

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

MANUELLE MARIA PEREIRA NATIVIDADE

**DESEMPENHO DE NOVOS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E
CLASSIFICAÇÃO DA NEFROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Belo Horizonte - MG
2015

MANUELLE MARIA PEREIRA NATIVIDADE

**DESEMPENHO DE NOVOS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E
CLASSIFICAÇÃO DA NEFROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Pimenta Barroso Magalhães - UFMG

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges - UFMG

Belo Horizonte - MG
2015

N278d Natividade, Manuelle Maria Pereira
Desempenho de novos biomarcadores no diagnóstico e classificação da nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 / Manuelle Maria Pereira Natividade. – 2015.
138 f. il.

Orientador: Henrique Pimenta Barroso Magalhães.
Coorientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Nefropatias diabéticas – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Diabetes – Teses. 4. Rins – Doenças – Teses. I. Magalhães, Henrique Pimenta Barroso. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.462



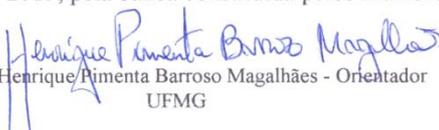
FOLHA DE APROVAÇÃO

DESEMPENHO DE NOVOS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DA NEFROPATIA DIABÉTICA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1.

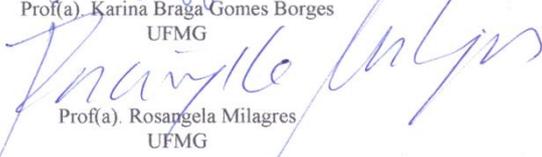
MANUELLE MARIA PEREIRA NATIVIDADE

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 03 de agosto de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Henrique Pimenta Barroso Magalhães - Orientador
UFMG


Prof(a). Karina Braga Gomes Borges
UFMG


Prof(a). Rosângela Milagres
UFMG


Prof(a). Luci Maria Sant Ana Dusse
UFMG

Belo Horizonte, 3 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio de toda ciência e sabedoria, por todas as bênçãos e graças concedidas.

Aos meus pais, Geraldo e Conceição, pelas orações, renúncias, incentivo, compreensão, inspiração e todo cuidado a mim dispensado.

À minha irmã Mariana e à Nathália, pelas orações e convivência, pelos exemplos de dedicação e por abrirem portas.

Ao Professor Henrique Pimenta Barroso Magalhães, pela oportunidade e confiança em mim depositada.

À Professora Karina Braga Gomes Borges, por sua presteza e valiosa contribuição.

Às Professoras Caroline Pereira Domingueti e Ana Paula Salles Moura Fernandes, que pelo gesto de compartilhar possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Professor João Paulo Amaral Haddad pela solicitude e grande auxílio.

À Labtest Diagnóstica SA, de maneira especial à Lara Carvalho Godoi, pela disponibilidade e parceria conosco firmada.

Aos pacientes do Hospital das Clínicas da UFMG e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, pela doação voluntária das amostras biológicas.

E à agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A nefropatia diabética é uma complicação crônica do diabetes mellitus que acomete aproximadamente 35% dos diabéticos tipo 1 e constitui a principal causa de doença renal crônica na maioria dos países. Além disso, está associada à alta morbidade e mortalidade, bem como a gastos médicos consideráveis. Diante disso, o diagnóstico precoce e seguro desta complicação, assim como o seu monitoramento adequado são essenciais para garantir a instituição de medidas protetivas e terapêuticas que possibilitem prevenir e retardar a sua progressão. No entanto, os testes tradicionalmente empregados no diagnóstico e monitoramento da nefropatia diabética – excreção urinária de albumina e taxa de filtração glomerular – apresentam limitações importantes. Neste contexto, tornam-se necessárias a pesquisa e avaliação do desempenho de novos biomarcadores. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de alguns biomarcadores emergentes no diagnóstico da nefropatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. Para tanto, a cistatina C, a fosfatase alcalina e a gama-glutamyltransferase foram determinadas no plasma e na urina de pacientes diabéticos tipo 1 com e sem nefropatia. Os novos biomarcadores não apresentaram diferenças significativas quanto ao sexo, índice de massa corporal e tabagismo. Além disso, apresentaram correlação entre si, com os marcadores clássicos de função renal (ureia e creatinina) e com os parâmetros empregados no diagnóstico da nefropatia diabética. Os biomarcadores avaliados foram capazes de diferenciar indivíduos saudáveis de diabéticos, diabéticos sem nefropatia de diabéticos com nefropatia e os estágios da albuminúria. Dentre os novos biomarcadores merece destaque a cistatina C, pois além de acompanhar melhor a progressão da albuminúria, ela apresentou o melhor desempenho, abaixo da razão urinária albumina/creatinina, no diagnóstico da nefropatia diabética. Os novos biomarcadores, portanto, sobretudo a sua determinação plasmática e, em especial a cistatina C, podem ser úteis na avaliação e no monitoramento da função renal, bem como no diagnóstico da nefropatia em pacientes com diabetes mellitus tipo 1.

Palavras-chave: nefropatia diabética, cistatina C, fosfatase alcalina, gama-glutamyltransferase.

ABSTRACT

Diabetic nephropathy is a chronic complication of diabetes mellitus that affects approximately 35% of type 1 diabetics and is the leading cause of chronic kidney disease in the most countries. Moreover, it is associated with high morbidity and mortality, as well as considerable medical expenses. Therefore, early and accurate diagnosis of this complication, as well as its adequate monitoring is essential to ensure the establishment of protective and therapeutic measures that allow prevent and slow its progression. However, tests traditionally employed in the diagnosis and monitoring of diabetic nephropathy – urinary albumin excretion and glomerular filtration rate – have significant limitations. In this context, it becomes necessary to search and evaluation of the performance of new biomarkers. From this perspective, the objective of this study was evaluate the performance of some emerging biomarkers in the diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. Then, cystatin C, alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase were determined in plasma and urine of patients with type 1 diabetes mellitus with and without diabetic nephropathy. The new biomarkers showed no significant differences regarding gender, body mass index and smoking. Furthermore, they correlated with each other, with classic markers of renal function (urea and creatinine) and the parameters used in the diagnosis of diabetic nephropathy. The evaluated biomarkers were able to differentiate healthy individuals from diabetics, diabetics without nephropathy from diabetics with nephropathy and the stages of albuminuria. Among the new biomarkers stands out cystatin C, as well as better monitor the progression of albuminuria, I had the best performance, below the urinary albumin/creatinine ratio, in the diagnosis of diabetic nephropathy. The new biomarkers thus, especially its plasma determination, in particular cystatin C, may be useful in the assessment and monitoring of the renal function and in the diagnosis of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus.

Keywords: diabetic nephropathy, cystatin C, alkaline phosphatase, gamma-glutamyltransferase.

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|-----------|
| Quadro 1 – Classificação etiológica do diabetes mellitus | 18 |
| Quadro 2 – Categorias da excreção urinária de albumina | 24 |
| Quadro 3 – Estratégias de tratamento da nefropatia diabética | 31 |
| Quadro 4 – Pontos de corte para o diagnóstico da nefropatia diabética | 35 |
| Quadro 5 – Estadiamento da DRC de acordo com a TFG e a EUA | 38 |
| Quadro 6 – Equações empregadas para a estimativa da TFG | 56 |
| Quadro 7 – Interpretação da área sob a curva (AUC) | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 – Diagnóstico de base dos pacientes brasileiros em diálise, 2011 a 2013 | 23 |
| Figura 2 – Alterações patológicas da nefropatia diabética | 26 |
| Figura 3 – Fluxograma para o diagnóstico da ND | 33 |
| Figura 4 – Classificação da população de estudo | 53 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1 – Dados clínicos e laboratoriais dos grupos controle e caso | 60 |
| Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND | 62 |
| Tabela 3 – Dados clínicos e laboratoriais dos diabéticos conforme o grau de albuminúria | 67 |
| Tabela 4 – Variação dos biomarcadores plasmáticos nos diabéticos conforme as características clínicas | 72 |
| Tabela 5 – Variação dos biomarcadores urinários nos diabéticos conforme as características clínicas | 75 |
| Tabela 6 – Variação das razões plasma/urina nos diabéticos conforme as características clínicas | 78 |
| Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG | 81 |
| Tabela 8 – Coeficientes de correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG | 84 |
| Tabela 09 – Coeficientes de correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG | 85 |
| Tabela 10 – Coeficientes de correlação entre diferentes equações da TFG | 86 |
| Tabela 11 – Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 87 |
| Tabela 12 – Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 91 |
| Tabela 13 – Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 95 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – FAL plasmática no grupo controle e no grupo caso | 59 |
| Gráfico 2 – GGT plasmática nos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND | 65 |
| Gráfico 3 – Cistatina C plasmática conforme o grau de albuminúria | 70 |
| Gráfico 4 – Cistatina C plasmática nos pacientes hipertensos e não hipertensos | 74 |
| Gráfico 5 – RFC nos pacientes hipertensos e não hipertensos | 77 |
| Gráfico 6 – Correlação entre a cistatina C e a creatinina plasmática | 82 |
| Gráfico 7 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 88 |
| Gráfico 8 – Desempenho dos biomarcadores urinários no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 89 |
| Gráfico 9 – Desempenho das razões plasma/urina no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 90 |
| Gráfico 10 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 92 |
| Gráfico 11 – Desempenho dos biomarcadores urinários na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 93 |
| Gráfico 12 – Desempenho das razões plasma/urina na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 94 |
| Gráfico 13 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 96 |
| Gráfico 14 – Desempenho dos biomarcadores urinários na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 97 |
| Gráfico 15 – Desempenho das razões plasma/urina na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------|---|
| ADA | American Diabetes Association |
| AGEs | Produtos finais de glicação avançada |
| Anti-GAD65 | Anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico |
| AUC | Área sob a curva |
| BRA | Bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II |
| CKD-EPI | Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration |
| DCCT | Diabetes Control and Complications Trial |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM1 | Diabetes mellitus tipo 1 |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DRC | Doença renal crônica |
| DRC-NA | Doença renal crônica não-albuminúrica |
| EUA | Excreção urinária de albumina |
| FAL | Fosfatase alcalina |
| GGT | Gama-glutamyltransferase |
| GST | α -glutathione S-transferase |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| IDF | International Diabetes Federation |
| IECA | Inibidores da enzima conversora de angiotensina |
| IL | Interleucinas |
| IMC | Índice de massa corporal |
| IRC | Insuficiência renal crônica |
| KDa | Quilodáltons |
| KDIGO | Kidney Disease: Improving Global Outcomes |
| KDOQI | Kidney Disease Outcomes Quality Initiative |
| L-FABP | Proteína ligadora de ácidos graxos tipo hepático |
| MDRD | Modification of Diet in Renal Disease |
| MEC | Matriz extracelular |
| miRNAs | MicroRNAs |
| NADP | Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato |
| NAG | N-acetil-glicosaminidase |
| ND | Nefropatia diabética |

| | |
|---------------|---|
| NGAL | Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| NIST | National Institute of Standards and Technology |
| NKF | National Kidney Foundation |
| PKC | Proteína quinase C |
| RAC | Razão albumina/creatinina |
| RCC | Razão cistatina C/creatinina |
| RFC | Razão fosfatase alcalina/creatinina |
| RGC | Razão gama-glutamyltransferase/creatinina |
| ROC | Receiver Operating Characteristics |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RUC | Razão ureia/creatinina |
| SBD | Sociedade Brasileira de Diabetes |
| SBN | Sociedade Brasileira de Nefrologia |
| SRAA | Sistema renina-angiotensina-aldosterona |
| TFG | Taxa de filtração glomerular |
| TFGe | Taxa de filtração glomerular estimada |
| TGF- β | Fator de transformação do crescimento beta |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral alfa |
| USRDS | United States Renal Data System |
| VEGF | Fator de crescimento vascular endotelial |
| WHO | World Health Organization |
| ZnT8 | Anticorpos anti-transportador de zinco |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 17 |
| 2.1 Diabetes mellitus (DM) | 17 |
| 2.1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) | 18 |
| 2.1.2 Complicações do DM | 20 |
| 2.2 Nefropatia diabética | 21 |
| 2.2.1 Definição | 21 |
| 2.2.2 Epidemiologia | 21 |
| 2.2.3 Classificação | 23 |
| 2.2.4 Patogênese | 25 |
| 2.2.4.1 Alterações hemodinâmicas | 26 |
| 2.2.4.2 Alterações metabólicas | 28 |
| 2.2.4.3 Processo inflamatório | 29 |
| 2.2.4.4 Fatores genéticos e epigenéticos | 30 |
| 2.2.5 Tratamento e prevenção | 31 |
| 2.2.6 Diagnóstico | 32 |
| 2.2.6.1 Albuminúria | 34 |
| 2.2.6.2 Taxa de filtração glomerular (TFG) | 37 |
| 2.3 Novos biomarcadores da ND | 41 |
| 2.3.1 Cistatina C | 43 |
| 2.3.2 Enzimas urinárias | 47 |
| 2.3.2.1 Fosfatase alcalina (FAL) | 47 |
| 2.3.2.2 Gama-glutamilttransferase (GGT) | 48 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 50 |
| 4 OBJETIVOS | 51 |
| 4.1 Objetivo geral | 51 |
| 4.2 Objetivos específicos | 51 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 52 |
| 5.1 Normas éticas | 52 |
| 5.2 População de estudo | 52 |
| 5.2.1 Critérios de inclusão do grupo caso | 53 |
| 5.2.2 Critérios de exclusão do grupo caso | 53 |

| | |
|---|----|
| 5.2.3 Classificação dos participantes | 54 |
| 5.3 Coleta e registro dos dados clínicos | 54 |
| 5.4 Coleta, preparo e armazenamento das amostras biológicas | 54 |
| 5.5 Dosagens bioquímicas | 55 |
| 5.6 Cálculo das razões e estimativa da TFG | 55 |
| 5.7 Análise estatística | 57 |
| 6 RESULTADOS | 59 |
| 6.1 Perfis clínico e laboratorial da população de estudo | 59 |
| 6.1.1 Perfil clínico-laboratorial dos grupos controle e caso | 59 |
| 6.1.2 Perfil clínico-laboratorial dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND | 61 |
| 6.1.3 Perfil clínico-laboratorial dos diabéticos conforme o grau de albuminúria.. | 66 |
| 6.2 Variações dos biomarcadores plasmáticos, urinários e das razões plasma/urina nos diabéticos conforme as características clínicas | 71 |
| 6.2.1 Variação dos biomarcadores plasmáticos | 71 |
| 6.2.2 Variação dos biomarcadores urinários | 74 |
| 6.2.3 Variação das razões plasma/urina | 77 |
| 6.3 Correlações entre os biomarcadores plasmáticos, urinários, razões plasma/urina e TFG estimada por diferentes equações | 80 |
| 6.3.1 Correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG | 80 |
| 6.3.2 Correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG | 83 |
| 6.3.3 Correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG | 84 |
| 6.3.4 Correlação entre diferentes equações da TFG | 86 |
| 6.4 Desempenho diagnóstico dos biomarcadores | 86 |
| 6.4.1 Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 86 |
| 6.4.2 Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 90 |
| 6.4.3 Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 94 |
| 7 DISCUSSÃO | 99 |

| | |
|--|-----|
| 7.1 Perfis clínico e laboratorial da população de estudo | 99 |
| 7.1.1 Perfil clínico-laboratorial dos grupos controle e caso | 99 |
| 7.1.2 Perfil clínico-laboratorial dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND | 101 |
| 7.1.3 Perfil clínico-laboratorial dos diabéticos conforme o grau de albuminúria | 105 |
| 7.2 Variações dos biomarcadores plasmáticos e urinários nos diabéticos conforme as características clínicas | 107 |
| 7.3 Correlações entre os biomarcadores plasmáticos, urinários, razões plasma/urina e TFG estimada por diferentes equações | 112 |
| 7.3.1 Correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG | 112 |
| 7.3.2 Correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG | 113 |
| 7.3.3 Correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG | 114 |
| 7.3.4 Correlação entre diferentes equações da TFG | 114 |
| 7.4 Desempenho diagnóstico dos biomarcadores | 115 |
| 7.4.1 Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1 | 115 |
| 7.4.2 Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 117 |
| 7.4.3 Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1 | 119 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 121 |
| 9 CONCLUSÃO | 124 |
| 10 PERSPECTIVAS DE ESTUDO | 125 |
| REFERÊNCIAS | 126 |
| ANEXO A | 134 |
| ANEXO B | 135 |
| ANEXO C | 136 |
| ANEXO D | 137 |

1 INTRODUÇÃO

O termo diabetes mellitus (DM) designa um grupo de doenças metabólicas de etiologia variada, caracterizadas por um quadro de hiperglicemia crônica, além de distúrbios no metabolismo de lipídeos e proteínas. Sua atual classificação inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional, sendo o DM1 e o DM2 os tipos de maior prevalência (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA), 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD), 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1999).

Os dados epidemiológicos mundiais sobre o DM revelam que uma epidemia está em curso, o que se torna preocupante pela elevada morbimortalidade e pelo impacto socioeconômico do diabetes e suas complicações. Frequentemente, o paciente diabético cursa com complicações crônicas, as quais representam uma das principais causas de incapacidade, redução da qualidade de vida e morte precoce na maioria dos países (ADA, 2015; BRASIL, 2013; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF), 2013).

Dentre as complicações crônicas do DM destaca-se a nefropatia diabética (ND), tanto pela sua prevalência quanto pelos índices de morbidade, mortalidade e gastos médicos associados ao seu tratamento. A ND acomete cerca de um terço dos pacientes com DM2 e 35% dos pacientes com DM1 e representa a principal causa de doença renal crônica (DRC) em muito países, bem como do estágio avançado dessa enfermidade, a insuficiência renal crônica (IRC) (ADA, 2015; FARMER *et al.*, 2014; NATIONAL KIDNEY FOUNDATION (NKF), 2012; SBD, 2015).

A ND, atualmente, é caracterizada pelo aumento da excreção urinária de albumina (EUA) acompanhada pelo declínio progressivo da função renal. Assim, o seu rastreamento, diagnóstico e monitoramento baseiam-se na determinação da EUA e na estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG), que é considerada o melhor índice global da função renal (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; NKF, 2007; SBD, 2015).

Diante do impacto da ND na saúde pública, tanto em termos sociais quanto econômicos, torna-se imperativo o diagnóstico precoce e seguro dessa doença, assim como o seu monitoramento adequado, a fim de garantir a instituição de medidas protetivas e terapêuticas que possibilitem prevenir e retardar a sua

progressão. No entanto, os testes tradicionalmente empregados no diagnóstico e acompanhamento da ND, isto é, a EUA e a TFG, apresentam limitações importantes que acabam por comprometer seus desempenhos em termos de sensibilidade, especificidade e valor prognóstico. Sendo assim, tornam-se necessárias a pesquisa e avaliação do desempenho de novos biomarcadores para a ND, que sejam capazes de superar as limitações inerentes aos marcadores tradicionais ou que possam, no mínimo, complementá-los (LEE; CHOI, 2014; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014; MORESCO *et al.*, 2013).

Nessa perspectiva, por meio de abordagens tecnológicas avançadas nas áreas da bioquímica, biologia molecular e proteômica, potenciais biomarcadores séricos e urinários têm sido identificados para o diagnóstico e monitoramento da ND, incluindo marcadores de lesão glomerular, tubular, de processo inflamatório e estresse oxidativo (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; KIM *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014). Desta forma, o presente estudo objetiva avaliar o desempenho de alguns novos biomarcadores plasmáticos e urinários – cistatina C, fosfatase alcalina (FAL) e gama-glutamilttransferase (GGT) – no diagnóstico e classificação da ND em pacientes com DM1.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Diabetes mellitus (DM)

O termo DM refere-se a um grupo de doenças metabólicas de múltipla etiologia, que se caracterizam por um quadro de hiperglicemia crônica, além de distúrbios no metabolismo de proteínas e lipídeos. A hiperglicemia crônica resulta de anormalidades na secreção e/ou na ação do hormônio pancreático insulina nos tecidos-alvo (ADA, 2015; WHO, 1999).

Os dados epidemiológicos revelam que uma epidemia de DM está em curso. Segundo a IDF, em 2014, com um total de 387 milhões de diabéticos, a prevalência mundial era de 8,3%, o que corresponde a 1 diabético em cada grupo de 12 pessoas. A estimativa é de que este número chegue à casa dos 592 milhões em 2035, o que representa um aumento de 53% no índice atual. Também em 2014, o Brasil ocupava o quarto lugar no *ranking* dos países com maior número de diabéticos (11,6 milhões), ficando atrás apenas da China (96,3 milhões), Índia (66,8 milhões) e dos Estados Unidos (25,8 milhões) (IDF, 2013, 2014; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

A atual classificação do DM, proposta pela WHO e pela ADA e recomendada pela SBD, baseia-se na etiologia da doença e inclui quatro classes clínicas: o DM1, o DM2, outros tipos específicos de DM e o DM gestacional, conforme descrito no **Quadro 1** (ADA, 2014; SBD, 2015).

Os sinais e sintomas característicos do DM incluem: poliúria, polidipsia, polifagia e perda inexplicada de peso. Há ainda maior susceptibilidade ao desenvolvimento de certas infecções e, nas crianças, o diabetes pode prejudicar o crescimento adequado (ADA, 2015; BRASIL, 2013).

Quanto ao diagnóstico do DM, atualmente são aceitos quatro critérios: hemoglobina glicada A1c $\geq 6,5\%$; glicose plasmática de jejum ≥ 126 mg/dL; glicose plasmática de 2 horas no teste de tolerância oral à glicose ≥ 200 mg/dL e glicemia aleatória ≥ 200 mg/dL na presença de sinais e sintomas clássicos de hiperglicemia (ADA, 2015).

Quadro 1 – Classificação etiológica do diabetes mellitus

I. Diabetes mellitus tipo 1: é responsável por 5% a 10% dos casos de diabetes e resulta da destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina. Pode ser de origem autoimune ou idiopática.

II. Diabetes mellitus tipo 2: responde por 90% a 95% dos casos e caracteriza-se por associar graus variados de redução na secreção de insulina com a resistência dos tecidos à ação desse hormônio.

III. Outros tipos específicos de diabetes: representa de 1% a 5% dos casos e está associado a causas variadas, como:

- Defeitos genéticos das células β ;
- Defeitos genéticos da ação da insulina;
- Doenças do pâncreas exócrino (pancreatite, neoplasia);
- Endocrinopatias (hipertireoidismo, síndrome de Cushing);
- Indução por drogas ou outras substâncias químicas (glicocorticoides, ácido nicotínico);
- Indução por infecções (citomegalovírus, rubéola congênita);
- Formas incomuns de diabetes imunomediado (síndrome de Stiff-man);
- Outras síndromes genéticas associadas ao diabetes (Klinefelter, Down).

IV. Diabetes mellitus gestacional: acomete de 1% a 14% das gestantes, sendo definido como qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início durante o período gestacional.

Fonte: Adaptado de ADA, 2014, p. S85.

2.1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

De forma geral, o DM1 apresenta-se de forma abrupta e acomete, principalmente, crianças e adolescentes sem sobrepeso, sendo o pico de incidência entre 5 e 7 anos e próximo à puberdade, mas pode ocorrer também em adultos. O traço clínico mais característico desse tipo de diabetes é a tendência à hiperglicemia grave e à cetoacidose (ADA, 2013; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; BRASIL, 2013).

O DM1 imunomediado decorre da destruição das células β por mecanismos autoimunes, e dentre os marcadores deste evento estão os auto-anticorpos anti-células das ilhotas, anti-insulina, anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD65), anti-tirosina fosfatases IA-2 e IA-2 β e anti-transportador de zinco (ZnT8). Estes auto-anticorpos podem estar presentes meses ou anos antes do

diagnóstico clínico e em até 90% dos pacientes quando se detecta a hiperglicemia (ADA, 2013; 2015; BRASIL, 2013; SBD, 2015).

O DM1 de etiologia desconhecida ou idiopático corresponde a uma minoria dos casos de diabetes e, geralmente, acomete indivíduos de ancestralidade asiática ou africana. Esse tipo de DM1 é hereditário e não apresenta evidências de autoimunidade contra as células β . Os pacientes acometidos apresentam graus variados de insulinopenia permanente e são propensos à cetoacidose (ADA, 2015).

O DM1 é uma enfermidade cuja patogênese, de caráter complexo e heterogêneo, ainda não foi completamente elucidada. O que se sabe, no entanto, é que a predisposição genética, fatores imunológicos e ambientais estão envolvidos na iniciação, desenvolvimento e progressão da doença (BURN, 2010; LI; SONG; QIN, 2014).

O DM1 é, claramente, uma desordem poligênica, com cerca de 40 locus até o momento conhecidos por influenciar a susceptibilidade à doença, sendo que a maioria desses locus está envolvida com respostas imunológicas. A maior parte da predisposição genética fica a cargo da região do antígeno leucocitário humano de classe II localizado no cromossomo 6, que confere de 40% a 50% do risco de desenvolver o DM1 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; NOKOFF; REWERS, 2013; RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O processo autoimune do DM1 se dá pela ativação imunológica anormal de linfócitos T antígeno-específicos em indivíduos geneticamente susceptíveis, que destroem seletivamente as células- β pancreáticas produtoras de insulina. Além dos linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$), outros tipos celulares do sistema imune também estão envolvidos na patogênese do DM1, como os linfócitos B, as células *natural killer* e os macrófagos. Esse conjunto de células produz um infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas denominado insulite, que se tornou uma marca do DM1. Além disso, também ocorre a produção de anticorpos contra múltiplos antígenos pancreáticos, anteriormente mencionados, como os anticorpos anti-GAD65, IA-2, IA-2 β , anti-ZnT8 e os anticorpos anti-células das ilhotas e anti-insulina (DIB; GOMES, 2009; LI; SONG; QIN, 2014; RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

Quanto aos fatores ambientais, têm sido propostos como contribuintes para o desenvolvimento do DM1: as infecções virais (particularmente as enterovirose e a rubéola congênita), as vacinas infantis, a microbiota intestinal, a obesidade e fatores relacionados à dieta, como o consumo de glúten e do leite de

vaca. Por outro lado, o aleitamento materno e a suplementação de vitamina E parecem conferir certo efeito protetor contra o DM1, embora os dados ainda sejam contraditórios (ATKINSON; CHERVONSKY, 2012; NOKOFF; REWERS, 2013; RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O tratamento do DM1 segue uma tríade composta por insulina-monitorização-educação em diabetes. A insulinoterapia deve ser instituída assim que o diagnóstico for confirmado e é recomendada a adoção de um esquema terapêutico intensivo, com a aplicação de três a quatro doses de insulina por dia, divididas em insulina basal e insulina prandial, sendo as doses ajustadas conforme as glicemias capilares, que devem ser realizadas ao menos três vezes ao dia. No fator educação dessa tríade estão inclusas a alimentação adequada, a atividade física e a orientação dos pacientes quanto ao autocuidado (ADA, 2015; BRASIL, 2013; SBD, 2012; 2015).

2.1.2 Complicações do DM

O DM, quando não controlado, pode evoluir com complicações agudas e crônicas de grande importância. O diabetes e suas complicações são considerados uma das principais causas de morte precoce na maioria dos países, sendo responsáveis por redução substancial da capacidade de trabalho e da expectativa de vida, além de gastos expressivos em saúde (ADA, 2014; BRASIL, 2013).

As complicações agudas, que podem ocorrer durante a evolução do DM, são a cetoacidose diabética e a hipoglicemia, condições estas graves e que requerem tratamento imediato. Já as complicações crônicas do DM se dividem em complicações macrovasculares e microvasculares. As três grandes manifestações macrovasculares são: doença cardiovascular (infarto agudo do miocárdio, angina), doença cerebrovascular (acidente vascular encefálico) e doença vascular periférica. Quanto às complicações microvasculares, elas são representadas pela retinopatia, neuropatia e ND. (BRASIL, 2013; SBD, 2015).

A retinopatia diabética acomete mais de 90% dos diabéticos tipo 1 após 20 anos de doença, e é responsável por cerca de 12% dos novos casos de diminuição da acuidade visual a um nível que impede a atividade laboral. A neuropatia diabética normalmente surge, nos pacientes com DM1, após os 5 anos de doença e, de forma semelhante à retinopatia, atinge altos níveis de prevalência

com a evolução do diabetes, acometendo 50% ou mais dos pacientes. As principais manifestações clínicas da neuropatia incluem: perda da sensibilidade tátil, térmica e dolorosa nos membros inferiores, que é considerada o principal fator para o desenvolvimento de úlceras nos pés de pessoas diabéticas; além de hipotensão postural; alterações gastrointestinais (gastroparesia, constipação, diarreia) e alterações genitourinárias (bexiga neurogênica, disfunção erétil) (ADA, 2015; BRASIL, 2013; SBD, 2015). Por fim, a última complicação microvascular do DM, porém não menos importante, a ND, será tratada com mais detalhes a seguir.

2.2 Nefropatia diabética (ND)

2.2.1 Definição

A ND foi descrita pela primeira vez em 1936, por Kimmilstiel e Wilson, que demonstraram a presença de lesões nodulares renais características em pacientes diabéticos, mais tarde denominadas de glomeruloesclerose nodular (GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014).

A ND é definida como uma complicação microvascular crônica do DM, sendo caracterizada, atualmente, pelo aumento da EUA acompanhada pelo declínio progressivo da função renal. Apresenta como fatores de risco para o seu desenvolvimento, além da susceptibilidade genética, o pobre controle glicêmico, a hipertensão, as dislipidemias e o tabagismo (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; SBD, 2015; THOMAS, 2010).

2.2.2 Epidemiologia

A ND é uma complicação frequente e responsável por uma contribuição significativa nos índices de morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos, além do impacto também relevante nos gastos associados à saúde. Cerca de um terço dos pacientes com DM2 e 35% dos pacientes com DM1 a desenvolvem ao longo do tempo (FARMER *et al.*, 2014; PHILLIPS, 2011; SBD, 2015).

De forma geral, a ND é a principal causa de DRC, bem como do estágio avançado dessa enfermidade, a doença renal em estágio final ou IRC. A DRC, por sua vez, é um problema de saúde pública mundial que afeta milhões de pessoas.

