permanece obscura, assim como os fatores preditivos de má evolução, porém proliferação celular e infiltração de células inflamatórias são bons marcadores de prognóstico renal, e também se correlacionam linearmente com a gravidade da disfunção renal ^{31,32}.

Zoja *et al.* estudando camundongos NZB/W, um modelo genético de doença por imunocomplexos que mimetiza o Lupus em humanos, demonstraram um aumento progressivo da expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do MCP-1, no glomérulo e nas células tubulares, correlacionados à progressão da doença e em associação com o aumento da infiltração das células mononucleares. Esses camundongos, quando tratados com ciclofosfamida, mostravam diminuição da expressão do RNAm do MCP-1 no tecido renal, baixo influxo de células inflamatórias e preservação das estruturas glomerulares e tubulares ³³.

Lema et al. estudaram camundongos MRL/lpr, outro modelo de mutação genética que resulta na proliferação linfocitária e mimetiza a doença renal por imunocomplexos, e observaram aumento dos marcadores sorológicos (anti-DNA e imunocomplexos circulantes) concomitante com o aumento significante da expressão do RNAm do MCP-1 no tecido renal (glomérulo e interstício) desses animais, quando comparados com camundongos MRL controle. Porém, o aparecimento da proteinúria, da

infiltração de células inflamatórias e da lesão renal ocorreram após o aumento da expressão do RNAm do MCP-1 e concomitante com a expressão do RNAm do CCR2 ³⁴.

Anders *et al.* demonstraram em modelo animal de GN por imunocomplexos (GN-IC), modelo no qual há lesão glomerular com proliferação de células mesangiais sem lesão significativa do interstício, aumento da expressão do MCP-1 e do seu receptor CCR2 somente na região glomerular, precedendo a proteinúria e o pico da infiltração leucocitária, o qual retornou ao basal após a resolução da GN-IC ³⁵.

Tesch *et al.* descreveram uma importante redução no infiltrado de células mononucleares no tecido renal, diminuição da proteinúria e aumento da sobrevida, além de diminuição da expressão do CCR2, em camundongos lúpicos MRL/FAS^{lpr} geneticamente deficientes para o MCP-1, quando comparados com camundongos lúpicos MRL/FAS^{lpr} selvagens ³⁶.

Em outro estudo, Hasegawa *et al.* mostraram que o modelo genético de camundongo MRL/lpr desenvolveu uma lesão renal progressiva em 10 a 12 semanas de evolução, histologicamente caracterizada como GN proliferativa endocapilar associada a infiltrado mononuclear intersticial que, nas fases mais tardias, poderiam evoluir com crescentes. Essas lesões progrediram com o passar do tempo e, em 20 semanas, os animais exibiam sinais de doença renal grave. Estes animais mostraram significante aumento da expressão do RNAm do MCP-1 no glomérulo e interstício a partir da 12ª semana. O MCP-1 foi localizado predominantemente em podócitos, mesângio, endotélio, células intersticiais, macrófagos e, ocasionalmente, em

células epiteliais tubulares. Após o uso do antagonista de MCP-1, antes ou no ínicio da nefrite lúpica, observou-se redução significativa da lesão glomerular e do infiltrado de células mononucleares quando comparado com o grupo controle, sugerindo que o antagonista de MCP-1 amenizou o início e a progressão da nefrite lúpica ³⁷.

Da mesma forma, Shimizu *et al.* observaram que a terapia com anti-MCP-1 atenuou a nefrite lúpica em camundongos MRL/lpr, com diminuição na taxa de formação de crescentes e do acúmulo de macrófagos no glomérulo, porém não mostraram redução da proteinúria e nem da concentração sérica de imunoglobulinas e/ou do depósito glomerular de imunocomplexos nesse mesmo grupo ³⁸.

No estudo de Lema *et al.*, notou-se que, no modelo de camundongo MRL/lpr deficiente para o CCR2, ocorria redução do infiltrado de macrófagos e de linfócitos T para o compartimento glomerular e tubulointersticial e, com isso, menor proliferação das células glomerulares, com redução da proteinúria e da doença renal. O estudo evidenciou que o receptor CCR2 apresentava um importante papel no desenvolvimento de doenças autoimunes (especialmente na produção de células T e anticorpos anti-DNA) e no desenvolvimento da lesão renal, influenciando, assim, a progressão da doença e a sobrevida do camundongo MRL/lpr ³⁹.

Em seres humanos, os estudos de Wada *et al.*, Noris *et al.* e Li *et al.* mostraram que pacientes lúpicos apresentavam níveis mais elevados de MCP-1 urinário e sérico do que voluntários saudáveis, e que também pacientes lúpicos com nefrite lúpica ativa apresentavam níveis mais

elevados de MCP-1 urinário que pacientes com nefrite lúpica em remissão. O estudo de Wada *et al.*, no entanto, não demonstrou relação entre MCP-1 urinário ou sérico com número de macrófagos no interstício, sedimento urinário e níveis de anti-DNA, porém mostrou relação com o tratamento uma vez que já que os pacientes que apresentavam níveis elevados de MCP-1 urinário evoluíram com queda significante, após remissão induzida com corticosteróide ^{40,41,42}.

Chan *et al.*, também demonstraram que o aumento da excreção de MCP-1, na urina em pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade, estava diretamente correlacionado com a atividade sistêmica da doença e com os achados histológicos da biópsia renal. Os níveis aumentados de MCP-1 urinário diminuíram com a terapia imunossupressora ⁴³.

Em outro estudo, Rovin *et al.* evidenciaram que, em pacientes portadores de nefrite lúpica, havia uma associação da excreção urinária de MCP-1 com a recidiva renal, ocorrendo um aumento dos níveis urinários de MCP-1 alguns meses antes do início da atividade clínica, porém, não observaram essa alteração em casos de recidiva não-renal, sugerindo que as quimiocinas urinárias não refletem a atividade sistêmica do LES, apenas a renal. Estes altos níveis de MCP-1 urinário durante a recidiva renal foram associados com à severidade da lesão renal, à classe histológica proliferativa e ao grau de proteinúria ⁴⁴.

Por sua vez, Kim *et al.* mostraram que o nível sérico de MCP-1 em indivíduos portadores de LES foi significantemente maior que no grupo controle, e que a presença da nefrite lúpica não influenciou esse resultado,

não havendo, consequentemente, diferença da excreção urinária de MCP-1 em ambos os grupos ⁴⁵.

Chan *et al.*, estudando pacientes com nefrite lúpica observaram correlação entre as expressões urinárias de RNAm de MCP-1, assim como de sua proteína com a atividade de nefrite lúpica, medido através do escore de SLEDAI. Observaram também correlação da expressão do RNAm de MCP-1 com o índice de atividade histológica na biópsia renal, mas não com a expressão da sua proteína. Houve, no entanto, importante correlação clínica entre níveis de MCP-1 urinário e grau de proteinúria (p< 0,001), albumina sérica (p<0,001), creatinina sérica (p<0,001) e taxa de filtração glomerular (p<0,001). Não se evidenciou associação entre a expressão urinária de RNAm de MCP-1 e da sua proteína com o índice de cronicidade histológica, proliferação endocapilar, crescente celular, infiltração leucocitária e inflamação intersticial ⁴⁶.

Amoura *et al.* estudaram a expressão do CCR2 nas células CD4+ de pacientes portadores de LES em remissão, LES em atividade e no grupo controle e observaram menor expressão do CCR2 nas células T somente no grupo dos pacientes lúpicos em atividade. Em todos os grupos não notou diferença da expressão do CCR2 nos monócitos. Por sua vez, o estudo não mostrou nenhuma correlação entre a expressão do CCR2 nos linfócitos e a atividade lúpica através do escore de SLEDAI (índice de atividade da doença LES) ou níveis de anticorpos anti-DNA ⁴⁷.

1.6 MCP-1, CCR2 e outras nefropatias

Infiltração de monócitos/macrófagos ocorre em doenças renais, tanto experimentais quanto humanas, além de nefrite lúpica. Wada *et al.*, ao estudarem modelo experimental de glomerulonefrite crescêntica em ratos Wistar-Kyoto induzidos com soro nefrotóxico, demonstraram por imunohistoquímica a presença de MCP-1 no glomérulo, nas células endoteliais vasculares e nas células epiteliais tubulares na fase aguda da doença, mas não nos controles saudáveis. Os animais que recebiam o anticorpo anti-MCP1 mostravam menor infiltração de macrófagos nos glomérulos, além de menor formação de crescentes. Numa fase tardia, os ratos que receberam o anti-MCP-1 apresentavam menor grau de glomeruloesclerose, melhor função renal e menor proteinúria ⁴⁸.

Esses mesmos autores mostraram, posteriormente, em humanos com glomerulopatia crescêntica não lúpica que os níveis de MCP-1 urinário se encontravam elevados nesses pacientes e correlacionavam-se com o grau de infiltração de macrófagos no interstício e com crescentes fibrocelulares e fibrosas ⁴⁹.

Rovin *et al.* já haviam demonstrado em 1994 a presença do MCP-1 em glomérulos de pacientes portadores de glomerulonefrite crescêntica e na granulomatose de Wegner, mas não em pacientes portadores de lesão mínima, glomerulonefrite membranosa, doença da membrana fina ou glomeruloesclerose nodular ⁵⁰. Em estudo recente, Tam *et al.* detectaram aumento dos níveis urinários de MCP-1 em pacientes com vasculite renal

ativa ou persistente em comparação com voluntários saudáveis, e em pacientes com vasculite inativa e vasculite confinada aos sítios extra-renais. Por meio da técnica de imuno-histoquímica confirmou-se o aumento da expressão de MCP-1 no glomérulo e interstício, porém, os níveis séricos de MCP-1 não demonstraram diferença significativa entre os grupos ⁵¹.

Gesualdo *et al.*, estudando pacientes portadores de glomerulonefrite membranoproliferativa secundária a crioglobulinemia mista, observaram um aumento da expressão gênica da proteína do MCP-1 tanto no túbulo-interstício, quanto no glomérulo, além da infiltração de macrófagos ⁵². Estes autores também demonstraram os mesmos achados na nefropatia por IgA e na nefrite intersticial aguda ⁵³.

A obstrução ureteral aguda em ratos promove influxo de células mononucleares no córtex e na medula do rim obstruído. Diante disso, Diamond *et al.*, ao usarem este modelo, encontraram uma expressão acentuada de MCP-1 nos túbulos corticais após 12h de ligação ureteral, em correspondência temporal com o surgimento de macrófagos intersticiais ⁵⁴.

Wada *et al.* demonstraram que, no modelo de fibrose renal induzido por obstrução ureteral unilateral, após o tratamento com inibidor da via de sinalização do MCP-1/CCR2, houve atenuação do infiltrado celular, principalmente macrófagos e, com isso diminuição da expressão do MCP-1. Este tratamento atenuou a progressão da fibrose renal e a deposição do colágeno tipo I concomitantemente com a diminuição da expressão renal de TGF-β1 ⁵⁵.

No modelo animal de nefrite nefrotóxica estudado por Schadde *et al.*, observou-se que no 3° dia após a indução da doença, houve um aumento da expressão de MCP-1 e do receptor CCR2 na região glomerular, nas células endoteliais e nas células do epitélio tubular (imuno-histoquímica), quando comparado ao grupo controle ⁵⁶.

O papel do MCP-1 e do receptor CCR2 na progressão da nefropatia diabética ainda permanece incerto. Chow *et al.* induziram à nefropatia diabética tipo 1 com estreptozotocina (STZ) em camundongos deficientes para o MCP-1 e em camundongos selvagens (não deficientes para o MCP-1) para estudarem a progressão dessa nefropatia. Os autores observaram que nos camundongos selvagens ocorreu desenvolvimento da nefropatia diabética associado ao aumento da produção de MCP-1 pelo rim, principalmente pelos túbulos, enquanto que em camundongos deficientes para o MCP-1 ocorria proteção para a nefropatia diabética associada à redução de macrófagos no glomérulo e interstício ⁵⁷.

Kanamori *et al.* demonstraram que camundongos portadores de nefropatia diabética tipo 1, após o uso de antagonista de MCP-1/CCR2, evoluíram com redução da glomerulosclerose sugerindo, assim, um papel crucial do MCP-1 na progressão da doença ⁵⁸.

Além de glomerulopatias variadas, também já foi mostrado o aumento da expressão gênica e da proteína de MCP-1 em biópsias renais de pacientes submetidos a transplante renal, os quais apresentavam rejeição celular aguda. Nestes mesmos pacientes, o aumento da excreção urinária do MCP-1 correlacionava-se com expressão tissular e havia uma significativa redução dos níveis de MCP-1 urinário naqueles pacientes que respondiam ao tratamento anti-rejeição ⁵⁹.

1.7 MCP-1 e CCR2 em patologias extra-renais

O MCP-1 também está envolvido na patogênese de outras doenças como no caso da fibrose pulmonar idiopática, que representa uma das mais comuns do grupo das patologias intersticiais pulmonares, levando à insuficiência respiratória progressiva por infiltração de células inflamatórias no interstício, particularmente linfócitos e monócitos, além de aumento da proliferação de fibroblastos no mesmo. Diante disso, Antoniades *et al.* demonstraram a expressão do RNAm do MCP-1 nas células epiteliais pulmonares de pacientes portadores de fibrose pulmonar idiopática, mas não em células epiteliais de pacientes não portadores dessa patologia ⁶⁰.

Os níveis de MCP-1 também estão significativamente aumentados no líquido sinovial de pacientes portadores de artrite reumatóide, quando comparado com o líquido sinovial de pacientes portadores de osteoartrose, assim como o nível sérico do MCP-1 está aumentado, quando comparado com voluntários saudáveis ⁶¹.

Sabendo que as células espumosas, derivadas dos monócitos, são os principais componentes do ateroma; Nelken *et al.* estudaram placas provenientes de endarterectomia de carótidas e evidenciaram expressão de MCP-1 principalmente nos macrófagos oriundos do ateroma, com isso sugeriram o potencial papel do MCP-1 na patogênese do ateroma ⁶².

Boring *et al.* observaram diminuição da formação da lesão aterosclerótica em camundongos *knock-out* para apolipoproteína E (ApoE) e

CCR2, identificando o CCR2 como determinante genético de aterosclerose em murinos e a importância dele no início da arteriosclerose ⁶³.

Recentes estudos demonstraram que indivíduos com hipercolesterolemia tendem a expressar maiores níveis de CCR2 nos monócitos e que esse aumento está correlacionado diretamente com os níveis plasmáticos de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e inversamente com os níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL), sugerindo que as lipoproteínas contribuem para a regulação da expressão do CCR2 64

Han *et al.* mostraram que mulheres na menopausa, após a terapia de reposição com estrógeno, cuja presença aumenta o nível plasmático de HDL e diminui o nível de LDL, apresentavam redução da expressão de CCR2 nos monócitos. Esses achados sugeriram que o alto nível de LDL leva ao aumento da sensitividade de monócitos/macrófagos ao MCP-1, aumentando, assim, o movimento dos monócitos precocemente para as lesões ateroscleróticas ^{64,65,66}.

Matsumori *et al.*, por sua vez, estudaram pacientes com infarto agudo do miocárdio (IAM) e, como grupo controle, pacientes portadores de angina *pectoris,* observaram então, que o nível plasmático de MCP-1 estava aumentado 3 horas após o início da dor nos pacientes com IAM e tornava-se significantemente aumentado após 9 horas de dor, permanecendo elevado durante 24 horas, quando comparado ao grupo controle ⁶⁷.

Já Kurihara *et al.* demonstraram que camundongos *knock-out* para CCR2 foram incapazes de combater a infecção por *Listeria monocytogenes* ⁶⁸,

enquanto outro estudo mostrou que estes mesmos animais apresentaram infecção pulmonar mais severa pelo *Cryptococcus neoformans*, devido à diminuição do recrutamento de macrófagos ⁶⁹. Em relação ao *Mycobacterium tuberculosis* os camundongos *knock-out* para CCR2, também apresentaram diminuição do recrutamento de macrófagos e rápida evolução da infecção ⁷⁰.

1.8 Polimorfismo do gene do MCP-1

Nas doenças inflamatórias, a severidade da inflamação do órgão varia consideravelmente entre indivíduos que são afetados pelo mesmo processo patológico. Vários determinantes contribuem para o processo inflamatório, entre eles as quimiocinas que desempenham um papel importante no recrutamento de leucócitos para o tecido. Neste processo, admite-se que o grau de expressão da quimiocina em resposta à injúria imune, regule a intensidade da infiltração leucocitária tissular. O potencial de atividade inflamatória da quimiocina depende, entre outros fatores, da forma da sua expressão gênica, ou seja, em situações em que há polimorfismos do gene algumas formas condicionam produtos mais ativos que outros.

O gene do MCP-1 está localizado no cromossomo 17q11,2-q12. A transcrição do gene do MCP-1 encontra-se sob controle de duas áreas distintas da região 5' flanqueada do gene. A região regulatória proximal confere um nível basal de atividade transcripcional para o gene do MCP-1 e

tem se mostrado respondedora a citocinas como: TNF, IL-1β e interferon-γ. Por sua vez, a região regulatória distal localizada 1,8 a 2,7 Kb acima do sítio de transcrição inicial contém 2 fatores nucleares-κB essenciais para indução de citocinas da expressão do MCP-1.

Foi identificado polimorfismo bialélico A/G na posição – 2518 do gene MCP-1 na região 5′ flanqueada. Monócitos de indivíduos que possuem o alelo G na posição –2518 produzem mais MCP-1 que os portadores do alelo A na mesma posição. O efeito do alelo G parece ser base dependente, tendo em vista que células de indivíduos homozigotos para G na posição – 2518 produzem mais MCP-1 que células de heterozigotos G/A ⁷¹.

Tucci *et al.* mostraram que a presença do alelo G na posição –2518 predispõe ao desenvolvimento do LES, além de conferir maior probabilidade de desenvolver glomerulonefrite lúpica, como mostrado nos quadros abaixo ⁷².

Genótipo	LES (n=134)	LES (n=134) Controle (n=118)	
AA	44% (60)	68% (81)	0,0002
AG	46% (61)	30% (34)	0,009
GG	10% (13)	2% (3)	0,0212

NOTA: LES=Lupus Eritematoso Sistêmico; NL = Nefrite Lúpica

Genótipo	LES com NL (n=49)	LES sem NL (n=85)	р
AA	23% (11)	58% (49)	< 0,0001
AG	59% (29)	38% (32)	0,0196
GG	18% (9)	4% (4)	0,0147

NOTA: LES=Lupus Eritematoso Sistêmico; NL = Nefrite Lúpica

Entretanto Nunez-Roldán *et al.* não conseguiram mostrar associação entre o polimorfismo (A/G) do MCP-1 na posição –2518 e susceptibilidade para LES e nem para nefrite lúpica, porém mostraram associação com vasculite cutânea lúpica ⁷³.

Nakashima *et al.* também não encontraram associação entre o polimorfismo do MCP-1 na posição –2518 e fenótipo histológico da nefrite lúpica ⁷⁴.

Liao *et al.*, em uma população de crianças chinesas, também não evidenciaram associação do polimorfismo de MCP-1 aos portadores de LES ⁷⁵.

Na população espanhola Sanchez *et al.*, também não demonstraram associação significativa do polimorfismo do MCP-1 aos pacientes lúpicos, mesmo quando o grupo foi estratificado de acordo com a presença ou ausência de doença renal (nefrite). Nesse estudo não houve diferença entre as raças (caucasianos e afro-americanos) ⁷⁶.

No estudo de Kim *et al.* não houve associação do polimorfismo do MCP-1 entre portadores de LES e o grupo controle, porém nos pacientes portadores de nefrite lúpica observou-se aumento não significativo dos níveis de MCP-1 sérico e urinário em portadores do alelo A ⁴⁵.

Em outras glomerulopatias, um estudo em população japonesa de pacientes portadores de nefropatia da IgA mostrou que a maioria dos pacientes apresentavam o genótipo AA e que esse genótipo era um fator de risco independente para a progressão da doença renal e para a sobrevida renal ⁷⁷.

Por sua vez, Steinmetz *et al.* não evidenciaram nenhuma associação entre o polimorfismo do MCP-1 -2518 A/G com a susceptibilidade para a nefropatia da IgA nem para a progressão da doença ⁷⁸.

Na nefropatia diabética tipo 2 foi evidenciado que indivíduos coreanos portadores do alelo A do gene do MCP-1 apresentavam maior correlação com insuficiência renal ⁷⁹, dados estes que não foram demonstrados nos trabalhos de Joo *et al.* e Prasad *et al.* com população coreana e indiana, respectivamente ^{80,81}.

O polimorfismo do MCP-1 também foi estudado em pacientes portadores de transplante renal e observou-se que indivíduos homozigotos G na posição – 2518 apresentavam maior risco de disfunção precoce do enxerto renal ⁸².

Em outras áreas clínicas, Gonzales *et al.* verificaram a influência da variação genética do MCP-1 na patogênese da doença adquirida pelo vírus humano da imunodeficiência (HIV-1). Adultos homozigotos G na posição – 2518 apresentavam redução de 50% no risco de adquirir a infecção HIV-1, no entanto, uma vez infectados, esses pacientes apresentavam 4,5 vezes mais chance de desenvolver demência associada ao HIV-1 ⁸³.

Frade *et al.* reportaram diminuição no risco de adquirir HIV-1 em pacientes portadores do alelo G do MCP-1 -2518, sendo efeito protetor provavelmente mediado pela superprodução de MCP-1, limitando o acesso ao receptor CCR2, que é um co-receptor para o HIV-1. Por outro lado, os pacientes homozigotos para o alelo G do MCP-1 -2518 que apresentavam infecção pelo HIV-1 evoluíram com progressão acelerada da doença e morte. Esses achados indicam que o efeito benéfico desse polimorfismo do MCP-1 não ocorre quando a infecção HIV-1 já está instalada ⁸⁴.

Em outras doenças inflamatórias, como infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), a freqüência do genótipo do MCP-1 não diferiu entre os

pacientes com HCV e o grupo controle. Contudo, o alelo G foi significativamente mais freqüente nos pacientes HCV com fibrose avançada e inflamação severa. Estes mesmos pacientes apresentavam níveis mais elevados de RNAm para MCP-1 no tecido hepático ⁸⁵.

Szalai *et al.* evidenciaram que indivíduos homozigotos para o alelo G/G do MCP-1 -2518, alteração que leva ao aumento da transcripção do MCP-1, apresentavam maior incidência de doença arterial coronariana ⁸⁶. Em outro estudo, os mesmos autores demonstraram que há correlação entre o alelo G do MCP-1 e a incidência e a severidade da doença asmática em crianças ⁸⁷.

No *Framingham Heart Study* foi observada alta prevalência do alelo G/G do MCP-1 -2518 em pacientes com infarto agudo do miocárdio ⁸⁸, enquanto que no estudo de Flex *et al.* foi evidenciada alta prevalência desse alelo em indivíduos com história de acidente vascular cerebral ⁸⁹. Porém, estudos com populações maiores não evidenciaram associações ^{90,91}.

1.9 Polimorfismo do receptor CCR2

O gene do CCR2 está localizado no cromossomo 3p21-p24. Recentemente, foi identificado o polimorfismo G/A na posição 190 desse gene, sendo que a substituição do G pelo A leva à alteração da valina pela isoleucina no aminoácido 64 (CCR2 V64I), localizado no primeiro domínio transmembrânico da proteína ^{10,21,92}.

Os dados sobre a influência desse polimorfismo na expressão do CCR2 são controversos. Na literatura foi evidenciado que células expressando CCR2A-64I migraram mais eficientemente do que células que expressavam o CCR2A-64V já a expressão do CCR2B não foi afetada por esse polimorfismo. Paralelamente os autores também mensuraram a expressão do CCR5 severamente bloqueada pela co-expressão do CCR2A-64I e não pela CCR2A-64V. Similarmente, a atividade do CCR5, co-receptor do HIV-1, foi drasticamente reduzida pela co-expressão do CCR2A-64I e não pela co-expressão do CCR2A-64V. Esses autores concluíram que o polimorfismo do CCR2A-64I modula a expressão do CCR5 na superfície celular ⁹³.

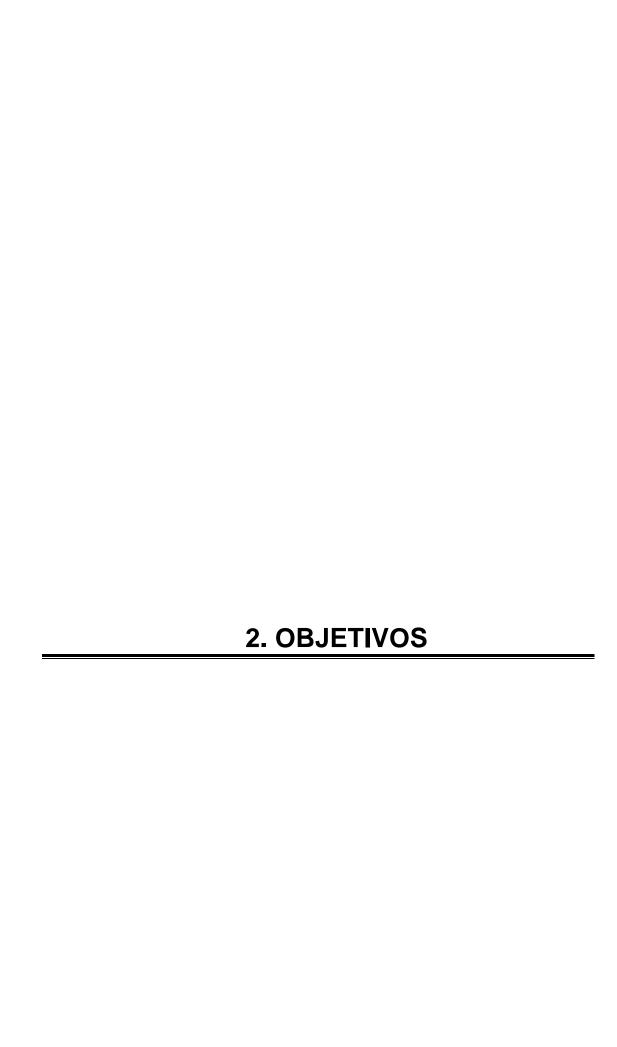
Por sua vez, estudos prévios mostravam que a mutação do CCR2 V64I não afeta a expressão ou a atividade do co-receptor do CCR5 em linhagem de células co-transfectadas ⁹⁴.

Estudos de coorte não evidenciaram diferença significante na frequência do alelo ou do genótipo do CCR2 em relação aos pacientes infectados e não infectados pelo HIV-1. Porém, quando analisado o subgrupo de pacientes infectados, evidenciou-se que pacientes portadores do alelo CCR2-64I apresentavam proteção para a infecção quando comparados com pacientes portadores do genótipo CCR2+/+64V. Além disso, os indivíduos portadores do alelo CCR2-64I, quando infectados, apresentavam evolução lenta da doença ou não apresentavam progressão da mesma ⁹².

Um estudo realizado na população brasileira não mostrou correlação do polimorfismo do CCR2 com a incidência da infecção do HIV-1, porém mostrou associação com a progressão dessa doença ⁹⁵.

Gonzáles *et al.* não evidenciaram diferença na frequência do polimorfismo do CCR2 entre os pacientes portadores de infarto agudo do miocárdico e indivíduos saudáveis, sugerindo que este polimorfismo não contribui para o risco de IAM ou retardo da doença coronariana ⁹⁶.

Por sua vez, Aguilar *et al.* estudaram 276 pacientes caucasianos portadores de LES que foram comparados com 194 indivíduos saudáveis caucasianos. Não encontraram diferença significante entre a distribuição dos genótipos do polimorfismo do V64I do gene CCR2 entre os dois grupos estudados. Sendo assim, não houve, então associação com susceptibilidade para o LES ⁹⁷.



Objetivos 33

2.1 Protocolo I: Estudo do genótipo

Avaliar, em pacientes portadores de nefrite lúpica, a relação entre o polimorfismo do MCP-1 e do seu receptor CCR2 com os seguintes parâmetros:

- atividade clínica da doença (escore SLEDAI);
- marcadores sorológicos;
- gravidade da apresentação renal;
- progressão da doença renal;
- tipos histológicos na biópsia renal;
- índices de atividade e cronicidade da biópsia renal;
- resposta ao tratamento imunossupressor convencional.

2.2 Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário

Avaliar, em pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade, a relação entre excreção urinária do MCP-1 e:

- atividade clínica da doença (escore SLEDAI);
- marcadores sorológicos;
- gravidade da apresentação renal;
- progressão da doença renal;
- tipos histológicos na biópsia renal.

3. MÉTODOS

3.1 Protocolo I: Estudo do genótipo

Foram estudados uma coorte de 197 pacientes portadores de LES, definidos pelos critérios do *American Rheumatism Association*², em seguimento regular no Ambulatório da Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo (HC-FMUSP) ou em Centros de Hemodiálise na cidade de São Paulo, entre janeiro de 1999 a dezembro de 2006, ocasião em que foi colhido sangue para genotipagem.

Todos os pacientes apresentavam diagnóstico histopatológico de nefrite lúpica, segundo a classificação da OMS ⁷, avaliados pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas como parte da investigação clínica de rotina, por meio das técnicas de microscopia óptica e imunofluorescência.

Os dados clínicos e laboratoriais foram resgatados do prontuário dos pacientes, sendo considerados dados iniciais aqueles próximos ao momento da biópsia renal e dados finais os da data do último seguimento. Vale acrescentar que não foi possível localizar alguns dados laboratoriais iniciais dos pacientes já em tratamento dialítico em unidades fora do HC-FMUSP.

Como grupo controle, foram incluídos 220 indivíduos saudáveis inscritos do banco de dados do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do INCOR pareados por sexo, raça e idade.

3.2 Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário

Foram estudados prospectivamente 34 pacientes com diagnóstico recente clínico-histológico de nefrite lúpica em atividade, sem nenhum uso de medicação imunossupressora ou, no máximo, com um mês de uso. Foram incluídos também pacientes com diagnóstico prévio de nefrite lúpica, que apresentavam novo surto da doença (*flare*), desde que o paciente estivesse sem medicação imunossupressora há pelo menos 6 meses. A biópsia renal foi realizada pela indicação do grupo clínico que assistia o paciente e não como parte deste protocolo e foi avaliada pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e classificada de acordo com a OMS ⁷.

Atividade renal ou *flare* renal foi definida pelos seguintes critérios: proteinúria > 1 g/24h, hipocomplementemia, níveis elevados de anti-DNA e alteração no sedimento urinário não associado à infecção do trato urinário, após um período de remissão parcial ou completa de, pelo menos, 6 meses.

A atividade renal leve foi considerada pela presença de hematúria (> 15 hemácias/campo) e/ou pela recorrência de cilindros hemáticos, leucocitários ou ambos na ausência de infecção. Enquanto que a atividade renal moderada foi definida pelo aumento da creatinina sérica em 0,2-1,0 mg/dl se a creatinina sérica basal fosse menor que 2 mg/dl, ou um aumento de 0,4-1,5 mg/dl se a creatinina basal fosse maior que 2 mg/dl. Por sua vez, a atividade renal grave foi definida por um aumento da creatinina sérica maior que 1,0 mg/dl se a creatinina sérica basal fosse menor que 2 mg/dl ou um aumento maior que 1,5 mg/dl se a creatinina basal fosse maior ou igual 2 mg/dl ⁴⁴.

Remissão completa foi definida por proteinúria de 24 h menor que 0,3 g, com sedimento urinário normal e valores de creatinina sérica até 15% acima do valor normal, enquanto remissão parcial foi definida por proteinúria de 24 h entre 0,3 g e 2,9 g, com albumina sérica de pelo menos 3 mg/dl e função renal estável. A falência de tratamento foi considerada quando os valores de proteinúria de 24 h fossem maiores que 3 g ou entre 0,3 g e 2,9 g, com albumina menor que 3 g/dl, queda do clearence de creatinina maior que 15% em relação ao valor basal ou interrupção do tratamento por efeitos colaterais ⁹⁸.

Os pacientes foram seguidos na Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas e avaliados através de parâmetros clínico-laboratoriais com retornos ambulatoriais regulares definidos pelo médico que os assistia, perfazendo, em média, uma consulta ao mês, sendo tratados com imunossupressão convencional ajustada de acordo com os critérios clínico-laboratoriais de avaliação de atividade da doença. Os esquemas terapêuticos mais comumente utilizados foram os corticóides em administração oral ou endovenosa associados à ciclofosfamida endovenosa mensal (0,75 g/m² de superfície de área corpórea) por 6 meses, obedecendo a critérios usados na Unidade de Nefrologia do Hospital das Clínicas, adaptadas do tratamento preconizado por Steinberg *et al.*, segundo protocolo do *National Institute of Health-USA* (NIH) ⁹⁹.

Nesse grupo, foram colhidas amostras isoladas de urina e estocadas em freezer -80 °C para dosagem de MCP-1. As amostras urinárias foram colhidas

no tempo zero, momento da entrada do paciente no protocolo (próximo a data da biópsia renal) e após 3 e 6 meses de seguimento ambulatorial.

As amostras de urina foram colhidas em recipiente estéril e a seguir centrifugadas a 3000xg durante 5 minutos, à temperatura de 4 °C para remoção de células e precipitados. As amostras foram estocadas a -80 °C e descongeladas somente no dia da realização do procedimento.

A dosagem urinária do MCP-1 foi realizada através da técnica de ELISA (Análise de imunoabsorção por ligação enzimática). Utilizou-se o *Kit* comercial da R&D Systems, Inc (Mineápolis, MN).

Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do fabricante e, para a leitura colorimétrica, utilizou-se o equipamento *Microplate reader* modelo 550 (Bio-Rad, Hercules, EUA) baseado no limite de detecção do *Kit*, no caso do MCP-1 foi de 5,0 pg/ml. Os valores do MCP-1 foram expressos em pg/ml.

Todas as amostras foram feitas em duplicatas.

A valor do MCP-1 urinário foi corrigido pela creatinina urinária, colhida da mesma amostra de urina utilizada para a dosagem do MCP-1, expressa em mg/dl.

3.3 Protocolo I e II: Aspectos comuns

Em ambos os protocolos foram avaliados marcadores de atividade lúpica, tanto sorológicos: fator anti-núcleo (FAN), complementos, anti-DNA e

anticorpo anti-fosfolípide (anticorpo anti-cardiolipina IgG e IgM e anticoagulante Iúpico), quanto histopatológicos: índice de atividade e cronicidade e presença de crescentes celulares no momento da biópsia renal. Também foram avaliados pelo Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo os marcadores bioquímicos convencionais: creatinina, uréia, proteinúria de 24 h, hemograma, colesterol total e frações, triglicérides, proteínas totais e frações, urina I, proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação como exames de rotina do paciente.

A função renal foi avaliada pela dosagem sérica de creatinina, sendo definidos os pacientes com insuficiência renal aqueles portadores de creatinina acima de 1,2 mg/dl ⁴³. Foram excluídos tanto pacientes diabéticos quanto portadores de sorologia positiva para Hepatite B, C ou HIV.

Como marcador da atividade clínica, foi utilizado o escore de SLEDAI (Quadro 4) 100, e como marcador de progressão da doença renal foi utilizada a duplicação de creatinina sérica e/ou instalação de insuficiência renal (IR) dialítica em relação ao tempo de seguimento.

Todos os pacientes foram submetidos à genotipagem do polimorfismo do gene MCP-1 e do seu receptor CCR2.

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP e os pacientes deram seu consentimento mediante informações prévias.