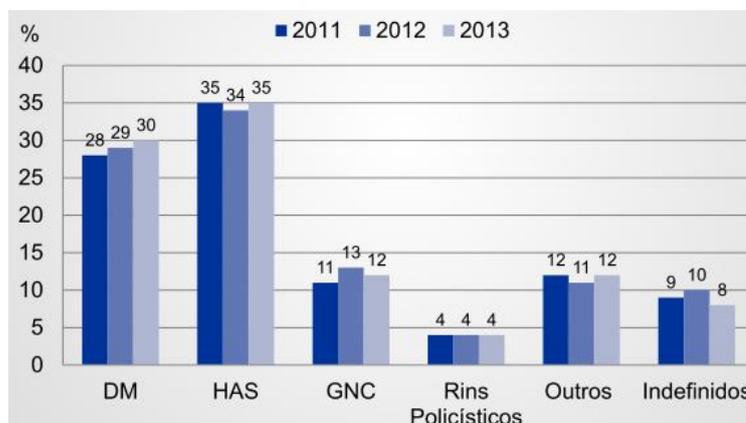
Essa posição alcançada pela ND, dentre as causas da DRC, é compreensível mediante o crescente número de casos tanto de DM1 quanto de DM2, além do estabelecimento cada vez mais precoce do diabetes, especialmente do DM2, e do aumento da expectativa de vida dos pacientes, que têm mais acesso ao tratamento e a novas modalidades terapêuticas (ADA, 2015; NKF, 2012; PHILLIPS, 2011).

Dados do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), um sistema de inquérito projetado para monitorar o estado de saúde e nutricional da população norte-americana, revelam que o índice de indivíduos com DRC que eram diabéticos, avaliados no período de 1988 a 2012, ficou muito próximo ou acima dos 40%. Esse índice colocou o DM em lugar de destaque dentre os fatores de risco para a DRC que foram considerados, ou seja, diabetes, hipertensão, doença cardiovascular e índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 (UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM (USRDS), 2014).

A ND também vem se destacando como causa primária da IRC na população norte-americana. Os dados epidemiológicos demonstram que o número de pacientes com IRC, que têm por diagnóstico de base o diabetes, vem aumentando desde 1980, sendo que no início da década de 1990 o DM assumiu o primeiro lugar no *ranking* e assim permanece, deixando para trás as demais causas de IRC avaliadas (hipertensão, glomerulonefrites e rins policísticos) (USRDS, 2014).

No Brasil, segundo os dados do último Censo de Diálise realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), o cenário da IRC não é muito diferente do norte-americano. Nos anos de 2011, 2012 e 2013, o DM ocupou o segundo lugar dentre os diagnósticos de base dos pacientes brasileiros em tratamento dialítico, ficando atrás apenas da hipertensão (**Figura 1**) (SBN, 2013).

A ND também é um importante fator de risco para a morte prematura e as doenças cardiovasculares. Dados revelam que até um terço dos pacientes diabéticos morrem no intervalo de um ano após o início da diálise, e mesmo aqueles que recebem um transplante renal continuam com taxas de mortalidade maiores do que os pacientes não diabéticos. O aumento da mortalidade entre os pacientes com ND é, em grande parte, secundário às doenças cardiovasculares, e o risco de óbito aumenta conforme a progressão da doença renal. Entre os pacientes com DM2, por exemplo, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 40% a 50% das mortes (FARMER *et al.*, 2014; FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; PHILLIPS, 2011).

Figura 1 – Diagnóstico de base dos pacientes brasileiros em diálise, 2011 a 2013

Fonte: SBN, 2013, slide 27.

Os custos associados ao tratamento constituem outro fator expressivo no que se refere à ND. Nos Estado Unidos, em 2012, de um total de 227 bilhões de dólares gastos com cuidados médicos em pacientes com 65 anos ou mais, 5,1% foram destinados a diabéticos com DRC. Isso equivale a mais de 11 bilhões de dólares, sendo o custo por cada paciente ao ano de quase 17.000 dólares. Quando se considera os gastos totais apenas com o diabetes, aproximadamente 31% foram aplicados no tratamento dos pacientes com DRC (USRDS, 2014).

2.2.3 Classificação

A albuminúria persistentemente aumentada, no intervalo de 30 a 300 mg/g (mg de albumina/g de creatinina), é considerada um indicador inicial da ND em pacientes com DM1 e um marcador para o seu desenvolvimento em pacientes com DM2, além de ser um indicador bem estabelecido de risco aumentado para as doenças cardiovasculares. Assim, com base nos valores crescentes da EUA, a ND é tradicionalmente classificada em três fases: normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria (ADA, 2015; SBD, 2015).

A NKF, em 2007, por meio das diretrizes do *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI), definiu a microalbuminúria como modesta elevação na EUA associada à função renal preservada, mas com alto risco de progressão para a macroalbuminúria e IRC. Já a macroalbuminúria, foi definida como aumento acentuado da EUA associado ao declínio progressivo da TFG, além do aumento da

pressão arterial e do risco elevado de progressão para a IRC. No KDOQI também foram estabelecidos os pontos de corte para os estágios de normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria de acordo com o tipo de amostra urinária avaliada (**Quadro 2**) (NKF, 2007).

Quadro 2 – Categorias da excreção urinária de albumina

| Tipo de amostra | NKF - KDOQI | | | KDIGO | | |
|-----------------------|-------------|-----------|-----------|-------|----------|------|
| | Normoalb. | Microalb. | Macroalb. | A1 | A2 | A3 |
| Aleatória (mg/g) | <30 | 30 – 300 | >300 | <30 | 30 – 300 | >300 |
| 24 horas (mg/24h) | <30 | 30 – 300 | >300 | <30 | 30 – 300 | >300 |
| Cronometrada (µg/min) | <20 | 20 – 200 | >200 | — | — | — |

A1: albuminúria normal ou levemente aumentada; A2: albuminúria moderadamente aumentada; A3: albuminúria gravemente aumentada. Fonte: Adaptado de KDIGO, 2012, p.5; NKF, 2007, p.S42.

Em 2012, as diretrizes do *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), que tem a NKF como um dos colaboradores, propôs uma nova classificação para os estágios da albuminúria. O que mudou, no entanto, foi a nomenclatura estabelecida para cada estágio, tendo sido mantidos os pontos de corte do KDOQI, conforme o **Quadro 2** (KDIGO, 2012).

Apesar das classificações já propostas pelo KDOQI e pelo KDIGO, mais recentemente, a albuminúria passou a ser classificada apenas com duas denominações: albuminúria normal (EUA <30 mg/g) e albuminúria aumentada (EUA \geq 30 mg/g). Isso porque se considera que os pontos de corte anteriormente adotados são relativamente arbitrários, uma vez que foram estabelecidos a partir de cortes com número limitado de pacientes com DM1 e assim acredita-se que, o mais provável, é que exista um contínuo de risco para os desfechos relacionados ao aumento da EUA, como a ND e as doenças cardiovasculares. Entretanto, os termos normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria ainda são amplamente utilizados (ADA, 2015; SBD, 2015).

Os termos microalbuminúria e macroalbuminúria também são empregados para definir os dois estágios da ND: o estágio incipiente e o clínico. O estágio incipiente é caracterizado pela microalbuminúria e normalmente se estabelece após 6 a 15 anos de diabetes. Embora a hipertensão não seja uma

manifestação da ND incipiente, a perda do declínio noturno da pressão arterial foi observada em pacientes que se encontram neste estágio e, por isso, acredita-se que este evento possa predizer o desenvolvimento da microalbuminúria. O estágio clínico, por sua vez, é definido pela evolução para a macroalbuminúria associada à hipertensão estabelecida. Na ND clínica, mais de 90% dos pacientes cursam com o declínio da TFG, culminando com o estabelecimento da IRC, que ocorre em média 7 anos após o início deste estágio (PHILLIPS, 2011; SACKS *et al.*, 2011).

Em 80% dos pacientes com DM1 e normoalbuminúria, a EUA pode aumentar cerca de 10% a 20% ao ano, levando mais da metade desses pacientes ao estágio clínico da ND dentro de 10 a 15 anos. Apesar disso, a progressão dos estágios da ND não é inexorável e, portanto, nem todos os pacientes com ND incipiente evoluem para o estágio clínico: em até 40% dos pacientes com DM1 ocorre uma remissão da microalbuminúria e cerca de 30% a 40% dos pacientes permanecem microalbuminúricos sem evoluir para a macroalbuminúria; eventos estes associados, frequentemente, às intervenções terapêuticas. Já os pacientes que progridem para a macroalbuminúria tendem a evoluir para a IRC (ADA, 2015; SACKS *et al.*, 2011; SBD, 2015).

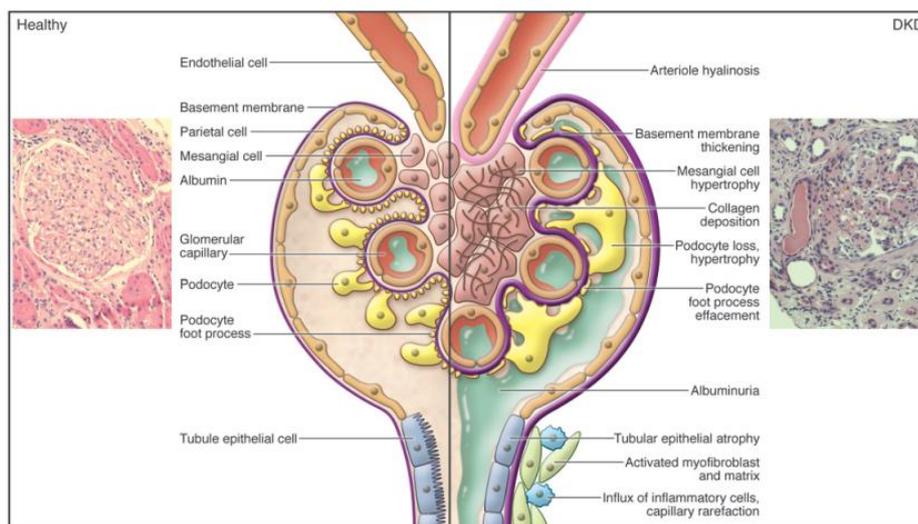
2.2.4 Patogênese

A patogênese da ND apresenta-se como evento multifatorial e de alta complexidade, e sabe-se que a glomeruloesclerose, o espessamento da membrana basal glomerular, a hipertrofia das células mesangiais, a deposição de colágeno, a perda e a hipertrofia de podócitos e a atrofia do epitélio tubular estão entre as principais alterações patológicas que ocorrem durante a evolução da ND (**Figura 2**). Essas alterações acabam por resultar na albuminúria progressiva, na redução da TFG, na retenção de fluidos e na elevação da pressão arterial (ARORA; SINGH, 2013; REIDY *et al.*, 2014; TAVAFI, 2013).

Os principais fatores envolvidos na patogênese da ND já descritos incluem: o mecanismo hemodinâmico, que envolve o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA); as citocinas pró-fibróticas e pró-inflamatórias, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α); diversas quinases, como a proteína quinase C (PKC); os produtos finais de glicação avançada (AGEs); além de mediadores de estresse oxidativo, como a

nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADP) (ARORA; SINGH, 2013; BADAL; DANESH, 2014; FURUKAWA *et al.*, 2013).

Figura 2 – Alterações patológicas da nefropatia diabética



Fonte: REIDY *et al.*, 2014, p. 2334.

2.2.4.1 Alterações hemodinâmicas

Dentre os fatores hemodinâmicos envolvidos na patogênese da ND, o aumento inicial da TFG (hiperfiltração), bem como a elevação da pressão intraglomerular assumem importância crítica. Na ND, a lesão dos glomérulos induz mudanças na sua microcirculação devidas a um desequilíbrio na resistência das arteríolas aferentes e eferentes, que acabam por resultar em hiperfiltração. A hiperfiltração, por sua vez, leva ao aumento da pressão intraglomerular e, dessa forma, insidiosamente, a combinação hiperfiltração mais hipertensão intraglomerular danifica os glomérulos e túbulos remanescentes, culminando com o desenvolvimento de glomerulosclerose e fibrose túbulo-intersticial (BADAL; DANESH, 2014; TRAMONTI; KANWAR, 2013; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

A obesidade e uma gama de substâncias pró-inflamatórias e fatores de crescimento também parecem atuar no estabelecimento da hiperfiltração. A endotelina-1, por exemplo, um importante vasoconstritor, apresenta níveis plasmáticos progressivamente maiores conforme a evolução da ND (ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

Com a hiperfiltração, a albumina passa mais facilmente dos capilares para os glomérulos, o que leva ao aumento da matriz mesangial, ao espessamento da membrana basal glomerular e à lesão dos podócitos. Além disso, o estresse mecânico resultante da hiperperfusão renal também induz a liberação de citocinas (TNF- α) e fatores de crescimento (TGF- β 1 e o fator de crescimento vascular endotelial - VEGF), bem como de colesterol e triglicérides, que contribuem para o acúmulo de proteínas da matriz extracelular (MEC), promovendo a expansão mesangial e a glomeruloesclerose (ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

O SRAA, por sua vez, desempenha um papel crucial no controle homeostático da pressão arterial e na perfusão tecidual, como também influencia na inflamação e na infiltração celular do tecido renal. Dessa forma, o desequilíbrio neste sistema também pode levar à hipertensão e à injúria do tecido renal (ARORA; SINGH, 2013).

A angiotensina II é o elemento biologicamente ativo mais poderoso do SRAA e, conseqüentemente, é considerada a molécula-mestra da lesão renal decorrente do diabetes. Sua ativação exacerbada leva ao desenvolvimento da hipertensão e à lesão renal, que resultam em alterações estruturais nos rins e à redução da função renal (ARORA; SINGH, 2013).

Vários estudos evidenciam que a atuação da angiotensina II na patogênese da ND se dá por múltiplas vias: ela aumenta, por exemplo, a síntese de TGF- β nas células mesangiais que, por sua vez, eleva a produção de proteínas de matriz (colágeno, fibronectina, laminina). A angiotensina II também estimula a síntese de VEGF nos podócitos, aumenta a produção renal de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regula a expressão de outras citocinas inflamatórias nos rins que estão envolvidas no estabelecimento e progressão da ND, como a interleucina (IL) - 6 (ARORA; SINGH, 2013).

A renina e seu receptor estão envolvidos na patogênese da ND, principalmente, por meio do aumento na síntese renal de citocinas inflamatórias e elementos fibróticos. A renina regula a expressão de TGF- β 1 nas células mesangiais que, por sua vez, estimulam o colágeno I, a fibronectina e o inibidor do ativador do plasminogênio 1; já o receptor de renina aumenta a produção renal de TNF- α e IL-1 β (ARORA; SINGH, 2013).

Os estudos também têm revelado que a aldosterona é um importante componente da patogênese da ND. Este elemento do SRAA acelera a lesão renal

pela indução da síntese de fatores de crescimento e ROS, além de interferir no processo de degradação da MEC (ARORA; SINGH, 2013).

2.2.4.2 Alterações metabólicas

No elenco das alterações metabólicas que ocorrem na ND figuram, dentre outros, a própria hiperglicemia, os AGEs, o estresse oxidativo e a PKC. A hiperglicemia, por exemplo, é considerada o gatilho-chave da lesão renal associada ao DM, agindo por meio da ativação e desequilíbrio de diversas vias metabólicas (SUN *et al.*, 2013; TAVAFI, 2013).

A hiperglicemia é capaz de elevar a expressão do VEGF nos podócitos, aumentando assim a permeabilidade vascular; também contribui para aumentar o estresse oxidativo pela exacerbação da oxidação da glicose e pela geração mitocondrial de ROS, que comprometem o DNA e aceleram o processo de apoptose. Além disso, é capaz de aumentar a expressão do TGF- β nos glomérulos e das proteínas de matriz especificamente estimuladas por essa citocina; o TGF- β , por sua vez, pode contribuir para a hipertrofia celular e aumentar a síntese de colágeno. Por fim, a hiperglicemia aumenta a geração dos AGEs através da ativação da via aldol-redutase e da PKC (SUN *et al.*, 2013; YAMAGISHI; MATSUI, 2010; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

Estudos têm demonstrado que os AGEs desempenham importante papel no desenvolvimento e progressão da lesão vascular diabética, sendo que, tanto a síntese aumentada como o clearance diminuído são responsáveis pelo acúmulo desses AGEs nos pacientes com ND. O acúmulo dos AGEs leva a alteração progressiva da arquitetura dos rins e, conseqüentemente, ao decréscimo da função renal. A formação dos AGEs nas proteínas da MEC, por exemplo, alteram as interações matriz-matriz e célula-matriz, contribuindo para o processo de glomeruloesclerose; bem como prejudicam a degradação das proteínas da MEC pelas metaloproteinases, levando ao espessamento da membrana basal e à expansão mesangial (SUN *et al.*, 2013; YAMAGISHI; MATSUI, 2010).

O desequilíbrio no delicado balanço entre as ROS que promovem o estresse oxidativo e o sistema de defesa antioxidante também atua na patogênese da ND. As ROS são capazes de induzir a lesão renal via peroxidação da membrana celular, oxidação de proteínas, vasoconstrição renal, lesões no DNA, aumento e

ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$, ativação da PKC, formação de AGEs e indução do TGF- β (BADAL; DANESH, 2014; TAVAFI, 2013).

A PKC, uma família de quinases serina/treonina, composta por no mínimo 15 isoformas e que está envolvida na regulação da contratilidade vascular, na proliferação celular e na síntese de proteínas da MEC, também tem sido associada ao processo patogênico da ND. Estudos vêm demonstrando que a ativação da PKC induz a disfunção renal, aumentando a expressão de Nox-2, Nox-4, endotelina-1, VEGF, TGF- β e do fator de crescimento do tecido conectivo, bem como a produção de moléculas oxidantes (ARORA; SINGH, 2013).

2.2.4.3 Processo inflamatório

A inflamação crônica desempenha um papel relevante no desenvolvimento e progressão das complicações tardias do DM, como a ND. Nesta, se observa um aumento da infiltração de macrófagos e a superprodução de moléculas de adesão de leucócitos. Os macrófagos são capazes de produzir citocinas inflamatórias, radicais livres e proteases, que contribuem para a injúria renal. E as próprias células renais produzem moléculas inflamatórias quando expostas à hiperfiltração, intensificando este processo (SUN *et al.*, 2013; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

Moléculas relacionadas ao processo inflamatório, como proteína C reativa, TNF- α e IL-1, IL-6 e IL-18 se encontram elevadas na ND, e seus níveis correlacionam-se com a albuminúria e a progressão para IRC. A IL-1, por exemplo, aumenta a permeabilidade vascular, a proliferação de células mesangiais e a deposição de matriz. Já a IL-6 eleva a expressão de fibronectina e de moléculas de adesão em células endoteliais e células vasculares. Outras citocinas ainda, como o TNF- α , prejudicam o balanço entre os mediadores da vasodilatação e vasoconstrição, contribuindo para alterações na permeabilidade dos capilares glomerulares (SUN *et al.*, 2013; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

A albumina também ativa algumas vias inflamatórias, através das células tubulares, que alimentam a patogênese da ND. Durante a fase de macroalbuminúria, as células epiteliais tubulares proximais podem assumir um papel pró-inflamatório e pró-fibrótico, expressando uma variedade de quimiocinas e, assim, iniciar certos sinais flogísticos que culminam em lesão tubular progressiva, inflamação intersticial

e fibrose. A extensão da lesão tubular depende de fatores como a hiperglicemia, os AGEs e a quantidade de albumina filtrada pela membrana glomerular (NAUTA *et al.*, 2011; TRAMONTI; KANWAR, 2013; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

2.2.4.4 Fatores genéticos e epigenéticos

A expressão gênica assim como os eventos epigenéticos também são reconhecidos como fatores determinantes na patogênese da ND. O modelo genético exato, no entanto, que subsidia a predisposição à ND ainda é incerto. Teoricamente, alguns genes com uma contribuição maior e outros genes com menor contribuição e suas interações com o meio ambiente atuam no desenvolvimento e progressão da ND (BADAL; DANESH, 2014; PHILLIPS, 2011; ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

As pesquisas realizadas com o objetivo de identificar variantes polimórficas associadas com a ND, frequentemente, consideram como genes candidatos aqueles que desempenham papéis na expressão de proteínas relacionadas à modulação de citocinas, proteínas envolvidas no metabolismo glicídico e lipídico, na formação da MEC, na homeostase da pressão sanguínea e no mecanismo de sensibilidade à insulina (ZELMANOVITZ *et al.*, 2009).

Através da regulação epigenética, os genes são ativados ou desativados dependendo da necessidade da célula, em resposta a vias de sinalização ou a estímulos ambientais. Em nível celular, os microRNAs (miRNAs), uma classe de pequenos RNAs não codificadores (21 a 24 nucleotídeos), atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão de genes. Tais reguladores vêm emergindo como fatores críticos na patogênese da ND, por meio do seu papel na regulação da homeostase renal (BADAL; DANESH, 2014).

A desregulação de certos miRNAs em condições de hiperglicemia tem sido demonstrada, por meio de estudos em animais, como capazes de levar à deposição de colágeno, ao acúmulo de fibronectina e à hipertrofia renal, enquanto que a expressão de alguns miRNAs *in vitro* e *in vivo* vem sendo associada a alterações patológicas nos podócitos e na função celular do endotélio glomerular (BADAL; DANESH, 2014).

No tecido renal, cinco miRNAs são referidos por serem especialmente abundantes em comparação com sua expressão em outros órgãos; são eles: miRNA-192, miRNA-194, miRNA-204, miRNA-215 e o miRNA-216. Níveis

diminuídos do miRNA-192, por exemplo, foram encontrados em pacientes com maior extensão de fibrose intersticial renal, sendo significativa a correlação inversa observada entre os níveis de miRNA-192 e o escore de fibrose (BONVENTRE, 2012; DISTEFANO; TAILA; ALVAREZ, 2013).

2.2.5 Tratamento e prevenção

Tradicionalmente, os objetivos do tratamento da ND incluem reduzir a EUA, sendo o alvo a obtenção de valores normais para esse parâmetro (normoalbuminúria), bem como evitar o seu aumento progressivo e desacelerar o declínio da TFG, além de prevenir a ocorrência de eventos cardiovasculares. Nesse sentido, recomenda-se não apenas o controle dos níveis glicêmicos e da pressão arterial, mas sim a adoção de intervenções múltiplas, que também contemplem a correção das dislipidemias, a adequação dietética e o abandono do tabagismo. As principais estratégias de tratamento da ND, com exceção do tratamento de substituição renal (diálise e transplante), são descritas no **Quadro 3** (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; SBD, 2015).

Quadro 3 – Estratégias de tratamento da nefropatia diabética

| Intervenção | Descrição |
|----------------------------|---|
| Controle pressórico | - Alvo: pressão arterial $\leq 130/80$ mmHg. - Uso de diuréticos (furosemida se TFG < 30 mL/min), antagonistas do cálcio e/ou β -bloqueadores e/ou vasodilatadores. |
| Fármacos que atuam no SRAA | - Inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA). - Bloqueadores do receptor AT1 da angiotensina II (BRA). - Antagonistas dos receptores da aldosterona. - Inibidores diretos da renina. |
| Controle glicêmico | - Alvo: HbA1c $< 7,0\%$ (individualizar de acordo com a presença de comorbidades). |
| Controle de lipídios | - Alvos (paciente não dialítico): - Triglicérides: < 150 mg/dL. - HDL colesterol: > 40 mg/dL para homens e > 50 mg/dL para mulheres. - LDL colesterol: - Se LDL basal > 190 mg/dL ou doença cardiovascular estabelecida: redução de 50% do LDL basal ou LDL < 70 mg/dL. - Se LDL basal > 100 mg/dL com idade entre 40 – 75 anos: redução de 30% do LDL basal (no mínimo) ou < 100 mg/dL. |
| Restrição | - Restrição moderada de proteínas: $< 1,0$ g/kg de peso/dia na |

| | |
|----------|--|
| proteica | presença de progressão da ND e redução da TFG. |
|----------|--|

Fonte: Adaptado de SBD, 2015, p.157.

As medidas indicadas para o tratamento da ND se aplicam também à sua prevenção. A ADA, por exemplo, traz como recomendações gerais para a redução do risco e o retardo da progressão da ND, o controle glicêmico e o controle pressórico intensivos. De fato, estudos como o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) revelam que o controle ideal dos níveis glicêmicos está associado com significativa redução do desenvolvimento das complicações microvasculares do DM, inclusive da ND. Sabe-se também que as medidas interventivas precoces para o controle da pressão arterial têm efeito não só na ND, mas também auxiliam na prevenção da maior causa de óbito entre os diabéticos, que são os eventos cardiovasculares (ADA, 2014; FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013).

2.2.6 Diagnóstico

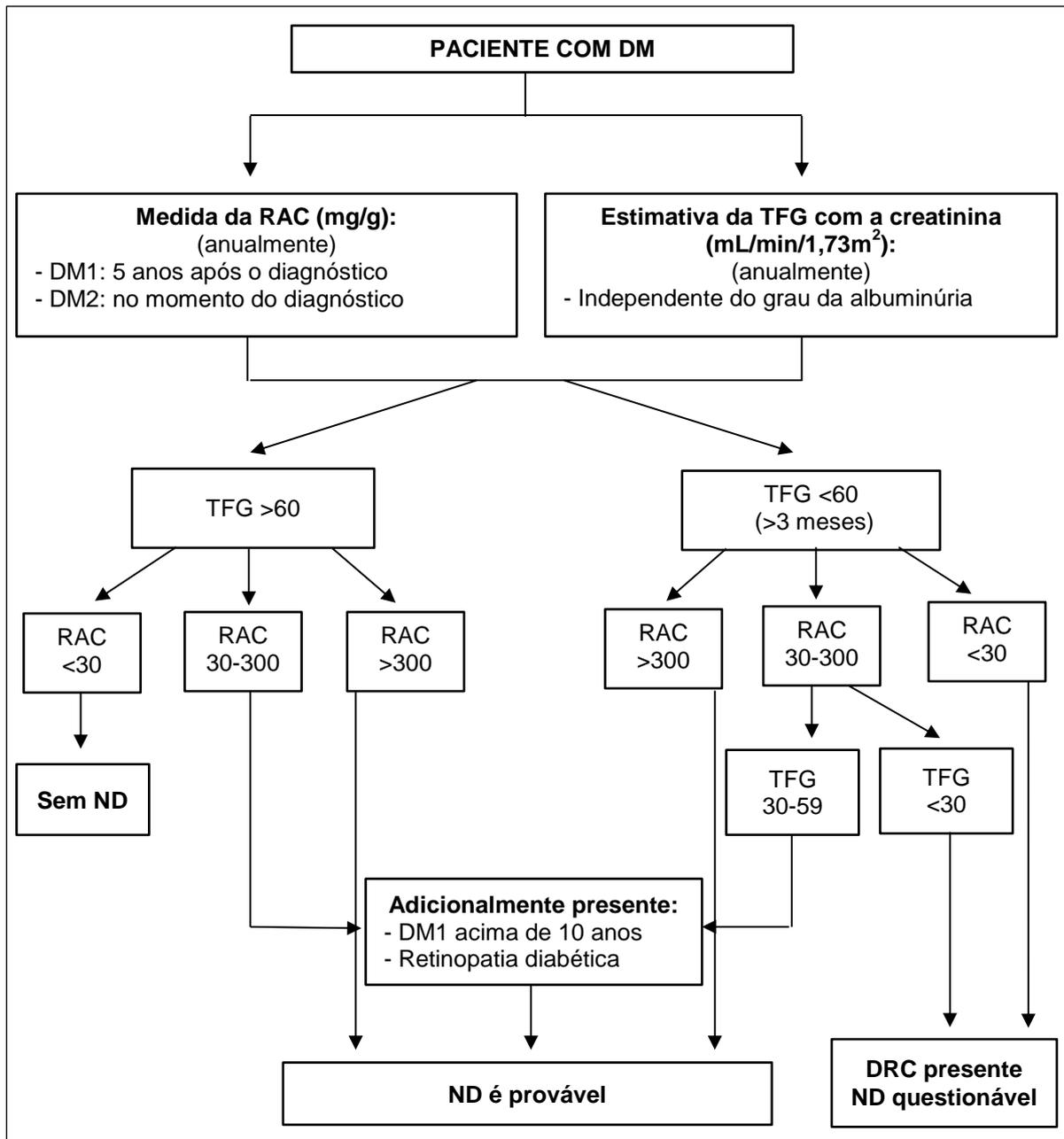
O rastreamento para a ND deve ser realizado anualmente e basear-se na determinação da albuminúria e na estimativa da TFG. Além disso, deve ser iniciado logo após o diagnóstico do diabetes nos pacientes com DM2 e após cinco anos de diagnóstico nos pacientes com DM1, com exceção dos pacientes com DM1 que se encontram na puberdade ou com diabetes persistentemente descompensado, os quais devem ser avaliados antes (NKF, 2007; SBD, 2015).

O que determina a diferença no ponto inicial do rastreamento entre o DM1 e o DM2 é que, normalmente, os pacientes com DM1 são diagnosticados com maior proximidade do início da doença e desenvolvem a microalbuminúria num intervalo de 5 a 10 anos após o diagnóstico. Ao passo que, no DM2, pela própria fisiologia da doença, o diagnóstico é mais tardio (em média 8 anos após o início da hiperglicemia) e assim, frequentemente, a microalbuminúria já está presente no momento do diagnóstico (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; NKF, 2007).

A ND tem uma natureza progressiva e a maioria dos pacientes evolui para o aumento contínuo da EUA acompanhado pela redução da TFG. Além disso, existe forte correlação entre a presença da ND e o tempo de duração do diabetes ou a

retinopatia diabética. Nesse sentido, o KDOQI estabeleceu um padrão de combinações entre EUA, TFG, tempo de duração do diabetes e retinopatia diabética para auxiliar no estabelecimento do diagnóstico da ND (GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014; NKF, 2007). Gosmanov; Wall; Gosmanova (2014) elaboraram um fluxograma que facilita a compreensão desse diagnóstico (**Figura 3**).

Figura 3 – Fluxograma vigente para o diagnóstico da ND



RAC: razão albumina/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular.

Fonte: Adaptado de GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014, p. 408.

A determinação da EUA e da TFG combinada com uma avaliação clínica cuidadosa são capazes de diagnosticar a ND na maioria dos casos. Mas em situações atípicas, o paciente deve ser submetido a uma avaliação adicional, com a realização de biópsia, por exemplo. São consideradas situações atípicas: início da albuminúria em pacientes cuja duração do DM é inferior a cinco anos, especialmente do DM1; albuminúria de início abrupto e rapidamente progressiva; alterações no sedimento urinário (presença de acantócitos, cilindros hemáticos e leucocitários); ausência de retinopatia ou neuropatia nos pacientes com DM1 e manifestações clínicas de outra doença sistêmica (GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014; SBD, 2015).

2.2.6.1 Albuminúria

A albumina é a proteína mais abundante do plasma, representando de 50% a 60% do conteúdo proteico total, e possui concentração que varia de 3,5 – 5,0 g/dL em condições fisiológicas. É uma proteína globular de pequeno peso molecular, 66 quilodáltons (KDa) aproximadamente, que consiste de uma única cadeia com 585 resíduos de aminoácidos organizados em três domínios homólogos (sítios I, II e III), cada qual composto por dois subdomínios (A e B). Devido ao seu elevado conteúdo de aminoácidos ácidos, a albumina apresenta carga líquida de -15 a -20 em pH neutro, ponto isoelétrico próximo de 5.0 e alta solubilidade hídrica (ANGUIZOLA *et al.*, 2013; CARACENI; TUFONI; BONAVIDA, 2013; MILLER *et al.*, 2010).

A albumina tem como funções a regulação da pressão oncótica, sendo responsável por 70% a 80% do total dessa pressão, bem como o transporte plasmático de moléculas variadas, tanto endógenas (ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, íons, hormônios, vitaminas, gases) quanto exógenas (drogas e toxinas). Além disso, desempenha atividade antitrombótica e antioxidante, sendo considerada o principal sistema antioxidante circulante do organismo (ANGUIZOLA *et al.*, 2013; CARACENI; TUFONI; BONAVIDA, 2013).

O glomérulo renal atua como uma barreira seletiva de filtração, com base no peso e na carga elétrica das moléculas, e como a albumina é uma proteína de concentração plasmática elevada e de peso molecular relativamente pequeno, quantidades significativas são filtradas para a urina glomerular. No entanto, a maior parte da albumina (99%) é reabsorvida quando ela atinge os túbulos proximais,

excretando-se assim não mais que 30 mg/dia dessa proteína na urina em condições fisiológicas. A EUA, portanto, reflete a atuação combinada de dois processos renais, filtração e reabsorção, podendo assim indicar a ocorrência não apenas de disfunção glomerular, mas também de alterações tubulares (MCMAHON; WAIKAR, 2013; MORESCO *et al.*, 2013; TAGLE; GONZÁLEZ; ACEVEDO, 2012).

Como já foi mencionado, a microalbuminúria tem demonstrado surgir no estágio inicial da ND no DM1 e ser um marcador para o seu desenvolvimento no DM2, além de ser um fator de risco independente para a progressão da DRC diabética e não diabética, um marcador bem estabelecido de risco aumentado para as doenças cardiovasculares e preditiva de mortalidade em geral. É nesse contexto que, atualmente, a albuminúria é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e monitoramento da ND (LEE; CHOI, 2014; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014; MCMAHON; WAIKAR, 2013; MORESCO *et al.*, 2013).

A medida da albuminúria pode ser realizada em diferentes tipos de amostras de urina: amostra isolada (primeira da manhã ou aleatória), de 24 horas ou com tempo cronometrado; cada uma delas com seu respectivo ponto de corte para o diagnóstico da ND (**Quadro 4**) (ADA, 2015; SBD, 2015).

Quadro 4 – Pontos de corte para o diagnóstico da ND

| Tipo de amostra de urina | Valor |
|--|-----------------|
| Amostra aleatória – RAC | ≥30 mg/g |
| Amostra aleatória – Concentração de albumina | ≥14 mg/L |
| Amostra de 24 horas | ≥30 mg/24 horas |
| Amostra com tempo cronometrado | ≥20 µg/min |

RAC: razão albumina/creatinina. Fonte: Adaptado de NKF, 2007, p.S42; SBD, 2015, p.155.

As amostras de 24 horas ou com tempo cronometrado demandam mais trabalho na coleta e pouco acrescentam em termos de acurácia e predição. Dessa forma, recomenda-se que o rastreamento para a ND seja realizado pela determinação da albumina em amostra isolada, em função da acurácia diagnóstica e facilidade desse tipo de coleta. Na amostra isolada pode-se medir apenas a concentração da albumina ou a razão albumina/creatinina (RAC). A medida da albumina isolada apresenta boa acurácia e menor custo, no entanto, a RAC parece ser mais acurada em pacientes com EUA marcadamente elevada e TFG reduzida.

Nesse sentido, a recomendação é de que a RAC seja empregada de forma preferencial (ADA, 2015; KDIGO, 2012; SBD, 2015).

Todo teste de albuminúria alterado deve ser confirmado em 2 de 3 amostras coletadas em um intervalo de 3 a 6 meses, devido à variabilidade da EUA, cujo coeficiente de variação intraindividual é de aproximadamente 40%. Além disso, recomenda-se que a determinação da albuminúria seja realizada na ausência de situações que podem promover sua elevação transitória, como exercício físico intenso nas últimas 24 horas, infecção em curso, febre, insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão e hiperglicemia não controladas, hematúria e gestação (ADA, 2015; GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014; SBD, 2015).

A medida da albuminúria deve ser realizada por um método padronizado. Diversas metodologias já foram propostas para a sua determinação, como imunoturbidimetria, imunonefelometria, radioimunoensaio, fitas reagente, Elisa, eletroforese, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), HPLC acoplada à espectrometria de massa e até HPLC acoplada à espectrometria de massas sequencial (SBD, 2015; SPEECKAERT *et al.*, 2011).

Cada método desenvolvido para a dosagem da albuminúria apresenta, inerentemente, qualidades e limitações, e os resultados obtidos diferem significativamente entre eles. O atual posicionamento do *National Kidney Disease Education Program – IFCC Working Group on Standardization of Albumin* considera o imunoensaio com anticorpo policlonal o método primário para a quantificação da albuminúria. A albumina humana é altamente antigênica e, como os anticorpos policlonais têm maior sensibilidade do que os monoclonais, o imunoensaio com anticorpos policlonais é capaz de detectar até mesmo moléculas de albumina modificadas (SPEECKAERT *et al.*, 2011).

Embora seja considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e acompanhamento da ND, a albuminúria apresenta limitações importantes que comprometem seu desempenho em termos de sensibilidade, especificidade e poder preditivo. A microalbuminúria, por exemplo, não é específica para a ND, uma vez que ela pode estar presente em pacientes diabéticos que não têm nefropatia e também em pacientes não diabéticos com DRC progressiva. Tem sido observado ainda que nem todos os pacientes com microalbuminúria progridem para a macroalbuminúria, havendo um número significativo de casos em que o paciente se mantém no estágio da microalbuminúria (35%) ou cursa com a remissão para a

normoalbuminúria (40%), o que limita o valor prognóstico da albuminúria para a ND e a IRC (ADA, 2015; LEE; CHOI, 2014; ROSHAN; STANTON, 2013; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

Em alguns casos, pacientes com microalbuminúria já apresentam alterações histológicas renais avançadas e outros evoluem com o declínio progressivo da função renal antes mesmo do aparecimento da microalbuminúria, indicando assim que a microalbuminúria pode não ser um marcador ideal para a detecção precoce da ND. Foi demonstrado que o declínio precoce e acentuado da TFG ($>3,5$ mL/min/ano), precedendo a microalbuminúria, pode ocorrer em até 60% dos pacientes com DM1, e isso acaba por questionar a relação cronológica estabelecida entre o aparecimento da albuminúria e o declínio da TFG (LEE; CHOI, 2014; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014; SBD, 2015).

Por fim, há pacientes diabéticos com TFG reduzida (<60 mL/min/1,73m²) na presença de normoalbuminúria (RAC <30 mg/g) e que, frequentemente, possuem alterações histológicas renais clássicas da ND. Essa condição tem sido chamada de doença renal crônica não-albuminúrica (DRC-NA) e, ao longo da última década, tem-se observado que ela ocorre com certa frequência, chegando a atingir entre 25% e 50% dos pacientes diabéticos com DRC. A patogênese desse quadro de DRC-NA, no entanto, ainda não foi elucidada (LIM *et al.*, 2012; MOTTTL *et al.*, 2013; SBD, 2015).

2.2.6.2 Taxa de filtração glomerular (TFG)

A estimativa da TFG deve ser realizada em todos os pacientes diabéticos anualmente e independente do grau da EUA, sendo ela útil para classificar os pacientes nos estágios da DRC e para monitorar a sua progressão. A DRC é definida como anormalidades na estrutura ou função renal, persistente por mais de 3 meses, com implicações para a saúde. Tais anormalidades incluem: TFG diminuída (<60 mL/min/1,73m²) na presença ou não de um ou mais marcadores de lesão renal, como a EUA aumentada; alterações no sedimento urinário ou nos eletrólitos; anormalidades detectadas por meio da histologia ou exame de imagem, e histórico de transplante renal. Nesse sentido, o estagiamento da DRC é baseado primariamente na TFG, que pode ser combinada a outras variáveis como a EUA,

conforme descrito no **Quadro 5** (ADA, 2015; GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014; KDIGO, 2012; SBD, 2015).

Quadro 5 – Estagiamento da DRC de acordo com a TFG e a EUA

| Estágios | Descrição | TFG (mL/min/1,73m ²) |
|----------|---|----------------------------------|
| 1 | TFG normal ou elevada com EUA aumentada | ≥90 |
| 2 | TFG com redução leve com EUA aumentada | 60 – 89 |
| 3A | TFG com redução leve a moderada | 45 – 59 |
| 3B | TFG com redução moderada a grave | 30 – 44 |
| 4 | TFG com redução grave | 15 – 29 |
| 5 | Insuficiência renal | <15 |

Fonte: Adaptado de KDIGO, 2012, p.27.

A TFG é considerada o melhor índice global da função renal e apresenta-se também como um preditor de IRC, doenças cardiovasculares e morte. É definida como a capacidade renal de depurar uma substância do sangue, sendo expressa como o volume de plasma que pode ser completamente depurado por unidade de tempo. Considera-se como normal, para adultos, uma TFG próxima de 125 mL/min/1,73m², adotando-se o valor inferior a 60 mL/min/1,73m² persistente por mais de 3 meses para indicar a presença de DRC e inferior a 15 mL/min/1,73m² como indicador de insuficiência renal (BASTOS, 2011; FARMER *et al.*, 2014; KDIGO, 2012).

A razão de se estagiar as doenças renais de acordo com a TFG baseia-se na observação de que ela diminui antes mesmo do início dos sintomas da DRC e se correlaciona com a gravidade das doenças renais. Contudo, a TFG pode permanecer clinicamente estável mesmo na vigência da perda de néfrons, o que ocorre devido ao seu aumento compensatório nos néfrons remanescentes, em virtude do aumento da pressão de filtração (hiperfiltração). Um bom exemplo de hiperfiltração glomerular é observado no início da ND, quando a TFG pode aumentar em até 40% do seu valor inicial (BASTOS, 2011).

A TFG pode ser avaliada com base na depuração de substâncias exógenas ou endógenas. Como exemplos de substâncias exógenas, pode-se mencionar a inulina, considerada o padrão-ouro; os agentes marcados com radioisótopos como o ¹²⁵I-iotalamato, o ⁵¹Cr-ácido etilenodiaminotetra-acético e o

^{99m}Tc -ácido dietilentriaminopenta-acético; e os agentes de contraste radiográfico como o iohexol e o iotalamato não radioativo. Já no grupo das substâncias endógenas destaca-se a creatinina (BASTOS, 2011; SANDILANDS *et al.*, 2013).

As substâncias exógenas preenchem alguns pré-requisitos de um marcador ideal da TFG: são livremente filtradas pelo glomérulo e não são reabsorvidas, metabolizadas e nem secretadas pelos túbulos renais. No entanto, devido à complexidade metodológica e à natureza invasiva para avaliar a sua depuração (infusão venosa, coleta de urina por períodos de tempo determinados), além da exigência de procedimentos especiais durante o manuseio e descarte das substâncias radiomarcadas, bem como o custo elevado, tornam o seu uso inconveniente e limitam sua aplicabilidade clínica. Dessa forma, na rotina, a TFG é normalmente avaliada por meio das substâncias de produção endógena e que são naturalmente eliminadas pelos rins (BASTOS, 2011; SANDILANDS *et al.*, 2013).

A depuração da creatinina em urina de 24 horas, até pouco tempo atrás, era considerada o melhor método de determinação da TFG na prática clínica. A creatinina, um derivado de aminoácido de 113 dáltons, que resulta da degradação não enzimática da creatina muscular, é produzida e excretada de forma relativamente constante, não se liga a proteínas, é livremente filtrada pelos glomérulos, não é metabolizada nos túbulos renais e sua determinação é simples e de baixo custo. Além disso, a depuração da creatinina apresenta boa correlação com a TFG determinada pela inulina (BASTOS, 2011; MCMAHON; WAIKAR, 2013).

Apesar das características anteriores favoráveis ao emprego da creatinina, outras particularidades não permitem considerá-la como um marcador ideal da TFG. Sua síntese, por exemplo, é proporcional à massa muscular e, portanto, dependente de fatores como idade, gênero e etnia. A creatinina sérica também é influenciada, até certo ponto, pelo consumo de carne, uma vez que o cozimento converte porções variadas de creatina em creatinina; e ela ainda pode elevar-se com a administração de medicamentos como a cimetidina e o trimetoprim. Além disso, a creatinina é secretada pelos túbulos proximais, o que acaba por superestimar a TFG, sendo essa superestimativa mais pronunciada para resultados de TFG menores e pode atingir valores entre 15% a 25%. A TFG também pode ser superestimada pela eliminação extra-renal da creatinina via trato gastrointestinal, particularmente na doença renal avançada (BASTOS, 2011; KDIGO, 2012; MCMAHON; WAIKAR, 2013; SANDILANDS *et al.*, 2013).

Outro impasse quanto ao emprego da creatinina para a avaliação da TFG é que o método tradicionalmente empregado para a sua determinação (picrato alcalino) também é limitado, uma vez que quantifica cromógenos não creatinínicos, da ordem aproximada de 0,2 mg/dL. Além disso, outro fator que limita o emprego da depuração da creatinina é a necessidade da coleta de urina de 24 horas, que além de trabalhosa, está sujeita a erros pela incompreensão da forma correta de coleta, bem como por condições de incontinência urinária (BASTOS, 2011; SANDILANDS *et al.*, 2013).

Com a finalidade de contornar as limitações da creatinina sérica e de sua depuração na avaliação da função renal, várias equações vêm sendo propostas para se estimar a TFG; sendo que tais equações consideram o valor da creatinina sérica ajustado por variáveis clínicas e demográficas. Dentre as diversas equações já desenvolvidas, destacam-se duas que são amplamente utilizadas: a equação do estudo *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) e a equação *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI). Com relação à creatinina empregada nessas equações, é recomendada a utilização de um método de dosagem que seja calibrado, isto é, equiparado pelo fabricante do ensaio ao método de referência internacional reconhecido pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST), que no caso da creatinina é a espectrometria de massa com diluição isotópica (BASTOS, 2011; KDIGO, 2012; SBD, 2015).

A equação MDRD foi desenvolvida a partir de um estudo multicêntrico, que avaliou o efeito da restrição proteica e do controle intensivo da pressão arterial na progressão da doença renal em pacientes com DRC. A MDRD foi inicialmente proposta em 1999 com 6 variáveis: creatinina, ureia e albumina séricas, idade, sexo e etnia. Em 2000, a fim de simplificar o seu emprego clínico, foi desenvolvida uma MDRD com apenas 4 variáveis (creatinina sérica, idade, sexo e etnia) e, por fim, em 2007, essa equação com 4 variáveis foi reformulada para sua aplicação com valores de creatinina obtidos por métodos rastreáveis ao NIST. A equação CKD-EPI, por sua vez, foi proposta em 2009, tendo-se utilizado os dados de 10 estudos para a sua formulação e os dados de mais 16 estudos para a sua validação. Assim como a MDRD simplificada, a CKD-EPI apresenta como variáveis a creatinina sérica, idade, sexo e etnia (LEVEY *et al.*, 2009; SANDILANDS *et al.*, 2013; SBD, 2015).

Apesar de serem práticas, as equações para a estimativa da TFG também apresentam limitações, que são reveladas especialmente quando se compara essa

TFG estimada (TFGe) com a TFG real obtida pela depuração de substâncias exógenas. A MDRD, por exemplo, apresenta menor acurácia para valores de TFG próximos ou acima de 60 mL/min/1,73 m², subestimando tais valores e, além disso, apresenta diferenças importantes no seu desempenho dependendo da etnia do paciente. Já a equação CKD-EPI tem demonstrado maior acurácia e menor imprecisão que a MDRD, particularmente para valores de TFG mais elevados. Entretanto, sua acurácia parece ser menor em pacientes diabéticos, com tendência a subestimar aqueles valores da TFG que se encontram na faixa de normalidade (BASTOS, 2011; LEVEY *et al.*, 2009; SANDILANDS *et al.*, 2013; SBD, 2015).

As limitações inerentes às equações para a estimativa da TFG indicam que nenhuma delas é ideal para todos os grupos populacionais, e que tais limitações devem ser consideradas no momento da sua aplicação e interpretação clínica. Apesar disso, as últimas diretrizes internacionais preconizam a avaliação da TFG ao invés do valor da creatinina isolado, sendo recomendada, de forma geral, o emprego da equação CKD-EPI para os adultos, embora possa ser utilizada uma equação alternativa quando esta demonstrar maior acurácia para o paciente ou grupo populacional que está sendo avaliado (KDIGO, 2012; SANDILANDS *et al.*, 2013).

2.3 Novos biomarcadores da ND

Em linhas gerais, um biomarcador é definido como uma substância biológica que pode ser mensurada e que reflete algum processo fisiológico, patológico ou uma resposta a alguma intervenção terapêutica. Um biomarcador ideal deve ser não invasivo, de fácil medida, reprodutível, de alta sensibilidade e especificidade, apresentar bom custo-benefício, além de permitir o diagnóstico precoce e o monitoramento da progressão da doença (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; MCMAHON; WAIKAR, 2013).

Há algum tempo, abordagens tecnológicas nas áreas da bioquímica, biologia molecular e proteômica têm identificado biomarcadores potenciais para a ND, tanto séricos quanto urinários, incluindo marcadores de lesão glomerular, tubular, de processo inflamatório e estresse oxidativo. Dentre tais biomarcadores, merecem destaque os indicadores de lesão tubular, uma vez que vem se afirmando a importante atuação túbulo-intersticial, e não apenas glomerular, na patogênese da ND. Recentemente, diversos estudos têm demonstrado que alguns desses

marcadores de disfunção tubular apresentam potencial clínico para indicar o estabelecimento e progressão da ND (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; KIM *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014).

O túbulo proximal está sujeito a uma variedade de fatores metabólicos, hemodinâmicos e inflamatórios associados à hiperglicemia e, por isso, é reconhecido o seu papel na patogênese da ND. Até mesmo a albuminúria persistente, secundária à disfunção glomerular, pode prejudicar as células tubulares renais, uma vez que a passagem de grandes quantidades de albumina no lúmen tubular leva à progressiva ativação intratubular da cascata do complemento. Expostas a todos esses fatores, as células epiteliais do túbulo proximal podem assumir um papel pró-inflamatório e pró-fibrótico, com a expressão diversas quimiocinas, o que leva à injúria, à inflamação intersticial e à fibrose (ASSAL *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2011; NAUTA *et al.*, 2011; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

A visão de que, na ND, a injúria glomerular é primária enquanto a injúria tubular é secundária, é superada pelo conhecimento de que os túbulos renais desempenham um papel crítico tanto na gênese quanto na progressão da ND. Um estudo revelou, por exemplo, que a regressão da microalbuminúria em pacientes com DM1 está associada a níveis menores de marcadores tubulares, o que é coerente com o papel da disfunção tubular já no início da ND (TONOLO; CHERCHI, 2014).

A injúria tubular também tem sido reportada em pacientes diabéticos cuja função glomerular se encontra intacta, precedendo assim a microalbuminúria e, por isso, os marcadores tubulares podem ser mais sensíveis do que a albuminúria nos estágios iniciais da ND. Alguns estudos demonstram ainda que, em certos casos, a função renal correlaciona-se melhor com o grau de injúria túbulo-intersticial do que com a injúria glomerular. Além disso, já foi observado que a lesão túbulo-intersticial é um melhor preditor de progressão para IRC do que a lesão glomerular (CARVALHO *et al.*, 2011; LACQUANITI *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

Os biomarcadores de lesão tubular são, essencialmente, proteínas plasmáticas de baixo peso molecular, como a cistatina C, e enzimas urinárias secretadas pelas células tubulares, como a FAL e a GGT. O aumento da excreção urinária das proteínas de baixo peso molecular se deve, sobretudo, à sua reabsorção tubular deficiente. Já a elevação na concentração das enzimas urinárias

decorre de sua secreção aumentada pelas células epiteliais tubulares (KIM *et al.*, 2013; MORESCO *et al.*, 2013).

2.3.1 Cistatina C

A cistatina C é um dos membros da superfamília das cistatinas humanas, que é composta por 12 proteínas, e pertence à família das cistatinas extracelulares. É definida como uma proteína catiônica não glicosilada, formada por 120 aminoácidos dispostos em uma cadeia polipeptídica simples, de ponto isoelétrico 9,3 e peso molecular de 13,4 KDa aproximadamente. É codificada pelo gene CST3, que está localizado no braço curto do cromossomo 20 e é expresso em todas as células nucleadas (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; SANTOS; WAGNER, 2013).

A cistatina C é um inibidor de proteases cisteínicas, como as catépsinas humanas B, H e L, que são enzimas envolvidas em processos patológicos, incluindo estado de inflamação, doenças neurológicas, invasão tumoral e metástases. Sabe-se que a cistatina C tem como função inibir tais proteases quando estas vertem dos lisossomos de células doentes ou que foram lisadas, preservando assim o tecido conjuntivo. Além desse papel no controle da proteólise extracelular, a cistatina C também atua na modulação do sistema imune (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; MCMAHON; WAIKAR, 2013; SANTOS; WAGNER, 2013).

Em virtude de seu baixo peso molecular e carga elétrica positiva, a cistatina C é livremente filtrada pelos glomérulos, sendo reabsorvida e catabolizada nos túbulos proximais quase por completo (99%). Dessa forma, ela não retorna à circulação em sua forma intacta e sua excreção urinária é bem pequena. Além disso, a cistatina C apresenta ritmo de produção constante, não sofre secreção tubular, sua eliminação extra-renal é insignificante e, conforme estudos iniciais, não é influenciada por fatores como idade, sexo, IMC e dieta. Tais características contribuem para que a concentração sérica da cistatina C dependa, quase exclusivamente, do processo de filtração glomerular e, por esse motivo, ela vem sendo considerada um potencial biomarcador endógeno da TFG, sendo o aumento da sua concentração plasmática associado à redução da TFG (BASTOS, 2011; FERGUSON; WAIKAR, 2012; FILLER; YASIN; MEDEIROS, 2014; GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; MCMAHON; WAIKAR, 2013; SANTOS; WAGNER, 2013).

Embora, inicialmente, a cistatina C tenha sido considerada livre de influências extra-renais, alguns estudos têm demonstrado a ação de certos interferentes sobre sua concentração sérica. É o caso do tabagismo, processos inflamatórios, neoplasias, função tireoidiana e uso de esteróides. Mas apesar desses achados, o desempenho da cistatina C como indicador de função renal vem sendo avaliado em diversos grupos de pacientes, como portadores de DRC, transplantados renais, gestantes com pré-eclâmpsia e, especialmente, em pacientes diabéticos (BASTOS, 2011; MACISAAC; PREMARATNE; JERUMS, 2011; MCMAHON; WAIKAR, 2013).

Há mais de 25 anos, a cistatina C foi proposta como um biomarcador promissor para a avaliação da TFG e, mais recentemente, ela vem sendo apontada como um indicador confiável e acurado da TFG também em pacientes diabéticos. Trabalhos sugerem, por exemplo, que a cistatina C sérica apresenta bom desempenho na detecção precoce do declínio da função renal em pacientes com DM e maior capacidade de indicar quais destes pacientes têm maior risco de progredir para a IRC, quando comparada a outros marcadores de função renal, embora haja controvérsias (JEON *et al.*, 2011; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014).

O desempenho diagnóstico da cistatina C em comparação com a creatinina foi avaliado de forma ampla, pela primeira vez, em 2002, por meio de uma meta-análise que envolveu 46 estudos e avaliou as recíprocas da cistatina C e da creatinina sérica frente a TFG obtida por um método de referência (depuração de substância exógena). Nesta meta-análise, a cistatina C se mostrou claramente superior à creatinina, tanto no coeficiente de correlação com a TFG medida quanto na avaliação da área sob a curva *Receiver Operating Characteristics* (ROC) (DHARNIDHARKA; KWON; STEVENS, 2002; FILLER; YASIN; MEDEIROS, 2014).

Tem sido demonstrado que a cistatina C apresenta melhor especificidade e sensibilidade para a detecção da redução leve da TFG (60 – 89 mL/min/1,73m²), tendo suas concentrações elevadas na vigência desse declínio, que corresponde à faixa cega da creatinina. Além disso, a cistatina C identifica melhor alterações na TFG na presença de hiperfiltração, condição comum nos estágios iniciais da ND (BASTOS, 2011; SANTOS; WAGNER, 2013; WEI *et al.*, 2014).

Diante do interesse na avaliação da cistatina C, foram desenvolvidas diversas equações para a estimativa da TFG baseadas na sua concentração.

Segundo as pesquisas, as equações baseadas na cistatina C demonstraram-se superiores ou, no mínimo, equivalentes às equações baseadas na creatinina que são frequentemente utilizadas, inclusive em pacientes diabéticos. Estimativas da TFG que consideram a cistatina C têm revelado maior acurácia do que a creatinina, por exemplo, na detecção de alterações da TFG com valores normais a elevados (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014).

Também foram propostas equações que combinam os valores séricos da cistatina C e da creatinina para a estimativa da TFG. Em alguns estudos, essas fórmulas combinadas apresentaram melhor desempenho na avaliação da função renal do que as fórmulas baseadas em apenas um marcador. No entanto, ainda não há um consenso quanto à superioridade das fórmulas baseadas na cistatina C, considerando-se que, possivelmente, elas não são adequadas para todos os grupos populacionais (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011).

Do ponto de vista prático, a determinação da cistatina C no soro ou plasma pode ser feita nas mesmas condições de coleta da creatinina. Sua estabilidade no soro é de 7 dias em temperatura ambiente, podendo ser armazenada sob congelamento por meses, pois resiste a vários ciclos de congelamento e descongelamento. Os kits comercialmente disponíveis para sua dosagem, empregados com maior frequência, baseiam-se nas técnicas de imunoturbidimetria e imunonefelometria, e os valores de referência variam conforme o método e o fabricante do reagente. Não existem diferenças relevantes nos níveis séricos da cistatina C em homens, mulheres e crianças, sendo que nas crianças os valores estabilizam-se após os 2 anos de idade (BASTOS, 2011; GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; SANTOS; WAGNER, 2013).

A cistatina C urinária também tem sido proposta para a avaliação da função renal, inclusive em pacientes diabéticos, e a sua aplicação na prática clínica vem sendo investigada nos últimos anos. A lesão tubular, que desempenha um papel importante na patogênese da ND, prejudica a reabsorção de cistatina C nos túbulos proximais e, assim, sua concentração na urina tende a aumentar. A razão cistatina C/creatinina urinária (RCC) é considerada um bom indicador de disfunção tubular, sendo que a concentração de cistatina C na urina pode aumentar até 200 vezes na vigência de lesão tubular (KIM *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014; MCMAHON; WAIKAR, 2013; TOGASHI; MIYAMOTO, 2013; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

A excreção urinária de cistatina C também pode aumentar na presença de lesão glomerular, devido à inibição competitiva pela reabsorção tubular provocada pelo aumento concomitante das outras proteínas de baixo peso molecular, como a albumina, β_2 -microglobulina, lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) e a proteína ligadora de ácidos graxos tipo hepático (L-FABP). Assim, a cistatina C urinária é considerada um marcador tanto de injúria tubular proximal quanto de injúria glomerular (KIM *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014; MCMAHON; WAIKAR, 2013; TOGASHI; MIYAMOTO, 2013).

Nos últimos anos, avanços têm permitido a maior aplicação da cistatina C na prática clínica, como a disponibilização de um material de referência certificado para a cistatina C plasmática, o ERM-DA 471/IFCC, desenvolvido pelo *IFCC Working Group for the Standardisation of Cystatin C* em colaboração com o *Institute for Reference Materials and Measurements*, bem como o desenvolvimento de métodos automatizados e de equações para a estimativa da TFG baseadas na sua concentração (FILLER; YASIN; MEDEIROS, 2014; GRUBB *et al.*, 2010).

Tais avanços, somados ao crescente número de estudos dedicados à cistatina C, tiveram impacto significativo nas diretrizes do KDIGO 2012 para o diagnóstico e tratamento da DRC. O KDIGO 2012 recomenda, por exemplo, que a cistatina C sérica seja determinada em adultos com TFG estimada pela creatinina entre 45 e 59 mL/min/1,73m² e que não apresentam albuminúria ou outros marcadores de lesão renal alterados, para que se confirme a ocorrência de DRC. Recomenda-se ainda que, mais do que a liberação do valor da cistatina C isolado, sejam empregadas as equações CKD-EPI baseada na cistatina C (CKD-EPI_{cis}) e CKD-EPI baseada na creatinina e cistatina C (CKD-EPI_{cre-cis}) para a estimativa da TFG, podendo-se empregar fórmulas alternativas se estas demonstrarem maior acurácia do que as CKD-EPIs (KDIGO, 2012; SHLIPAK; MATTES; PERALTA, 2013).

Embora a determinação da cistatina C venha ganhando espaço na prática clínica, suas limitações e as situações em que ela está de fato indicada ainda não foram completamente esclarecidas; além disso, a sua dosagem é de alto custo, sendo em média oito vezes superior à dosagem da creatinina. Nesse sentido, não se deve abandonar os marcadores já consagrados de função renal, como a creatinina e a albuminúria, devendo-se avaliar em concomitância os níveis de cistatina C (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014).

2.3.2 Enzimas urinárias

O tecido renal é a principal fonte das enzimas urinárias excretadas, e a determinação dessas enzimas é considerada um método sensível e não invasivo para a avaliação da integridade das células tubulares. Nesse sentido, estudos têm demonstrado que a avaliação da enzimúria pode facilitar a detecção precoce da ND. Dentre as enzimas urinárias que indicam disfunção tubular se encontram a FAL e a GGT, além de outras como α -glutathione S-transferase (GST) e a N-acetilglicosaminidase (NAG). O aumento da FAL e GGT urinária reflete lesão da membrana das bordas em escova com perda da estrutura de microvilosidade (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013).