Quadro 4 - Índice de atividade da doença LES (escore SLEDAI)

Peso	Sintoma	Definição
8	Convulsão	Novo episódio. Excluir: infecções, distúrbios metabólicos ou drogas.
8	Psicose	Distúrbio de percepção da realidade, incluindo: alucinação,
		incoerência, perda de associação, pensamento ilógico,
		comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir
		uremia e drogas.
8	Síndrome cerebral	Alteração da função mental com dano da orientação, memória ou
	orgânica	outras funções intelectuais, com início rápido e aspectos clínicos
		flutuantes. Incluindo alteração do nível de consciência com
		redução da capacidade de focar e inabilidade para manter-se
		atento, associado no mínimo a 2 das seguintes alterações:
		distúrbio da percepção, discurso incoerente, insônia ou
		sonolência durante o dia, aumento ou diminuição da atividade
		psicomotora. Excluir: infecções, distúrbios metabólicos ou drogas.
8	Distúrbio visual	Alterações do LES na retina. Incluem: corpos citóides, hemorragias
		retinianas, exsudato seroso ou hemorrágico na coróide ou neurite
		óptica. Excluir: infecções, hipertensão ou drogas.
8	Desordens dos nervos	Novo episódio de neuropatia motora ou sensorial
	cranianos	
8	Cefaléia	Severa e persistente; pode ser migratória, mas não deve responder
		à analgesia com narcóticos.
8	Acidente Vascular	Novo episódio de acidente vascular cerebral.
	cerebral	Excluir arteriosclerose.
8	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos em dedos, infarto
		periungueal, hemorragias esparsas ou biópsia ou angiograma
		com perfil de vasculite.
4	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação.
4	Miosite	Dor/fraqueza na musculatura proximal associado com níveis
		elevados de CPK/aldolase ou alterações na eletromiografia
		ou biópsia mostrando miosite.
4	Cilindros urinários	Cilindros hemáticos.
4	Hematúria	> 5 hemácias/campo. Excluir litíase renal, infecção
		ou outras causas.
4	Proteinúria	> 0,5 g/24h. Novo episódio ou aumento recente
	5 17.1	da proteinúria > 0,5 g/24h.
4	Piúria	> 5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	Rash	Novo episódio ou recorrência do rash tipo inflamatório.
2	Alopécia	Novo episódio ou recorrência de perda anormal de cabelo
0	ťu	(parcialmente ou difusamente).
2	Úlcera mucosa	Novo episódio ou recorrência de úlceras orais ou nasais.
2	Pleurite	Dor torácica pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2	Pericardite	Dor pericárdica com no mínimo 1 das seguintes alterações:
2	Conquino consideration	atrito, derrame ou ECG ou ECO confirmatório.
2	Consumo complemento	Decréscimo de CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior
2	Anti DNA	considerado normal para o teste específico do laboratório.
2	Anti-DNA	> 25% do valor normal ou acima do valor normal fixado
1	Eobro	pelo teste específico do laboratório.
1 1	Febre Trombocitopenia	> 38 °C. Excluir causa infecciosa.
1	Trombocitopenia	< 100.000 plaquetas/mm³.
1	Leucopenia	< 3. 000 leucócitos/mm³. Excluir drogas.

FONTE: Bombardier C. Arthritis Rheum. 1992

3.4 Análise do polimorfismo do gene do MCP-1 e do seu receptor CCR2 por reação de cadeia polimerase genômica

Amostras de sangue total periférico (3 ml) foram colhidas em seringas contendo ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA). O DNA genômico foi extraído por meio da técnica *salting-out*, que utiliza uma solução de NaCL saturada ¹⁰¹.

A identificação do polimorfismo do MCP-1 e do CCR2 foi realizada pela através da técnica de reação em cadeia da polimerase associada a polimorfismo de fragmentos de DNA, obtidos por enzima de restrição (PCR-RFLP), por meio de primers específicos, descritos por Hong et al. e Nakajima et al. Respectivamente 102,103. A região regulatória do gene do MCP-1 e a do CCR2 foram amplificadas utilizando 1 μL de DNA genômico a 10 mM de Tris-HCl (pH=9.0), 50 mM de KCL, 2,5 mM de MgCl₂, 100 μM de cada dNTP, 0,3 U de Easy Tag DNA Polymerase (Invitrogen®) e uma concentração de 5 pmol de cada primer Forward: 5'CCGAGATGTTCCCAGCACAG3' e Reverse: 5'CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT3' para o MCP-1 e Forward: CCR2-F: 5'-TTG TGG GCA ACA TGa TGG-3' e Reverse: CCR2-R: 5'CTG TGA ATA ATT TGC ACA TTG C-3' para o CCR2. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 35 ciclos em um termociclador da marca PTC-DNA Engine Tetrad₂ nas seguintes condições: 1 min a 94 °C;

30 segundos a 92 °C; 3 minutos a 59,6 °C; 1 minuto a 72 °C e finalmente 10 minutos a 72 °C para o MCP-1 e 94 °C por 1 min; 92 °C por 30 seg; 53,4 °C por 3 min e 72 °C por 1min e 72 °C por 10 min para o CCR2. O produto amplificado do MCP-1 foi de 930 pb em seguida esse produto foi digerido com 1 U de enzima de restrição Pvu II (Invitrogen®) em câmara úmida a 37 °C durante toda a noite, enquanto o produto amplificado do CCR2 foi de 348 pb e foi digerido com 1 U de enzima de restrição BsaBl (New England, Biolab®) em câmara úmida a 60 °C durante toda a noite. Os produtos de digestão foram analisados por eletroforese a 100 V constante, durante 60 minutos em gel de agarose 1,5%, corado com 5% de brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador (Eagle Eyes II – Stratagene). Para o MCP-1, o perfil genotípico A/A foi identificado por uma banda com 930 bp de tamanho. As bandas com 708 e 222 bp de tamanho foram rotuladas como perfil genotípico G/G e para as três bandas com 930, 708 e 222 bp de tamanho, considerou-se A/G ⁷² (Figura 2). Para o CCR2, o perfil genotípico V/V mostrou somente a banda 348 bp de tamanho. As duas bandas de 183 e 165 bp foram cosideradas um perfil genotípico I/I e, para as três bandas de 348, 183 e 165 bp, foram rotuladas como um perfil genotípico V/I 104.

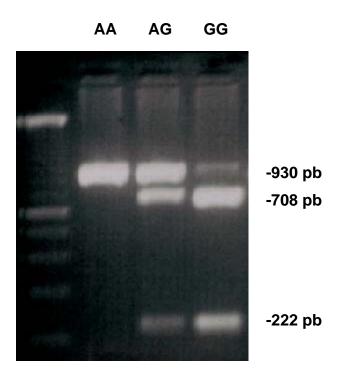


Figura 2 - Amostra de genotipagem do polimorfismo do MCP-1

O controle de qualidade de ambas as análises foram realizados em 20 amostras selecionadas aleatoriamente.

3.5 Análise Estatística

Os dados contínuos e semi-contínuos foram inicialmente comparados com a curva de Gauss através do teste de distância K-S (Kolmogorov-Smirnov) e determinados como paramétricos ou não. Os dados paramétricos foram representados pela média e desvio padrão e comparados por meio do teste t de *student* não pareado (com a correção de Welch quando necessário). Quando comparados mais de dois grupos, utilizou-se a análise de variância para dados não repetidos com pós-teste modificado de Tukey (DMS).

Os dados não paramétricos foram expressos através de mediana e percentis e comparados pelo teste de Mann-Whitney. Para mais de dois grupos foi utilizado o teste de KrusKal-Wallis com pós-teste de Muller-Dunn.

Para a análise longitudinal de dados paramétricos, utilizou-se teste de análise de variância para medidas repetidas com pós-teste de Tukey para a comparação de três ou mais tempos, enquanto que, para a comparação de dois tempos, utilizou-se o teste t pareado.

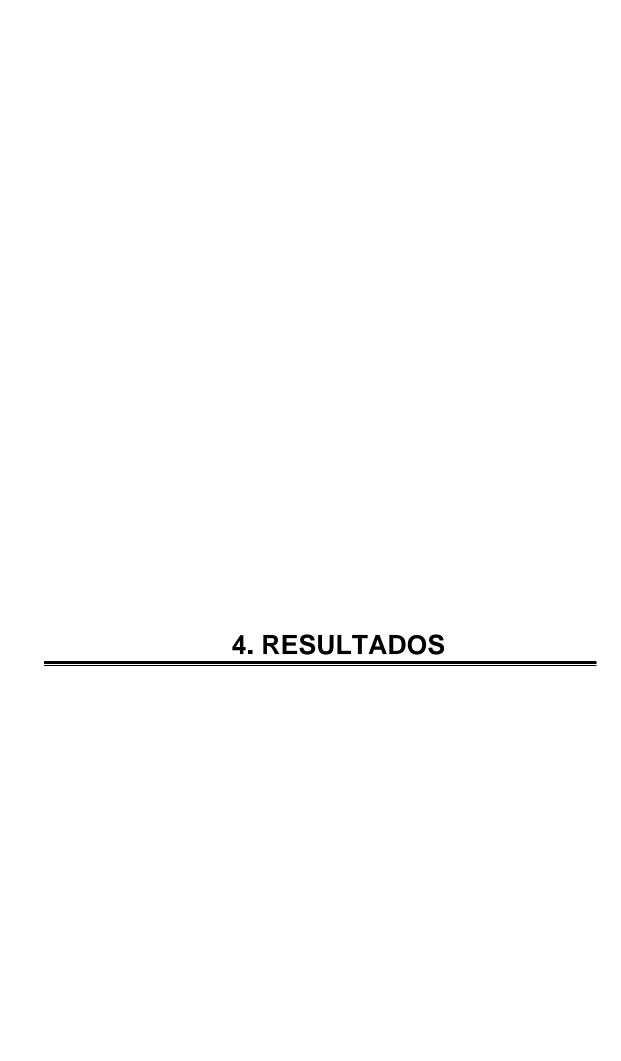
Para a análise longitudinal de dados não paramétricos utilizou-se o teste de Wilcoxom para dois tempos, quando mais tempos foram analisados, utilizou-se o teste de Friedman com pós-teste de Dunn.

Os dados categóricos foram representados por meio de freqüência absoluta (n) e relativa (%) e, quando realizada a distribuição univariada utilizou-se teste de proporção do observado *versus* o esperado; já na análise bivariada utilizou-se o teste de asociação de qui-quadrado de Pearson. Para ambas as condições, foi calculado o valor do *odds ratio* com respectivo intervalo de confiança.

Para análise de sobrevida utilizou-se o modelo de Kaplan-Meier para avaliação da taxa de deteriorização da função renal. O teste de Log-Rank foi utilizado para a discriminação entre as curvas de sobrevida.

A nota de corte foi obtida através da curva operacional de resposta (ROC), utilizando o valor correspondente à maior sensibilidade e especificidade, que corresponde ao ponto de maior proximidade (100% de sensibilidade e especificidade) ¹⁰⁵.

Para o presente estudo, utilizou-se risco $\alpha \le 5\%$ para cometer erro tipo I, ou de primeira espécie e risco $\beta \le 20\%$ para cometer erro tipo II ou de segunda espécie.



4.1 Protocolo I: Estudo do genótipo

Foram analisados os polimorfismos do gene MCP-1 e do seu receptor CCR2 em 197 pacientes portadores de nefrite lúpica (NL), do sexo feminino, com idade média de $28,6\pm9,8$ anos, sendo 129~(65,5%) pacientes de etnia branca e 68~(34,5%) de etnia não-branca, comparados com o grupo controle pareado composto de 220~indivíduos saudáveis do sexo feminino, com idade média de $30\pm10,7$ anos, 159~(72,3%) de etnia branca e 61~(27,7%) não-branca. Os dados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes com nefrite lúpica estão na tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas, laboratoriais e histológicas dos pacientes portadores de nefrite lúpica (n=197)

SLEDAI				
Escore total	20 (16-24)			
Escore renal	8 (8 -12)			
Creatinina sérica (mg/dl)	1,4 (0,9-2,8)			
Albumina plasmática (g/dl)	2,6 (2,0-3,1)			
Proteinúria (g/24h)	4,4 (2,7-7,1)			
Creatinina sérica > 1,2 mg/dl %	56,3 (n=111)			
FAN ≥ 1/160 %	54 (n=105)			
C3 sérico consumido(mg/dl) %	81,2 (n=160)			
C4 sérico consumido (mg/dl) %	49,7 (n=98)			
Anti-DNA (UI/mI) positivo %	74,6 (n=147)			
Anticorpo Antifosfolípide positivo %	37,6 (n=74)			
Biópsia renal				
Classe III + IV %	66,5 (n=131)			
IA	5 (3-7)			
IC	3 (1-5)			
Classe V %	31 (n=61)			
IA	3 (1-3,5)			
IC	2 (0-3)			
Classe VI %	2,5 (n=5)			
IA	0 (0-4)			
IC	9 (7-12)			
Tempo de seguimento (meses)	$69 \pm 37{,}1$			

NOTA: Dados expressos em mediana (25%-75%); média \pm DP; freqüência absoluta (n) e relativa (%). anti-DNA= anticorpo anti-ácido desoxirribonucléico; C3= fração C3 do complemento; C4= fração C4 do complemento; FAN=fator anti-núcleo; IA= índice de atividade; IC= índice de cronicidade; SLEDAI= índice de atividade da doença Lupus Eritematoso Sistêmico.

Em relação ao polimorfismo do MCP-1, a frequência do genótipo GG foi significantemente maior nos pacientes portadores de nefrite lúpica quando comparado com o grupo controle (12,7% e 5,0%, respectivamente) (p=0,019, OR=2,27), enquanto o genótipo AA apresentou maior frequência no grupo controle (56,8% e 48,7%), porém sem significância estatística (p=0,059, OR=0,77). Com relação aos alelos, a freqüência do alelo A foi significantemente maior no grupo controle (p=0,007, OR=0,80) quando comparada aos pacientes com nefrite lúpica (Tabela 2).

Já em relação ao polimorfismo do CCR2 não foi observada nenhuma diferença na frequência do genótipo entre os dois grupos, porém foi observada maior freqüência do alelo V no grupo controle (p=0,046, OR=0,86) (Tabela 3).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi obtido nesse estudo (p= 0,99).

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e grupo controle

	Pacientes NL (n=197)			troles =220)	р	OR	95% IC
	n	%	n	%			
Genótipos							
AA	96	48,7	125	56,8	0,059	0,77	0,53-1,13
AG	76	38,6	84	38,2	0,527	0,90	0,58-1,40
GG	25	12,7	11	5,0	0,019	2,27	1,74-3,53
Alelos							
Α	268	68	334	75,9	0,007	0,80	0,81-0,84
G	126	32	106	24,1	0,189	1,19	0,82-1,71

NOTA: Teste de proporção (univariada).

IC= intervalo de confiança; NL=nefrite lúpica; OR=odds ratio.

Tabela 3 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e grupo controle

		ntes NL :197)		ntroles =220)	p	OR	95% IC
	n	%	n	%			
Genótipos							
VV	148	75,1	177	80,5	0,120	0,84	0,62-1,14
VI	44	22,3	41	18,6	0,664	1,01	0,60-2,0
II	5	2,5	2	0,9	0,445	3,33	0,36-30,72
Alelos							
V	340	86,3	395	89,8	0,046	0,86	0,84-0,86
1	54	13,7	45	10,2	0,421	1,22	0,70-2,14

NOTA: Teste de proporção (univariada).

IC= intervalo de confiança; NL=nefrite lúpica; OR=odds ratio.

A análise da distribuição dos polimorfismos gênicos do MCP-1, CCR2 e seus respectivos alelos em relação às classes histológicas da nefrite lúpica não mostraram diferença estatisticamente significativa (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e classes histológicas (n=197)

	MCP-1								
	Genótipos* n (%) Alelos** n (%)								
	AA	AG	GG	Α	G				
Classe IV (n=131)	60 (45,8)	52 (39,7)	19 (14,5)	172 (65,6)	90 (34,4)				
Classe V (n=61)	34 (55,7)	21 (34,5)	6 (9,8)	89 (72,9)	33 (27,1)				
Class VI (n=5)	2 (40)	3 (60)	0 (0)	7 (70)	3 (30)				

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e classes histológicas (n=197)

			CCR2		
		Genótipos* n (%)	Alelo	s** n (%)	
	VV	VI	II	V	ı
Classe IV (n=131)	97 (74)	29 (22,2)	5 (3,8)	223 (85,1)	39 (14,9)
Classe V (n=61)	47 (77)	14 (23)	0 (0)	108 (88,5)	14 (11,5)
Class VI (n=5)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	9 (90)	1 (10)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

Também não se observou diferença entre os genótipos MCP-1, CCR2 e alelos em relação à presença de crescentes, índice de atividade e índice de cronicidade na biópsia renal (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos do MCP-1, CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e presença de crescentes, índice de atividade e cronicidade na biópsia renal (n=197)

	pre	scentes sentes n=97)	aus	scentes sentes =92)		>= 4 :100)		\ < 4 =80)		>= 2 =118)		5 < 2 =62)
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Genótipos MCP-1*												
AA	44	(45,4)	48	(52,2)	46	(46)	41	(51,3)	55	(46,6)	32	(51,6)
AG	42	(43,3)	31	(33,7)	44	(44)	27	(33,7)	52	(44,1)	19	(30,6)
GG	11	(11,3)	13	(14,1)	10	(10)	12	(15)	11	(9,3)	11	(17,8)
Alelos**												
Α	130	(67)	127	(69)	136	(68)	109	(68,1)	162	(68,6)	83	(67)
G	64	(33)	57	(31)	64	(32)	51	(31,9)	74	(31,4)	41	(33)
Genótipos CCR2*												
VV	71	(73,2)	70	(76,1)	72	(72)	61	(76,2)	85	(72)	48	(77,4)
VI	23	(23,7)	20	(21,7)	26	(26)	16	(20)	29	(24,6)	13	(21)
II	3	(3,1)	2	(2,2)	2	(2)	3	(3,8)	4	(3,4)	1	(1,6)
Alelos**												
V	165	(85,1)	160	(87)	170	(85)	138	(86,3)	199	(84,3)	109	(88)
1	29	(14,9)	24	(13)	30	(15)	22	(13,7)	37	(15,7)	15	(12)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

NOTA: IA=índice de atividade; IC= índice de cronicidade

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Estudando a função renal através da creatinina sérica e considerando os pacientes (n=197) em relação à variação da creatinina entre o início e final do seguimento, verificamos uma diferença significante (p<0,001) entre os pacientes que melhoraram e pioraram, como o esperado em NL com tratamento ativo (Figura 3).