2.3.2.1 Fosfatase alcalina (FAL)

A FAL (EC 3.1.3.1) apresenta peso molecular entre 70 e 120 KDa, de acordo com seu tecido de origem. Ela está presente na maioria dos tecidos humanos e associa-se, particularmente, às membranas das células superficiais localizadas na mucosa do intestino delgado e nos túbulos proximais dos rins, especialmente nas células epiteliais da borda em escova, além de ser encontrada nos osteoblastos, nos hepatócitos e na placenta (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013).

A FAL catalisa a hidrólise alcalina de uma variedade de substratos naturais e sintéticos, embora sua função metabólica exata ainda não seja compreendida. Parece que essa enzima está envolvida com o transporte de lipídeos no intestino e com o processo de calcificação óssea, sendo sua concentração sérica comumente empregada na avaliação de doenças ósseas e hepáticas (KUNUTSOR *et al.*, 2014; TALIERCIO *et al.*, 2013).

A FAL também tem sido investigada na avaliação das doenças renais, inclusive na ND, embora os estudos ainda sejam escassos. Jung *et al.* (1988), por exemplo, verificaram que pacientes com DM1 apresentaram uma concentração maior da FAL urinária do que indivíduos saudáveis, e que os pacientes com DM1 e ND também apresentaram valores maiores do que os pacientes com DM1 sem ND. De forma semelhante, Carvalho *et al.* (2011) observaram que a FAL urinária esteve

correlacionada com a albuminúria, e que sua concentração foi maior nos diabéticos tipo 2 com ND do que naqueles sem ND.

Também no DM1, Patrick *et al.* (1993) verificaram que os pacientes com microalbuminúria apresentaram uma excreção urinária de FAL significativamente maior do que os pacientes com normoalbuminúria. Uslu *et al.* (2005) fizeram essa mesma observação avaliando, conjuntamente, pacientes com DM2 e DM1. Além disso, observaram uma correlação significativa da FAL urinária com a creatinina sérica e o clearance de creatinina, e que a FAL urinária foi capaz de discriminar os pacientes diabéticos entre com ND e sem ND.

Outros estudos revelaram que a FAL sérica, por sua vez, se encontra elevada em pacientes com hiperfiltração, como ocorre no DM e na síndrome metabólica. E embora o mecanismo que explique a associação entre os níveis séricos da FAL e a hiperfiltração não seja conhecido, acredita-se que o aumento da FAL decorre da sua maior produção endógena, em resposta a hipertrofia e à lesão tubular (OH; HAN, K.; HAN, S., 2015).

Também já foi observado que, em pacientes com função renal reduzida, níveis plasmáticos elevados de FAL estão associados à DRC, ao maior risco de evolução para a IRC, à insuficiência cardíaca e à morte (TALIERCIO *et al.*, 2013; OH; HAN, K.; HAN, S., 2015).

2.3.2.2 Gama-glutamyltransferase (GGT)

A GGT (EC 2.3.2.2) é uma glicoproteína com peso molecular de 90 KDa aproximadamente, embora algumas insoenzimas podem chegar a 200 KDa. É reconhecida como uma enzima ligada à membrana e tem como função catalisar a transferência do grupo γ -glutamil de peptídeos e compostos que o contêm para um acceptor (CARVALHO *et al.*, 2011; KWIATKOWSKA *et al.*, 2014; MORESCO *et al.*, 2013).

A GGT está presente em células que possuem atividade secretória, como as células tubulares proximais dos rins, os hepatócitos, as células pancreáticas e as células intestinais (em ordem decrescente de abundância), sendo considerada um indicador sensível de lesão celular (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013).

Na prática clínica, aumentos na atividade da GGT sérica são associados à disfunção hepática e ao abuso de álcool, no entanto, também tem sido demonstrada a sua correlação com outros eventos. Já foi relatado, por exemplo, que a GGT foi capaz de prever a microalbuminúria e a DRC em pacientes diabéticos e hipertensos (LEE *et al.*, 2005; MORESCO *et al.*, 2013; YILMAZ *et al.*, 2013).

A GGT sérica, assim como a FAL, também demonstrou estar associada à mortalidade. Foi observado que níveis elevados de GGT estão associados ao risco aumentado de morte, sendo sugerido que a GGT desempenha atividade pró-inflamatória e pró-oxidante, contribuindo assim para a promoção da aterosclerose e, conseqüentemente, para o aumento do risco cardiovascular (KUNUTSOR *et al.*, 2014).

O aumento da GGT urinária, por sua vez, tem sido relacionado à lesão das células tubulares renais da borda em escova, assim com a elevação da FAL urinária. Nesse sentido, estudos têm investigado o seu desempenho na avaliação da função renal, embora o número de trabalhos ainda seja pequeno (MORITA *et al.*, 1991; MORESCO *et al.*, 2013).

A GGT urinária demonstrou estar associada aos níveis plasmáticos de glicose e hemoglobina A1c, bem como ao grau de função renal. Além disso, a GGT parece contribuir para o diagnóstico precoce da ND, uma vez que seus níveis podem estar aumentados mesmo na ausência de microalbuminúria. Essa enzima já foi reportada como biomarcador específico para a ND em pacientes com DM2, apresentando desempenho superior à FAL urinária. No entanto, em pacientes com DM1, a GGT não apresentou um bom desempenho para a avaliação da ND (CARVALHO *et al.*, 2011; JUNG *et al.*, 1988; MORESCO *et al.*, 2013).

Já foi relatado que a atividade da GGT urinária também é maior em pacientes com DM2 e hiperfiltração do que naqueles sem hiperfiltração, sendo válido lembrar que a hiperfiltração está associada a um pior prognóstico da ND (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013).

3 JUSTIFICATIVA

Diante de uma epidemia de DM em curso, é compreensível o impacto social e econômico que decorre dessa doença e de suas principais complicações. E dentre as complicações do DM assume especial destaque a ND, que representa uma complicação frequente e grave, além de estar associada a altos índices de morbidade, mortalidade e gastos elevados dispensados ao seu tratamento.

Nesse contexto, o diagnóstico precoce e seguro da ND, bem como o seu monitoramento adequado, tornam-se imprescindíveis para a instituição de medidas protetivas e terapêuticas que possibilitem prevenir e retardar a sua progressão. Entretanto, os testes atualmente empregados no diagnóstico e acompanhamento da ND (EUA e TFG) apresentam limitações que comprometem os seus desempenhos e, por isso, faz-se necessária a busca e avaliação de novos biomarcadores. Essa busca e avaliação do desempenho de novos biomarcadores têm o intuito de identificar marcadores que possam superar os testes tradicionais em termos de sensibilidade, especificidade e poder prognóstico, ou que sejam, no mínimo, capazes de complementá-los.

É nessa perspectiva que este trabalho foi proposto, tendo como objetivo avaliar o desempenho de alguns biomarcadores tubulares emergentes, tanto no plasma quanto na urina, no diagnóstico da ND em pacientes com DM1; haja vista o reconhecimento da importante atuação dos túbulos renais na iniciação e progressão da ND. A melhor compreensão do desempenho dos biomarcadores é fundamental para a sua adoção na prática clínica, sobretudo em condições clínicas particulares e populações de risco, como os diabéticos tipo 1.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho dos biomarcadores tubulares: cistatina C, FAL e GGT, no plasma e na urina, no diagnóstico e classificação da ND em pacientes com DM1.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil dos biomarcadores no plasma, na urina, das razões plasma/urina de cada biomarcador e a TFG estimada por diferentes equações em indivíduos saudáveis e com DM1, assim como nos diabéticos sem ND e com ND e nos diabéticos conforme o grau de albuminúria.
- Verificar a variação dos biomarcadores no plasma, na urina e das razões plasma/urina nos pacientes diabéticos conforme as variáveis clínicas: idade, sexo, IMC, tempo de diagnóstico do DM, tabagismo, comorbidades e complicações do DM.
- Avaliar as correlações entre os biomarcadores plasmáticos, urinários, razões plasma/urina e a TFG estimada por diferentes equações.
- Avaliar o desempenho dos biomarcadores plasmáticos, urinários e das razões plasma/urina no diagnóstico da ND, bem como na identificação da microalbuminúria e macroalbuminúria.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Normas éticas

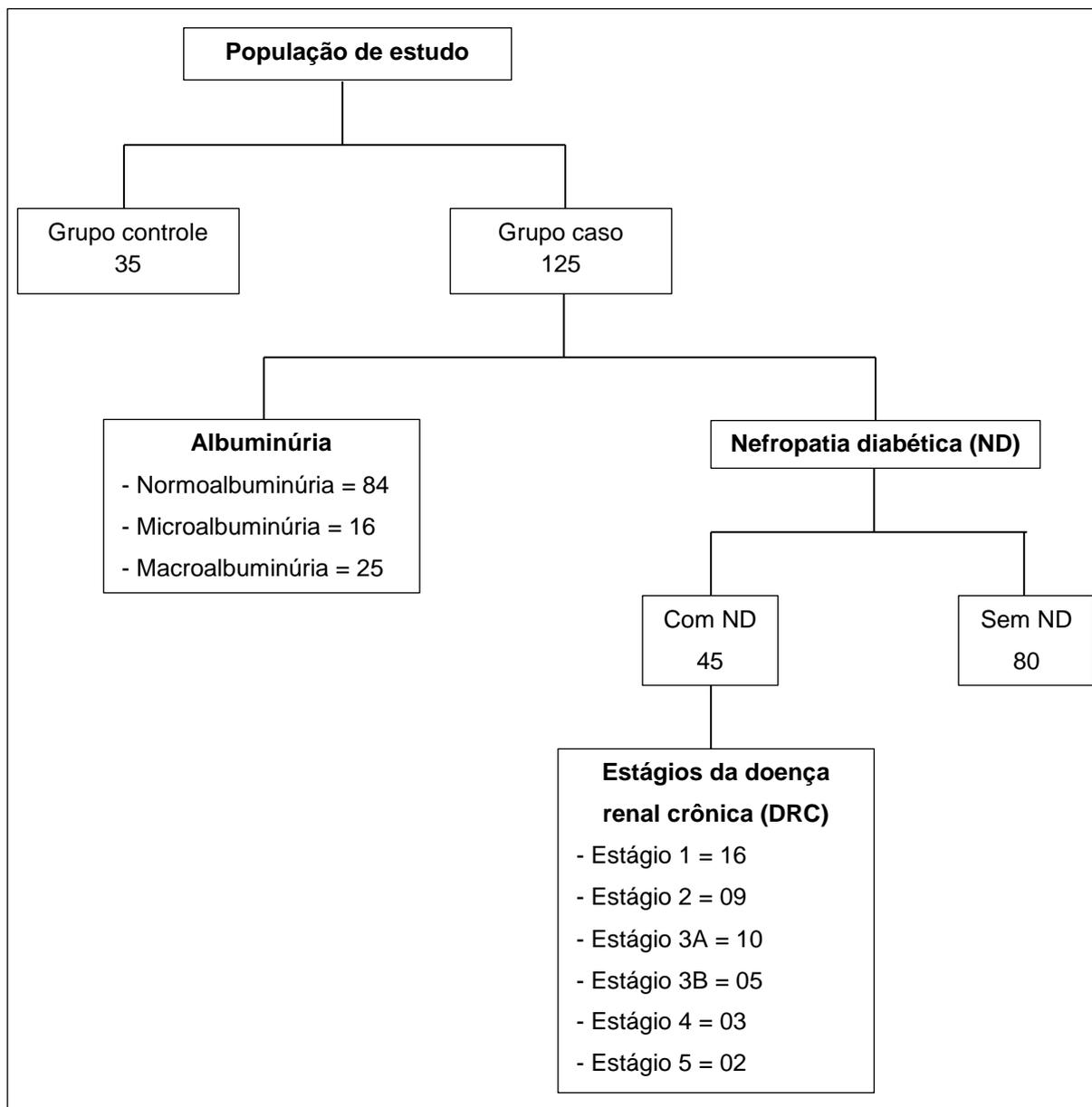
Os dados clínicos e as amostras biológicas utilizadas no presente estudo foram previamente obtidos na tese de doutorado intitulada “Avaliação da função renal e sua associação com FVW, ADAMTS13 e Dímero D em pacientes diabéticos tipo 1” de autoria de Caroline Pereira Domingueti, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes e co-orientação da Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges, que foi defendida em 2014 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

O referido trabalho recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG sob o número 0392.0.203.000-11 (**ANEXO A**) e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte sob o número 006/2012 (**ANEXO B**). Todos os participantes do estudo foram esclarecidos quanto aos objetivos do estudo, responderam à Ficha Clínica (**ANEXO C**) e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**ANEXO D**).

5.2 População de estudo

Neste trabalho foram incluídos 160 participantes, distribuídos em grupo caso e grupo controle, cuja seleção foi realizada no período de novembro de 2011 a setembro de 2012. O grupo caso foi composto por 125 indivíduos adultos na faixa etária de 18 a 60 anos, com diagnóstico clínico e laboratorial de DM1 e portadores ou não de nefropatia diabética, que foram selecionados por equipe médica especializada nos ambulatórios de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UFMG e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. O grupo controle foi composto por 35 indivíduos saudáveis com idade entre 18 e 60 anos, sem histórico de diabetes, hipertensão arterial sistêmica e/ou doença renal, recrutados entre os alunos e funcionários da UFMG (**Figura 4**). Os participantes foram selecionados de acordo com critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos.

Figura 4 – Classificação da população de estudo



5.2.1 Critérios de inclusão do grupo caso

- Idade entre 18 e 60 anos;
- Diagnóstico clínico e laboratorial de DM1;
- Portadores ou não de nefropatia diabética.

5.2.2 Critérios de exclusão do grupo caso

- Paciente sob tratamento dialítico;

- Histórico de transplante renal;
- Processo infeccioso em curso;
- Portador de doença hepática;
- Histórico de alcoolismo;
- Histórico de câncer;
- Gravidez.

5.2.3 Classificação dos participantes

Os participantes foram classificados de acordo com a RAC nos estágios de normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria, conforme as diretrizes do documento NKF-KDOQI (2007), anteriormente apresentadas no **Quadro 2**. Já a classificação dos participantes em portadores ou não de ND foi realizada de acordo os dados da RAC, TFG estimada pela CKD-EPI_{cre} 2009, tempo de diagnóstico do diabetes e presença ou não de retinopatia diabética, também segundo as diretrizes do NKF-KDOQI (2007) apresentadas na **Figura 3**. O estagiamento da DRC foi baseado nos valores da RAC e da TFG estimada pela CKD-EPI_{cre} 2009, conforme as diretrizes do KDIGO (2012) descritas no **Quadro 5**.

5.3 Coleta e registro dos dados clínicos

Os dados clínicos dos participantes do grupo caso foram obtidos por meio dos seus respectivos prontuários, e os dados clínicos dos participantes do grupo controle por meio de questionário. Estes dados foram registrados na Ficha Clínica e incluem informações como idade, sexo, IMC, pressão arterial, tabagismo, tempo de diagnóstico do diabetes, medicamentos em uso, presença de co-morbidades (hipertensão, dislipidemias, hipotireoidismo) e complicações decorrentes do diabetes (nefropatia, retinopatia e neuropatia).

5.4 Coleta, preparo e armazenamento das amostras biológicas

Amostras de sangue venoso foram colhidas entre 7:00 e 10:00 horas e após jejum de 12 horas. Foram coletadas 3 amostras de 3,5 mL de sangue venoso de cada participante, em tubos do sistema Vacuette[®] com anticoagulante citrato. As

amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C, sendo o plasma posteriormente aliquotado em tubos do tipo eppendorf de 500 µL, devidamente identificados com as iniciais do nome do participante e a data da coleta. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C e, para a realização das dosagens bioquímicas, as alíquotas necessárias foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas em vórtex.

Também foram colhidas, no período supracitado, amostra de urina aleatória de cada participante, com retenção urinária mínima de 4 horas. As amostras foram armazenadas em tubo falcon de 15 mL, devidamente identificados com as iniciais do nome do participante e a data da coleta, e mantidas em freezer a -80°C. Para a realização das dosagens bioquímicas, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 2000 g por 10 minutos a 4°C, para a obtenção do sobrenadante.

5.5 Dosagens bioquímicas

As dosagens bioquímicas foram realizadas em duplicata no analisador automático modelo Labmax 240. Foram empregados kits diagnósticos da marca Labtest[®], sendo realizada a calibração e o controle interno de qualidade previamente à determinação de cada analito.

A cistatina C (plasmática e urinária) foi determinada por método imunoturbidimétrico; a creatinina (plasmática e urinária) por método enzimático-Trinder rastreável ao NIST e a ureia (plasmática e urinária) por método enzimático UV (urease). A atividade da FAL (plasmática e urinária) foi determinada por método cinético de Bowers e Mc Comb modificado e a atividade da GGT (plasmática e urinária) por método cinético de Szasz modificado. A albumina plasmática foi dosada por método colorimétrico (verde de bromocresol) e a albumina urinária por método imunoturbidimétrico.

5.6 Cálculo das razões e estimativa da TFG

A partir dos dados bioquímicos foram calculadas: a razão plasma/urina para cada analito avaliado (albumina, cistatina C, creatinina, ureia, FAL e GGT) e a

razão urinária entre cada analito e a creatinina como denominador (analito corrigido pela creatinina urinária).

A estimativa da TFG foi realizada por meio de 6 equações, sendo 2 equações baseadas na creatinina plasmática (MDRD_{4-IDMS} 2007 e CKD-EPI_{cre} 2009), 2 equações baseadas na cistatina C plasmática (CKD-EPI_{cis} 2012 e Tan *et al.*, 2002) e 2 equações que combinam creatinina e cistatina C plasmáticas (CKD-EPI_{cre-cis} 2012 e Tidman *et al.*, 2008) (**Quadro 6**).

Quadro 6 – Equações empregadas para a estimativa da TFG

MDRD_{4-IDMS} 2007

$$\text{TFG} = 175 \times (\text{Cr})^{-1.154} \times (\text{idade})^{-0.203} \times (1.212 \text{ se negro}) \times (0.742 \text{ se mulher})$$

CKD-EPI_{cre} 2009

Sexo feminino

| Etnia | Creatinina | Equação |
|-----------------|------------|--|
| Negra | ≤ 0.7 | $\text{TFG} = 166 \times (\text{Cr}/0.7)^{-0.329} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Negra | > 0.7 | $\text{TFG} = 166 \times (\text{Cr}/0.7)^{-1.209} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Branca ou outra | ≤ 0.7 | $\text{TFG} = 144 \times (\text{Cr}/0.7)^{-0.329} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Branca ou outra | > 0.7 | $\text{TFG} = 144 \times (\text{Cr}/0.7)^{-1.209} \times 0.993^{\text{idade}}$ |

Sexo masculino

| Etnia | Creatinina | Equação |
|-----------------|------------|--|
| Negra | ≤ 0.9 | $\text{TFG} = 163 \times (\text{Cr}/0.9)^{-0.411} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Negra | > 0.9 | $\text{TFG} = 163 \times (\text{Cr}/0.9)^{-1.209} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Branca ou outra | ≤ 0.9 | $\text{TFG} = 141 \times (\text{Cr}/0.9)^{-0.411} \times 0.993^{\text{idade}}$ |
| Branca ou outra | > 0.9 | $\text{TFG} = 141 \times (\text{Cr}/0.9)^{-1.209} \times 0.993^{\text{idade}}$ |

CKD-EPI_{cis} 2012

| Cistatina-C | Equação |
|-------------|--|
| ≤ 0.8 | $\text{TFG} = 133 \times (\text{Cis}/0.8)^{-0.499} \times 0.996^{\text{idade}} \times (0.932 \text{ se mulher})$ |
| > 0.8 | $\text{TFG} = 133 \times (\text{Cis}/0.8)^{-1.328} \times 0.996^{\text{idade}} \times (0.932 \text{ se mulher})$ |

Tan *et al.* (2002)

$$\text{TFG} = (87.1 / \text{cistatina C}) - 6.87$$

CKD-EPI_{cre-cis}Sexo feminino

| Cr | Cis | Equação |
|-------|-------|--|
| ≤ 0.7 | ≤ 0.8 | $TFG = 130 \times (Cr/0.7)^{-0.248} \times (Cis/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negra})$ |
| ≤ 0.7 | > 0.8 | $TFG = 130 \times (Cr/0.7)^{-0.248} \times (Cis/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negra})$ |
| > 0.7 | ≤ 0.8 | $TFG = 130 \times (Cr/0.7)^{-0.601} \times (Cis/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negra})$ |
| > 0.7 | > 0.8 | $TFG = 130 \times (Cr/0.7)^{-0.601} \times (Cis/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negra})$ |

Sexo masculino

| Cr | Cis | Equação |
|-------|-------|--|
| ≤ 0.9 | ≤ 0.8 | $TFG = 135 \times (Cr/0.9)^{-0.207} \times (Cis/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negro})$ |
| ≤ 0.9 | > 0.8 | $TFG = 135 \times (Cr/0.9)^{-0.207} \times (Cis/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negro})$ |
| > 0.9 | ≤ 0.8 | $TFG = 135 \times (Cr/0.9)^{-0.601} \times (Cis/0.8)^{-0.375} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negro})$ |
| > 0.9 | > 0.8 | $TFG = 135 \times (Cr/0.9)^{-0.601} \times (Cis/0.8)^{-0.711} \times 0.995^{idade} \times (1.08 \text{ se negro})$ |

Tidman *et al.* (2008)

$$TFG = [TFG\text{-MDRD} + (100 / \text{cistatina C}) - 14] / 2$$

Cr: creatinina plasmática em mg/dL; Cis: cistatina plasmática em mg/L; Idade: em anos.

A escolha das equações para a estimativa da TFG foi baseada nos seguintes motivos: a MDRD_{4-IDMS} e as equações CKD-EPIs são equações desenvolvidas por estudos de grande relevância e são atualmente recomendadas por entidades de reconhecimento internacional, como a ADA e a NKF. Já as equações propostas por Tan *et al.* (2002) e por Tidman *et al.* (2008) foram elaboradas a partir de populações similares à população deste estudo (pacientes saudáveis e com DM1) e/ou empregaram o método turbidimétrico para a dosagem da cistatina C.

5.7 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por meio do programa estatístico Stata versão 11.0. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição paramétrica foram expressas como média e desvio padrão e comparadas por teste T de Student quando avaliados dois grupos e Anova quando avaliados três grupos. As variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas

por Mann-Whitney se avaliados dois grupos e Kruskal-Wallis se avaliados três grupos. As variáveis categóricas foram apresentadas como frequência absoluta e relativa (%) e comparadas por teste Qui-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher. A investigação da correlação entre as variáveis bioquímicas foi realizada pelo coeficiente de correlação de Spearman, sendo adotados os seguintes critérios para sua interpretação: os coeficientes com valores entre 0.000 – 0.300 indicam correlação fraca entre os biomarcadores, os coeficientes com valores entre 0.301 – 0.700 indicam correlação moderada e os coeficientes com valores acima de 0.700 indicam correlação forte (RATNER, 2009). O desempenho diagnóstico dos biomarcadores foi avaliado pela curva ROC, sendo a interpretação da área sob a curva (AUC) baseada na classificação proposta por Swets (1988) (**Quadro 7**). Considerou-se como sensibilidade a probabilidade do teste classificar corretamente os doentes e como especificidade a probabilidade do teste classificar corretamente os não doentes, conforme D'Arrigo *et al.* (2011). Foi considerado como significativo o valor de $p < 0.05$.

Quadro 7 – Interpretação da área sob a curva (AUC)

| AUC | Desempenho diagnóstico |
|--------------------------|-------------------------------|
| $AUC \leq 0.500$ | Incapaz de discriminar |
| $0.500 < AUC \leq 0.700$ | Baixa acurácia |
| $0.700 < AUC \leq 0.900$ | Acurácia moderada |
| $0.900 < AUC < 1.000$ | Alta acurácia |
| $AUC = 1.000$ | Discriminação perfeita |

Fonte: Adaptado de Swets (1988), p.1287.

6 RESULTADOS

6.1 Perfis clínico e laboratorial da população de estudo

6.1.1 Perfil clínico-laboratorial dos grupos controle e caso

Na **Tabela 1** são apresentados os dados clínicos e laboratoriais do grupo controle e do grupo caso. O grupo controle foi composto por 35 indivíduos saudáveis, com idade mediana de 30 anos e IMC mediano de 24 Kg/m², sendo 63% do sexo feminino. O grupo caso foi composto por 125 indivíduos com DM1, idade mediana de 33 anos e IMC mediano de 24 Kg/m², sendo 64% do sexo feminino. Não houve diferença significativa entre os dois grupos com relação à idade, IMC e sexo.

O tempo médio de diagnóstico do diabetes no grupo caso foi de 19 ± 8 anos e a frequência de hipertensão de 66%, dislipidemia 38%, hipotireoidismo 18%, tabagismo 9%, retinopatia 44% e neuropatia 15%.

No que se refere aos biomarcadores plasmáticos, foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e o grupo caso para a cistatina C, creatinina, ureia e FAL (**Gráfico 1**), sendo os valores desses quatro marcadores maiores no grupo caso. Para a albumina e a GGT não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Gráfico 1 – FAL plasmática no grupo controle e no grupo caso

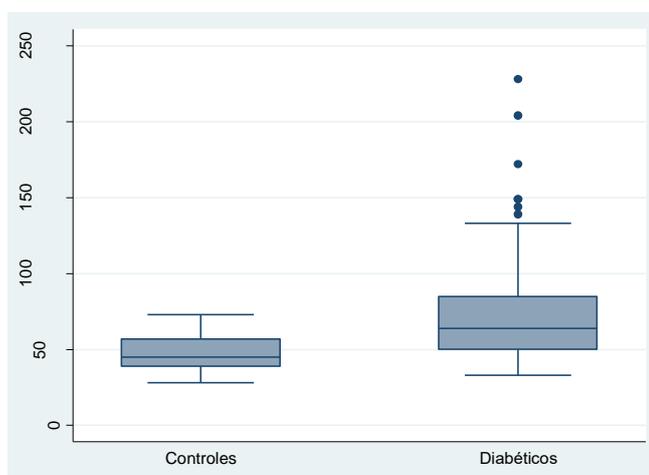


Tabela 1 – Dados clínicos e laboratoriais dos grupos controle e caso

| Dados clínicos | Controles | Diabéticos | p |
|------------------------------|---------------|---------------|-------|
| Número de indivíduos - n°(%) | 35 (22) | 125 (78) | --- |
| Idade (anos) | 30 (26 – 37) | 33 (26 – 40) | 0.690 |
| Sexo - M/F (%) | 13/22 (37/63) | 45/80 (36/64) | 1.000 |
| IMC (Kg/m ²) | 24 (22 – 27) | 24 (21 – 26) | 0.698 |
| Tempo de diagnóstico (anos) | ---- | 19 ± 8 | --- |
| Hipertensão - n°(%) | ---- | 83 (66) | --- |
| Dislipidemia - n°(%) | ---- | 48 (38) | --- |
| Hipotireoidismo - n°(%) | ---- | 22 (18) | --- |
| Retinopatia - n°(%) | ---- | 55 (44) | --- |
| Neuropatia - n°(%) | ---- | 19 (15) | --- |
| Tabagismo - n°(%) | ---- | 11 (9) | --- |

Biomarcadores no plasma

| | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
| Albumina (g/dL) | 3.9 (3.8 – 4.0) | 3.9 (3.7 – 4.0) | 0.602 |
| Cistatina C (mg/L) | 0.66 (0.49 – 0.80) | 0.83 (0.68 – 1.0) | <0.001* |
| Creatinina (mg/dL) | 0.67 (0.60 – 0.73) | 0.73 (0.62 – 0.93) | 0.005* |
| FAL (U/L) | 45 (39 – 57) | 64 (50 – 85) | <0.001* |
| GGT (U/L) | 15 (9 – 28) | 16 (12 – 28) | 0.359 |
| Ureia (mg/dL) | 21 (18 – 16) | 28 (23 – 39) | <0.001* |

Biomarcadores na urina

| | | | |
|------------|----------------------|-----------------------|---------|
| RAC (mg/g) | 2.6 (1.2 – 4.0) | 10.8 (3.4 – 69.2) | <0.001* |
| RCC (mg/g) | 0.08 (0.03 – 0.10) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 0.126 |
| RFC (U/g) | 1.0 (0 – 1.9) | 1.8 (0.3 – 4.1) | 0.015* |
| RGC (U/g) | 0.7 (0.2 – 1.7) | 1.1 (0.3 – 13.2) | 0.034* |
| RUC (mg/g) | 12700 (8437 – 13897) | 13879 (11165 – 17082) | 0.007* |

Razão plasma/urina

| | | | |
|-------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| Albumina | 8298 (6000 – 13226) | 2847 (516 – 11613) | <0.001* |
| Cistatina C | 6.0 (2.8 – 17.4) | 9.8 (4.8 – 34.6) | 0.018* |
| Creatinina | 0.004 (0.003 – 0.007) | 0.009 (0.004 – 0.014) | <0.001* |
| FAL | 21.0 (13.5 – 29.8) | 31.4 (17.1 – 54.0) | 0.156 |
| GGT | 11.9 (5.0 – 25.8) | 13.2 (1.4 – 32.8) | 0.468 |
| Ureia | 0.012 (0.009 – 0.016) | 0.020 (0.014 – 0.034) | <0.001* |

TFG (mL/min/1,73m²)

| | | | |
|-----------------------------|-----------------|----------------|---------|
| MDRD _{4-IDMS} | 117 (107 – 126) | 103 (76 – 127) | 0.012* |
| CKD-EPI _{cre} | 121 (113 – 124) | 114 (88 – 126) | 0.024* |
| CKD-EPI _{cis} | 128 (109 – 138) | 105 (76 – 122) | <0.001* |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | 125 (102 – 171) | 98 (76 – 121) | <0.001* |
| CKD-EPI _{cre-cis} | 126 (114 – 140) | 112 (81 – 128) | <0.001* |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | 127 (110 – 156) | 112 (79 – 129) | <0.001* |

*Diferença significativa; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamiltransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular. Variável categórica: expressa como frequência absoluta e relativa (%) e comparada por teste exato de Fisher. Variável contínua com distribuição paramétrica: expressa

como média e desvio padrão. Variáveis contínuas com distribuição não paramétrica: expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Mann-Whitney.