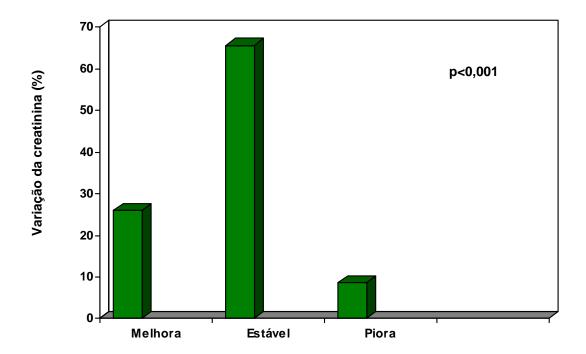


Figura 3 - Variação da creatinina entre o início e final do seguimento

A insuficiência renal foi definida como valores de creatinina maiores que 1,2 mg/dl. A distribuição dos pacientes quanto à presença de IR e relação com os polimorfismos do MCP-1, CCR2 e alelos está nas tabelas 7, 8, 9 e 10. Não houve associação dos genótipos e alelos com a função renal no início e no final do seguimento.

Tabela 7 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e função renal no início do seguimento (n=197)

	MCP-1							
	Genótipos* n (%) Alelos** n (%)							
	AA	AG	GG	Α	G			
Creatinina > 1,2 mg/dl (n=111)	56 (50,5)	43 (38,7)	12 (10,8)	155 (69,8)	67 (30,2)			
Creatinina ≤ 1,2 mg/dl (n=86)	40 (46,5)	33 (38,4)	13 (15,1)	113 (65,7)	59 (34,3)			

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

Tabela 8 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e função renal no início do seguimento (n=197)

	CCR2							
	Ge	nótipos* n (%	Alelos	s** n (%)				
	vv	VI	II	V	I			
Creatinina > 1,2 mg/dl (n=111)	80 (72,1)	27 (24,3)	4 (3,6)	187 (84,2)	35 (15,8)			
Creatinina ≤ 1,2 mg/dl (n=86)	68 (79,1)	17 (19,8)	1 (1,1)	153 (89)	19 (11)			

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Tabela 9 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e função renal no final do seguimento (n=197)

	MCP-1							
	Ge	enótipos* n (Alelos	s** n (%)				
	AA	AG	GG	Α	G			
Creatinina > 1,2 mg/dl (n=77)	34 (44,2)	32 (41,6)	11 (14,2)	100 (64,9)	54 (35,1)			
Creatinina ≤ 1,2 mg/dl (n=120)	62 (51,7)	44 (36,7)	14 (11,6)	168 (70)	72 (30)			

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

Tabela 10 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e função renal no final do seguimento (n=197)

			CCF	R2		
	Genótipos* n (%) Alelos** n (%)					
	VV	VI	II	V	ı	
Creatinina > 1,2 mg/dl (n=77)	59 (76,6)	15 (19,5)	3 (3,9)	133 (86,4)	21 (13,6)	
Creatinina ≤ 1,2 mg/dl (n=120)	89 (74,2)	29 (24,2)	2 (1,6)	207 (86,3)	33 (13,7)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Dentro deste grupo (n=197), 44 pacientes evoluíram com perda da função renal e necessitaram de terapia renal substitutiva (TRS). Comparando o grupo que evoluiu para hemodiálise (HD) com aquele que não evoluiu para HD, não houve associação entre seus genótipos e alelos à necessidade de diálise (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e terapia renal substitutiva (TRS) (n=197)

	MCP-1					
	Ge	os** n (%)				
TRS	AA	AG	GG	Α	G	
Sim (n=44)	23 (52,3)	15 (34,1)	6 (13,6)	61 (69,3)	27 (30,7)	
Não (n=153)	73 (47,7)	61 (39,9)	19 (12,4)	207 (67,6)	99 (32,4)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ2) p=NS

NOTA: TRS= terapia renal substitutiva

Tabela 12 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e terapia renal substitutiva (TRS) (n=197)

			CCF	R2	
	Gei	nótipos* n (%	Alelos	s** n (%)	
TRS	VV	VI	II	V	ı
Sim (n=44)	32(72,7)	10 (22,7)	2 (4,6)	74 (84,1)	14 (15,9)
Não (n=153)	116 (75,8)	34 (22,2)	3 (2)	266 (87)	40 (13)

^{*}Teste de associação bivariada (χ2) p=NS

NOTA: TRS= terapia renal substitutiva

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Quanto ao valor da proteinúria no início do quadro, também não houve associação entre os genótipos do MCP-1, CCR2 e seus respectivos alelos (Tabela 13 e 14).

Tabela 13 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e proteinúria inicial (n=197)

			МСР	P-1	
	Ge	os** n (%)			
	AA	AG	GG	Α	G
Proteinúria > 3,0 g/24h (n=141)	68 (48,2)	55 (39)	18 (12,8)	191 (67,7)	91 (32,3)
Proteinúria ≤ 3,0 g/24h (n=56)	28 (50)	21 (37,5)	7 (12,5)	77 (68,8)	35 (31,2)

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

Tabela 14 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e proteinúria inicial (n=197)

			C	CR2	
	Ger	nótipos* n (%	b)	Alelos** n (%)	
	vv	VI	II	V	ı
Proteinúria > 3,0 g/24h (n=141)	105 (74,5)	33 (23,4)	3 (2,1)	243 (86,2)	39 (13,8)
Proteinúria ≤ 3,0 g/24h (n=56)	43 (76,8)	11 (19,6)	2 (3,6)	97 (86,6)	15 (13,4)

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Estudando marcadores imunológicos nos pacientes portadores de nefrite lúpica em relação ao genótipo, não encontramos associação do MCP-1, CCR2 e alelos com o valor do FAN ≥ 1/160, anti-DNA positivo, consumo de complemento e presença ou não de anticorpo antifosfolípide (Tabelas 15 e 16).

Tabela 15 - Distribuição dos genótipos do MCP-1, CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e marcadores imunológicos (n=197)

	1.	AN ≥ /160 =105)	1	AN < /160 n=92)		ti-DNA n=147)		ti-DNA (n=50)	Ant p	Ac. ifosfolí ide + n=74)	Ant p	Ac. ifosfolí ide - n=94)
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Genótipos MCP-1*												
AA	55	(52,4)	41	(44,6)	64	(43,5)	32	(64)	35	(47,3)	49	(52,1)
AG	38	(36,2)	38	(41,3)	65	(44,2)	11	(22)	32	(43,2)	31	(33)
GG	12	(11,4)	13	(14,1)	18	(12,3)	7	(14)	7	(9,5)	14	(14,9)
Alelos**												
Α	148	(70,5)	120	(65,2)	193	(65,6)	75	(75)	102	(69)	129	(68,6)
G	62	(29,5)	64	(34,8)	101	(34,4)	25	(25)	46	(31)	59	(31,4)
Genótipos CCR2*												
VV	79	(75,2)	69	(75)	112	(76,2)	36	(72)	55	(74,3)	71	(75,5)
VI	24	(22,9)	20	(21,7)	30	(20,4)	14	(28)	17	(23)	20	(21,3)
II	2	(1,9)	3	(3,3)	5	(3,4)	0	(0)	2	(2,7)	3	(3,2)
Alelos**												
V	182	(86,7)	158	(85,9)	254	(86,4)	86	(86)	127	(85,8)	162	(86,2)
<u> </u>	28	(13,3)	26	(14,1)	40	(13,6)	14	(14)	21	(14,2)	26	(13,8)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

NOTA: anti-DNA= anticorpo anti-ácido desoxirribonucléico; Ac.=anticorpo; FAN=fator anti-núcleo.

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Tabela 16 - Distribuição dos genótipos do MCP-1, CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica em relação ao complemento (n=197)

		nto consumido =161)	Complemento normal (n=3		
	n	%	n	%	
Genótipos MCP-1*					
AA	75	(46,6)	21	(58,3)	
AG	67	(41,6)	9	(25)	
GG	19	(11,8)	6	(16,7)	
Alelos**					
Α	217	(67,4)	51	(70,8)	
G	105	(32,6)	21	(29,2)	
Genótipos CCR2*					
VV	125	(77,6)	23	(63,9)	
VI	32	(19,9)	12	(33,3)	
II	4	(2,5)	1	(2,8)	
Alelos**					
V	282	(87,6)	58	(80,6)	
1	40	(12,4)	14	(19,4)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

Foi avaliada a correlação do polimorfismo genotípico e alelíco do MCP-1 e CCR2 com relação às manifestações clínicas dos pacientes portadores de nefrite lúpica através do escore de SLEDAI e não houve associação entre os parâmetros (Tabelas 17 e 18).

Tabela 17 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e escore SLEDAI (n=197)

	MCP-1				
	Ge	nótipos* n (%)	Alelos** n (%)	
	AA	AG	GG	A	G
SLEDAI ≥ 20 (n=113)	55 (48,7)	50 (44,2)	8 (7,1)	160 (70,8)	66 (29,2)
SLEDAI < 20 (n=84)	41 (48,8)	26 (31)	17 (20,2)	108 (64,3)	60 (35,7)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

Tabela 18 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e escore SLEDAI (n=197)

	CCR2					
	Ge	nótipos* n (%	%)	Alelos** n (%)		
	VV	VI	II	V	1	
SLEDAI ≥ 20 (n=113)	90 (79,6)	20 (17,7)	3 (2,7)	200 (88,5)	26 (11,5)	
SLEDAI < 20 (n=84)	58 (69)	24 (28,6)	2 (2,4)	140 (83,3)	28 (16,7)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

SLEDAI= índice de atividade da doença Lupus Eritematoso Sistêmico

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

SLEDAI= índice de atividade da doença Lupus Eritematoso Sistêmico

Quando estudados apenas os critérios renais através do escore de SLEDAI com relação aos polimorfismos do MCP-1 e CCR2, não se observou nenhuma associação, porém, quando estudados os alelos de ambos os genes, notou-se que nos pacientes com quadro de nefropatia leve (escore < 8) houve um predomínio significante do alelo V em relação ao alelo I (p=0,046) (Tabelas 19 e 20).

Tabela 19 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e SLEDAI renal (n=197)

		MCP-1					
	Ge	enótipos* n ((%)	Alelos** n (%)			
	AA	AG	GG	Α	G		
SLEDAI RENAL ≥ 8 (n=157)	76 (48,4)	61 (38,9)	20 (12,7)	213 (67,8)	101 (32,2)		
SLEDAI RENAL < 8 (n=40)	20 (50)	15 (37,5)	5 (12,5)	55 (68,8)	25 (31,2)		

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

SLEDAI= índice de atividade da doença Lupus Eritematoso Sistêmico

Tabela 20 - Distribuição do genótipo do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica e SLEDAI renal (n=197)

			MC	P-1		
	Ger	nótipos* n (%	6)	Alelos** n (%)		
	AA	AG	GG	Α	G	
SLEDAI RENAL ≥ 8 (n=157)	113 (72)	39 (24,8)	5 (3,2)	265 (84,4)	49 (15,6)	
SLEDAI RENAL < 8 (n=40)	35 (87,5)	5 (12,5)	0 (0)	75 (93,8)	5 (6,2)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

SLEDAI= índice de atividade da doença Lupus Eritematoso Sistêmico

^{**}Teste de proporção univariada p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p=0,046

É conhecida a relação entre o tratamento imunossupressor com a sobrevida renal e a sobrevida do paciente com nefrite lúpica. Assim, vários esquemas de imunossupressão são propostos como tratamento, porém, em nosso meio, utilizamos o da NIH com algumas variantes adaptadas a cada paciente. Com a finalidade de avaliarmos se a intensidade da medicação imunossupressora interferiu no desenlace final do paciente, analisamos as doses de imunossupressores administradas aos pacientes em relação à distribuição genotípica. Não houve nenhuma relação entre doses de imunossupressores e genótipos (Tabela 21).

Tabela 21 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e CCR2 em pacientes portadores de nefrite lúpica e doses de imunossupressores (n=197)

	Genótipos						
	MCP-1			CCR2			
	AA	AG	GG	VV	VI	II	
Corticóide oral (mg/dia)	20,97±13,08	20,80±10,97	17,39±7,20	20,55±11,59	20,51±12,42	16,72±9,26	
Metilprednisolona (mg)	3398±1665	3353±1346	3529±1192	3289±1311	3784±2001	3000±0	
Ciclofosfamida (mg)	7321±4186	7297±4443	7675±3286	7300±4482	7587±3203	6800±692	
Tempo de seguimento (meses)	60,34±45,29	55,89±44,71	64,64±48,77	59,09±45,89	61,7±45,86	39,4±17,96	

^{*} Anova para medidas não repetidas; Média ± desvio padrão

Quando os pacientes foram separados de acordo com a etnia, não foi observada diferença significativa em relação à distribuição dos genótipos MCP-1 e CCR2, porém, em relação aos alelos, houve predomínio do alelo A e do alelo V nos pacientes de ambas as etnias (Tabelas 22 e 23). Para essa análise foram excluídos os pacientes da etnia amarela (n=3 pacientes).

Tabela 22 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica de acordo com a etnia (n=194)

	MCP-1				
	Genótipos* n (%)			Alelo	os** n (%)
	AA	AG	GG	Α	G
Etnia Branca (n=129)	63 (48,8)	50 (38,8)	16 (12,4)	176 (68,2)	82 (31,8)
Etnia Não- branca (n=65)	33 (50,8)	23 (35,4)	9 (13,8)	89 (68,5)	41 (31,5)

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

Tabela 23 - Distribuição dos genótipos do CCR2 e alelos em pacientes portadores de nefrite lúpica de acordo com a etnia (n=194)

	MCP-1				
	Genótipos* n (%)			Alelos** n (%)	
	AA	AG	GG	Α	G
Etnia Branca (n=129)	95 (73,6)	30 (23,3)	4 (3,1)	220 (85,3)	38(14,7)
Etnia Não- branca (n=65)	52 (80)	13 (20)	0 (0)	117 (90)	13 (10)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

^{**}Teste de proporção univariada p<0,0001

^{**}Teste de proporção univariada p=0,0003

Em relação à distribuição da etnia de acordo com as classes histológicas, função renal no início e no final do seguimento e desfecho para TRS, também não foi evidenciada a diferença estatística (Tabelas 24, 25 e 26).

Tabela 24 - Distribuição da etnia em pacientes portadores de nefrite lúpica de acordo com as classes histológicas (n=194)

	Etnia Branca (n=129)		Etnia Não- branca (n=65)	
	n	%	n	%
Classe IV (n=129)	92	(71,3)	37	(56,9)
Classe V (n=60)	34	(26,4)	26	(40)
Class VI (n=5)	3	(2,3)	2	(3,1)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

Tabela 25 - Distribuição da etnia em pacientes portadores de nefrite lúpica e função renal no início e final do seguimento (n=194)

	Etnia Branca (n=129)		Etnia Não- branca (n=65)	
Creatinina (mg/dl)	n	%	n	%
Inicial >1,2	77	(59,7)	33	(50,8)
Inicial ≤ 1,2	52	(40,3)	32	(49,2)
Final > 1,2	52	(40,3)	23	(35,4)
Final ≤ 1,2	77	(59,7)	42	(64,6)

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

Tabela 26 - Distribuição da etnia em pacientes portadores de nefrite lúpica e TRS (n=194)

	Etnia Bra	Etnia Branca (n=129)		Etnia Não- branca (n=65)	
TRS	n	%	n	%	
Sim (n=44)	34	(26,4)	10	(15,4)	
Não (n=153)	95	(73,6)	55	(84,6)	

^{*}Teste de associação bivariada (χ^2) p=NS

NOTA: TRS= terapia renal substitutiva

Quando analisados os pacientes portadores do alelo G e do alelo I (denominado Grupo GI), não se encontrou diferença estatística entre as classes histológicas e a função renal no início e no final do seguimento quando comparado com o grupo não portador de ambos os alelos (denominado Grupo não GI) (Tabelas 27 e 28).

Tabela 27 - Distribuição do grupo GI e do grupo não GI de acordo com as classes histológicas

	Etnia l	Branca (n=129)	Etnia Não- branca (n=65)	
	n	%	n	%
Classe IV (n=131)	19	(79,2)	112	(64,7)
Classe V (n=61)	4	(16,7)	57	(33)
Class VI (n=5)	1	(4,1)	4	(2,3)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

Tabela 28 - Distribuição do grupo GI e do grupo não GI de acordo com a função renal no início e final do seguimento

	Etnia Branca (n=129)		Etnia Não- branca (n=65)	
Creatinina (mg/dl)	n	%	n	%
Inicial >1,2	16	(66,7)	95	(54,9)
Inicial ≤ 1,2	8	(33,3)	78	(45,1)
Final > 1,2	11	(45,8)	66	(38,2)
Final ≤ 1,2	13	(54,2)	107	(61,8)

^{*}Teste de associação bivariada (χ²) p=NS

Não houve diferença estatística entre as curvas de sobrevida renal funcional dos pacientes portadores de nefrite lúpica em relação aos genótipos MCP-1, CCR2 e seus respectivos alelos (Figuras 4, 5,6 e 7).