Quanto aos biomarcadores urinários, não foi encontrada diferença significativa entre os dois grupos apenas para a RCC. Já os valores de RAC, RFC, RGC e RUC foram significativamente maiores no grupo caso.

A razão plasma/urina dos biomarcadores avaliados foi significativamente diferente entre os grupos para a albumina, cistatina C, creatinina e ureia. As razões da cistatina C, creatinina e ureia foram maiores no grupo caso do que no grupo controle, ao passo que a razão da albumina foi maior no grupo controle. As razões plasma/urina da FAL e da GGT, por sua vez, não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Para a TFG estimada, observou-se diferença significativa entre os grupos para as 6 equações utilizadas, sendo os valores da TFG menores no grupo caso quando comparado ao controle.

6.1.2 Perfil clínico-laboratorial dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND

Na **Tabela 2** são apresentados os dados clínicos e laboratoriais dos controles e dos diabéticos sem e com ND. O grupo dos diabéticos sem ND foi composto por 80 indivíduos com idade mediana de 32 anos e IMC mediano de 24 Kg/m², sendo 64% do sexo feminino. O grupo dos diabéticos com ND foi composto por 45 indivíduos com idade mediana de 34 anos e IMC mediano de 23 Kg/m², sendo 64% do sexo feminino. Não houve diferença significativa com relação à idade, IMC e sexo entre os três grupos avaliados.

O tempo de diagnóstico entre os diabéticos com ND foi significativamente maior do que o tempo de diagnóstico entre os diabéticos sem ND. Além disso, verificou-se que a frequência de hipertensão, dislipidemia e retinopatia também foi maior no grupo de diabéticos com ND. Já para as frequências de hipotireoidismo, neuropatia e tabagismo não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos de diabéticos.

Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND

| Dados clínicos | Controles | Diabéticos | | p |
|--------------------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| | | Diabéticos sem ND | Diabéticos com ND | |
| Número de indivíduos - n°(%) | 35 | 80 (64) | 45 (36) | --- |
| Idade (anos) | 30 (26 – 37) | 32 (25 – 38) | 34 (28 – 44) | 0.279 |
| Sexo - M/F(%) | 13/22 (37/63) | 29/51 (36/64) | 16/29 (36/64) | 0.938 |
| IMC (Kg/m ²) | 24 (22 – 27) | 24 (22 – 26) | 23 (21 – 26) | 0.380 |
| Tempo de diagnóstico (anos) | ---- | 18 ± 8 | 22 ± 7 | 0.003* |
| Hipertensão - n°(%) | ---- | 43 (54) | 40 (89) | <0.001* |
| Dislipidemia - n°(%) | ---- | 23 (29) | 25 (56) | 0.003* |
| Hipotireoidismo - n°(%) | ---- | 12 (15) | 10 (22) | 0.335 |
| Retinopatia - n°(%) | ---- | 26 (32) | 29 (64) | 0.001* |
| Neuropatia - n°(%) | ---- | 12 (15) | 7 (16) | 1.000 |
| Tabagismo - n°(%) | ---- | 6 (8) | 5 (11) | 0.523 |
| Biomarcadores no plasma | | | | |
| Albumina (g/dL) | 3.9 (3.8 – 4.0) | 3.9 (3.7 – 4.0) | 3.8 (3.6 – 4.1) | 0.809 |
| Cistatina C (mg/L) | 0.66 (0.49 – 0.80) | 0.74 (0.60 – 0.85) ^a | 1.32 (0.96 – 1.81) ^{bc} | p ^a =0.031* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| Creatinina (mg/dL) | 0.67 (0.60 – 0.73) | 0.69 (0.61 – 0.77) | 1.21 (0.84 – 1.61) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| FAL (U/L) | 45 (39 – 57) | 56 (46 – 73) ^a | 83 (64 – 95) ^{bc} | p ^a < 0.001* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| GGT (U/L) | 15 (9 – 28) | 14 (11 – 21) | 25 (16 – 43) ^{bc} | p ^b 0.006* p ^c <0.001* |
| Ureia (mg/dL) | 21 (18 – 26) | 25 (22 – 30) ^a | 42 (29 – 58) ^{bc} | p ^a =0.002* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |

| Biomarcadores na urina | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| RAC (mg/g) | 2.6 (1.2 – 4.0) | 4.2 (2.6 – 10.7) ^a | 395.6 (62.4 – 1527.7) ^{bc} | p ^a <0.001* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| RCC (mg/g) | 0.08 (0.03 – 0.10) | 0.06 (0.03 – 0.09) | 0.09 (0.06 – 0.52) ^{bc} | p ^b 0.033* p ^c <0.001* |
| RFC (U/g) | 1.0 (0 – 1.9) | 1.5 (0.1 – 3.8) | 3.0 (1.0 – 4.9) ^{bc} | p ^b =0.001* p ^c =0.031* |
| RGC (U/g) | 0.7 (0.2 – 1.7) | 1.0 (0.3 – 11.4) | 1.3 (0.5 – 16.9) ^b | p ^b =0.005* |
| RUC (mg/g) | 12700 (8437 – 13897) | 14652 (11231 – 17825) ^a | 13173 (10951 – 16415) | p ^a =0.003* |
| Razão plasma/urina | | | | |
| Albumina | 8298 (6000 – 13226) | 7045 (3229 – 18500) | 130 (34 – 1007) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| Cistatina C | 6.0 (2.8 – 17.4) | 11.6 (5.1 – 37.2) ^a | 9.5 (4.0 – 28.3) | p ^a =0.012* |
| Creatinina | 0.004 (0.003 – 0.007) | 0.006 (0.004 – 0.010) ^a | 0.013 (0.008 – 0.028) ^{bc} | p ^a =0.009* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| FAL | 21.0 (13.5 – 29.8) | 25.7 (15.7 – 54.0) | 34.7 (18.8 – 58.4) | 0.187 |
| GGT | 11.9 (5.0 – 25.8) | 13.2 (1.3 – 30.2) | 12.7 (1.5 – 33.3) | 0.698 |
| Ureia | 0.012 (0.009 – 0.016) | 0.016 (0.012 – 0.026) ^a | 0.034 (0.025 – 0.069) ^{bc} | p ^a <0.001* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| TFG (mL/min/1,73m²) | | | | |
| MDRD _{4-IDMS} | 117 (107 – 126) | 114 (98 – 133) | 61 (44 – 93) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| CKD-EPI _{cre} | 121 (113 – 124) | 121 (110 – 129) | 67 (48 – 107) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| CKD-EPI _{cis} | 128 (109 – 138) | 116 (98 – 130) | 58 (35 – 85) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | 125 (102 – 171) | 111 (96 – 137) ^a | 59 (41 – 84) ^{bc} | p ^a <0.001* |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|--|
| | | | | p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |
| CKD-EPI _{cre-cis} | 126 (114 – 140) | 120 (104 – 133) | 61 (41 – 91) ^{bc} | p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | 127 (110 – 156) | 119 (104 – 138) | 66 (42 – 93) ^{bc} | p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |

*Diferença significativa; ND: nefropatia diabética; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamyltransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular. Variáveis categóricas: expressas como frequência absoluta e relativa (%) e comparadas por Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Variável contínua com distribuição paramétrica: expressa como média e desvio padrão e comparada por teste T de Student. Variáveis contínuas com distribuição não paramétrica: expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

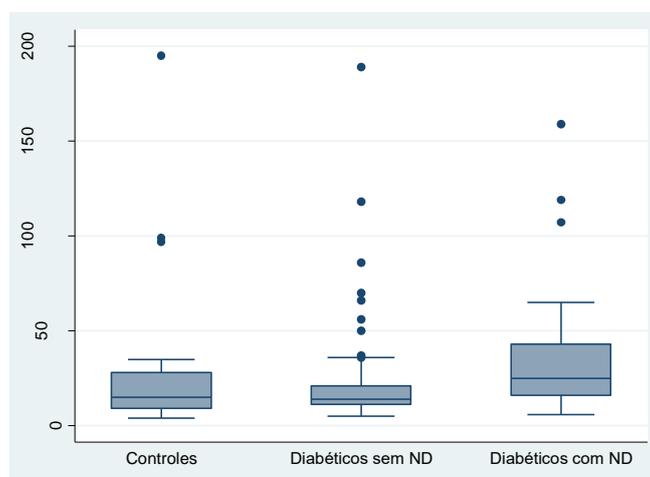
^a p < 0.05 para diabéticos sem ND x controles.

^b p < 0.05 para diabéticos com ND x controles.

^c p < 0.05 para diabéticos com ND x diabéticos sem ND.

Os valores da cistatina C, FAL e ureia plasmática foram significativamente maiores nos diabéticos sem e com ND do que nos controles, e também foram maiores nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND. Já para a creatinina e a GGT (**Gráfico 2**), os valores foram maiores apenas nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND e aos controles. A albumina, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre os grupos.

Gráfico 2 – GGT plasmática nos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND



Quanto aos valores na urina, a RAC apresentou valores maiores nos diabéticos com e sem ND do que nos controles, bem como valores maiores nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND. Já para a RCC e a RFC, os valores foram significativamente maiores apenas nos diabéticos com ND em relação aos controles e aos diabéticos sem ND. A RGC só foi maior nos diabéticos com ND em relação aos controles, e a RUC apenas foi significativamente maior nos diabéticos sem ND em comparação aos controles.

Foram observadas diferenças significativas entre os grupos para as razões plasma/urina da albumina, cistatina C, creatinina e ureia, ao passo que as razões da FAL e da GGT não apresentaram diferença entre os grupos. A razão da albumina foi significativamente menor nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND e aos controles. As razões da creatinina e da ureia foram maiores nos pacientes com e sem ND do que nos controles, e também foram maiores nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND. A razão da cistatina C, por sua vez, só foi significativamente maior nos diabéticos sem ND em comparação aos controles.

A TFG apresentou diferença significativa entre os grupos para as 6 equações. Para a equação de Tan *et al.* (2002), a TFG foi significativamente menor nos diabéticos com e sem ND com relação aos controles, e também nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND. Para as demais equações, a TFG apenas foi menor nos diabéticos com ND em comparação aos diabéticos sem ND e aos controles.

6.1.3 Perfil clínico-laboratorial dos diabéticos conforme o grau de albuminúria

Na **Tabela 3** são apresentados os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes diabéticos conforme o grau de albuminúria. O grupo dos diabéticos com normoalbuminúria foi composto por 84 indivíduos com tempo de diagnóstico médio de 18 ± 8 , sendo 63% do sexo feminino; a idade mediana foi de 32 anos e o IMC mediano de 24 Kg/m^2 . O grupo dos diabéticos com microalbuminúria foi composto por 16 indivíduos com tempo de diagnóstico médio de 23 ± 7 , sendo 75% do sexo feminino; a idade mediana foi de 38 anos e o IMC mediano de 24 Kg/m^2 . O grupo dos diabéticos com macroalbuminúria foi composto por 25 indivíduos com tempo de diagnóstico médio de 22 ± 7 , sendo 60% do sexo feminino; a idade mediana foi de 30 anos e o IMC mediano de 22 Kg/m^2 .

O tempo de diagnóstico, o IMC e o percentual de sexo masculino e feminino não diferiram entre os grupos, ao passo que a idade foi significativamente maior no grupo dos diabéticos com microalbuminúria do que nos dois outros grupos.

A frequência de hipertensão foi significativamente maior nos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria do que nos diabéticos com normoalbuminúria. Para a dislipidemia e a retinopatia, a frequência foi maior apenas nos diabéticos com macroalbuminúria em relação aos diabéticos com normoalbuminúria. Já para o hipotireoidismo, neuropatia e tabagismo, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 3 – Dados clínicos e laboratoriais dos diabéticos conforme o grau de albuminúria

| Dados clínicos | Normoalbuminúria | Microalbuminúria | Macroalbuminúria | p |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--|
| Número de indivíduos - n°(%) | 84 (67) | 16 (13) | 25 (20) | --- |
| Idade (anos) | 32 (26 – 40) | 38 (32 – 44) ^a | 30 (23 – 38) ^c | p ^a =0.031* p ^c =0.024* |
| Sexo - M/F (%) | 31/53 (37/63) | 4/12 (25/75) | 10/15 (40/60) | 0.613 |
| IMC (Kg/m ²) | 24 (22 – 26) | 24 (21 – 27) | 22 (20 – 24) | 0.254 |
| Tempo de diagnóstico (anos) | 18 ± 8 | 23 ± 7 | 22 ± 7 | 0.059 |
| Hipertensão - n°(%) | 46 (55) | 15 (94) ^a | 22 (88) ^b | p ^a =0.004* p ^b =0.002* |
| Dislipidemia - n°(%) | 26 (31) | 8 (50) | 14 (56) ^b | p ^b =0.002* |
| Hipotireoidismo - n°(%) | 14 (17) | 4 (25) | 4 (16) | 0.720 |
| Retinopatia - n°(%) | 30 (36) | 7 (44) | 18 (72) ^b | p ^b <0.001* |
| Neuropatia - n°(%) | 12 (14) | 3 (19) | 4 (16) | 0.805 |
| Tabagismo - n°(%) | 6 (7) | 2 (12) | 3 (12) | 0.559 |
| Biomarcadores no plasma | | | | |
| Albumina (g/dL) | 3.9 (3.7 – 4.0) | 4.0 (3.8 – 4.4) | 3.6 (3.4 – 4.0) ^{bc} | p ^b =0.005* p ^c =0.001* |
| Cistatina C (mg/L) | 0.74 (0.61 – 0.87) | 1.02 (0.87 – 1.48) ^a | 1.59 (1.07 – 2.24) ^{bc} | p ^a <0.001* p ^b <0.001* p ^c <0.001* |
| Creatinina (mg/dL) | 0.69 (0.61 – 0.79) | 0.91 (0.68 – 1.24) ^a | 1.39 (0.85 – 1.80) ^{bc} | p ^a =0.010* p ^b <0.001* p ^c =0.049* |
| FAL (U/L) | 58 (48 – 74) | 68 (57 – 84) | 89 (79 – 128) ^{bc} | p ^b <0.001* p ^c =0.004* |
| GGT (U/L) | 14 (11 – 21) | 30 (14 – 42) ^a | 25 (18 – 50) ^b | p ^a =0.029* p ^b <0.001* |
| Ureia (mg/dL) | 25 (22 – 31) | 38 (29 – 50) ^a | 42 (29 – 59) ^b | p ^a <0.001* p ^b <0.001* |

| Biomarcadores na urina | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|
| RAC (mg/g) | 4.3 (2.6 – 10.9) | 63.5 (42.0 – 133.4) ^a | 1266.2 (691.3 – 2476.6) ^{bc} | p ^a < 0.001* p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |
| RCC (mg/g) | 0.06 (0.03 – 0.09) | 0.06 (0.04 – 0.09) | 0.25 (0.07 – 1.09) ^{bc} | p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |
| RFC (U/g) | 1.5 (0.1 – 3.8) | 3.0 (1.15 – 4.85) | 3.0 (1.3 – 4.9) | 0.074 |
| RGC (U/g) | 1.0 (0.3 – 11.0) | 5.8 (0.8 – 18.2) | 1.1 (0.4 – 21.5) | 0.195 |
| RUC (mg/g) | 14652 (11178 – 17522) | 13752 (10952 – 19342) | 12771 (10420 – 15569) | 0.363 |
| Razão plasma/urina | | | | |
| Albumina | 7045 (2847 – 18500) | 1035 (408 – 1284) ^a | 34 (21 – 63) ^{bc} | p ^a < 0.001* p ^b < 0.001* p ^c < 0.001* |
| Cistatina C | 11.8 (5.0 – 37.2) | 26.2 (9.2 – 52.4) | 4.6 (3.4 – 11.2) ^{bc} | p ^b = 0.004* p ^c = 0.003* |
| Creatinina | 0.006 (0.004 – 0.010) | 0.011 (0.007 – 0.016) ^a | 0.017 (0.009 – 0.049) ^b | p ^a = 0.008* p ^b < 0.001* |
| FAL | 25.5 (14.7 – 54.6) | 36.0 (18.7 – 42.4) | 33.5 (23.4 – 76.0) | 0.312 |
| GGT | 13.2 (1.3 – 29.9) | 3.1 (1.1 – 51.4) | 18.8 (1.9 – 33.3) | 0.571 |
| Ureia | 0.018 (0.013 – 0.027) | 0.032 (0.018 – 0.046) ^a | 0.047 (0.029 – 0.116) ^b | p ^a = 0.001* p ^b < 0.001* |
| TFG (mL/min/1,73m²) | | | | |
| MDRD _{4-IDMS} | 114 (96 – 132) | 74 (60 – 106) ^a | 52 (33 – 93) ^b | p ^a = 0.001* p ^b < 0.001* |
| CKD-EPI _{cre} | 119 (108 – 128) | 86 (66 – 108) ^a | 59 (37 – 107) ^b | p ^a < 0.001* p ^b < 0.001* |
| CKD-EPI _{cis} | 116 (95 – 130) | 74 (49 – 98) ^a | 45 (29 – 80) ^b | p ^a < 0.001* p ^b < 0.001* |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | 111 (93 – 136) | 79 (52 – 94) ^a | 48 (32 – 75) ^b | p ^a < 0.001* p ^b < 0.001* |

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| CKD-EPI _{cre-cis} | 120 (102 – 131) | 81 (58 – 96) ^a | 49 (31 – 91) ^b | p ^a <0.001* p ^b <0.001* |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | 118 (102 – 136) | 80 (60 – 98) ^a | 50 (33 – 86) ^b | p ^a <0.001* p ^b <0.001* |

*Diferença significativa; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama glutamil-transferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular. Variáveis categóricas: expressas como frequência absoluta e relativa (%) e comparadas por teste exato de Fisher. Variável contínua com distribuição paramétrica: expressa como média e desvio padrão e comparada por Anova. Variáveis contínuas com distribuição não paramétrica: expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

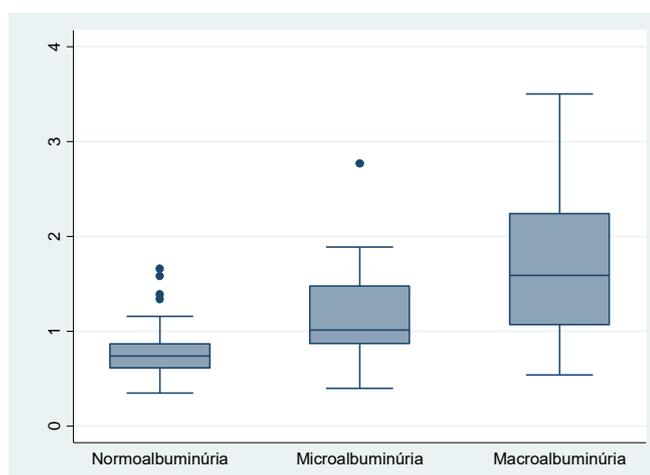
^a p<0.05 para pacientes com microalbuminúria x pacientes com normoalbuminúria.

^b p<0.05 para pacientes com macroalbuminúria x pacientes com normoalbuminúria.

^c p<0.05 para pacientes com macroalbuminúria x pacientes com microalbuminúria.

Quanto aos biomarcadores plasmáticos, a albumina foi significativamente menor e a FAL significativamente maior nos diabéticos com macroalbuminúria em relação aos diabéticos com microalbuminúria e normoalbuminúria. A cistatina C (**Gráfico 3**) e a creatinina foram maiores nos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria do que nos diabéticos com normoalbuminúria, bem como foram maiores nos diabéticos com macroalbuminúria em relação aos diabéticos com microalbuminúria. Já a GGT e a ureia, apenas foram maiores nos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria em relação aos diabéticos com normoalbuminúria.

Gráfico 3 – Cistatina C plasmática conforme o grau de albuminúria



Para os biomarcadores urinários, houve diferença significativa entre os grupos apenas para a RAC e a RCC. A mediana da RAC foi maior no grupo dos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria do que no grupo dos diabéticos com normoalbuminúria, e também foi maior no grupo dos diabéticos com macroalbuminúria em relação aos diabéticos com microalbuminúria. A RCC, por sua vez, apresentou mediana maior nos diabéticos com macroalbuminúria do que nos diabéticos com microalbuminúria e normoalbuminúria.

Quanto às razões plasma/urina, observou-se diferença significativa entre os grupos para a albumina, cistatina C, creatinina e ureia. A razão da albumina apresentou mediana menor nos diabéticos com microalbuminúria do que nos diabéticos com normoalbuminúria, assim como foi menor nos diabéticos com

macroalbuminúria em relação aos diabéticos com microalbuminúria e normoalbuminúria. A razão da cistatina C foi menor nos diabéticos com macroalbuminúria em relação aos diabéticos com microalbuminúria e normoalbuminúria. Já as razões da creatinina e a ureia foram significativamente maiores nos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria em comparação aos diabéticos com normoalbuminúria.

A TFG apresentou diferença significativa entre os três grupos para as 6 equações avaliadas, sendo que em todas as equações os valores da TFG foram menores nos diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria em relação aos pacientes com normoalbuminúria, mas não apresentou diferença significativa entre os diabéticos com microalbuminúria e macroalbuminúria.

6.2 Variações dos biomarcadores plasmáticos, urinários e das razões plasma/urina nos diabéticos conforme as características clínicas

6.2.1 *Variação dos biomarcadores plasmáticos*

Na **Tabela 4** são apresentados a mediana e o intervalo interquartil para cada biomarcador plasmático no grupo dos diabéticos conforme as variáveis clínicas e a comparação entre as categorias dessas variáveis.

Para a variável idade foi observada diferença significativa entre os grupos para a cistatina C, creatinina, GGT e ureia. A cistatina C, a creatinina e a ureia foram maiores nos grupos com idade entre 30 – 44 anos e 45 – 60 anos em comparação ao grupo com idade entre 18 – 29 anos. Já a GGT foi maior no grupo com idade entre 45 – 60 anos em relação aos outros dois grupos. A albumina e a FAL não apresentaram diferença significativa entre as categorias de idade.

Quanto às categorias de sexo, encontrou-se diferença significativa entre os grupos para a albumina, creatinina e FAL, sendo que estes três biomarcadores apresentaram valores mais elevados no sexo masculino. Já a cistatina C, a GGT e a ureia não apresentaram diferença entre homens e mulheres.

Tabela 4 – Variação dos biomarcadores plasmáticos nos diabéticos conforme as características clínicas

| | Albumina (g/dL) | Cistatina C (mg/L) | Creatinina (mg/dL) | FAL (U/L) | GGT (U/L) | Ureia (mg/dL) |
|-----------------------------|-----------------|--|--|--------------|--|--|
| Idade | | | | | | |
| 18 – 29 anos | 3.8 (3.7 – 4.0) | 0.74 (0.54 – 0.95) | 0.68 (0.57 – 0.84) | 67 (52 – 89) | 16 (10 – 21) | 26 (22 – 30) |
| 30 – 44 anos | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.87 (0.70 – 1.07) ^a | 0.77 (0.66 – 0.94) ^a | 61 (49 – 80) | 16 (13 – 29) | 30 (23 – 44) ^a |
| 45 – 60 anos | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.96 (0.83 – 1.39) ^b | 0.78 (0.68 – 1.21) ^b | 76 (48 – 85) | 24 (18 – 42) ^{bc} | 36 (25 – 49) ^b |
| p | 0.605 | p ^a =0.032* p ^b =0.003* | p ^a =0.012* p ^b =0.050* | 0.486 | p ^b =0.006* p ^c =0.050* | p ^a =0.019* p ^b =0.007* |
| Sexo | | | | | | |
| Masculino | 4.0 (3.8 – 4.2) | 0.83 (0.73 – 1.07) | 0.83 (0.71 – 1.21) | 72 (56 – 88) | 18 (13 – 36) | 30 (25 – 40) |
| Feminino | 3.8 (3.6 – 4.0) | 0.84 (0.62 – 1.04) | 0.68 (0.58 – 0.87) | 60 (46 – 82) | 16 (12 – 25) | 26 (22 – 39) |
| p | 0.001* | 0.425 | <0.001* | 0.038* | 0.062 | 0.052 |
| IMC | | | | | | |
| Baixo peso/eutrófico | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.85 (0.68 – 1.13) | 0.76 (0.63 – 0.95) | 67 (50 – 87) | 16 (12 – 28) | 27 (23 – 41) |
| Sobrepeso | 3.8 (3.7 – 4.0) | 0.76 (0.62 – 0.92) | 0.70 (0.60 – 0.89) | 60 (48 – 78) | 18 (13 – 34) | 30 (25 – 38) |
| Obesidade | 3.7 (3.6 – 4.0) | 0.78 (0.72 – 1.13) | 0.74 (0.67 – 0.93) | 73 (54 – 88) | 18 (12 – 25) | 28 (25 – 42) |
| p | 0.517 | 0.553 | 0.792 | 0.442 | 0.639 | 0.860 |
| Tempo de diagnóstico | | | | | | |
| ≤10 anos | 4.0 (3.8 – 4.1) | 0.71 (0.48 – 0.84) | 0.70 (0.57 – 0.79) | 62 (43 – 77) | 15 (12 – 28) | 26 (21 – 30) |
| 11 – 20 anos | 3.8 (3.7 – 4.0) | 0.77 (0.61 – 0.98) | 0.70 (0.61 – 0.88) | 64 (54 – 84) | 16 (12 – 26) | 28 (24 – 36) |
| >20 anos | 3.8 (3.6 – 4.1) | 0.96 (0.79 – 1.36) ^{de} | 0.82 (0.65 – 1.21) ^{de} | 68 (50 – 85) | 19 (13 – 34) | 29 (24 – 50) |
| p | 0.612 | p ^d <0.001* p ^e =0.001* | p ^d =0.022* p ^e =0.050* | 0.572 | 0.653 | 0.251 |
| Tabagismo | | | | | | |
| Não | 3.9 (3.7 – 4.0) | 0.82 (0.67 – 1.02) | 0.72 (0.62 – 0.89) | 64 (50 – 85) | 16 (12 – 25) | 28 (23 – 39) |
| Sim | 3.8 (3.5 – 4.1) | 1.03 (0.83 – 1.64) | 0.83 (0.71 – 1.28) | 72 (61 – 88) | 27 (14 – 56) | 34 (24 – 51) |
| p | 0.736 | 0.134 | 0.155 | 0.418 | 0.051 | 0.252 |

| Hipertensão | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Não | 3.9 (3.7 – 4.0) | 0.70 (0.57 – 0.84) | 0.67 (0.57 – 0.76) | 62 (50 – 77) | 14 (10 – 20) | 25 (23 – 29) |
| Sim | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.93 (0.74 – 1.39) | 0.80 (0.67 – 1.21) | 68 (51 – 88) | 18 (13 – 39) | 30 (24 – 46) |
| p | 0.862 | <0.001* | <0.001* | 0.348 | 0.009* | 0.001* |

| Dislipidemia | | | | | | |
|---------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Não | 3.9 (3.7 – 4.0) | 0.80 (0.60 – 0.91) | 0.69 (0.61 – 0.84) | 61 (50 – 78) | 15 (10 – 22) | 25 (23 – 30) |
| Sim | 3.9 (3.6 – 4.0) | 0.96 (0.76 – 1.48) | 0.84 (0.70 – 1.24) | 74 (52 – 89) | 21 (14 – 42) | 36 (28 – 50) |
| p | 0.919 | <0.001* | <0.001* | 0.163 | 0.002* | <0.001* |

| Hipotireoidismo | | | | | | |
|------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Não | 3.9 (3.7 – 4.0) | 0.83 (0.68 – 1.04) | 0.73 (0.62 – 0.89) | 68 (52 – 85) | 16 (12 – 29) | 28 (23 – 39) |
| Sim | 4.0 (3.6 – 4.1) | 0.90 (0.61 – 1.34) | 0.74 (0.60 – 1.21) | 58 (50 – 85) | 18 (14 – 25) | 29 (23 – 42) |
| p | 0.529 | 0.900 | 0.410 | 0.498 | 0.359 | 0.900 |

| Retinopatia | | | | | | |
|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Não | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.74 (0.57 – 0.87) | 0.69 (0.61 – 0.79) | 60 (50 – 82) | 16 (12 – 22) | 26 (23 – 31) |
| Sim | 3.8 (3.6 – 4.0) | 1.00 (0.78 – 1.66) | 0.86 (0.66 – 1.49) | 73 (50 – 89) | 21 (13 – 42) | 36 (25 – 56) |
| p | 0.572 | <0.001* | <0.001* | 0.152 | 0.066 | <0.001* |

| Neuropatia | | | | | | |
|-------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|--------------|--------------|
| Não | 3.9 (3.7 – 4.1) | 0.83 (0.66 – 1.04) | 0.72 (0.62 – 0.89) | 64 (50 – 83) | 16 (12 – 25) | 28 (23 – 38) |
| Sim | 3.9 (3.5 – 4.0) | 0.93 (0.70 – 1.65) | 0.77 (0.62 – 1.28) | 67 (50 – 92) | 21 (14 – 48) | 30 (25 – 52) |
| p | 0.841 | 0.218 | 0.425 | 0.369 | 0.219 | 0.163 |

*Diferença significativa; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase. Variáveis expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

^a p<0.05 para pacientes com idade entre 30 – 44 anos x pacientes com idade entre 18 – 29 anos.

^b p<0.05 para pacientes com idade entre 45 – 60 anos x pacientes com idade entre 18 – 29 anos.

^c p<0.05 para pacientes com idade entre 45 – 60 anos x pacientes com idade entre 30 – 44 anos.

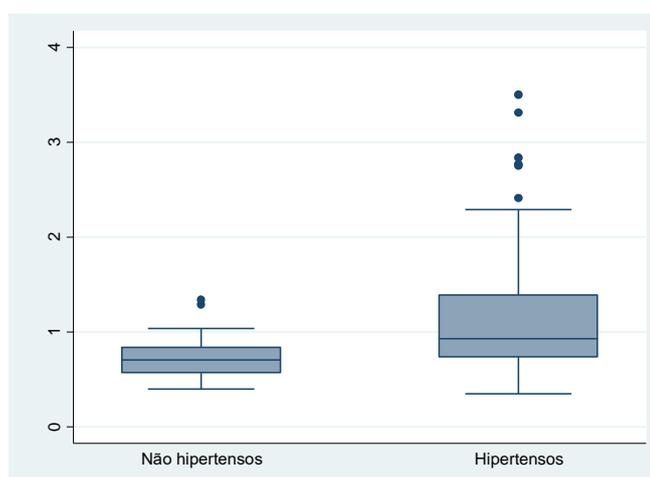
^d p<0.05 para pacientes com tempo de diagnóstico >20 anos x pacientes com tempo de diagnóstico ≤10 anos.