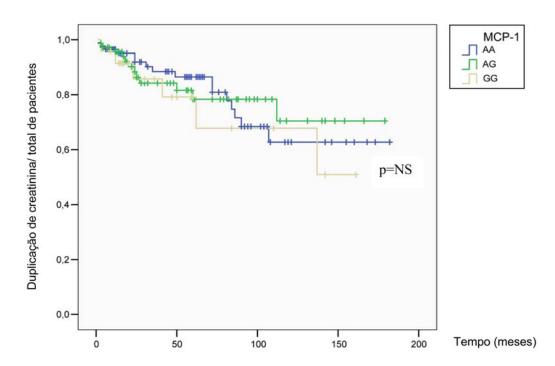


Figura 4 - Curva de duplicação da creatinina nos pacientes com NL em relação ao tempo de seguimento de acordo com os genótipos do MCP-1

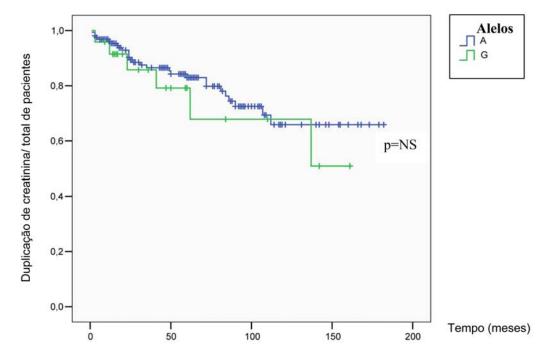


Figura 5 - Curva de duplicação da creatinina nos pacientes com NL em relação ao tempo de seguimento de acordo com os alelos do MCP-1

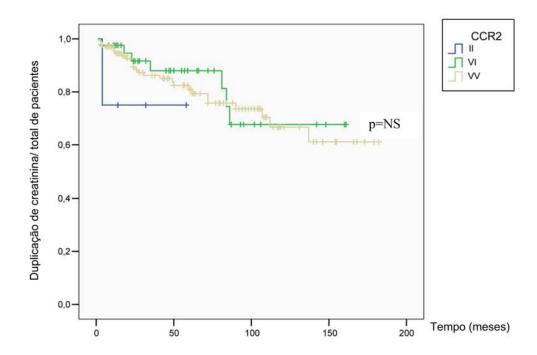


Figura 6 - Curva de duplicação da creatinina nos pacientes com NL em relação ao tempo de seguimento de acordo com os genótipos do CCR2

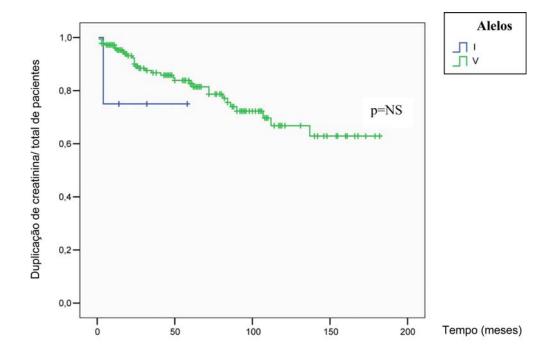


Figura 7 - Curva de duplicação da creatinina nos pacientes com NL em relação ao tempo de seguimento de acordo com os alelos do CCR2

4.2 Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário

Foram realizadas dosagens urinárias do MCP-1 (uMCP-1) em 34 pacientes do sexo feminino, com idade média de $28,4 \pm 9,9$ anos, portadores de nefrite lúpica em atividade, sendo 9 (26,5%) pacientes de etnia branca e 25 (73,5%) de etnia não-branca. As coletas ocorreram no tempo zero (T_0), próximo ao momento da realização da biópsia renal e após 3 (T_3) e 6 (T_6) meses de seguimento. Os dados clínicos, laboratoriais e histológicos dos pacientes com nefrite lúpica em atividade estão na tabela 29.

Tabela 29 - Características clínicas, laboratoriais e histológicas dos pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade no início do protocolo (n=34)

Creatinina sérica (mg/dl)	1,8 (1,0-3,1)	
Albumina (g/dl)	2,6 (2,1-3,2)	
Proteinúria (g/24h)	5,4 (3,5-6,8)	
Creatinina > 1,2 mg/dl %	64,7 (n=22)	
FAN ≥ 1/160 %	76,5 (n=26)	
C3 consumido (mg/dl) %	97 (n=33)	
C4 consumido (mg/dl) %	76,5 (n=26)	
Anti-DNA (UI/mI) positivo %	70,6 (n=24)	
Anticorpo Antifosfolípide positivo %	79,4 (n=27)	
Biópsia renal		
Classe III + IV %	79,4 (n=27)	
Classe V %	20,6 (n=7)	
Flare		
Leve %	26,5 (n=9)	
Moderado %	29,4 (n=10)	
Grave %	44,1 (n=15)	

NOTA: Dados expressos em mediana (25%-75%); freqüência absoluta (n) e relativa (%). anti-DNA= anticorpo anti-ácido desoxirribonucléico; C3= fração C3 do complemento; C4= fração C4 do complemento; FAN=fator anti-núcleo.

A média da dosagem urinária do MCP-1 foi significantemente maior no início do protocolo, momento da abertura do quadro, quando comparado com o MCP-1 urinário após 3 e 6 meses de tratamento. Em resumo o uMCP-1 diminuiu significantemente ao longo do seguimento (p<0,05) (Figura 8).

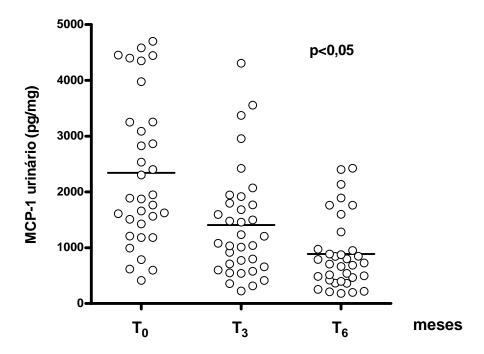


Figura 8 - Dosagem urinária de MCP-1 nos tempos 0, 3 e 6 meses de seguimento em cada paciente

Como no protocolo I, a função renal dos pacientes foi avaliada através da creatinina sérica e considerado como IR aqueles pacientes com creatinina maior que 1,2 mg/dl. Quando realizada a análise da creatinina sérica no ínicio do quadro e após 6 meses de tratamento em relação ao uMCP-1, observou-se diferença estatística somente no T_0 , onde pacientes com creatinina inicial maior que 1,2 mg/dl apresentaram valores mais elevados de uMCP-1 (p<0,05) (Figuras 9 e 10).

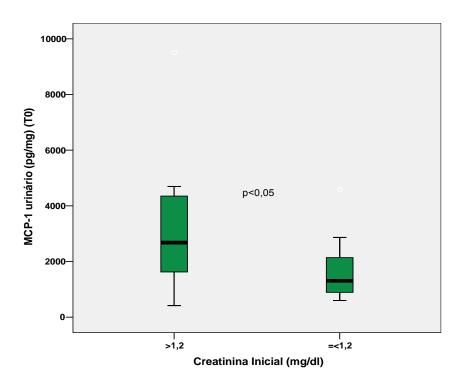


Figura 9 - MCP-1 urinário e creatinina sérica no tempo zero (T₀)

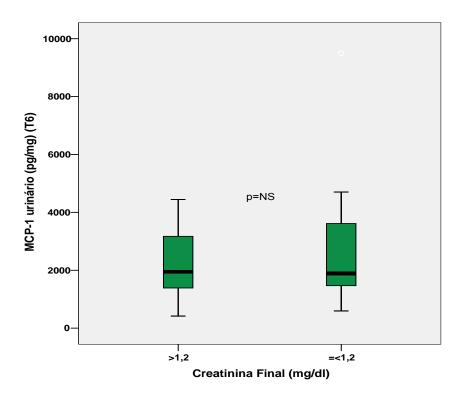


Figura 10 - MCP-1 urinário e creatinina sérica após 6 meses de tratamento

A creatinina sérica e o uMCP-1 apresentaram uma correlação positiva no tempo zero do protocolo (p<0,05; r=0,51) (Figura 11).

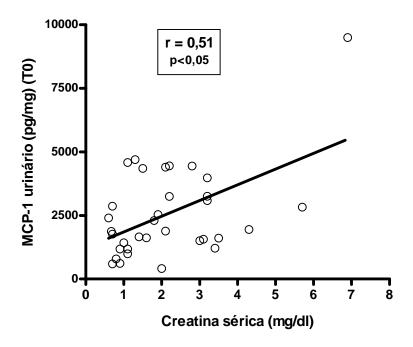


Figura 11 - Correlação do MCP-1 urinário e creatinina sérica no tempo zero (T_0)

Quanto à proteinúria de 24h no ínicio do quadro e após 6 meses de tratamento, não se observou associação com o uMCP-1 (Figuras 12 e 13).

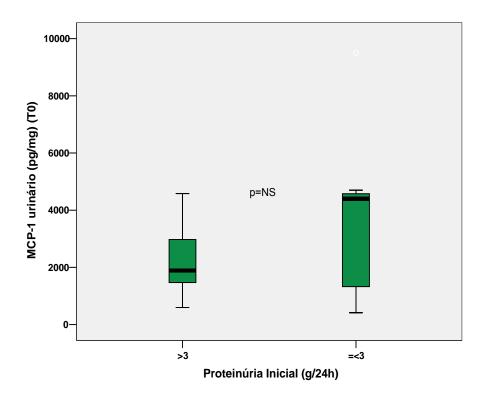


Figura 12 - MCP-1 urinário e proteinúria de 24h no tempo zero (T₀)

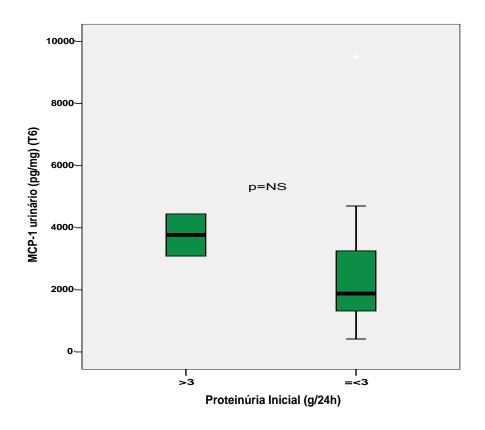


Figura 13 - MCP-1 urinário e proteinúria de 24h após 6 meses de tratamento

Com relação à histologia renal, não houve relação entre o uMCP-1 e as classes histológicas da nefrite lúpica de acordo com a classificação da OMS (Figura 14).

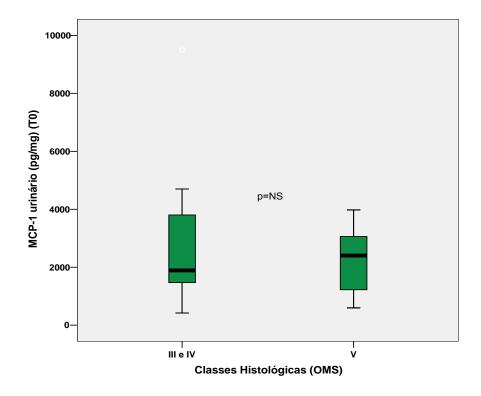


Figura 14 - MCP-1 urinário e classes histológicas (classificação da OMS)

Através do escore de SLEDAI e escore de SLEDAI renal em relação ao uMCP-1, foi avaliada a relação das manifestações clínicas dos pacientes portadores de nefrite lúpica no tempo zero e não se observou associação entre os parâmetros (Figuras 15 e 16).

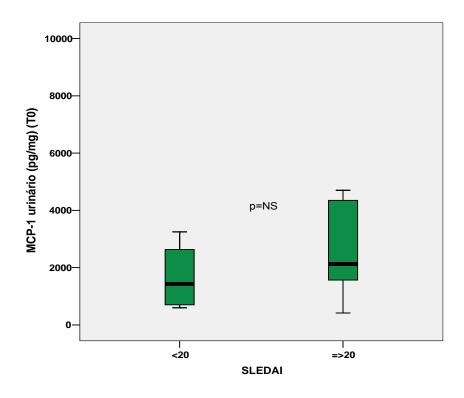


Figura 15 - MCP-1 urinário e SLEDAI no tempo zero (T₀)

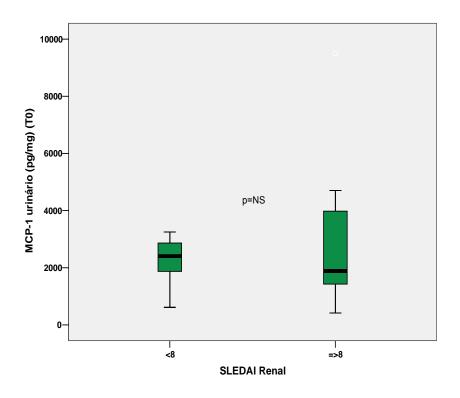


Figura 16 - MCP-1 urinário e SLEDAI Renal no tempo zero (T_0)

Quanto aos marcadores imunológicos para LES em relação ao uMCP-1, não evidenciamos associação com o valor do FAN \geq 1/160, anti-DNA positivo e consumo de complemento no tempo zero (Figuras 17, 18, 19 e 20). Porém, houve aumento significante do uMCP-1 em pacientes com anticorpo antifosfolípide positivo estudados no T_0 (p<0,05) (Figura 21).

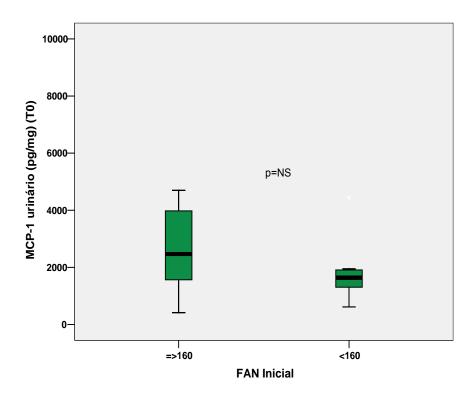


Figura 17 - MCP-1 urinário e FAN no tempo zero (T₀)

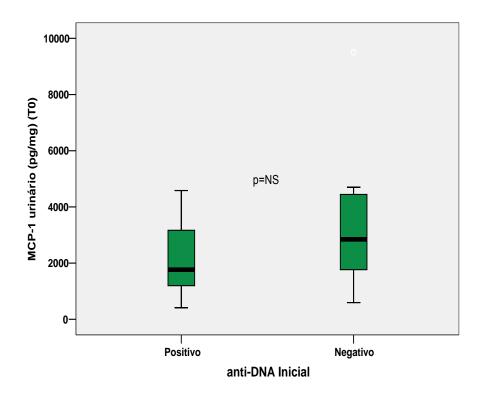


Figura 18 - MCP-1 urinário e anti-DNA no tempo zero (T₀)

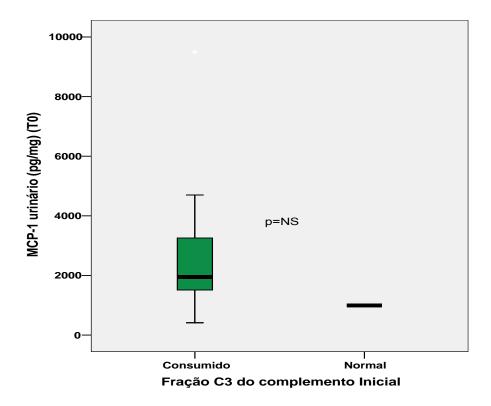


Figura 19 - MCP-1 urinário e fração C3 do complemento no tempo zero (T₀)

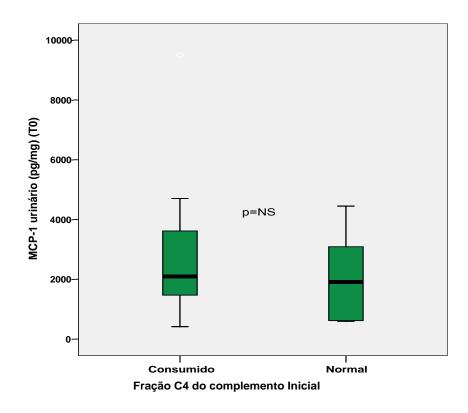


Figura 20 - MCP-1 urinário e fração C4 do complemento no tempo zero (T₀)

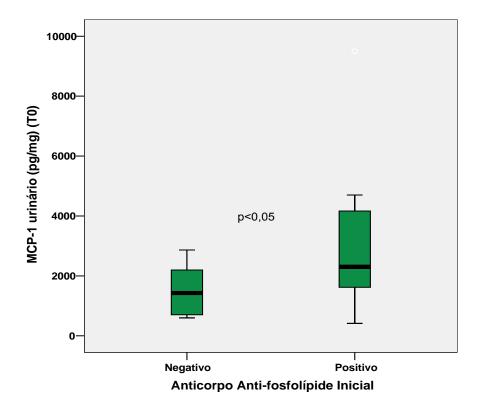


Figura 21 - MCP-1 urinário e anticorpo antifosfolípide no tempo zero (T₀)

Quando analisada a gravidade da doença renal utilizando critérios de *flare* constatou-se um aumento significante do uMCP-1 nos pacientes com *flares* grave e moderado em relação ao *flare* leve (p<0,05) (Figura 22).

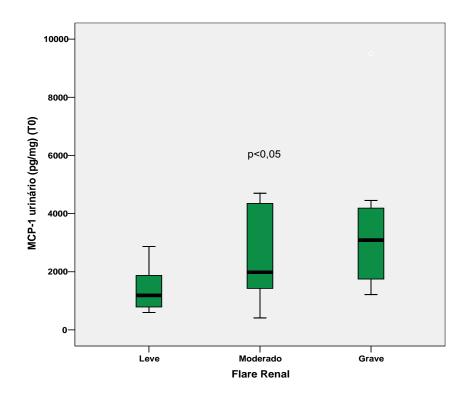


Figura 22 - MCP-1 urinário e intensidade do *flare* renal no tempo zero (T₀)

Já em relação à intensidade dos *flares* e classes histológicas, não se observou nenhuma associação significante. Vale salientar que o *flare* leve foi mais frequente na classe V, enquanto os *flares* moderado e grave foram mais freqüentes nas classes III e IV (Figura 23)

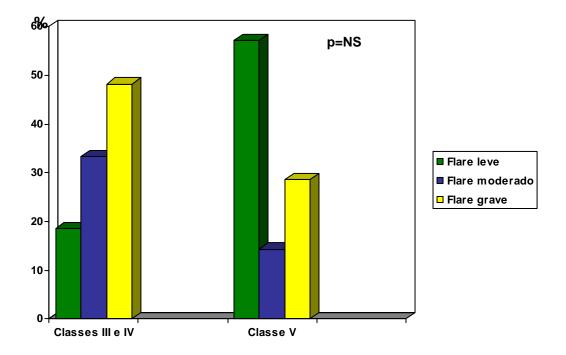


Figura 23 - Intensidade do f*lare* renal e classes histológicas (classificação da OMS)

Quanto à distribuição genotípica do MCP-1 e à intensidade do *flare* renal, observou-se uma associação significante dos *flares* moderado e grave nos pacientes portadores dos genótipos AA e AG em relação ao genótipo GG (p< 0,05), enquanto que, em relação à distribuição alélica não se notou associação. Já quanto à distribuição genotípica e alélica do CCR2 e intensidade do *flare* renal não se observou nenhuma associação (Figuras 24, 25, 26 e 27).