^e p<0.05 para pacientes com tempo de diagnóstico >20 anos x pacientes com tempo de diagnóstico entre 11 – 20 anos.

Para o tempo de diagnóstico do diabetes, apenas a cistatina C e a creatinina apresentaram diferença significativa entre os grupos. Os valores de cistatina C e creatinina foram maiores no grupo com tempo de diagnóstico superior a 20 anos do que nos grupos com tempo de diagnóstico entre 11 – 20 anos e inferior a 10 anos.

Com relação à hipertensão e à dislipidemia, foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a cistatina C (**Gráfico 4**), creatinina, GGT e ureia. Estes quatro biomarcadores apresentaram valores maiores nos grupos com hipertensão e dislipidemia do que nos grupos sem estas co-morbidades do diabetes.

Gráfico 4 – Cistatina C plasmática nos pacientes hipertensos e não hipertensos



Quanto à retinopatia, encontrou-se diferença significativa entre os grupos para a cistatina C, creatinina e ureia, sendo os valores destes marcadores mais elevados no grupo com retinopatia. Para as demais variáveis clínicas – IMC, tabagismo, hipotireoidismo e neuropatia – não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos.

6.2.2 Variação dos biomarcadores urinários

Na **Tabela 5** são apresentados a mediana e o intervalo interquartil para cada biomarcador urinário no grupo dos diabéticos conforme as variáveis clínicas e a comparação entre as categorias dessas variáveis.

Tabela 5 – Variação dos biomarcadores urinários nos diabéticos conforme as características clínicas

| | RAC (mg/g) | RCC (mg/g) | RFC (U/g) | RGC (U/g) | RUC (mg/g) |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|--|--|-----------------------|
| Idade | | | | | |
| 18 – 29 anos | 10.5 (3.2 – 329.3) | 0.08 (0.05 – 0.11) | 1.1 (0 – 4.2) | 1.3 (0.2 – 22.6) | 13803 (10567 – 16355) |
| 30 – 44 anos | 11.8 (3.6 – 48.5) | 0.06 (0.03 – 0.10) | 2.1 (0.9 – 4.1) | 1.1 (0.4 – 11.1) | 13207 (11165 – 17082) |
| 45 – 60 anos | 10.4 (3.9 – 64.6) | 0.07 (0.04 – 0.09) | 3.0 (0.5 – 4.9) | 1.1 (0.5 – 5.4) | 16032 (12788 – 21476) |
| p | 0.964 | 0.206 | 0.207 | 0.950 | 0.149 |
| Sexo | | | | | |
| Masculino | 8.8 (3.2 – 98.7) | 0.07 (0.04 – 0.11) | 1.3 (0.1 – 3.3) | 1.1 (0.4 – 15.8) | 12873 (10348 – 16013) |
| Feminino | 11.8 (3.7 – 63.5) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 2.2 (0.4 – 4.8) | 1.1 (0.3 – 12.0) | 14344 (11496 – 18302) |
| p | 0.505 | 0.658 | 0.096 | 0.521 | 0.050 |
| IMC | | | | | |
| Baixo peso/ eutrófico | 13.6 (3.9 – 129.2) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 2.6 (0.4 – 4.6) | 1.3 (0.5 – 18.0) | 13465 (10578 – 16971) |
| Sobrepeso | 6.8 (3.4 – 41.6) | 0.06 (0.03 – 0.10) | 3.0 (0.5 – 4.9) | 1.2 (0.4 – 4.8) | 14152 (10910 – 18332) |
| Obesidade | 4.6 (2.8 – 24.6) | 0.05 (0.02 – 0.10) | 0.5 (0 – 1.6) ^{ab} | 0.2 (0 – 0.5) ^{ab} | 14652 (12788 – 18097) |
| p | 0.367 | 0.311 | p ^a =0.025* p ^b =0.021* | p ^a =0.002* p ^b =0.008* | 0.417 |
| Tempo de diagnóstico | | | | | |
| ≤10 anos | 8.1 (3.6 – 12.3) | 0.07 (0.03 – 0.10) | 0.4 (0 – 3.5) | 0.6 (0.3 – 5.5) | 13111 (10636 – 19330) |
| 11 – 20 anos | 11.0 (2.8 – 147.5) | 0.08 (0.05 – 0.10) | 1.6 (0.3 – 3.8) | 1.3 (0.4 – 14.2) | 14594 (11204 – 16812) |
| >20 anos | 13.0 (4.2 – 142.5) | 0.06 (0.04 – 0.10) | 2.6 (0.8 – 4.4) | 1.1 (0.3 – 16.2) | 13372 (11178 – 17122) |
| p | 0.261 | 0.456 | 0.057 | 0.592 | 0.918 |
| Tabagismo | | | | | |
| Não | 11.0 (3.4 – 64.6) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 1.8 (0.2 – 4.1) | 1.1 (0.3 – 13.2) | 13959 (11172 – 17272) |
| Sim | 14.3 (3.5 – 1266.2) | 0.07 (0.05 – 0.15) | 3.5 (1.4 – 4.9) | 1.3 (0.7 – 16.9) | 11617 (10344 – 16013) |
| p | 0.511 | 0.350 | 0.097 | 0.518 | 0.320 |

| Hipertensão | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Não | 6.0 (3.1 – 12.7) | 0.06 (0.03 – 0.09) | 1.0 (0 – 3.2) | 0.8 (0.2 – 6.2) | 14570 (11278 – 17879) |
| Sim | 14.4 (3.8 – 340.3) | 0.07 (0.04 – 0.11) | 2.6 (0.4 – 4.6) | 1.2 (0.5 – 16.9) | 13465 (11149 – 16614) |
| p | 0.003* | 0.112 | 0.014* | 0.040* | 0.332 |

| Dislipidemia | | | | | |
|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Não | 9.5 (3.1 – 24.6) | 0.07 (0.04 – 0.09) | 1.4 (0.2 – 3.7) | 1.1 (0.2 – 15.1) | 14128 (11184 – 16971) |
| Sim | 15.0 (4.0 – 655.6) | 0.07 (0.04 – 0.14) | 3.1 (1.0 – 5.0) | 1.1 (0.5 – 9.6) | 13542 (11025 – 18302) |
| p | 0.023* | 0.510 | 0.013* | 0.562 | 0.759 |

| Hipotireoidismo | | | | | |
|------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Não | 10.6 (3.4 – 129.2) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 1.8 (0.3 – 4.1) | 1.1 (0.3 – 15.1) | 14039 (11165 – 17082) |
| Sim | 11.6 (4.1 – 62.4) | 0.07 (0.04 – 0.12) | 2.0 (0.1 – 4.8) | 1.3 (0.4 – 5.5) | 13090 (10885 – 18097) |
| p | 0.597 | 0.535 | 0.651 | 0.969 | 0.719 |

| Retinopatia | | | | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Não | 5.6 (2.7 – 18.5) | 0.06 (0.04 – 0.09) | 1.4 (0.2 – 4.0) | 1.2 (0.3 – 15.1) | 14251 (11522 – 16990) |
| Sim | 16.3 (6.5 – 949.1) | 0.07 (0.04 – 0.19) | 2.6 (0.4 – 4.6) | 1.0 (0.3 – 12.7) | 16990 (10420 – 17551) |
| p | <0.001* | 0.042* | 0.193 | 0.950 | 0.336 |

| Neuropatia | | | | | |
|-------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|-----------------------|
| Não | 10.3 (3.4 – 64.6) | 0.07 (0.04 – 0.10) | 1.8 (0.3 – 3.9) | 1.2 (0.4 – 13.2) | 13742 (11130 – 17082) |
| Sim | 13.6 (6.5 – 147.3) | 0.06 (0.03 – 0.11) | 1.9 (0 – 4.7) | 0.9 (0 – 16.9) | 14363 (12303 – 18507) |
| p | 0.254 | 0.896 | 0.790 | 0.495 | 0.625 |

*Diferença significativa; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão fosfatase alcalina/creatinina; RGC: razão gama-glutamiltransferase/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina. Variáveis expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

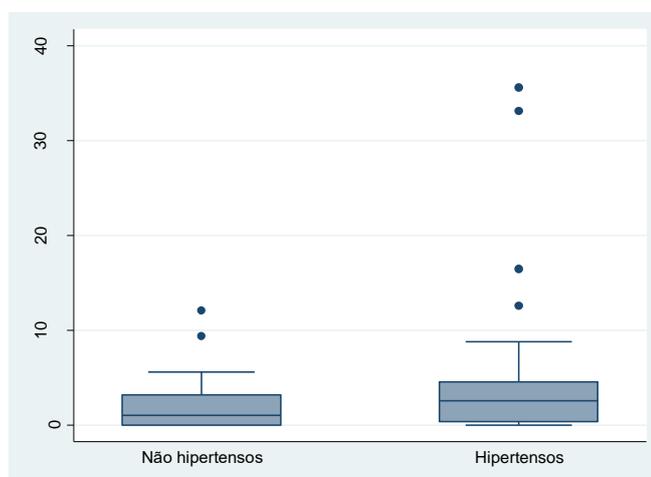
^a p<0.05 para pacientes obesos x pacientes com baixo peso/eutrófico.

^b p<0.05 para pacientes obesos x pacientes com sobrepeso.

Para o IMC, apenas a RFC e a RGC apresentaram diferença significativa entre os grupos, sendo seus valores menores no grupo com obesidade em comparação aos grupos com sobrepeso e baixo peso/eutrófico.

Quanto à hipertensão, foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a RAC, RFC (**Gráfico 5**) e RGC, sendo que para estes três biomarcadores os valores foram maiores no grupo com hipertensão.

Gráfico 5 – RFC nos pacientes hipertensos e não hipertensos



Já para a dislipidemia, a diferença entre os grupos foi significativa apenas para a RAC e a RFC. Os valores destes dois biomarcadores apresentaram-se mais elevados no grupo com dislipidemia.

Para a retinopatia, por sua vez, a diferença foi significativa apenas para a RAC e a RCC, sendo observados valores maiores para o grupo com retinopatia.

No que se refere às demais variáveis clínicas – idade, sexo, tempo de diagnóstico do diabetes, tabagismo, hipotireoidismo e neuropatia – não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados.

6.2.3 Variação das razões plasma/urina

Na **Tabela 6** são apresentados a mediana e o intervalo interquartil para a razão plasma/urina de cada biomarcador no grupo dos diabéticos conforme as variáveis clínicas e a comparação entre as categorias dessas variáveis.

Tabela 6 – Variação das razões plasma/urina nos diabéticos conforme as características clínicas

| | Albumina | Cistatina C | Creatinina | FAL | GGT | Ureia |
|-----------------------------|---------------------|--|--|---------------------|-------------------|--|
| Idade | | | | | | |
| 18 – 29 anos | 2847 (178 – 8333) | 5.6 (3.7 – 24.7) | 0.006 (0.004 – 0.013) | 32.3 (21.2 – 73.7) | 7.5 (1.1 – 31.4) | 0.016 (0.012 – 0.033) |
| 30 – 44 anos | 2739 (1079 – 10857) | 12.1 (5.5 – 40) ^a | 0.009 (0.005 – 0.014) | 31.9 (17.1 – 53.3) | 13.6 (2.0 – 30.8) | 0.021 (0.015 – 0.034) ^a |
| 45 – 60 anos | 3592 (516 – 16818) | 26.6 (9 – 42) ^b | 0.011 (0.006 – 0.016) | 24.8 (15.1 – 31.7) | 15.0 (3.1 – 68.5) | 0.003 (0.018 – 0.042) ^{bc} |
| p | 0.736 | p ^a =0.026* p ^b =0.010* | 0.125 | 0.489 | 0.254 | p ^a =0.049* p ^b =0.024* p ^c =0.022* |
| Sexo | | | | | | |
| Masculino | 3999 (154 – 11840) | 6.6 (4.6 – 34.6) | 0.005 (0.004 – 0.014) | 32.4 (17.1 – 73.7) | 12.2 (1.2 – 40.6) | 0.017 (0.013 – 0.039) |
| Feminino | 2566 (925 – 9189) | 13.4 (5 – 35.1) | 0.009 (0.005 – 0.014) | 28.3 (15.8 – 45.9) | 13.3 (1.5 – 30.2) | 0.022 (0.014 – 0.034) |
| p | 0.893 | 0.330 | 0.319 | 0.679 | 0.983 | 0.446 |
| IMC | | | | | | |
| Baixo peso / eutrófico | 2533 (516 – 7600) | 9.3 (4.1 – 33.8) | 0.008 (0.004 – 0.015) | 28.3 (14.3 – 45.7) | 9.7 (1.3 – 31.3) | 0.002 (0.014 – 0.037) |
| Sobrepeso | 5931 (902 – 10428) | 12.8 (5.0 – 35.8) | 0.009 (0.004 – 0.012) | 31.9 (22.2 – 56.3) | 16.7 (5.0 – 37.5) | 0.019 (0.013 – 0.034) |
| Obesidade | 8327 (1365 – 20000) | 19.3 (6.0 – 69.5) | 0.009 (0.006 – 0.017) | 45.9 (31.9 – 82.1) | 35.2 (6.0 – 70.4) | 0.021 (0.014 – 0.032) |
| p | 0.164 | 0.446 | 0.635 | 0.362 | 0.200 | 0.824 |
| Tempo de diagnóstico | | | | | | |
| ≤10 anos | 3404 (1590 – 5599) | 6.7 (4.9 – 36.4) | 0.004 (0.003 – 0.008) | 26.5 (13.2 – 134.4) | 10.9 (3.1 – 40.5) | 0.015 (0.011 – 0.018) |
| 11 – 20 anos | 2740 (160 – 12262) | 7.8 (4.1 – 28.1) | 0.006 (0.004 – 0.013) | 31.9 (21.4 – 50.6) | 13.4 (1.4 – 31.4) | 0.017 (0.013 – 0.034) |
| >20 anos | 2660 (516 – 10000) | 20.5 (5.5 – 47.7) | 0.010 (0.006 – 0.017) ^{de} | 29.8 (14.3 – 53.3) | 13.0 (1.4 – 36.6) | 0.029 (0.018 – 0.040) ^{de} |
| p | 0.844 | 0.137 | p ^d =0.001* p ^e =0.024* | 0.604 | 0.877 | p ^d =0.001* p ^e =0.005* |
| Tabagismo | | | | | | |
| Não | 2793 (808 – 11618) | 10.5 (4.8 – 38.1) | 0.008 (0.004 – 0.014) | 31.3 (16.0 – 56.3) | 13.1 (1.4 – 32.3) | 0.020 (0.013 – 0.034) |

| | | | | | | |
|----------|------------------|------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Sim | 4141 (56 – 7600) | 6.6 (4.0 – 27.1) | 0.010 (0.004 – 0.025) | 31.7 (17.1 – 36.2) | 15.9 (6.0 – 37.5) | 0.027 (0.016 – 0.045) |
| p | 0.664 | 0.438 | 0.484 | 0.556 | 0.481 | 0.253 |

Hipertensão

| | | | | | | |
|----------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Não | 5481 (2394 – 11240) | 8.4 (4.9 – 38.8) | 0.005 (0.004 – 0.010) | 34.3 (18.7 – 74.4) | 13.4 (1.3 – 39.1) | 0.014 (0.011 – 0.020) |
| Sim | 1743 (141 – 11613) | 11.7 (4.6 – 33.8) | 0.010 (0.005 – 0.017) | 30.6 (16.0 – 44.8) | 12.7 (1.5 – 31.4) | 0.027 (0.016 – 0.040) |
| p | 0.023* | 0.853 | 0.001* | 0.420 | 0.995 | <0.001* |

Dislipidemia

| | | | | | | |
|----------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Não | 3578 (1079 – 11622) | 8.6 (4.8 – 32.3) | 0.007 (0.004 – 0.013) | 34.1 (16.0 – 70.4) | 9.7 (1.1 – 29.1) | 0.018 (0.013 – 0.030) |
| Sim | 1650 (91 – 9082) | 12.6 (4.1 – 39.0) | 0.010 (0.004 – 0.018) | 28.4 (17.1 – 36.2) | 19.4 (3.1 – 40.7) | 0.031 (0.016 – 0.043) |
| p | 0.071 | 0.554 | 0.039* | 0.354 | 0.024* | 0.003* |

Hipotireoidismo

| | | | | | | |
|----------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Não | 3578 (516 – 11622) | 9.5 (4.8 – 36.3) | 0.008 (0.004 – 0.016) | 31.7 (18.7 – 54.0) | 13.1 (1.4 – 32.3) | 0.019 (0.013 – 0.034) |
| Sim | 2412 (692 – 7193) | 11.8 (4.8 – 34.6) | 0.010 (0.005 – 0.013) | 25.9 (15.1 – 70.4) | 13.4 (1.7 – 37.5) | 0.028 (0.016 – 0.034) |
| p | 0.582 | 0.652 | 0.891 | 0.753 | 0.780 | 0.570 |

Retinopatia

| | | | | | | |
|----------|---------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Não | 5481 (1340 – 17659) | 10.4 (4.9 – 34.6) | 0.006 (0.004 – 0.011) | 31.9 (18.7 – 63.6) | 12.9 (1.3 – 31.9) | 0.017 (0.013 – 0.029) |
| Sim | 1667 (56 – 5233) | 9.8 (4.2 – 53.1) | 0.011 (0.005 – 0.025) | 28.4 (15.1 – 44.1) | 17.4 (1.6 – 38.3) | 0.031 (0.016 – 0.060) |
| p | 0.001* | 0.848 | 0.001* | 0.476 | 0.453 | <0.001* |

Neuropatia

| | | | | | | |
|----------|--------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Não | 3585 (604 – 11840) | 9.4 (4.8 – 34.6) | 0.008 (0.004 – 0.014) | 31.2 (15.7 – 55.3) | 13.2 (1.5 – 31.4) | 0.020 (0.014 – 0.034) |
| Sim | 2436 (509 – 9189) | 15.9 (5.0 – 95.7) | 0.010 (0.005 – 0.042) | 31.6 (22.1 – 42.4) | 16.8 (1.2 – 39.1) | 0.025 (0.013 – 0.116) |
| p | 0.431 | 0.229 | 0.251 | 0.860 | 0.799 | 0.429 |

*Diferença significativa; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase. Variáveis expressas como mediana e intervalo interquartil e comparadas por Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney.

^a p<0.05 idade entre 30 – 44 anos x idade entre 18 – 29 anos.

^b p<0.05 idade entre 45 – 60 anos x idade entre 18 – 29 anos.

^c p<0.05 idade entre 45 – 60 anos x idade entre 30 – 44 anos.

^d p<0.05 tempo de diagnóstico >20 anos x tempo de diagnóstico ≤10 anos.

^e p<0.05 tempo de diagnóstico >20 anos x tempo de diagnóstico entre 11 – 20 anos.

Para a variável idade, apenas a razão plasma/urina da cistatina C e da ureia foram significativamente diferentes entre os grupos. A razão plasma/urina da cistatina C foi maior no grupo com idade entre 30 – 44 anos e 45 – 60 anos em comparação ao grupo com idade entre 18 – 29 anos. Já a razão plasma/urina da ureia apresentou valores maiores para o grupo com idade entre 30 – 44 anos em relação ao grupo com idade entre 18 – 29 anos, e valores menores para o grupo com idade entre 45 – 60 anos em relação aos outros dois grupos.

Quanto ao tempo de diagnóstico, foram observadas diferenças significativas entre os grupos somente para a razão plasma/urina da creatinina e da ureia, sendo encontrados valores mais elevados para a razão plasma/urina desses dois biomarcadores no grupo com tempo de diagnóstico superior a 20 anos em comparação aos outros dois grupos.

Para a hipertensão e a retinopatia, foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para a razão plasma/urina da albumina, creatinina e ureia. A razão plasma/urina da creatinina e da ureia apresentaram valores maiores para os grupos com hipertensão e com retinopatia, ao passo que a razão plasma/urina da albumina apresentou valor maior para os grupos sem hipertensão e sem retinopatia.

No caso da dislipidemia, observou-se diferença significativa entre os grupos para as razões plasma/urina da creatinina, GGT e ureia, sendo encontrados valores mais elevadas dessas razões no grupo com dislipidemia.

Quanto às demais variáveis clínicas – sexo, IMC, tabagismo, hipotireoidismo e neuropatia – não houve diferença significativa entre os grupos.

6.3 Correlações entre os biomarcadores plasmáticos, urinários, razões plasma/urina e TFG estimada por diferentes equações

6.3.1 Correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG

Na **Tabela 7** são apresentados os coeficientes de correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os outros biomarcadores e com a TFG. Não foram reportados os coeficientes entre os biomarcadores plasmáticos e suas

próprias razões plasma/urina e destes biomarcadores com as equações que o consideram na fórmula, uma vez que já se espera uma correlação forte.

Tabela 7 – Coeficientes de correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG

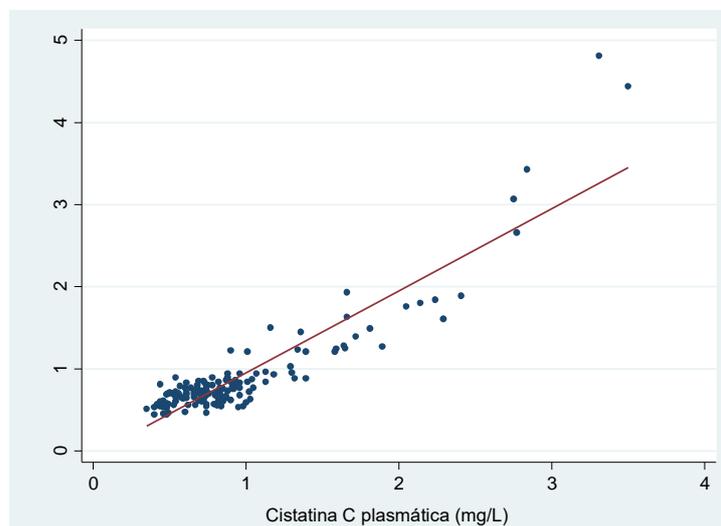
| | Albumina | Cistatina C | Creatinina | Ureia | FAL | GGT |
|----------------------------------|----------|-------------|------------|----------|----------|----------|
| Biomarcadores plasmáticos | | | | | | |
| Albumina | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Cistatina C | 0.154 | --- | --- | --- | --- | --- |
| Creatinina | 0.261* | 0.728** | --- | --- | --- | --- |
| Ureia | 0.189* | 0.602** | 0.670** | --- | --- | --- |
| FAL | 0.073 | 0.398** | 0.287* | 0.358** | --- | --- |
| GGT | 0.062 | 0.340** | 0.353** | 0.340** | 0.323** | --- |
| Biomarcadores urinários | | | | | | |
| RAC | -0.078 | 0.534** | 0.410** | 0.454** | 0.415** | 0.284* |
| RCC | -0.164 | 0.147 | 0.112 | 0.148 | 0.242* | 0.079 |
| RUC | -0.134 | -0.052 | -0.160 | 0.207* | -0.110 | -0.176* |
| RFC | -0.056 | 0.166 | 0.086 | 0.083 | 0.158 | 0.095 |
| RGC | 0.041 | 0.035 | 0.065 | -0.007 | 0.126 | -0.054 |
| Razão plasma/urina | | | | | | |
| Albumina | --- | -0.519** | -0.476** | -0.453** | -0.471** | -0.390** |
| Cistatina C | 0.138 | --- | 0.002 | 0.060 | -0.178 | -0.095 |
| Creatinina | -0.018 | 0.597** | --- | 0.546** | 0.180 | 0.125 |
| Ureia | 0.059 | 0.679** | 0.612** | --- | 0.200 | 0.185 |
| FAL | -0.054 | 0.100 | 0.156 | 0.129 | --- | 0.057 |
| GGT | 0.052 | 0.164 | 0.128 | 0.308* | 0.046 | --- |
| TFG | | | | | | |
| MDRD4-IDMS | -0.109 | -0.744** | --- | -0.662** | -0.192* | -0.273* |
| CKD-EPI _{cre} | -0.105 | -0.753** | --- | -0.677** | -0.204* | -0.329** |
| CKD-EPI _{cis} | -0.113 | --- | -0.698** | -0.596** | -0.348** | -0.327** |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | -0.155 | --- | -0.728** | -0.602** | -0.398** | -0.340** |
| CKD-EPI _{cre-cis} | -0.125 | --- | --- | -0.645** | -0.310** | -0.329** |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | -0.147 | --- | --- | -0.647** | -0.312** | -0.327** |

*p<0.05; **p<0.001; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamyltransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular. Análise de correlação: Spearman.

A cistatina C apresentou forte correlação positiva com a creatinina (**Gráfico 6**) e forte correlação negativa com a TFG estimada pela MDRD_{4-IDMS} e pela CKD-EPI_{cre}. Sua correlação com a ureia, FAL, GGT, RAC e com as razões plasma/urina da creatinina e ureia foi moderada e positiva, ao passo que sua

correlação com a razão plasma/urina da albumina foi moderada e negativa. Com os demais biomarcadores, a cistatina C não apresentou correlação.

Gráfico 6 – Correlação entre a cistatina C e a creatinina plasmática



A creatinina apresentou uma forte correlação positiva com a cistatina C e uma forte correlação negativa com a TFG estimada pela equação de Tan *et al.* (2002). Com a ureia, GGT, RAC e com a razão plasma/urina da ureia sua correlação foi moderada e positiva. Já com a razão plasma/urina da albumina e com a TFG estimada pela CKD-EPI_{cr}, sua correlação foi moderada e negativa. Com a FAL, a correlação da creatinina foi fraca, e com os demais biomarcadores não houve correlação.

Para a ureia, verificou-se que sua correlação foi moderada e positiva com a cistatina C, creatinina, FAL, GGT, RAC e razões plasma/urina da creatinina e GGT. Com a razão plasma/urina da albumina e com a TFG estimada pelas 6 equações, sua correlação foi moderada e negativa. Com a RUC, a ureia apresentou uma correlação fraca. Com os biomarcadores restantes não houve correlação.

A FAL apresentou uma correlação moderada e positiva com a cistatina C, ureia, GGT e RAC. Já com a razão plasma/urina da albumina e com a TFG estimada pelas equações, com exceção da MDRD_{4-IDMS} e da CKD-EPI_{cr}, a FAL apresentou uma correlação moderada e negativa. Já com a RCC e com a TFG estimada pela MDRD_{4-IDMS} e pela CKD-EPI_{cr}, sua correlação foi fraca. Com os demais biomarcadores não houve correlação.

Quanto à GGT, sua correlação foi moderada e positiva com a cistatina C, creatinina, ureia e FAL. Com a razão plasma/urina da albumina e com a TFG estimada pelas equações, com exceção da $MDRD_{4-IDMS}$, sua correlação foi moderada e negativa. Com a TFG estimada pela $MDRD_{4-IDMS}$, a GGT apresentou correlação fraca, e com os demais biomarcadores não houve correlação.

A albumina apresentou correlação fraca e positiva com a ureia e a creatinina. Já com os demais biomarcadores e com a TFG não houve correlação.

6.3.2 Correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG

Na **Tabela 8** são apresentados os coeficientes de correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG. Como no tópico anterior, não foram reportados os coeficientes dos biomarcadores urinários com suas próprias razões plasma/urina, e os coeficientes entre a RCC e as equações que contêm a cistatina C.

A RAC apresentou uma correlação moderada e positiva com a RCC e com a razão plasma/urina da ureia. Com a TFG estimada pelas 6 equações, sua correlação foi moderada negativa. Já com a RFC e razão plasma/urina da cistatina C, sua correlação foi fraca. Com os demais biomarcadores não houve correlação.

A RCC apresentou uma correlação moderada e positiva com a RAC e uma correlação moderada e negativa com a razão plasma/urina da albumina. Já com a RUC, RFC, RGC e com a razão plasma/urina da ureia, a RCC apresentou correlação fraca. Com os biomarcadores restantes e com a TFG estimada pela $MDRD_{4-IDMS}$ e pela $CKD-EPI_{cre}$, não houve correlação.

A RUC apresentou uma correlação moderada e positiva com a razão plasma/urina da albumina e da cistatina C. Com a RCC, sua correlação foi fraca. Já com outros biomarcadores e com a TFG, a RUC não apresentou correlação.

Quanto à RFC, sua correlação com a RGC e com razão plasma/urina da ureia foi moderada e positiva, ao passo que com a razão plasma/urina da GGT foi moderada e negativa. Já com a RAC, RCC e com a TFG, com exceção da TFG estimada pela equação de Tan *et al.* (2002), sua correlação fraca. Com os demais biomarcadores e com a TFG estimada pela equação de Tan *et al.* (2002), a RFC não apresentou correlação.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG

| | RAC | RCC | RUC | RFC | RGC |
|--------------------------------|----------|----------|---------|----------|---------|
| Biomarcadores urinários | | | | | |
| RAC | --- | --- | --- | --- | --- |
| RCC | 0.429** | --- | --- | --- | --- |
| RUC | -0.132 | -0.231* | --- | --- | --- |
| RFC | 0.254* | 0.231* | 0.067 | --- | --- |
| RGC | 0.168 | 0.273* | 0.029 | 0.529** | --- |
| Razão plasma/urina | | | | | |
| Albumina | --- | -0.547** | 0.347** | -0.066 | -0.007 |
| Cistatina C | -0.276* | --- | 0.473** | 0.035 | -0.103 |
| Creatinina | --- | --- | --- | --- | --- |
| Ureia | 0.414** | 0.106* | --- | 0.417** | 0.309* |
| FAL | 0.013 | -0.172 | 0.133 | --- | -0.321* |
| GGT | 0.093 | -0.167 | 0.080 | -0.333** | --- |
| TFG | | | | | |
| MDRD4-IDMS | -0.431** | -0.094 | 0.026 | -0.219* | -0.045 |
| CKD-EPIcre | -0.440** | -0.098 | -0.001 | -0.256* | -0.068 |
| CKD-EPIcis | -0.514** | --- | 0.022 | -0.195* | -0.027 |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | -0.535** | --- | 0.054 | -0.166 | -0.035 |
| CKD-EPIcre-cis | -0.492** | --- | 0.003 | -0.209* | -0.047 |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | -0.486** | --- | 0.043 | -0.186* | -0.042 |

*p<0.05; **p<0.001; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina; TFG: taxa de filtração glomerular. Análise de correlação: Spearman.