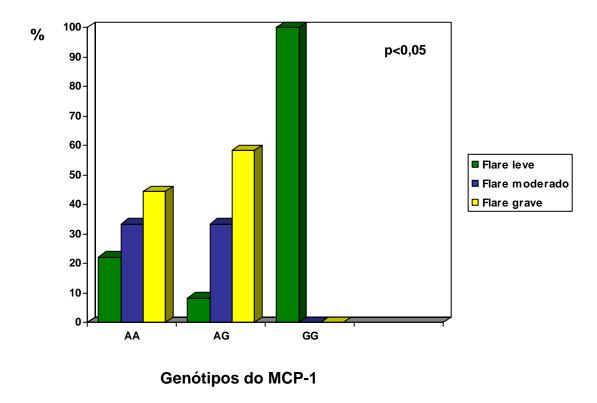


Figura 24 - Distribuição dos genótipos do MCP-1 e intensidade do flare renal

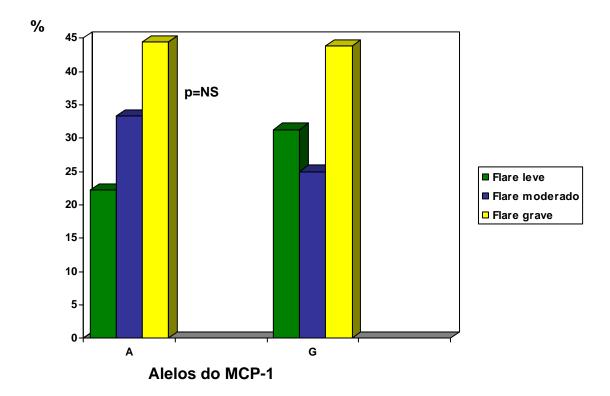


Figura 25 - Distribuição dos alelos do MCP-1 e intensidade do flare renal

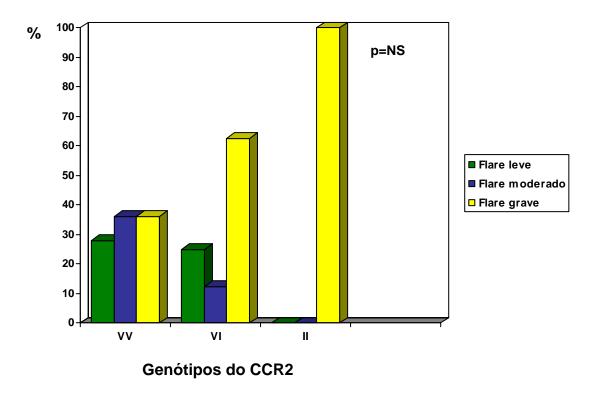


Figura 26 - Distribuição dos genótípos do CCR2 e intensidade do flare renal

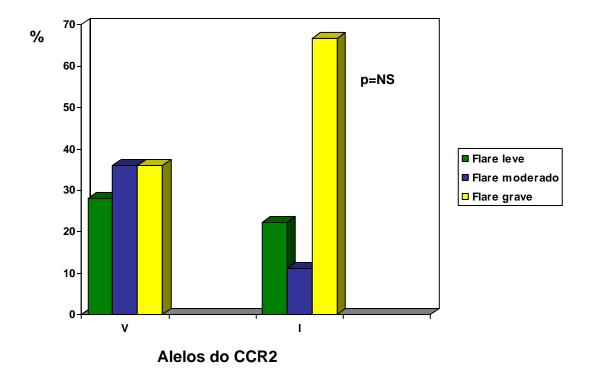


Figura 27 - Distribuição dos alelos do CCR2 e intensidade do flare renal

Quando os pacientes foram estudados de acordo com a etnia, não houve associação entre a etnia e a dosagem do uMCP-1 no início do protocolo (Figura 28).

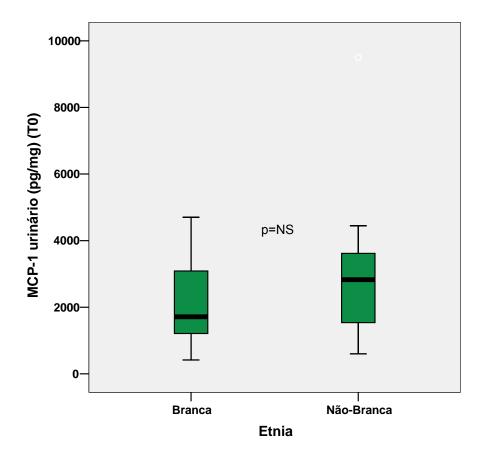


Figura 28 - Etnia e MCP-1 urinário no tempo zero (T₀)

Estudando a distribuição genotípica do MCP-1 dos 34 pacientes em relação ao uMCP-1 foi observado um aumento significante do uMCP-1 no tempo zero do protocolo nos pacientes portadores dos genótipos AG e AA quando comparado ao genótipos GG (p<0,05), porém não se evidenciou associação entre a distribuição alélica do MCP-1 e o uMCP-1 (Figuras 29 e 30).

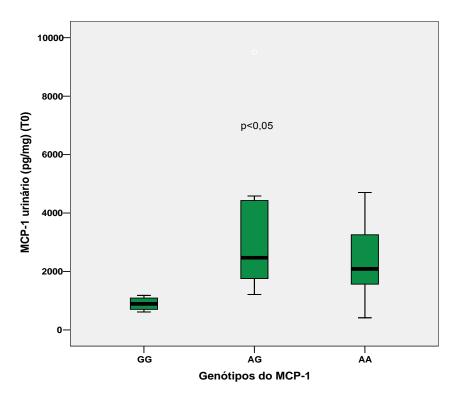


Figura 29 - Distribuição genotípica do MCP-1 e uMCP-1 no tempo zero (T_0)

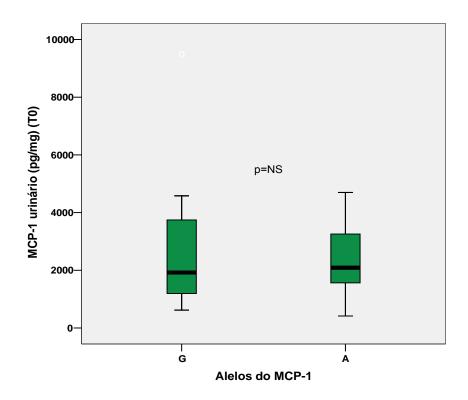


Figura 30 - Distribuição alélica do gene do MCP-1 e uMCP-1 no tempo zero (T₀)

Já em relação à distribuição genotípica e alélica do CCR2, não se notou nenhuma associação dos mesmos e a dosagem de uMCP-1 no tempo zero do protocolo (Figuras 31 e 32).

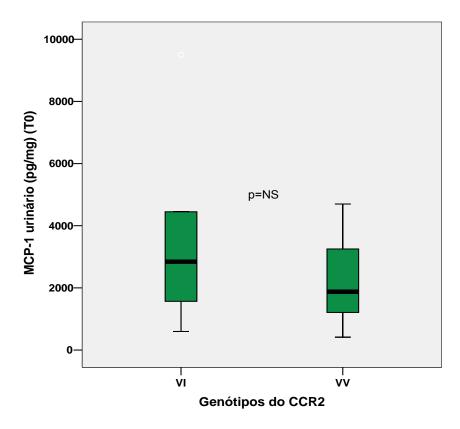


Figura 31 - Distribuição genotípica do CCR2 e uMCP-1 no tempo zero (T₀)

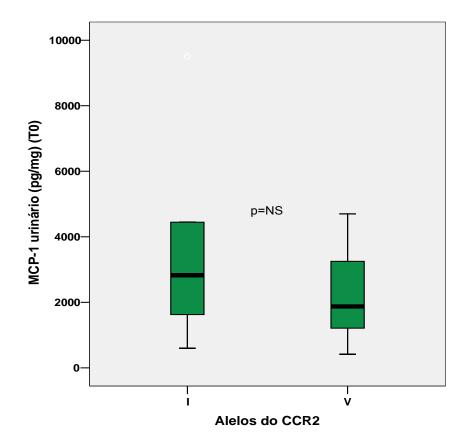


Figura 32 - Distribuição alélica do CCR2 e uMCP-1 no tempo zero (T_0)



5.1 Protocolo I: Estudo do genótipo

Dados do presente estudo demonstraram que, em relação ao polimorfismo do gene do MCP-1 -2518, a frequência do genótipo GG foi significativamente maior nos pacientes portadores de nefrite lúpica quando comparado com o grupo controle (12,7% e 5%, respectivamente) enquanto o genótipo AA apresentou maior frequência no grupo controle (56,8% e 48,7%, respectivamente), porém sem significância estatística. Com relação aos alelos, a freqüência do alelo A foi significantemente maior no grupo controle quando comparada aos pacientes portadores de nefrite lúpica (75,9% e 68%, respectivamente).

Já em relação ao polimorfismo do gene do CCR2, não foi evidenciada diferença na frequência do genótipo entre os dois grupos, porém foi observada maior freqüência, estatisticamente significante, do alelo V no grupo controle em relação aos portadores de nefrite lúpica (89,8% e 86,3%, respectivamente).

Os nossos achados concordam com a hipótese de Rovin *et al.*, em que o polimorfismo do gene do MCP-1 -2518 parece influenciar a atividade da transcrição da região regulatória distal do gene em resposta ao estímulo inflamatório, pois células mononucleares obtidas de indivíduos saudáveis portadores do genótipo GG ou AG, após estímulo com IL-1β, produzem mais MCP-1 do que as células de indivíduos com genótipo AA. Isso sugere que,

sob os mesmos estímulos, indivíduos carregando o alelo G na posição -2518 produzem mais MCP-1 que indivíduos com genótipo AA e, conseqüentemente, podem apresentar uma resposta inflamatória mais potente com maior dano tecidual. Isto vem de encontro a idéia que a nefrite lúpica é, dentro do LES, uma condição de resposta inflamatória exacerbada com maior infiltração tecidual e maior lesão ao órgão acometido ⁷¹.

O mesmo achado foi relatado por Tucci *et al.* que observaram maior freqüência do genótipo AA em indivíduos saudáveis controle em relação aos pacientes com LES, onde os genótipos AG e GG foram mais freqüentes. Quando analisados os pacientes portadores de LES com ou sem NL, notou-se aumento da freqüência do genótipo GG e AG nos pacientes portadores de NL, enquanto a freqüência do genótipo AA foi maior nos pacientes sem NL. Em relação à distribuição alélica observou-se que a presença do alelo G foi maior nos pacientes com LES comparados com o controle, e que a presença do alelo G ocorreu também com maior freqüência em pacientes com NL, quando comparados com pacientes sem NL. Os dados desse estudo sugerem que os pacientes portadores de LES com o genótipo GG ou AG apresentavam 2 a 4 vezes maior risco de desenvolver NL do que os pacientes com o genótipo AA ⁷².

Já em discordância com os nossos dados, Kim *et al.* demonstraram que células mononucleares de pacientes portadores de nefrite lúpica carregando o alelo A na posição -2518, após estímulo com fitohemaglutinina, produziam mais MCP-1 do que pacientes carregando o alelo G na posição -2518 ⁴⁵. Achado semelhante porém diferente do nosso foi observado por

Lima *et al.* que estudaram uma população de pacientes mexicanos e encontraram um aumento significante do genótipo AA e do alelo A nos pacientes portadores de LES, quando comparados com indivíduos saudáveis. No entanto quando os pacientes foram estratificados de acordo com a presença ou ausência de doença renal, não evidenciaram associação entre o polimorfismo do gene do MCP-1 -2518 e a susceptibilidade para nefrite lúpica (106). Trabalhos de Nunez-Roldán *et al.* e Sanchez *et al.*, que estudaram uma população de pacientes caucasianos, também não evidenciaram associação entre o polimorfismo do gene do MCP-1 -2518 e a susceptibilidade para o LES, nem nefrite lúpica ^{73,76}. Estas discrepâncias nos achados de literatura podem ser explicadas pela heterogeneidade racial das populações, assim como, pela clínica dos pacientes analisados normais e doentes.

Quanto ao polimorfismo do receptor CCR2, são poucos os dados na literatura. Um estudo realizado com modelo de camundongo lúpico MRLFAS^{lpr} geneticamente deficiente para o CCR2 evidenciou que o receptor CCR2 apresentava um importante papel no desenvolvimento de doenças auto-imune e da lesão renal, influenciando a progressão da doença renal e a sobrevida do animal ³⁹.

Porém, os poucos trabalhos realizados abordando a distribuição genotípica do CCR2 em pacientes portadores de LES não demonstraram nenhuma associação entre o polimorfismo do CCR2 e a susceptibilidade para o LES, quando comparados com indivíduos saudáveis ^{97,107}.

Com relação à função renal, nossos achados sugerem não haver associação entre a freqüência da distribuição genotípica do MCP-1 e CCR2 ou de seus alelos, que possa estar relacionada à gravidade da nefrite lúpica na sua instalação (creatinina inicial) nem na sua progressão, medida pela creatinina ao final do seguimento. O mesmo pode ser dito com relação ao desenlace renal (duplicação da creatinina ou necessidade de TRS) como constatado pelas curvas de sobrevida renal funcional dos pacientes portadores de nefrite lúpica.

Kim *et al.* também não constataram associação entre os diferentes genótipos do MCP-1 nos pacientes portadores de NL e função renal ⁴⁵. Não encontramos relatos na literatura sobre a gravidade da doença renal e a distribuição genotípica e alélica do CCR2.

Com relação às classes histológicas da nefrite lúpica (classificação pela OMS), nossos dados não evidenciaram associação entre a distribuição de genótipos e alelos, dados que se assemelham aos trabalhos de Tucci *et al.* e Nakashima *et al*, que também não encontraram esta associação ^{72,74}. No entanto, estudos prévios realizados em camundongos lúpicos MRLFAS^{lpr} geneticamente deficientes para o MCP-1 já demonstraram uma atenuação da GN proliferativa nesses animais ³⁶.

Estudamos também a distribuição dos genótipos do MCP-1 e CCR2 quanto aos índices de atividade (IA – que pode ter valor de 0 a 24) e cronicidade (IC - que pode ter valor de 0 a 12) da nefrite lúpica padronizados pela OMS. Com a aplicação destes índices, tem sido observado por alguns autores que pacientes com IA>12 e IC> 4 têm pior prognóstico em termos de

sobrevida renal a longo prazo ³¹. Outros centros, no entanto, não têm constatado tal valor prognóstico em estudos de larga escala ¹⁰⁸. Nós não verificamos nenhuma associação entre a distribuição genotípica e alélica e os índices de atividade e cronicidade nos pacientes estudados.

Em relação à gravidade da doença sistêmica avaliada pelo escore de SLEDAI, nossos dados não mostraram associação com o polimorfismo genotípico e alélico do MCP-1 e CCR2 nos pacientes portadores de NL porém, quando foram avaliados os critérios renais de atividade (SLEDAI renal), notou-se que pacientes com quadro de nefropatia leve apresentavam predomínio significante do alelo V em relação ao alelo I do CCR2.

Os dados da literatura sobre a associação dos polimorfismos nos pacientes portadores de NL com as manifestações clínicas da doença são escassos. O protocolo de Lima *et al.* estudou apenas a distribuição do polimorfismo do MCP-1 em relação à leucopenia nos pacientes portadores de LES e observou um aumento significativo do genótipo AA nesses pacientes ¹⁰⁶.

Estudando os marcadores de atividade imunológica dos pacientes com nefrite lúpica em relação aos genótipos e alelos, não observamos associação do MCP-1 e CCR2 com os seguintes marcadores: FAN, anti-DNA, complemento e anticorpo antifosfolípide. Por outro lado, relato de literatura de Lima et al. evidenciaram que pacientes portadores de LES com anti-DNA e anticorpo antifosfolípide positivos apresentavam maior freqüência do genótipo GG em relação ao genótipo AA, quando comparados com os pacientes com anti-DNA e anticorpo antifosfolípide negativos. No mesmo

estudo observou-se que pacientes com anticorpo antifosfolípide positivo também apresentavam maior freqüência do alelo G. Estes achados referem-se a uma população de pacientes lúpicos e não de nefrite lúpica ¹⁰⁶.

Estudos de genótipos e etnia são sempre muito importantes. Assim, os pacientes do nosso estudo foram estratificados, de acordo com a etnia em brancos e não-brancos e não evidenciamos diferença estatística entre a distribuição genotípica e alélica do MCP-1 e CCR2 em relação a este aspecto. Em contraste aos nossos achados, o estudo de Brown *et al.* mostrou uma maior porcentagem, porém não significante, do genótipo AG e GG nos pacientes caucasianos portadores de NL, mas não nos pacientes afro-americanos também portadores de NL. O autor acredita que não encontrou diferença estatística devido ao reduzido número de pacientes com o genótipo GG analisados (n=12). Nesse mesmo trabalho, o autor demonstrou que pacientes caucasianos portadores do alelo G apresentavam um risco 4 vezes maior de desenvolver LES, mas não os pacientes afro-americanos ¹⁰⁹. Isso sugere que a expressão do polimorfismo do MCP-1, possa ser influenciada pela etnia.