Para a RGC, foi observada uma correlação moderada negativa com a razão plasma/urina da FAL. Já com a razão plasma/urina da ureia, sua correlação foi moderada e positiva, e com a RCC foi fraca. Com os outros biomarcadores e com a TFG estimada pelas 6 equações, a RGC não apresentou correlação.

6.3.3 Correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG

Na **Tabela 9** são apresentados os coeficientes de correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG. Apenas não foram reportados os coeficientes entre as razões plasma/urina da cistatina C e da creatinina com as equações da TFG que as contêm.

Tabela 09 – Coeficientes de correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG

| | Razão Albumina | Razão Cistatina C | Razão Creatinina | Razão Ureia | Razão FAL | Razão GGT |
|-----------------------------|----------------|-------------------|------------------|-------------|-----------|-----------|
| Razão plasma/urina | | | | | | |
| Albumina | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Cistatina C | 0.448** | --- | --- | --- | --- | --- |
| Creatinina | -0.073 | 0.425** | --- | --- | --- | --- |
| Ureia | -0.201* | 0.326* | 0.933** | --- | --- | --- |
| FAL | 0.017 | 0.222* | 0.224* | 0.114 | --- | --- |
| GGT | -0.094 | 0.223* | 0.059 | 0.059 | 0.418** | --- |
| TFG | | | | | | |
| MDRD4-IDMS | 0.335** | -0.139 | --- | -0.683** | -0.131 | -0.139 |
| CKD-EPI _{cre} | 0.336** | -0.154 | --- | -0.679** | -0.089 | -0.171 |
| CKD-EPI _{cis} | 0.413** | --- | -0.627** | -0.679** | -0.104 | -0.144 |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | 0.449** | --- | -0.600** | -0.688** | -0.122 | -0.132 |
| CKD-EPI _{cre-cis} | 0.389** | --- | --- | -0.664** | -0.108 | -0.143 |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | 0.394** | --- | --- | -0.692** | -0.106 | -0.128 |

*p<0.05; **p<0.001; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamiltransferase; TFG: taxa de filtração glomerular. Análise de correlação: Spearman.

A razão plasma/urina da albumina apresentou uma correlação moderada positiva com a razão plasma/urina da cistatina C e com a TFG estimada pelas 6 equações. Com a razão plasma/urina da ureia, sua correlação foi fraca e negativa. E com as demais razões, não apresentou correlação.

A razão plasma/urina da cistatina C apresentou uma correlação moderada positiva com a razão plasma/urina da albumina, creatinina e ureia. Com a razão da FAL e GGT, sua correlação foi fraca e positiva, e com a TFG estimada pelas equações MDRD_{4-IDMS} e CKD-EPI_{cre}, não apresentou correlação.

Para a razão plasma/urina da creatinina, sua correlação foi forte e positiva com a razão da ureia, e moderada e positiva com a razão da cistatina C. Com a TFG estimada pelas equações de Tan *et al.* (2002) e pela CKD-EPI_{cis}, sua correlação foi moderada e negativa. Já com a razão da FAL, sua correlação foi fraca e positiva, e com a razão da GGT e da albumina não apresentou correlação.

Quanto à razão plasma/urina da ureia, sua correlação foi forte e positiva com a razão da creatinina, moderada e positiva com razão da cistatina C e fraca negativa com a razão da albumina. Com a TFG estimada pelas 6 equações, sua correlação foi moderada e negativa. Já com as razões da FAL e da GGT, não houve correlação.

Para a razão plasma/urina da FAL, sua correlação foi moderada e positiva com a razão da GGT e fraca positiva com as razões da cistatina C e creatinina. Já com a razão da albumina e com a TFG estimada pelas 6 equações, não apresentou correlação.

A razão plasma/urina da GGT apresentou correlação moderada e positiva com a razão da FAL e correlação fraca positiva com a razão da cistatina C. Com as demais razões e com a TFG estimada pelas 6 equações, não apresentou correlação.

6.3.4 Correlação entre diferentes equações da TFG

Na **Tabela 10** são apresentados os coeficientes de correlação entre 6 equações empregadas para a estimativa da TFG. Conforme os resultados, todas as equações avaliadas apresentaram uma correlação forte e positiva entre si.

Tabela 10 – Coeficientes de correlação entre diferentes equações da TFG

| | MDRD4-IDMS | CKD-EPIcre | CKD-EPIcis | Tan <i>et al.</i> (2002) | CKD-EPIcre-cis |
|-----------------------------|------------|------------|------------|--------------------------|----------------|
| MDRD4-IDMS | --- | --- | --- | --- | --- |
| CKD-EPIcre | 0.969** | --- | --- | --- | --- |
| CKD-EPIcis | 0.791** | 0.803** | --- | --- | --- |
| Tan <i>et al.</i> (2002) | 0.744** | 0.753** | 0.983** | --- | --- |
| CKD-EPIcre-cis | 0.886** | 0.990** | 0.977** | 0.949** | --- |
| Tidman <i>et al.</i> (2008) | 0.897** | 0.896** | 0.962** | 0.946** | 0.989** |

**p<0.001; TFG: taxa de filtração glomerular. Análise de correlação: Spearman.

6.4 Desempenho diagnóstico dos biomarcadores

6.4.1 Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1

Na **Tabela 11** são apresentados os valores da AUC de cada biomarcador plasmático, urinário e razão plasma/urina referente aos seus desempenhos no diagnóstico da ND em pacientes com DM1, quando comparados aos pacientes sem ND. Também são apresentados os valores de especificidade e sensibilidade correspondente ao melhor cutoff de cada biomarcador.

Tabela 11 – Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1

| | AUC | Cutoff | Especificidade (%) | Sensibilidade (%) |
|--------------------------------|------------------------|--------|--------------------|-------------------|
| Biomarcadores no plasma | | | | |
| Cistatina C (mg/L) | 0.884 | 1,05 | 99 | 69 |
| Ureia (mg/dL) | 0.825 ^a | 40 | 94 | 58 |
| Creatinina (mg/dL) | 0.818 ^{ab} | 0,93 | 96 | 64 |
| FAL (U/L) | 0.758 ^{bc} | 79 | 82 | 60 |
| GGT (U/L) | 0.717 ^{cd} | 24 | 80 | 56 |
| Albumina (g/dL) | 0.477 | 4,2 | 90 | 22 |
| Biomarcadores na urina | | | | |
| RAC (mg/g) | 0.967 ^a | 28,2 | 100 | 93 |
| RCC (mg/g) | 0.715 ^{bcde} | 0,15 | 100 | 38 |
| RFC (U/g) | 0.616 ^{ef} | 5,8 | 92 | 18 |
| RGC (U/g) | 0.587 ^{eg} | 52 | 99 | 7 |
| RUC (mg/g) | 0.440 | 21712 | 96 | 11 |
| Razão plasma/urina | | | | |
| Ureia | 0.801 ^{bcdef} | 0,03 | 83 | 69 |
| Creatinina | 0.746 ^{bcdef} | 0,025 | 98 | 31 |
| FAL | 0.567 ^{fgh} | 382,2 | 98 | 10 |
| GGT | 0.529 ^{ghi} | 105,4 | 94 | 12 |
| Cistatina C | 0.435 | 870 | 100 | 0 |
| Albumina | 0.053 | 390000 | 100 | 0 |

AUC: área sob a curva; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina.

^a p>0.05 entre o biomarcador x cistatina C.

^f p>0.05 entre o biomarcador x RCC

^b p>0.05 entre o biomarcador x ureia.

^g p>0.05 entre o biomarcador x RFC.

^c p>0.05 entre o biomarcador x creatinina.

^h p>0.05 entre o biomarcador x RGC.

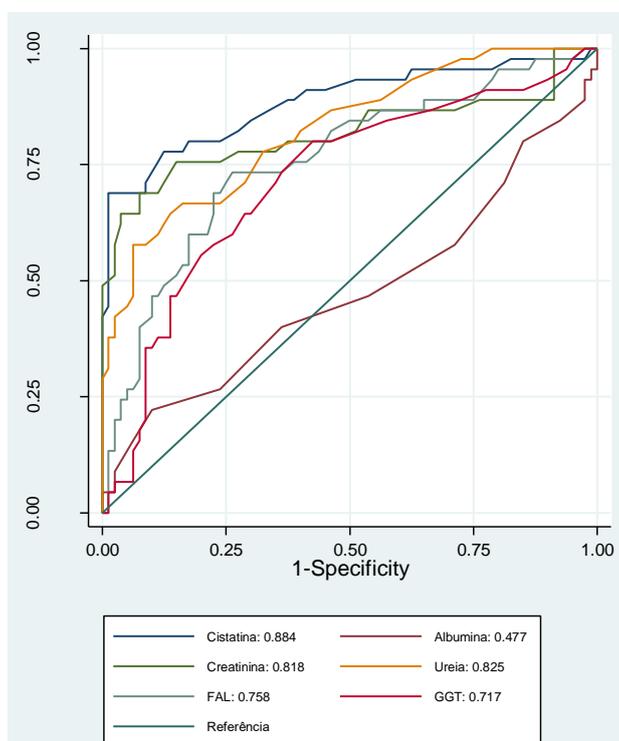
^d p>0.05 entre o biomarcador x FAL.

ⁱ p>0.05 entre o biomarcador x razão plasma/urina da FAL.

^e p>0.05 entre o biomarcador x GGT.

No grupo dos biomarcadores plasmáticos (**Gráfico 7**), a cistatina C, ureia, creatinina, FAL e GGT apresentaram acurácia moderada para o diagnóstico da ND nos pacientes com DM1, ao passo que a albumina foi incapaz de discriminar os diabéticos entre aqueles com e sem ND.

Gráfico 7 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos no diagnóstico da ND em pacientes com DM1



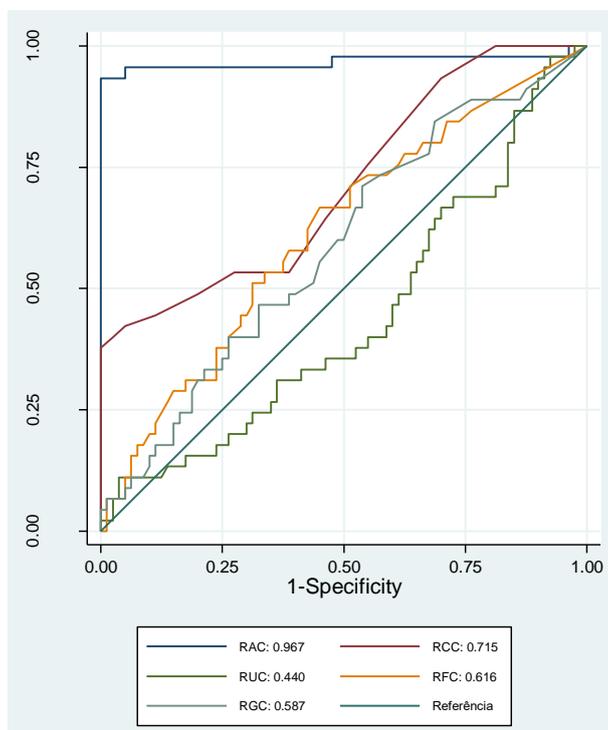
Comparando-se as AUC, verifica-se que a cistatina C, a ureia e a creatinina apresentaram desempenho semelhante no diagnóstico da ND, assim como a FAL e a GGT foram semelhantes entre si. Além disso, não houve diferença significativa entre ureia e FAL, creatinina e FAL, e creatinina e GGT.

Ainda no grupo dos biomarcadores plasmáticos, a cistatina C com um cutoff de 1,05 mg/L, apresentou os maiores valores de especificidade e sensibilidade, sendo sua especificidade superior à sensibilidade.

No grupo dos biomarcadores urinários (**Gráfico 8**), a RAC apresentou alta acurácia no diagnóstico da ND, a RCC apresentou acurácia moderada, a RFC e a RGC demonstraram baixa acurácia e a RUC foi incapaz de discriminar os diabéticos entre aqueles com ND e sem ND.

Conforme a AUC, a RAC apresentou desempenho superior aos demais biomarcadores urinários, no entanto, seu desempenho foi semelhante ao da cistatina C plasmática. A RCC, por sua vez, apresentou desempenho semelhante à RFC e aos biomarcadores plasmáticos ureia, creatinina, FAL e GGT. A RFC e a RGC apresentaram desempenho semelhante entre si e à GGT plasmática.

Gráfico 8 – Desempenho dos biomarcadores urinários no diagnóstico da ND em pacientes com DM1

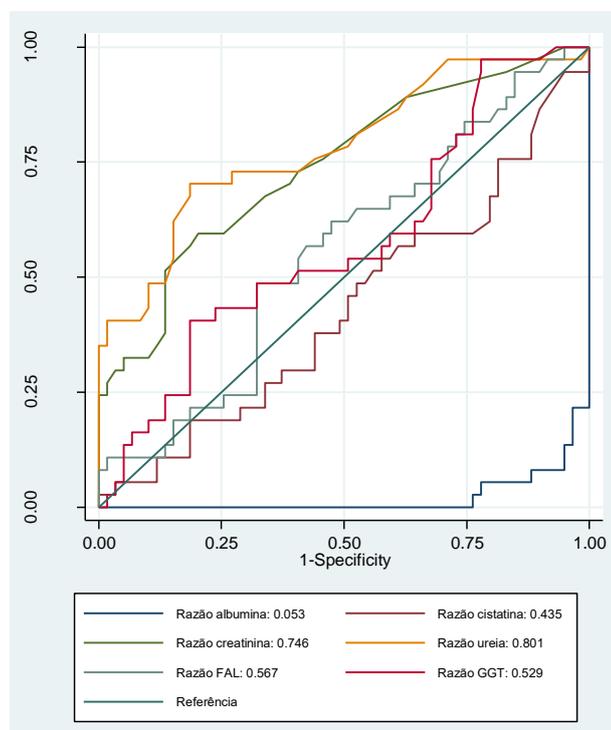


Quanto à especificidade e à sensibilidade, tanto a RAC quanto a RCC apresentaram especificidade de 100%, mas a sensibilidade da RAC foi quase três vezes superior à da RCC. A RFC e a RGC também apresentaram especificidade elevada (acima de 90%), porém sensibilidade bem reduzida (abaixo de 20%).

No grupo das razões plasma/urina (**Gráfico 9**), as razões da ureia e da creatinina apresentaram acurácia moderada no diagnóstico da ND, enquanto as razões da FAL e da GGT demonstraram baixa acurácia. Já as razões da cistatina C e da albumina foram incapazes de discriminar os diabéticos entre aqueles com e sem ND.

De acordo com a AUC, no grupo das razões plasma/urina, a razão da ureia apresentou o melhor desempenho seguido pela razão da creatinina, porém, ambas razões foram semelhantes à ureia, creatinina, FAL, GGT e à RCC. As razões plasma/urina da FAL e da GGT também foram semelhantes entre si, bem como à RFC e à RGC; a razão da FAL ainda foi semelhante à RCC.

Gráfico 9 – Desempenho das razões plasma/urina no diagnóstico da ND em pacientes com DM1



No que se refere à especificidade e sensibilidade, apresentaram as melhores combinações de valores em ordem decrescente: razão plasma/urina da ureia, creatinina, FAL e GGT.

6.4.2 Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1

Na **Tabela 12** são apresentados os valores da AUC de cada biomarcador plasmático, urinário e razão plasma/urina referente aos seus desempenhos na detecção da macroalbuminúria nos pacientes com DM1, quando comparados ao grupo de pacientes com DM1 e normo/microalbuminúria. Também são apresentados os valores de sensibilidade e especificidade correspondente ao melhor cutoff de cada biomarcador.

No grupo dos biomarcadores plasmáticos (**Gráfico 10**), com exceção da albumina, todos apresentaram acurácia moderada na identificação da macroalbuminúria. Além disso, conforme a AUC, os desempenhos desses biomarcadores com acurácia moderada foram semelhantes entre si. Já a albumina

não foi capaz de discriminar entre os pacientes com macroalbuminúria e aqueles com normo/microalbuminúria.

Tabela 12 – Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1

| | AUC | Cutoff | Especificidade (%) | Sensibilidade (%) |
|--------------------------------|--------------------------|--------|--------------------|-------------------|
| Biomarcadores no plasma | | | | |
| Cistatina C (mg/L) | 0.842 | 1,66 | 97 | 48 |
| FAL (U/L) | 0.826 ^a | 89 | 91 | 60 |
| Creatinina (mg/dL) | 0.801 ^{ab} | 1,39 | 97 | 52 |
| Ureia (mg/dL) | 0.781 ^{abc} | 53 | 95 | 44 |
| GGT (U/L) | 0.712 ^{abcd} | 119 | 99 | 8 |
| Albumina (g/dL) | 0.300 | 5.0 | 100 | 0 |
| Biomarcadores na urina | | | | |
| RAC (mg/g) | 1.000 | 329,3 | 100 | 100 |
| RCC (mg/g) | 0.840 ^{abcde} | 0,19 | 99 | 60 |
| RFC (U/g) | 0.619 ^e | 16,5 | 99 | 8 |
| RGC (U/g) | 0.557 ^{eg} | 75,4 | 100 | 8 |
| RUC (mg/g) | 0.404 | 29774 | 100 | 0 |
| Razão plasma/urina | | | | |
| Ureia | 0.762 ^{abcdef} | 0,061 | 97 | 44 |
| Creatinina | 0.725 ^{bcdetgi} | 0,048 | 99 | 32 |
| FAL | 0.595 ^{eghij} | 382,2 | 97 | 13 |
| GGT | 0.567 ^{ghijl} | 5600 | 100 | 0 |
| Cistatina C | 0.292 | 870 | 100 | 0 |
| Albumina | 0.002 | 2262 | 100 | 0 |

AUC: área sob a curva; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamilttransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina.

^a p>0.05 entre o biomarcador x cistatina C.

^h p>0.05 entre o biomarcador x RGC.

^b p>0.05 entre o biomarcador x FAL.

ⁱ p>0.05 entre o biomarcador x razão plasma/urina da ureia.

^c p>0.05 entre o biomarcador x creatinina.

^j p>0.05 entre o biomarcador x razão plasma/urina da creatinina.

^d p>0.05 entre o biomarcador x ureia.

^e p>0.05 entre o biomarcador x GGT.

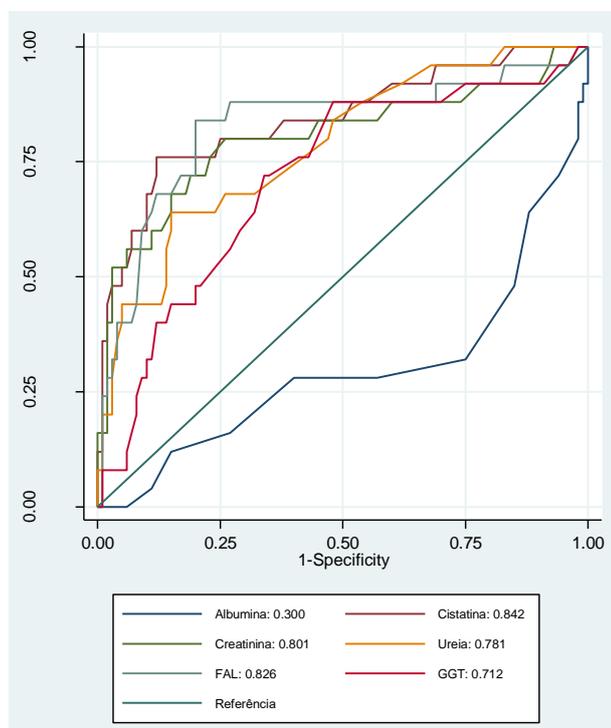
^f p>0.05 entre o biomarcador x RCC.

^l p>0.05 entre o biomarcador x razão plasma/urina da FAL.

^g p>0.05 entre o biomarcador x RFC.

Quanto à especificidade e à sensibilidade, apresentaram as melhores combinações de valores em ordem decrescente: FAL, creatinina, cistatina C ureia e GGT.

Gráfico 10 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1

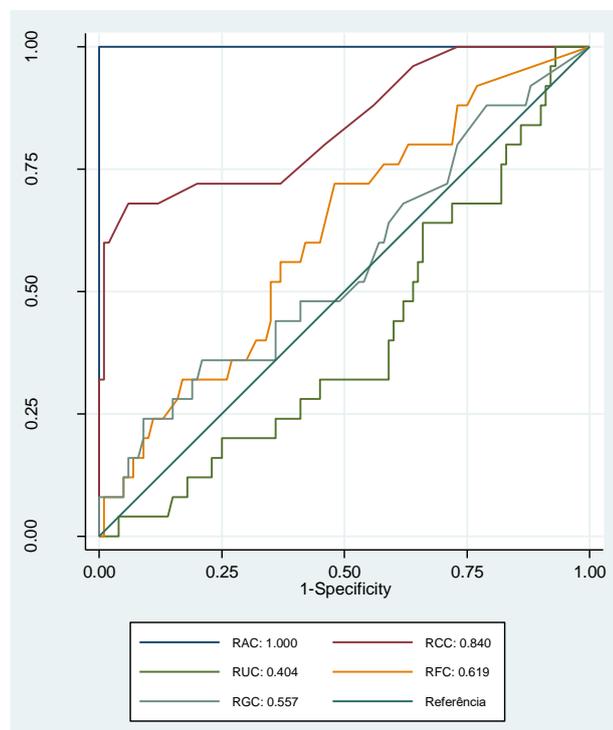


No grupo dos biomarcadores urinários (**Gráfico 11**), a RAC apresentou acurácia perfeita na detecção dos diabéticos com macroalbuminúria, com especificidade e sensibilidade de 100% para um cutoff de 329,3 mg/g. Já a RCC apresentou acurácia moderada e a RFC e a RGC apresentaram baixa acurácia. A RUC, por sua vez, não foi capaz de discriminar os diabéticos com macroalbuminúria daqueles com normo/microalbuminúria.

De acordo com a AUC, o desempenho da RAC foi superior aos demais biomarcadores urinários, bem como a todos os biomarcadores plasmáticos e às razões plasma/urina. A RCC, por sua vez, apresentou desempenho superior à RFC e à RGC, e desempenho semelhante aos biomarcadores plasmáticos. Já a RFC e a RGC apresentaram desempenho semelhante entre si e foram semelhantes à GGT plasmática.

Abaixo da RAC, a melhor combinação de valores de especificidade e sensibilidade foi apresentada pela RCC. Já a RFC e a RGC, apesar de possuírem alta especificidade (99% e 100%, respectivamente), apresentaram sensibilidade muito baixa (8% para ambas).

Gráfico 11 – Desempenho dos biomarcadores urinários na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1

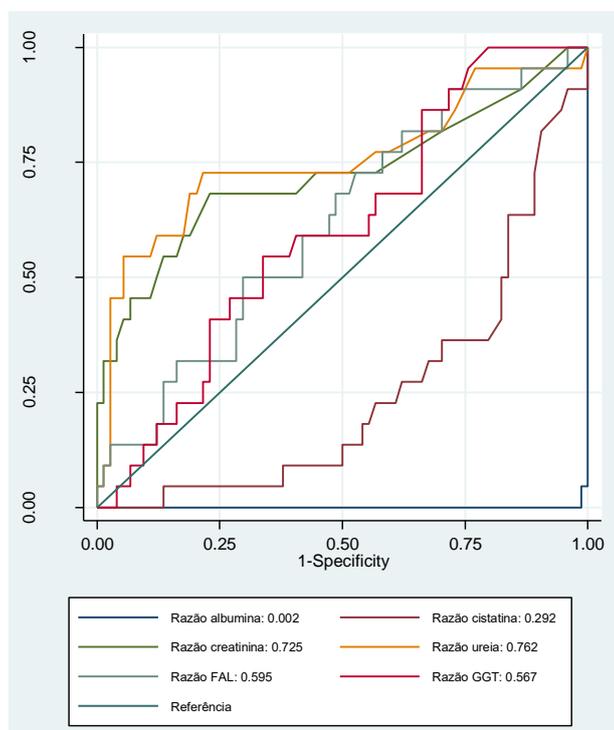


Quanto às razões plasma/urina (**Gráfico 12**), as razões da ureia e da creatinina apresentaram acurácia moderada, ao passo que as razões da FAL e da GGT apresentaram baixa acurácia. Já as razões da cistatina C e da albumina foram incapazes de discriminar os diabéticos com macroalbuminúria daqueles com normo/microalbuminúria.

Conforme a AUC, as razões plasma/urina da ureia, creatinina, FAL e GGT apresentaram desempenhos semelhantes entre si. Além disso, a razão da ureia apresentou desempenho semelhante aos biomarcadores plasmáticos e à RCC. A razão da creatinina, por sua vez, foi semelhante aos biomarcadores plasmáticos com exceção da cistatina C, bem como foi semelhante à RCC e à RFC. Já as razões da FAL e da GGT apresentaram desempenho semelhante à GGT plasmática, RFC e RGC.

Quanto à especificidade e à sensibilidade, as melhores combinações de valores foram apresentadas, em ordem decrescente: pela razão plasma/urina da ureia, creatinina, FAL e GGT.

Gráfico 12 – Desempenho das razões plasma/urina na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1



6.4.3 Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1

Na **Tabela 13** são apresentados os valores da AUC de cada biomarcador plasmático, urinário e razão plasma/urina referente aos seus desempenhos na detecção da micro/macroalbuminúria nos pacientes com DM1, quando comparados ao grupo de diabéticos com normoalbuminúria. Também são apresentados os valores de sensibilidade e especificidade correspondente ao melhor cutoff de cada biomarcador.

Os biomarcadores plasmáticos (**Gráfico 13**), com exceção da albumina, apresentaram acurácia moderada na detecção da micro/macroalbuminúria. Já a albumina não foi capaz de discriminar os pacientes com micro/macroalbuminúria daqueles com normoalbuminúria.

De acordo com a AUC, a cistatina C, ureia, creatinina e FAL apresentaram desempenho semelhante entre si. Já a GGT apresentou desempenho semelhante à ureia, creatinina e FAL.

Tabela 13 – Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1

| | AUC | Cutoff | Especificidade (%) | Sensibilidade (%) |
|--------------------------------|--------------------------|--------|--------------------|-------------------|
| Biomarcadores no plasma | | | | |
| Cistatina C (mg/L) | 0.853 | 1,05 | 94 | 66 |
| Ureia (mg/dL) | 0.802 ^a | 40 | 90 | 56 |
| Creatinina (mg/dL) | 0.778 ^{ab} | 0,93 | 92 | 61 |
| FAL (U/L) | 0.756 ^{abc} | 87 | 90 | 51 |
| GGT (U/L) | 0.716 ^{bcd} | 28 | 87 | 51 |
| Albumina (g/dL) | 0.437 | 4,4 | 98 | 10 |
| Biomarcadores na urina | | | | |
| RAC (mg/g) | 1.000 | 33,6 | 100 | 100 |
| RCC (mg/g) | 0.729 ^{abcde} | 0,15 | 99 | 39 |
| RFC (U/g) | 0.625 ^{ef} | 5,8 | 93 | 20 |
| RGC (U/g) | 0.595 ^{eg} | 52 | 99 | 7 |
| RUC (mg/g) | 0.452 | 21712 | 96 | 12 |
| Razão plasma/urina | | | | |
| Ureia | 0.782 ^{abcdef} | 0,047 | 98 | 41 |
| Creatinina | 0.733 ^{bcddefg} | 0,025 | 96 | 32 |
| FAL | 0.582 ^{igh} | 382,2 | 98 | 11 |
| GGT | 0.543 ^{ghi} | 105,4 | 94 | 13 |
| Cistatina C | 0.425 | 870 | 100 | 0 |
| Albumina | 0.017 | 390000 | 99 | 0 |

AUC: área sob a curva; FAL: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamyltransferase; RAC: razão albumina/creatinina; RCC: razão cistatina C/creatinina; RFC: razão FAL/creatinina; RGC: razão GGT/creatinina; RUC: razão ureia/creatinina.

^a p>0.05 entre o biomarcador x cistatina C.

^f p>0.05 entre o biomarcador x RCC.

^b p>0.05 entre o biomarcador x ureia.

^g p>0.05 entre o biomarcador x RFC.

^c p>0.05 entre o biomarcador x creatinina.

^h p>0.05 entre o biomarcador x RGC.

^d p>0.05 entre o biomarcador x FAL.

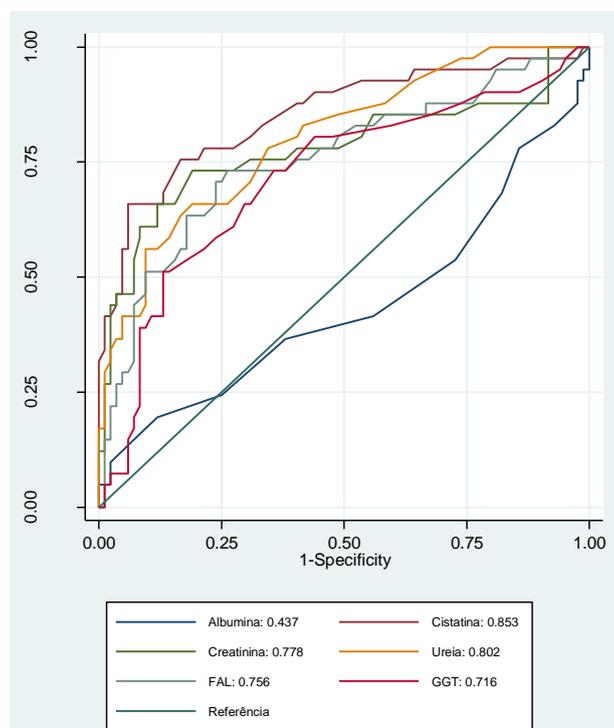
ⁱ p>0.05 entre o biomarcador x razão plasma/urina

^e p>0.05 entre o biomarcador x GGT.

da FAL.

Quanto à especificidade e sensibilidade, apresentaram as melhores combinações de valores, em ordem decrescente: cistatina C, creatinina, ureia, FAL e GGT.