Por sua vez, Hwang *et al.* demonstraram maior frequência do alelo G em relação ao alelo A nos indivíduos coreanos saudáveis (65% e 35%, respectivamente), sendo essa freqüência 2 vezes maior na população coreana do que nos caucasianos e afro-americanos ¹¹⁰. Um estudo japonês também evidenciou que o alelo G é mais freqüente que o alelo A na população asiática (65% e 35%, respectivamente), indicando o predomínio do alelo G nessa população ¹¹¹. Já ao contrário dos dois estudos citados

acima, Rovin *et al.* evidenciaram menor frequência do alelo G em relação ao alelo A nos indivíduos asiáticos (47% e 53%), caucasianos (29% e 71%) e afro-americanos (22% e 78%) ⁷¹.

Acreditamos que os nossos dados não demonstraram diferença estatística em relação à etnia por conta da complexa miscigenação da nossa população, que é composta por pessoas de diversas origens e pelos critérios subjetivos de caracterização dos mesmos apontados de acordo com a impressão de quem preencheu o prontuário. Segundo o estudo de Parra *et al.* seria necessário no mínimo uma avaliação das características étnicas (marcadores moleculares) dos ancestrais dos pacientes, para podermos estabelecer mais precisamente a etnia de cada um deles, pois somente a aparência física não é um bom preditor para ancestrais africanos ¹¹².

5.2 Protocolo II: Estudo do MCP-1 urinário

Estudando prospectivamente 34 pacientes com nefrite lúpica em atividade constatamos que os valores da excreção urinária do MCP-1 foi significativamente maior no tempo zero, próximo à abertura do quadro, quando comparado com os valores após 3 e 6 meses de tratamento. Portanto, nos nossos pacientes portadores de NL, o uMCP-1 apresentou diminuição significativa ao longo do seguimento.

Noris *et al.* já descreveram a elevação dos níveis de uMCP-1 em pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade quando comparados com

pacientes com nefrite lúpica inativa ou indivíduos saudáveis, que diminuíam após o tratamento com corticosteróide. Acredita-se que este aumento do uMCP-1 reflita a superprodução renal da proteína pelas células glomerulares, como conseqüência da inflamação local e síntese de quimiocinas e linfocinas como IL-1, independente de eventos sistêmicos. Além disso, neste mesmo estudo, os autores relataram que os níveis séricos de MCP-1, antes e após a administração de corticóide não se correlacionavam com os níveis urinários do MCP-1, sugerindo que a rápida diminuição do uMCP-1 pode refletir o efeito anti-inflamatório renal da terapia com esteróide. Para reforçar essa teoria, os achados do estudo mostraram uma forte correlação entre uMCP-1 e o aumento de infiltração leucocitária em pacientes com NL em atividade ⁴¹.

O estudo de Rovin *et al.* também confirma a hipótese de que o MCP-1 é produzido no glomérulo lesado de pacientes com nefrite lúpica, pois, através da técnica de imonuhistoquímica, observaram uma forte imunorreatividade do MCP-1 no glomérulo desses pacientes. O MCP-1 glomerular foi encontrado predominantemente no mesângio com distribuição focal e granular ⁵⁰.

Os trabalhos de Tucci *et al.* e Li *et al.* também demonstraram que os níveis de uMCP-1 foi maior nos pacientes portadores de LES, quando comparados com o grupo controle (indivíduos saudáveis), porém os níveis foram mais elevados nos pacientes portadores de NL do que nos pacientes sem NL. Isto sugere que este aumento do MCP-1 nos pacientes com LES em relação ao grupo controle foi devido àqueles pacientes portadores de NL ^{42,72}.

Quando analisamos a gravidade da doença renal do ponto de vista clínico-laboratorial, evidenciamos um aumento significante do uMCP-1 nos pacientes que apresentaram *flares* grave e moderado em relação aos pacientes com *flare* leve.

O mesmo foi observado por Rovin *et al.* que demonstraram um aumento do uMCP-1 de acordo com a severidade do *flare* renal, os níveis de uMCP-1 foram significativamente mais elevados no *flare* grave do que nos *flares* moderado e leve. Este estudo sugere que o uMCP-1 é um sensível e específico biomarcador de *flare* renal e da severidade da lesão renal no LES ⁴⁴.

Com relação à histologia da nefrite lúpica (classificação da OMS), os nossos dados não mostraram relação significativa entre o uMCP-1 e as classes histológicas. Ao contrário dos nossos achados, Rovin *et al.* encontraram níveis de uMCP-1 significativamente mais elevados nas formas proliferativas (classe III e IV) do que nas formas não proliferativas (classe V) ⁴⁴. Assim como Wada *et al.* que evidenciaram níveis marcadamente maiores de uMCP-1 em pacientes portadores da classe IV quando comparados com pacientes com as classes V e II. As lesões proliferativas glomerulares são caracterizadas pelo aumento das células mesangiais, da infiltração de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, acompanhados pela deposição de complexos imunes e lesões necrotizantes segmentares além disso, essas lesões estão associadas à nefrite túbulo-intersticial com depósitos de imunoglobulinas, complemento e infiltração de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, diferentemente das formas não proliferativas (classe V e II) em que essas características ocorrem em menor

escala. Isto pode explicar a diferença entre os níveis de uMCP-1 entre os pacientes portadores das classes III e IV em relação às classes V e II ⁴⁰.

Por sua vez, Tucci *et al.* observaram maiores níveis de MCP-1 urinário nos pacientes portadores da classe V (não proliferativa) quando comparado com as classes III e IV (proliferativas) ⁷².

Quando analisamos a relação da função renal através da creatinina plasmática no início do quadro renal (T_0) e após 6 meses de tratamento (T_6) com os níveis do uMCP-1, observamos diferença estatística somente no T_0 , quando ficou evidente aumento do uMCP-1 nos pacientes com creatinina inicial > 1,2 mg/dl. Observamos, também, uma correlação positiva entre o nível do uMCP-1 e a creatinina sérica nos pacientes portadores de NL no início da atividade renal.

Nossos achados concordam com o trabalho de Rovin *et al.*, em que o nível de uMCP-1 durante a atividade renal em pacientes com alteração da função renal, identificada através da elevação da creatinina (creatinina > 1,1mg/dl), foi significativamente maior do que o nível do uMCP-1 durante a atividade renal em pacientes com função renal normal ⁴⁴. Assim como com os estudos de Li *et al.* e Tucci *et al.* que demonstraram uma correlação positiva entre o nível do uMCP-1 e a creatinina sérica nos pacientes portadores de NL, ou seja, quanto maior o valor da creatinina, maior a excreção do MCP-1 urinário ^{42,72}.

Estudamos a relação das manifestações clínicas dos pacientes portadores de nefrite lúpica em atividade através do escore de SLEDAI e

escore de SLEDAI renal em relação ao uMCP-1 e não observamos associação entre os parâmetros.

Contrapondo nossos achados, Chan *et al.* observaram um aumento da expressão do mRNA do MCP-1 na urina de pacientes portadores de NL correlacionado diretamente com a atividade sistêmica da doença (escore de SLEDAI), o qual diminuiu com a redução da atividade renal ⁴³.

Analisamos, também, a gravidade da atividade renal (*flare* renal) em relação à distribuição genotípica do MCP-1 e observamos um predomínio significante dos *flares* moderado e grave nos pacientes com genótipos AA e AG em relação ao genótipo GG, enquanto que, em relação à distribuição alélica não notamos diferença estatística. Já quanto à distribuição genotípica a alélica do CCR2 e a gravidade da atividade renal, não se observou nenhuma associação

Com relação aos marcadores imunológicos para LES, nossos dados não encontraram diferença estatística entre o uMCP-1 nos pacientes portadores de NL e o valor do FAN (FAN ≥ 1/160), anti-DNA positivo e consumo de complemento no início da atividade renal. Porém, observamos um aumento significativo do uMCP-1 nos pacientes portadores de NL em relação ao anticorpo antifosfolípide positivo.

Os dados da literatura são escassos em relação à associação do uMCP-1 e os marcadores imunológicos para o LES. De acordo com os nossos achados, o estudo de Wada *et al.* não demonstraram correlação entre os títulos de anti-DNA e a excreção urinária de MCP-1 em pacientes portadores de NL ⁴⁰. Por outro lado, o trabalho de Tucci *et al.* demonstraram

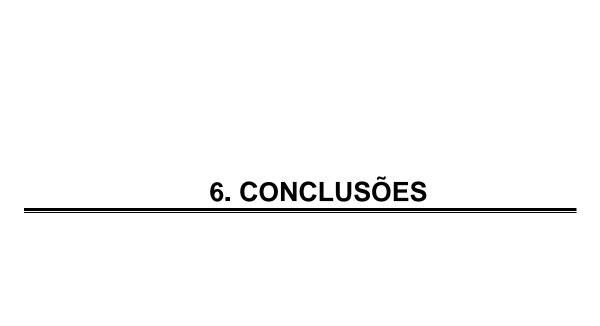
que os pacientes portadores de NL com anti-DNA positivo apresentavam maiores níveis de uMCP-1 ⁷².

Estudamos ainda a distribuição genotípica do MCP-1 em relação à excreção urinária do MCP-1 e observamos um aumento significante do uMCP-1 nos pacientes com genótipos AG e AA quando comparado aos genótipos GG no início da atividade renal, porém não evidenciamos diferença entre a distribuição alélica do MCP-1 e o uMCP-1. Já em relação a distribuição genotípica e alélica do CCR2, não notamos nenhuma diferença entre a frequência e a dosagem de uMCP-1 na abertura do quadro renal. Kim et al. demonstraram um aumento não significante dos níveis de uMCP-1 no genótipo AA de pacientes portadores de NL em relação aos genótipos AG e GG de pacientes com NL ⁴⁵. Já Tucci et al., estudando os níveis urinários de MCP-1 em pacientes portadores de LES pela distribuição genotípica do MCP-1, evidenciaram que os pacientes com os genótipos GG e AG apresentavam maiores níveis de uMCP-1 do que os pacientes com o genótipo AA 72. Existe uma variação entre os estudos, porém não há dados suficientes na literatura para explicar essa diferença genotípica em relação à dosagem urinária do MCP-1. Quanto ao polimorfismo do CCR2 não encontramos relatos na literatura para comparação dos dados.

Em resumo nossos dados mostram que o genótipo GG está associado com maior predisposição para nefrite lúpica, havendo aumento da excreção urinária do MCP-1 no início da atividade renal nos pacientes portadores de NL. Valores elevados do uMCP-1 estão associados com função renal e com a gravidade da atividade renal (*flares* grave e moderado).

Discussão 97

Com relação ao genótipo, não foi evidenciado associação com aspectos clínicos e histológicos dos pacientes. Outros polimorfismos genéticos, tais como de outras quimiocinas, receptores de quimiocinas, Fc, receptores de complementos podem estar associados com a predisposição da NL e podem por sua vez determinar o risco relativo de um paciente com diagnóstico já estabelecido de LES desenvolver a doença renal. A monitorização dos níveis urinários do MCP-1 pode ser uma abordagem útil e não-invasiva para a detecção precoce da NL e para a monitorização da atvidade da NL e da resposta terapêutica.



Conclusões 99

➤ Em relação ao polimormismo do MCP-1 observamos um aumento significativo da frequência do genótipo GG nos pacientes portadores de nefrite lúpica quando comparado com o grupo controle (p<0,05). Assim como maior freqüência do alelo A no grupo controle quando comparada aos pacientes com nefrite lúpica (p<0,05).</p>

- Quanto ao polimorfismo do CCR2 não foi observada nenhuma diferença na frequência dos genótipos entre os dois grupos porém, o alelo V esteve associado ao grupo controle quando comparado com os pacientes com nefrite lúpica (p<0,05).</p>
- Não houve associação dos genótipos do MCP-1, CCR2 e seus respectivos alelos com pacientes portadores de nefrite lúpica em relação à classe histológica, presença de insuficiência renal, marcadores imunológicos, manifestações clínicas (SLEDAI), proteinúria inicial e final e doses acumuladas de imunossupressores utilizados.
- ➤ Em relação ao escore renal (SLEDAI) não se observou nenhuma associação com os genótipos do MCP-1 e do CCR2, porém houve associação do alelo V nos pacientes com quadro de nefropatia leve (escore < 8) (p<0,05).

Conclusões 100

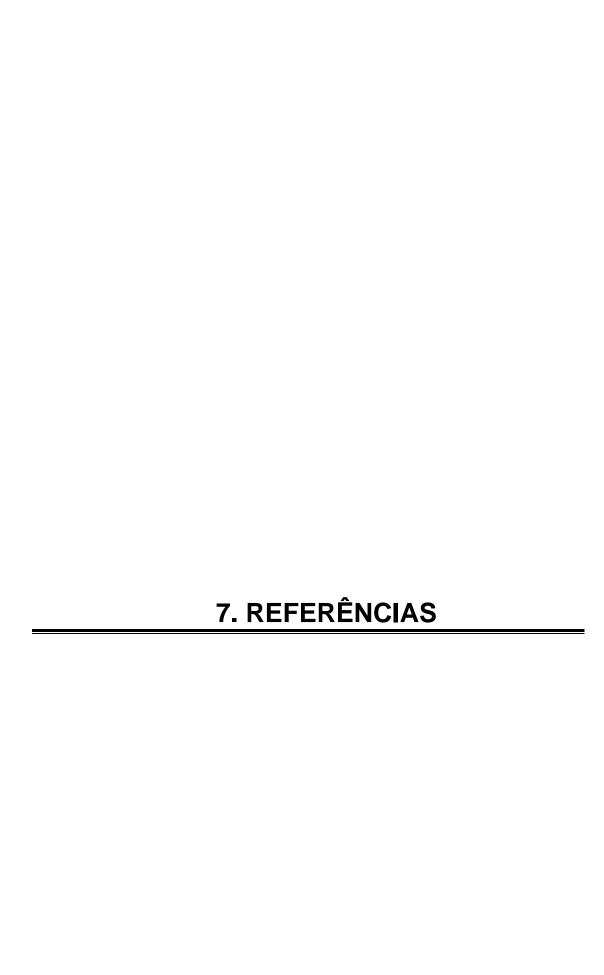
Não observamos associação entre etnia e distribuição dos genótipos MCP-1 e CCR2. Quanto aos alelos constatamos o dobro da freqüência do alelo A em relação ao G em ambos os grupos étnicos, assim como do alelo V em relação ao I.

- Não houve diferença estatística entre as curvas de sobrevida renal funcional dos pacientes portadores de nefrite lúpica em relação aos genótipos e respectivos alelos do MCP-1 e CCR2.
- Os valores da excreção urinária do MCP-1 foram significantemente maiores no início do protocolo, momento da abertura da nefrite, quando comparados com os valores de MCP-1 urinário após 3 e 6 meses de tratamento, portanto, o uMCP-1 diminuiu ao longo do seguimento com o tratamento (p < 0,05).</p>
- Quando agrupamos os pacientes quanto aos níveis de creatinina no início do protocolo em mais e menos graves, observamos níveis mais elevados de uMCP-1 no grupo com função renal mais comprometida (p<0,05). Constatamos também uma correlação positiva entre a creatinina sérica e o uMCP-1 no início do protocolo, ou seja, quanto maior o valor da creatinina maior a excreção do MCP-1 urinário (p<0,05; r=0,51).</p>

Conclusões 101

Não houve associação do uMCP-1 com a classe histológica, proteinúria ínicial ou após 6 meses de tratamento, manifestações clínicas (SLEDAI e SLEDAI renal) e marcadores imunológicos, exceto com o anticorpo antifosfolípide. O grupo com anticorpo antifosfolípide positivo no início do protocolo mostrou níveis mais elevados da excreção do uMCP-1 (p<0,05).</p>

- Evidencianos um aumento significante do uMCP-1 nos flares grave e moderado em relação ao flare leve (p<0,05).</p>
- Observamos um aumento significante do uMCP-1 nos pacientes portadores dos genótipos AG e AA quando comparado aos genótipos GG no início da atividade renal (p<0,05). Em relação à distribuição genotípica e alélica do CCR2 não se notou nenhuma diferença na freqüência dos mesmos e a dosagem de uMCP-1 na abertura do quadro renal.</p>
- Observamos uma freqüência maior de flares moderado e grave nos pacientes portadores dos genótipos AA e AG em relação ao genótipo GG (p< 0,05).</p>



1. Appel GB, Radhakrishnan J, D'Agati VD. Secondary Gomerular Disease. In: Barry M. Brenner. Brenner & Rector's the Kidney. 7 th edição. Philadelphia-USA: Saunders; 2004. p. 1382-1397.

- 2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF. Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25:1271-7.
- 3. Hopkinson N. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1992; 51:1292-4.
- Boumpas DT, Austin HA, Fessler BJ, Balow JE, Lockshin MD Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Ann Intern Med. 1995; 122:440-52.
- 5. Davidson A, Aranow C. Pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2006; 18:468-75.
- 6. Ponticelli C, Moroni G. Renal biopsy in lupus nephritis what for, when and how often? *Nephrol Dial Transplant*. 1998; 13:2452-4.
- Churg GJ, Bernstein J, Glassock RJ. Renal disease: classification and atlas of glomerular diseases. 2nd ed. New York. Igaku-Shoin; 1995, 151-180.
- 8. 9. Cameron JS. Lupus nephritis. J Am Soc Nephrol. 1999; 10:413-24.
- 10. Berden JH. Lupus nephritis. *Kidney Int.* 1997; 52:538:58.
- 11. Appel GB, Valeri A. The course and treatment of lupus nephritis. *Annu Rev Med.* 1994; 45:525-37.
- 12. Van Goor H, Ding G, Kees-Folts D, Grond J, Schreiner GF, Diamond JR. Biology of disease: macrophages and renal disease. *Am J Kidney Dis*. 1995; 26:541-8.
- 13. Boyce NW, Tipping PG, Holdsworth SR. Glomerular macrophages produce reactive oxygen species in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest.* 1989; 35:778-82.
- 14. Diamond JR, Pesek I. Glomerular tumor necrosis factor and interleukin 1 during acute aminonucleoside nephrosis: an immunohistochenical study. *Lab Invest.* 1991; 64:21-8.

15. Kohan DE. Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. *J Lab Clin Med.* 1992; 119:477-84.

- 16. Coleman DL, Ruef C. Interlrukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int.* 1992; 41:604-6.
- 17. Ikeda M, Ikeda U, Ohara T, Kusano E, Kano, S. Recombinant interleukin-6 inhibit the growth of rat mesangial cells in culture. *Am J Pathol.* 1992; 141:327-34.
- 18. Rovin BH, Phan LT. Chemoatactic factors and renal inflammation. *Am J Kidney Dis.* 1998; 31:1065-84.
- 19. Rovin BH. Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000; 13:225-32.
- 20. Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:827-72.
- 21. Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/ chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2006; 150:191-204.
- 22. Rollins BJ, Yoshimura T, Leonard EJ, Pober JS. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol.* 1990; 136:1229-33.
- 23. Luster AD. Chemokines chemotactic cytokines that mediate inflamation. *N Engl J Med.* 1998; 338:436-45.
- 24. Schmouder RL, Strieter RM, Kunkel S. Interferon-γ regulation of human cortical epithelial cell-derived monocyte chemotactic peptide-1. *Kidney Int*. 1993; 44:43-9.
- 25. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemoctatic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by il-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1990; 144:3034-38.
- 26 Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernádez-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental imune complex nephritis trough nuclear factor-κb activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol*. 1998; 161:430-9.
- 27 Rovin BH, Tan LC. LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractant expression. *Kidney Int.* 1993; 43:218-25.

28 Hora K, Satriano JA, Santiago A, Mori T, Stanley ER, Shan Z, Schlondorff D. Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:745-9.

- 29 Jocks T, Zahner G, Freudenberg J, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK. Prostaglandin E1 reduces the glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti- thymocyte antibody-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7:897-905.
- 30. Orth SR, Viedt C, Dechend R, Fei J, Hansch GM, Kreuzer J. MCP-1 induces inflammatory activation of human tubular epithelial cells: involvement of the transcription factors, nuclear factor κB and activating protein 1. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:1534-47.
- 31. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM. Prognostic factors in lupus nehritis: contribution of renal histologic data. *Am J Med.* 1983; 75:382-91.
- 32. Alexopoulus E, Seron D, Hartley RB, Cameron S. Lupus nephritis: correlation of intersticial cells with glomerular function. *Kidney Int.* 1990; 37:100-9.
- Zoja C, Liu XH, Donadelli R, Abbate M, Testa D, Corna D, Taraboletti G, Vecchi A, Dong QG, Rollins BJ, Bertani T, Remuzzi G. Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *J Am* Soc Nephrol. 1997; 8:720-9.
- 34. Lema GP, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D. chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:1369-82.
- 35. Anders HJ, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Sereger S, Luckow B, Weller L, Gröne HJ, Schlöndorff D. Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:919-31.
- 36. Tesh 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; 190:1813-24.
- 37. Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki J, Yoshie O, Nose M, Fujita S. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:2555-66.

38. Shimizu S, Nakashima H, Masutani K, Inoue Y, Miyake K, Akahoshi M, Tanaka Y, Egashira K, Hirakata H, Otsuka T, Harada M. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephrtis in MRL/lpr mice. *Rheumatology* 2004; 43:1121-8.

- 39. Lema GP, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla S, Sereger S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlöndorff D, Luckow B. Chemokine receptor CCR2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupusprone mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:3592-601.
- 40. Wada T, Yokoyama H, Su SB, Mukaida N, Iwano M, Dohi K, Takahashi Y, Sasaki T, Furuichi K, Segawa C, Hisada Y, Ohta S, Takasawa K, Kobayashi KI, Matsushima K. Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int.* 1996; 49:761-7.
- 41. Noris M, Bernasconi S, Casiraghi F, Sozzani S, Gotti E, Remuzzi G, Mantovani A. Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab Invest.* 1995; 73:804-9.
- 42. Li Y, Tucci M, Narain S, Barnes EV, Sobel ES, Segal MS, Richards HB. Urinary biomarkers in lupus nephritis. *Autoimmun Rev.* 2006; 5:383-8.
- 43. Chan RWY, Lai FMM, Li EKM, Tam LS, Chow KM, Li PKT, Szeto CC. The effect of immunosuppressive therapy on the messenger RNA expression of target genes in the urinary sediment of patients with active lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006; 21:1534-40.
- 44. Rovin BH, Song H, Birmingham DJ, Hebert LA, Yu CY, Nagaraja HN. Urine chemokines as biomarkers of human systemic Lupus Erythematosus. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:467-73.
- 45. Kim HL, Lee DS, Yang SH, Lim CS, Chung JH, Kim S, Lee JS, Kim YS. The polymorphism of monocyte chemoattractant protein-1 is associated with the renal disease of SLE. *Am J Kidney Dis.* 2002; 40:1146-52.
- 46. Chan RWY, Lai FMM, Li EKM, Tam LS, Wong TYH, Szeto CYK, Li PKT, Szeto CC. Expression of chemokine and fibrosing factor messenger rna in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2004; 50:2882-90.
- 47. Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphaël D, Ghillani P, Debre P, Piette JC, Gorochov G. Roles of CCR2 and CXCR3 in the cell-mediated response occurring during lupus flare. *Arthritis Rheum.* 2003; 48:3487-96.

48. Wada T, Yokoyama H, Furuichi K, Kobayashi K, Harada K, Naruto M, Su S, Akiyama M, Mukaida N, Matsushima K. Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor. *FASEB J.* 1996; 10:1418-25.

- 49. Wada T, Furuichi K, Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda S, Takasawa K, Kida H, Kobayashi K, Mukaida N, OhmotoY, Matsushima K, Yokoyama H. MIP-1α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1999; 56:995-1003.
- 50. Rovin BH, Rumanick M, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractana protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest.* 1994; 71:536-42.
- 51. Tam FWK, Sanders JS, George A, Hammad T, Miller C, Dougan T, Cook T, Kallenberg CGM, Gaskin G, Levy JB, Pusey CD. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 is a marker of active renal vasculitis. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:2761-8.
- 52. Gesualdo L, Grandaliano G, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Manno C, Schena FP. Monocyte recruitment in cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis: a pathogenic role for monocyte chemoatactic peptide-1. *Kidney Int.* 1997; 51:155-63.
- 53. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP. Monocyte chemoatactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenic role in intersticial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7:906-13.
- 54. Diamond JR, Kees-Folt D, Frye JE, Restrepo NC. Macrophages, Monocytes chemoattractant peptide-1 and tgfβ in experimental hidronephrosis. *Am J Physiol.* 1994; 266:F926-F933.
- 55. Wada T, Furuichi K, Sasaki N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15:940-8.
- 56. Schdde E, Kretzler M, Banas B, Luckow B, Assmann K, Schlondorff D. Expression of chemokines and their receptors in nephrotoxic serum nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15:1046-53.
- 57. 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; 69:73:80.

58. Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 360:772-7.

- 59. Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Stallone G, Schena FP. Monocyte chemotactic peptide –1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 1997; 63:414-20.
- Antoniades HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradins RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 mrna in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:5371-5.
- 61. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Johnson B, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Strieter RM. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1992; 90:772-9.
- 62. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest*. 1991; 88:1121-7.
- 63. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:894-7.
- 64. Peters W, Charo IF. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* 2003; 10:259-64.
- 65. Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia: differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res.* 1999; 40: 1053-63.
- 66. Han KH, Tangirala RK, Green SR, Quehenberger O. Chemokine receptor CCR2 espression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemostaxis in human monocytes: a regulatory role for plasma LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1983-91.
- 67. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Yoshida A, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Matsushima K, Sasayama S. Plasma levels of the monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein 1 are elevated in patients with acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:419-23.

68. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med.* 1997; 186:1757-62.

- 69. Traynor TR, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary Cryptococcus neoformans infection. *J Immunol.* 2000; 164:2021-7.
- Peters W, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, Ernst JD. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:7958-63.
- 71. Rovin BH, Lu L, Saxena R. A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 259:344-8.
- 72. Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, Richards HB. Strong association of a funcional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:1842-9.
- 73. Nunez-Roldán A, Gonzales-Escribano MF, Sánchez-Román J, Aguilar F. MCP-1 Promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2001; 58:335-8.
- 74. Nakashima H, Akahoshi M, Shimizu S, Inoue Y, Miyake K, Ninomiya I, Igawa T, Sadanaga A, Otsuka T, Harada M. Absence of association between the MCP-1 gene polymorphism and histological phenotype of lupus nephritis. *Lupus*. 2004;13:165-7.
- 75. Liao CH, Yao TC, Chung HT, See LC, Kuo ML, Huang JL. Polymorphisms in the promoter region of RANTES and the regulatory region of monocyte chemoattractant protein-1 among Chinese children with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2004; 8:2062-7.
- 76. Sanchez E, Sabio JM, Callejas JL, Ramon E, Gacia-Portales R, Garcia-Hernandes FJ, Jimenez-Alonso J, Gonzales-Escribano MF, Martin J, Koeleman BP. Association study of genetic variants of pro-inflamatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet*. 2006; 7:48.
- 77. Mori H, Kaneko Y, Narita I, Goto S, Saito N, Kondo D, Sato F, Ajiro J, Saga D, Ogawa A, Sakatsume M, Ueno M, Tabei K, Gejyo F. Monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G gene polymorphisms and renal survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Exp Nephrol.* 2005; 9:297-303.

78. Steinmetz, O.M.; Panzer, U.; Harendza, S.; Mertens, P.R.; Ostendorf, T.; Floege, J.; Helmchen, U.; Stahl, R.A.K. No association of the –2518 MCP-1 A/G promoter polymorphism with incidence and clinical course of IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:596-601.

- 79. Moon JY, Jeong L, Lee S, Jeong K, Lee T, Ihm CG, Suh J, Kim J, Jung YY, Chung JH. Association of polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 promoter with diabetic kidney failure in Korean patients with type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci.* 2007; 22:810-4.
- 80. Joo KW, Hwang YH, Kim JH, Oh KH, Kim H, Shin HD, Chung WK, Yang J, Park KS, Ahn C. MCP-1 and RANTES polymorphisms in Korean diabetic end-stage renal disease. *J Korean Med Sci.* 2007; 22:611-5.
- 81. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK. Association of TGF beta1, TNF alpha, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. *BMC Med Genet*. 2007; 12:8-20.
- 82. Kruger B, Schroppel B, Ashkan R, Marder B, Zulke C, Murphy B, Kramer BK, Fischereder M. A Monocyte Chemoattractant Protein 1(MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:2585 9.
- 83. Gonzales E, Rovin BH, Sen L, Cooke G, Dhanda R, Mummidi S, Kulkarni H, Bamshad MJ, Telles V, Anderson SA, Walter EA, Stephan KT, Deucher M, Mangano A, Bologna R, Ahuja SS, Dolan MJ, Ahuja SK. HIV 1 infection and AIDS dementia are influenced by a mutant MCP-1 allele linked to increase monocyte infiltration of tissues and MCP-1 levels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:13795-800.
- 84. Frade JMR, Lorente M, Mellado M, Alcamí J, Gutiérrez-Ramos JC, Zaballos A, Real G, Martínez CA. The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J Clin Invest.* 1997; 100:497-502.
- 85. Muhlbauer M, Bosserhoff AK, Hartmann A, Thasler WE, Weiss TS, Herfarth H, Lock G, Scholmerich J, Hellerbrand C. A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease. *Gastroenterology*. 2003; 125:1085-93.
- 86. Szalai C, Duba J, Prohászka Z, Kalina Á, Szabó T, Nagy B, Horváth L, Császár A. Involvement of polymorphisms in the chemokine system in the susceptibility for coronary artery disease (CAD): coincidence of elevated Lp(a) and MCP-1 -2518 G/G genptype in CAD patients. *Atherosclerosis* 2001; 158:233-9.

87. Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszkó A, Krikovszky D, Szabó T, Falus A. olymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2001, 108:375-81.

- 88. McDermott DH, Yang Q, Kathiresan S, Cupples LA, Massaro JM, Keaney JF Jr, Larson MG, Vasan RS, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ, Murphy PM, Benjamin EJ. CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant Protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2005; 112:1113-20.
- 89. Flex A, Gaetani E, Papalo P, Straface G, Proia AS, Pecorini G. Proinflammatory genetic profiles in subjects with history of ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:2270-5.
- 90. Simeoni E, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Fleury S, Ruiz J, Kappenberger L. Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur Heart J.* 2001; 158:233-9.
- 91. Bjarnadottir K, Eiriksdottir G, Aspelund T, Gudnason V. Examination of genetic effects of polymorphisms in the MCP-1 and CCR2 genes on MI in the Icelandic population. *Atherosclerosis* 2006; 188:341-6.
- 92. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. *Science* 1997; 277:959-65.
- 93. Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T. A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. *AIDS* 2004; 18:729-38.
- 94. Lee B, Doranz BJ, Rana S, Yi Y, Mellado M, Frade JM. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol.* 1998; 72:7450-8.
- 95. Munerato P, Azevedo ML, Sucupira MCA, Pardini R, Novaes Pinto GH, Catroxo M, Souza IE, Diaz RS. Frequency of polymorphisms of genes coding for HIV-1 co-receptors CCR5 and CCR2 in a Brazilian population. *Braz J Infect Dis.* 2003, 7:236-40.
- González P, Alvarez R, Batalla A, Reguero JR, Alvarez V, Astudillo A, Cubero GI, Cortina A, Coto E. Genetic variation at the chemokine receptors CCR5/CCR2 in myocardial infection. *Genes Immun*. 2001; 2:191-5.

97. Aguilar F, Nunez-Roldán A, Torres B, Wichmann I, Sánchez-Román J, Gonzales-Escribano MF. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2003; 30:1770-4.

- 98. Chen YE, Korbet SM, Katz RS, Schwartz MM, Lewis EJ, Value of a complete or partial remission in severe lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:46-53.
- 99. Steinberg AD, Kaltreider HB, Staples PJ, Goetzl EJ, Talal N, Decker JL. Cyclophosphamide in lupus nephritis: a controled trial. *Ann Inter Med*. 1971; 75:165-171.
- 100. Bombardier C, Gladmann DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI: a Disease Activity Index for Lupus Patients. *Arthritis Rheum.* 1992; 35:630-40.
- 101. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Miller et al. Nucleic Acids Res.1988; 16:1215.
- 102. Hong SB, Jin SY, Park HJ, Jung JH, Sim WY. Analysis of the monocyte chemoattractant protein 1 -2518 promoter polymorphism in Korean patients with alopecia areata. *J Korean Med Sci.* 2006, 21:90-4.
- 103. Nakajima K, Tanaka Y, Nomiyama T, Ogihara T, Piao L, Sakai K, Onuma T, Kawamori R. Chemokine Receptor Genotype is associated with diabetic nephropathy in Japanese with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51:238-42.
- 104. Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, Jinushi E, Ito A, Kawakami Y. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:2021-3.
- 105. P. Armitage & G. Berry. Statistical methods in epidemiology. In: Statistical Methods in Medical Research. 3 th edição Oxford-England: Blackwell Science Ltda.; 1994. p. 507-534.
- 106. Lima G, Soto-Vega E, Atisha-Fregoso Y, Sánchez-Guerrero J, Vallejo M, Vargas-Alarcón G, Llorente L. MCP-1, RANTES, and SDF-1 polymorphism in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2007;68:980-5.
- 107. Ye DQ, Hu YS, Li XP, Yang SG, Hao JH et al. The correlation between monocyte chemoattractant protein-1 and the arthritis of systemic lupus erythematosus among Chinese. *Arch Dermatol Res* 2005; 296:366-371.

108. Donadio JV, Glassock RJ. Immunossupressive drug therapy in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis.* 1993;21:239-49.

- 109. Brown KS, Nackos E, Morthala S, Jensen LE, Whitehead AS, Feldt JMV. Monocyte chemmoattractant protein 1: plasma concentrations and A(-2518)G promoter polymorphism of its gene in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007;34:740-6.
- 110. Hwang SY, Cho ML, Park B, Kim YH, Min DJ. Allelic frequency of the MCP-1 promoter -2518 polymorphism in the Korean population and in Korean patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and adult-onset Still's disease. *Eur J Immunogenet*. 2002;29:413-6.
- 111. Jibiki T, Terai M, Shima M, Ogawa A, Hamada H, Kanazawa M, Yamamoto S, Oana S, Kohno Y. Monocyte chemmoattractant protein 1 gene regulatory region polymorphism and serum levels of Monocyte chemmoattractant protein 1 in Japanese patients with Kawasaki disease. *Arthritis and Rheum.* 2001;44:2212.
- 112. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:177-82.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>inis</u>	tra	ção

Baixar livros de Agronomia

Baixar livros de Arquitetura

Baixar livros de Artes

Baixar livros de Astronomia

Baixar livros de Biologia Geral

Baixar livros de Ciência da Computação

Baixar livros de Ciência da Informação

Baixar livros de Ciência Política

Baixar livros de Ciências da Saúde

Baixar livros de Comunicação

Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE

Baixar livros de Defesa civil

Baixar livros de Direito

Baixar livros de Direitos humanos

Baixar livros de Economia

Baixar livros de Economia Doméstica

Baixar livros de Educação

Baixar livros de Educação - Trânsito

Baixar livros de Educação Física

Baixar livros de Engenharia Aeroespacial

Baixar livros de Farmácia

Baixar livros de Filosofia

Baixar livros de Física

Baixar livros de Geociências

Baixar livros de Geografia

Baixar livros de História

Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura

Baixar livros de Literatura de Cordel

Baixar livros de Literatura Infantil

Baixar livros de Matemática

Baixar livros de Medicina

Baixar livros de Medicina Veterinária

Baixar livros de Meio Ambiente

Baixar livros de Meteorologia

Baixar Monografias e TCC

Baixar livros Multidisciplinar

Baixar livros de Música

Baixar livros de Psicologia

Baixar livros de Química

Baixar livros de Saúde Coletiva

Baixar livros de Serviço Social

Baixar livros de Sociologia

Baixar livros de Teologia

Baixar livros de Trabalho

Baixar livros de Turismo