Gráfico 13 – Desempenho dos biomarcadores plasmáticos na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1

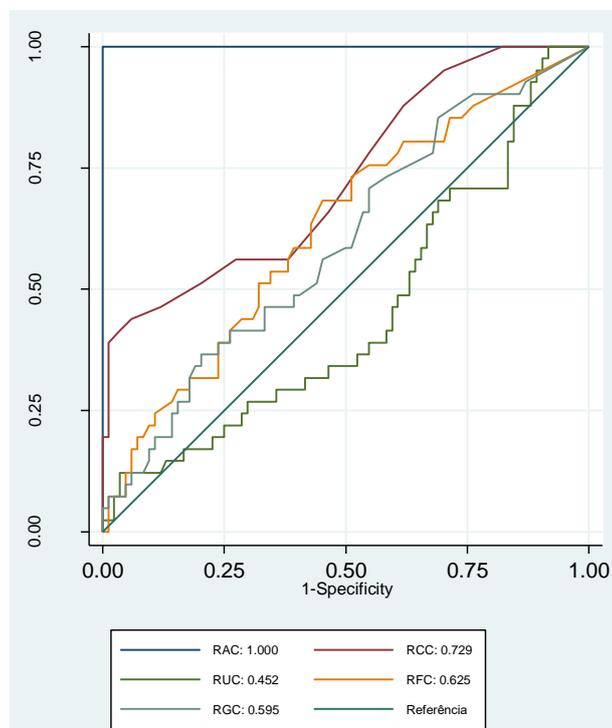


No grupo dos biomarcadores urinários (**Gráfico 14**), a RAC apresentou acurácia perfeita na detecção dos diabéticos com micro/macroalbuminúria, com especificidade e sensibilidade de 100% a um cutoff de 33,6 mg/g. Já a RCC apresentou acurácia moderada, e a RFC e a RGC apresentaram baixa acurácia. A RUC, por sua vez, não foi capaz de discriminar os pacientes com micro/macroalbuminúria daqueles com normoalbuminúria.

Conforme a AUC, o desempenho da RAC foi superior aos demais biomarcadores urinários, bem como a todos os biomarcadores plasmáticos e às razões plasma/urina. A RCC, por sua vez, apresentou desempenho semelhante a todos os biomarcadores plasmáticos e à RFC. Já a RFC e a RGC apresentaram desempenho semelhante entre si e à GGT plasmática.

Abaixo da RAC, apresentaram as melhores combinações de especificidade e sensibilidade em ordem decrescente: RCC, RFC e RGC.

Gráfico 14 – Desempenho dos biomarcadores urinários na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1

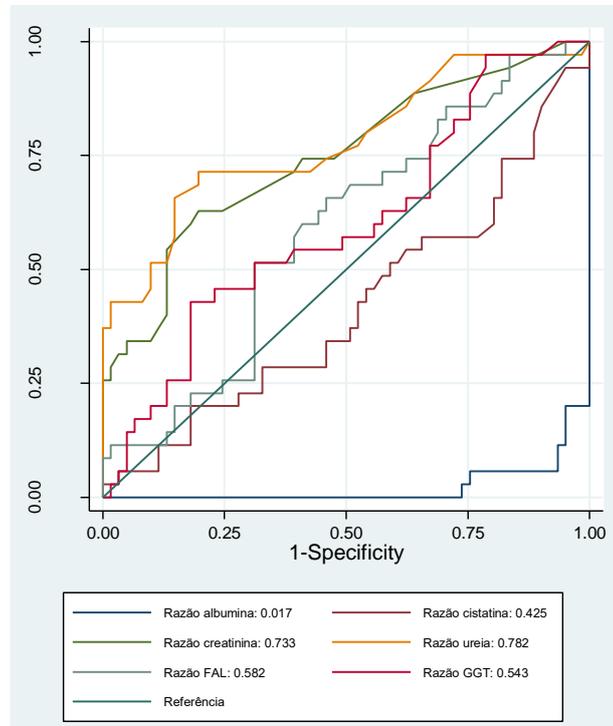


Quanto às razões plasma/urina (**Gráfico 15**), as razões da ureia e da creatinina apresentaram acurácia moderada na identificação dos diabéticos com micro/macroalbuminúria, ao passo que as razões da FAL e da GGT apresentaram baixa acurácia. Já as razões da cistatina C e da albumina não foram capazes de discriminar os pacientes com micro/macroalbuminúria daqueles com normoalbuminúria.

De acordo com a AUC, a razão plasma/urina da ureia apresentou desempenho superior ao demais biomarcadores urinários e desempenho semelhante aos biomarcadores plasmáticos e à RCC. Já a razão plasma/urina da creatinina foi semelhante aos biomarcadores plasmáticos ureia, creatinina, FAL e GGT, e também foi semelhante à RCC e à RFC. As razões da FAL e da GGT foram semelhantes entre si, bem como à RFC e RGC.

Quanto à especificidade e à sensibilidade, apresentaram as melhores combinações de valores em ordem decrescente: razão plasma/urina da ureia, creatinina, FAL e GGT.

Gráfico 15 – Desempenho das razões plasma/urina na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1



7 DISCUSSÃO

7.1 Perfis clínico e laboratorial da população de estudo

7.1.1 Perfil clínico-laboratorial dos grupos controle e caso

A observação de valores mais elevados dos marcadores de função renal – ureia, creatinina e cistatina C – nos diabéticos, pode estar correlacionada à menor TFG apresentada por este grupo, apesar de seu valor mediano ainda se encontrar dentro da normalidade.

De forma semelhante ao nosso trabalho, Matys *et al.* (2013) observaram valores maiores de cistatina C em pacientes com DM2 comparados a indivíduos não diabéticos. Segundos estes autores, no caso específico da cistatina C, que é livremente filtrada pelos glomérulos e então reabsorvida e metabolizada nos túbulos, a sua elevação no plasma resulta, principalmente, do declínio da TFG.

Os pacientes diabéticos também apresentaram valores maiores de FAL plasmática do que os controles. Este achado pode ser justificado pela existência de uma associação entre níveis mais elevados da FAL com doenças metabólicas, como o é o caso do diabetes. Oh *et al.* (2015), por exemplo, demonstraram maior prevalência de diabetes em pacientes com FAL plasmática elevada.

Avaliando-se os biomarcadores plasmáticos que apresentaram uma diferença significativa entre controles e diabéticos, verifica-se que a FAL apresentou o maior aumento nos diabéticos (42%), seguida pela ureia (33%), cistatina C (26%) e creatinina (9%).

Quanto aos biomarcadores urinários, apenas não foi observada diferença significativa entre controles e diabéticos para a RCC. Já os valores de RAC, RFC, RGC e RUC apresentaram-se mais elevados no grupo dos diabéticos.

No que se refere à RAC, sabe-se que a hiperglicemia crônica pode comprometer a membrana basal glomerular quanto à sua seletividade de carga e tamanho, o que favorece uma passagem aumentada de albumina e, conseqüentemente, sua maior excreção urinária (JUNG *et al.*, 1988; WANG *et al.*; 2013). Assim como nós, Wang *et al.* (2013) também encontraram níveis mais elevados de RAC em pacientes com DM2 comparados a indivíduos não diabéticos.

O aumento da RFC e da RGC, por sua vez, tem sido associado à injúria tubular, uma vez que a FAL e a GGT urinárias aumentam em decorrência da lesão das células tubulares que as secretam (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013). Semelhantemente ao nosso achado, Jung *et al.* (1988) verificaram que pacientes com DM1 apresentaram uma concentração maior da FAL urinária do que indivíduos saudáveis, e Mohammadi-Karakani *et al.* (2007) observaram valores mais elevados de FAL urinária em pacientes com DM2 comparados à não diabéticos.

Os dados demonstram ainda que, dentre os biomarcadores urinários que diferiram de forma significativa entre controles e diabéticos, a RAC apresentou o maior aumento nos pacientes diabéticos (315%), contra 80% de aumento da RFC, 57% da RGC e 9% da RUC.

No que se refere às razões plasma/urina, os valores significativamente maiores da creatinina, ureia e cistatina C nos diabéticos se justificam pelos valores plasmáticos mais elevados destes biomarcadores neste grupo, o que resultou no aumento da sua razão plasma/urina.

Para a razão plasma/urina da albumina, no entanto, os pacientes diabéticos apresentaram um valor menor do que os controles. Isso porque a albumina urinária foi maior nos diabéticos, enquanto sua concentração plasmática foi semelhante à concentração dos controles; o que condiz com a patofisiologia do declínio da função renal.

Embora a razão da FAL não tenha apresentado diferença entre os grupos do ponto de vista estatístico ($p=0.156$), em termos de valor absoluto a razão da FAL foi maior no grupo caso em relação ao grupo controle em 10,4 U/L, o que pode indicar uma boa capacidade da FAL na avaliação de pacientes diabéticos. Talvez, se forem avaliados pacientes diabéticos com um perfil metabólico e hemodinâmico mais homogêneo e/ou se forem aplicados outros testes estatísticos, a razão da FAL seja capaz de discriminar indivíduos saudáveis de indivíduos com diabetes.

Dentre as razões plasma/urina que foram significativamente diferentes entre controles e diabéticos, a razão da albumina apresentou a maior alteração nos diabéticos (uma redução de 191%), seguida pela razão da creatinina que aumentou 125%. Já as razões da ureia e da cistatina C apresentaram percentuais de aumento próximos, sendo 67% e 63%, respectivamente.

Quanto à TFG estimada pelas 6 equações, os pacientes diabéticos apresentaram um valor menor do que os controles. O que favoreceu a ocorrência

deste resultado é o fato de que entre os diabéticos há pacientes com ND, e sabe-se que na ND a TFG tende a reduzir progressivamente com a evolução da doença (ARORA; SINGH, 2013).

7.1.2 Perfil clínico-laboratorial dos controles, diabéticos sem ND e diabéticos com ND

O maior tempo de diagnóstico do diabetes apresentado pelos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND pode ser justificado pelo fato de que a incidência da ND aumenta conforme o tempo de evolução do DM. Segundo Thomas (2010), no DM1, a ND é relativamente rara nos primeiros 5 a 10 anos da doença, mas aumenta sua incidência nos próximos 10 anos, atingindo um pico de 3% ao ano após os 15 anos de diabetes.

A maior frequência de hipertensão e dislipidemia entre os diabéticos com ND está associada ao fato de que estas co-morbidades constituem fatores de risco para o desenvolvimento da ND. Além disso, no caso específico de pacientes com DM1, a hipertensão pode não ser apenas um promotor da ND, como também pode ser consequência dessa doença. Observa-se que, nos diabéticos tipo 1, a hipertensão frequentemente se inicia quando o paciente evolui da microalbuminúria para a macroalbuminúria (ADA, 2014; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014).

Os pacientes diabéticos com ND também apresentaram uma maior frequência de retinopatia. Assim como a ND, a retinopatia é uma complicação crônica microvascular do diabetes e com frequência considerável em pacientes com DM1, chegando a acometer mais de 90% destes pacientes após 20 anos de diagnóstico. Além disso, sabe-se que a retinopatia apresenta uma forte correlação com a ND, tanto que ela é considerada um fator complementar para o diagnóstico da ND (ADA, 2015; GOSMANOV; WALL; GOSMANOVA, 2014; SBD, 2015).

Quanto aos biomarcadores plasmáticos, não foi observada diferença significativa para a creatinina entre os diabéticos sem ND e os controles, o que pode ser entendido pelo fato de não ter havido diferença na TFG entre estes dois grupos. Apesar disso, a cistatina C e a ureia foram maiores nos diabéticos sem ND do que nos controles, o que demonstra que estes dois biomarcadores se elevaram mais precocemente nos pacientes diabéticos do que a creatinina.

Tanto a creatinina quanto a cistatina C e a ureia apresentaram valores mais elevados nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND, o que pode estar correlacionado à menor TFG apresentada pelos diabéticos com ND. De forma semelhante ao nosso trabalho, Wang *et al.* (2013) também observaram valores maiores de cistatina C em pacientes com DM2 e ND em relação a pacientes com DM2 sem ND.

Os diabéticos com ND também apresentaram valores mais elevados de FAL do que os diabéticos sem ND. Oh *et al.* (2015) levantam a hipótese de que a elevação da FAL decorre do aumento de sua produção endógena em resposta à injúria tubular. Esta hipótese pode explicar o nosso achado, uma vez que os diabéticos com ND também apresentaram elevações dos marcadores urinários de injúria tubular (RCC, RFC e RGC).

A observação de GGT mais elevada nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND e aos controles, pode ser entendida pelo fato de a GGT estar associada ao diabetes, ao estresse oxidativo e de ser considerada um preditor de microalbuminúria e DRC em pacientes com diabetes e hipertensão manifesta (YILMAZ *et al.*, 2013).

Quando se compara a FAL e a GGT, observa-se que a FAL também apresentou um valor mais elevado nos diabéticos sem ND do que nos controles, o que indica que a FAL discriminou melhor entre diabéticos e indivíduos saudáveis.

Quanto à albumina plasmática, nosso resultado está de acordo com o trabalho de Carvalho *et al.* (2011), que também não observaram diferença significativa entre diabéticos tipo 2 com e sem ND.

Avaliando-se os biomarcadores plasmáticos que apresentaram uma diferença significativa entre diabéticos sem e com ND, verifica-se que a cistatina C e a GGT apresentaram o mesmo percentual de aumento nos diabéticos com ND (78%), e que este foi próximo ao aumento da creatinina (75%) e da ureia (68%). A FAL, por sua vez, apresentou um aumento menor do que os outros marcadores (48%). Estes resultados indicam, portanto, que a cistatina C e a GGT apresentaram um comportamento mais próximo dos marcadores clássicos de função renal.

A RAC também apresentou valores maiores nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND. Além do comprometimento da membrana basal glomerular, sabe-se que o aumento da pressão de filtração, que é frequente no estágio inicial da ND, também favorece a maior excreção urinária de albumina

(WANG *et al.*; 2013). Como nós, Wang *et al* (2013) encontraram valores mais elevados de RAC em pacientes com DM2 e ND em comparação aos diabéticos sem ND.

Os diabéticos com ND também apresentaram RCC mais elevada do que os diabéticos sem ND, o que pode indicar o comprometimento tanto glomerular quanto tubular na ND. A cistatina C urinária aumenta na presença de lesão glomerular devido à inibição competitiva pela reabsorção tubular, que é provocada pelo aumento concomitante das outras proteínas de baixo peso molecular; assim como pode elevar-se na presença de lesão tubular, que compromete a capacidade de reabsorção da cistatina C nos túbulos proximais (KIM *et al.*, 2013; LEE; CHOI, 2014; MCMAHON; WAIKAR, 2013; TOGASHI; MIYAMOTO, 2013; TRAMONTI; KANWAR, 2013).

Nós também observamos valores mais elevados de RFC e RGC nos diabéticos com ND, o que pode indicar, mais uma vez, a ocorrência de injúria tubular nestes pacientes (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013). De forma semelhante aos nossos resultados, Jung *et al.* (1988) avaliando pacientes com DM1 e Carvalho *et al.* (2011) avaliando pacientes com DM2, observaram valores mais elevados de RFC nos diabéticos com ND do que nos diabéticos sem ND.

Dentre os biomarcadores urinários que apresentaram diferença significativa entre os diabéticos sem e com ND, destaca-se a RAC que apresentou um aumento nos diabéticos com ND de 94 vezes, o que equivale a mais de 9000%. A RFC apresentou o segundo maior aumento (100%), seguida pela RCC (50%) e pela RGC (30%).

Quanto às razões plasma/urina da ureia e da creatinina, os maiores valores observados nos diabéticos com e sem ND em comparação aos controles e também nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND, justificam-se pelos valores plasmáticos mais elevados destes biomarcadores nos diabéticos em relação aos controles, bem como nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND, o que resulta no aumento da sua razão plasma/urina.

Para a razão plasma/urina da cistatina C, o maior valor encontrado nos diabéticos sem ND em relação aos controles, pode ser explicado pelo maior valor da cistatina C no plasma dos pacientes diabéticos, enquanto o seu valor urinário foi semelhante ao valor do grupo controle.

Já a menor razão plasma/urina da albumina observada nos diabéticos com ND em relação aos diabéticos sem ND e aos controles, justifica-se pelo maior valor de albumina urinária nos diabéticos com ND, enquanto sua concentração plasmática não diferiu dos outros dois grupos; o que é coerente com o declínio da função renal.

Embora a razão plasma/urina da FAL não tenha apresentado diferença entre os grupos do ponto de vista estatístico ($p=0.187$), em termos de valor absoluto a razão da FAL apresentou um aumento de 4,7 U/L do grupo controle para o grupo de diabéticos sem ND, um aumento de 9,0 U/L do grupo de diabéticos sem ND para o grupo de diabéticos com ND e um aumento de 13,7 U/L do grupo controle para o grupo de diabéticos com ND. Como no item anterior, este achado chama atenção pelo fato de a razão da FAL ter apresentado um aumento progressivo em valores absolutos, o que também pode indicar uma boa capacidade da FAL na discriminação entre diabéticos com e sem ND.

Nas razões plasma/urina, semelhantemente aos biomarcadores urinários, a albumina apresentou a maior alteração nos pacientes com ND, sofrendo uma redução de 54 vezes (mais de 5000%). As razões da creatinina e da ureia apresentaram aumentos próximos, de 117% e 112%, respectivamente. Estes resultados demonstram, portanto, que os marcadores tradicionais (creatinina, ureia, albumina) reafirmaram sua validade na avaliação da ND.

Quanto à TFG estimada pelas 6 equações, verificou-se que os pacientes diabéticos com ND apresentaram valores menores do que os diabéticos sem ND e os controles, o que condiz com o declínio da função renal na ND. Além disso, para a equação proposta por Tan *et al.* (2002), os diabéticos sem ND apresentaram menor TFG do que os controles, o que pode apontar que esta equação é mais indicada para a detecção de alterações da TFG nos pacientes com DM1. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que a equação de Tan *et al.* (2002) foi desenvolvida apenas com diabéticos tipo 1, além de ter sido empregado um teste turbidimétrico para a dosagem da cistatina C, condições que se assemelham ao nosso estudo (TAN *et al.*, 2002).

7.1.3 Perfil clínico-laboratorial dos diabéticos conforme o grau de albuminúria

Nós observamos que a hipertensão foi mais frequente nos pacientes com microalbuminúria e macroalbuminúria do que nos pacientes com normoalbuminúria, o que concorda com a afirmação de que a hipertensão, nos pacientes com DM1, pode ser uma consequência da progressão da ND (MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014).

Quanto à retinopatia e à dislipidemia, apenas houve uma frequência significativamente maior nos pacientes com macroalbuminúria em relação aos pacientes com normoalbuminúria. Nossa observação para a dislipidemia concorda tanto com o trabalho de Jeon *et al.* (2011) quanto com o trabalho de Kim *et al.* (2013), que estudaram pacientes com DM2.

No que se refere à cistatina C e à creatinina plasmática, observou-se um aumento dos seus valores conforme a progressão da albuminúria, o que concorda novamente com os trabalhos de Jeon *et al.* (2011) e Kim *et al.* (2013), que também fizeram esta observação ao avaliar pacientes com DM2.

Os aumentos apresentados pela creatinina e pela cistatina C ficaram bem próximos: o aumento de normoalbuminúria para microalbuminúria foi de 32% para a creatinina e de 38% para a cistatina C; o aumento de microalbuminúria para macroalbuminúria foi de 53% para a creatinina e de 56% para a cistatina C; e a elevação de normoalbuminúria para a macroalbuminúria foi de 101% para a creatinina e de 115% para a cistatina C. Estes resultados revelam uma equivalência dos dois biomarcadores no acompanhamento da albuminúria.

Os resultados ainda revelam que a creatinina e a cistatina C acompanharam melhor a evolução da ND nos pacientes com DM1, refletida pela progressão da albuminúria, uma vez que os outros marcadores plasmáticos não apresentaram diferenças entre todos os níveis de albuminúria. A albumina e a FAL não apresentaram diferença entre normoalbuminúria e microalbuminúria; já a ureia e a GGT não foram significativamente diferentes entre microalbuminúria e macroalbuminúria.

A GGT apresentou um aumento maior entre normoalbuminúria e microalbuminúria (114%) do que a ureia (52%), e o aumento da FAL não foi significativo. A FAL, porém, foi o único biomarcador dentre estes três que apresentou um aumento significativo entre microalbuminúria e macroalbuminúria

(31%). E os três marcadores apresentaram aumentos aproximados entre normoalbuminúria e macroalbuminúria, sendo de 53% para a FAL, 68% para a ureia e 78% para a GGT. Estes dados demonstram, assim, que a GGT apresentou maior capacidade do que a FAL e a ureia na detecção da microalbuminúria, e que a FAL foi o único marcador capaz de detectar a evolução da microalbuminúria para a macroalbuminúria.

Quanto aos biomarcadores urinários, apenas a RAC apresentou diferença significativa entre os três níveis de albuminúria, o que indica que ela foi melhor do que os demais biomarcadores urinários no acompanhamento da albuminúria. Este nosso resultado é semelhante aos achados em pacientes com DM2 relatados por Jeon *et al.* (2011), Kim *et al.* (2013) e Wang *et al.* (2013).

Para a RCC, os pacientes com macroalbuminúria apresentaram valores mais elevados do que os pacientes com normoalbuminúria e microalbuminúria. Já entre os pacientes com normoalbuminúria e microalbuminúria não houve diferença, o que indica que a RCC não foi tão efetiva para acompanhar a progressão da albuminúria nos pacientes com DM1. Jeon *et al.* (2011), no entanto, avaliando pacientes com DM2, observaram que a RCC aumentou conforme os três níveis de albuminúria. Quanto à RFC, RGC e à RUC, estas não apresentaram diferença significativa entre os níveis de albuminúria.

Comparando-se a RAC e a RCC, verifica-se que a RAC apresentou um aumento entre microalbuminúria e macroalbuminúria de quase 20 vezes e entre normoalbuminúria e macroalbuminúria de 294 vezes; ao passo que o aumento da RCC foi de 4 vezes entre estes níveis de albuminúria. Isso demonstra que a RAC apresentou uma alteração maior do que a RCC com a evolução da microalbuminúria para a macroalbuminúria. Além disso, a RAC foi o único biomarcador urinário capaz de detectar a progressão da normoalbuminúria para a microalbuminúria, com um aumento de 15 vezes, o que reafirma o seu valor no diagnóstico mais inicial da ND.

Para as razões plasma/urina da creatinina e da ureia, foram observados valores maiores nos pacientes com microalbuminúria e macroalbuminúria em relação aos controles, o que se justifica pelo aumento destes biomarcadores no plasma conforme a elevação da albuminúria.

A razão plasma/urina da albumina, por sua vez, foi menor nos pacientes com microalbuminúria e macroalbuminúria em comparação aos controles, e menor nos pacientes com macroalbuminúria em relação aos pacientes com

microalbuminúria. Este resultado é coerente com o aumento da albumina urinária, enquanto a albumina plasmática não se alterou ou sofreu pequena redução com a progressão da albuminúria.

A razão plasma/urina da albumina aumentou quase 7 vezes de normoalbuminúria para microalbuminúria, as razões da creatinina e da ureia aumentaram 1,8 vezes e a razão da cistatina C não apresentou aumento significativo. De microalbuminúria para a macroalbuminúria, a RAC aumentou 30 vezes e a cistatina C 5,7 vezes, ao passo que as razões da creatinina e da ureia não aumentaram de forma significativa. Já de normoalbuminúria para a macroalbuminúria, o aumento da RAC foi de 207 vezes, contra um aumento médio de 2,7 vezes para as razões da cistatina C, creatinina e ureia.

Os resultados anteriores demonstram que os marcadores clássicos de função renal (creatinina, ureia, albumina) foram capazes de detectar a evolução de normoalbuminúria para microalbuminúria, enquanto a cistatina C não o foi; sendo a albumina o melhor marcador. Quanto à detecção da progressão de microalbuminúria para macroalbuminúria, a cistatina C superou a creatinina e a ureia, mas não foi superior à albumina.

No que se refere à TFG estimada pelas 6 equações, foram observados valores menores nos estágios de microalbuminúria e macroalbuminúria em relação à normoalbuminúria. No entanto, não houve diferença entre os estágios de microalbuminúria e macroalbuminúria, o que sugere que as equações empregadas não foram adequadas para distinguir estas duas categorias de albuminúria.

7.2 Variações dos biomarcadores plasmáticos e urinários nos diabéticos conforme as características clínicas

a) Idade

A cistatina C, a creatinina e a ureia plasmáticas aumentaram conforme a progressão da idade, o que pode ser explicado pelo declínio da função renal que ocorre com o envelhecimento. Declínio esse que pode ser apenas fisiológico, como ocorre em pessoas saudáveis, ou que pode ser agravado por doenças, como é o caso dos diabéticos que desenvolvem a ND. De forma parecida com o nosso trabalho, Wei *et al.* (2014) ao avaliar pacientes com doenças variadas (diabetes,

hipertensão, doenças cardíacas, hematológicas, renais) observaram valores maiores de cistatina C e creatinina nos pacientes com idade igual ou superior a 60 anos do que naqueles com idade inferior a 60 anos.

Também foi observado um maior valor da GGT plasmática nos diabéticos com idade igual ou superior a 45 anos. Segundo Yilmaz *et al.* (2013), a GGT elevada é um preditor de DRC em pacientes diabéticos. Assim, diante dessa informação e como também se sabe que a idade mais avançada favorece o desenvolvimento e progressão da DRC, isso pode justificar os valores mais elevados de GGT observados nos diabéticos com idade mais avançada.

Quanto aos biomarcadores urinários, não foi observada diferença significativa entre as categorias de idade. Para a RCC, nossos resultados se assemelham ao achado de Uchida & Gotoh (2002), que também não encontraram diferença na RCC entre indivíduos saudáveis de idades variadas.

b) Sexo

Os pacientes do sexo masculino apresentaram valores maiores de albumina, creatinina e FAL plasmáticas do que o sexo feminino. A diferença no valor da creatinina pode ser explicada pela influência positiva da massa muscular na sua concentração (BASTOS, 2011). Já para a albumina e a FAL, não é reconhecida uma interferência significativa do sexo, tanto que se adota um único valor de referência para homens e mulheres.

A cistatina C, por sua vez, não apresentou diferença significativa entre os sexos. Este resultado concorda com o trabalho de Woo *et al.* (2014), que também não observaram diferença na concentração da cistatina C entre homens e mulheres com ND.

Os biomarcadores urinários também não apresentaram diferença significativa conforme o sexo. Semelhantemente aos nossos resultados, Brott *et al.* (2014) não observaram diferença para a RAC entre homens e mulheres saudáveis, e Pennemans *et al.* (2013) não encontraram diferença na RCC conforme o sexo.

c) Índice de massa corporal (IMC)

Os seis biomarcadores plasmáticos avaliados não apresentaram diferença significativa entre as categorias de IMC. De forma semelhante ao nosso estudo, Zhang *et al.* (2010) verificaram que a cistatina C não variou segundo o IMC em diabéticos tipo 2 com ND. O fato de os biomarcadores avaliados não sofrerem interferência do IMC favorece a sua utilização na prática clínica, especialmente dos novos biomarcadores, haja vista o número significativo e crescente de indivíduos com sobrepeso/obesidade na população de uma forma geral. Segundo os dados da Pesquisa Nacional de Saúde 2013, por exemplo, 56,9% da população adulta brasileira apresentaram sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ Kg/m}^2$) e 20,8% obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2015).

Com relação à RCC, assim como nós, Uchida & Gotoh (2002) relataram que este analito não sofreu interferência do IMC em indivíduos saudáveis. Já Satoh-Asahara *et al.* (2011) verificaram que pacientes inicialmente obesos, que perderam peso, apresentaram uma redução significativa nos níveis de RCC.

d) Tempo de diagnóstico do diabetes

A creatinina e a cistatina C apresentaram valores maiores nos diabéticos com tempo de diagnóstico superior a 20 anos, o que pode ser explicado pelo declínio da função renal que, frequentemente, ocorre em paralelo à evolução do diabetes. Este aumento da cistatina C e da creatinina demonstra que estes dois biomarcadores foram mais efetivos no monitoramento da função renal dos pacientes com DM1 do que os demais biomarcadores, que não apresentaram uma elevação significativa ao longo do tempo de evolução da doença.

Quanto aos biomarcadores urinários, não foi observada diferença significativa conforme o tempo de diagnóstico do diabetes. Até mesmo a cistatina C e a creatinina, que tiveram seus valores plasmáticos aumentados conforme o tempo de duração da doença, não demonstraram o mesmo comportamento na urina. Isso pode indicar que a avaliação destes biomarcadores na urina é menos efetiva do que suas concentrações plasmáticas para o acompanhamento da evolução do diabetes e da ND.

e) Tabagismo

As concentrações dos biomarcadores avaliados, tanto no plasma quanto na urina, não apresentaram diferença significativa entre tabagistas e não tabagistas, o que favorece o emprego destes biomarcadores na prática clínica.

No que se refere à cistatina C, nosso resultado é contrário ao de Ichihara *et al.* (2007) e Evangelopoulos *et al.* (2011), que encontraram valores maiores de cistatina C para os tabagistas do que para os não tabagistas.

f) Hipertensão

As concentrações plasmáticas de cistatina C, creatinina e ureia foram significativamente maiores nos pacientes hipertensos do que nos pacientes sem hipertensão, e o que pode explicar este achado é fato de que a hipertensão é um promotor da ND. A ND cursa com o declínio da TFG e, conseqüentemente, as moléculas que são excretadas via urina têm suas concentrações plasmáticas aumentadas (MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). Nossos resultados são coerentes com os trabalhos de Juraschek *et al.* (2013) e Wei *et al.* (2014), que relatam uma associação positiva da cistatina C e da creatinina com a hipertensão.

A GGT também apresentou um valor mais elevado nos pacientes hipertensos, o que pode ser justificado pela associação da GGT com doenças como a hipertensão e o diabetes (YILMAZ *et al.*, 2013).

Os pacientes hipertensos também apresentaram maiores valores de RAC, RFC e RGC. O maior valor de RAC nos pacientes hipertensos pode ser entendido pela associação existente entre a hipertensão arterial e a EUA, tendo em vista que a pressão arterial elevada favorece a maior excreção de albumina (JARRAYA *et al.*, 2013). Quanto aos valores de RFC e RGC, sabe-se que o aumento na excreção de FAL e GGT está associado à injúria tubular, o que pode indicar uma associação da hipertensão com o comprometimento das células tubulares (CARVALHO *et al.*, 2011; MORESCO *et al.*, 2013).

g) Dislipidemia

Os diabéticos com dislipidemia apresentaram valores mais elevados de cistatina C, creatinina, ureia e GGT plasmáticas. De forma semelhante, Juraschek *et al.* (2013) observaram uma associação entre níveis mais elevados de triglicérides e valores maiores de cistatina C e creatinina, além de uma associação entre HDL maior e menor concentração de cistatina C.

Apesar dos nossos resultados, assim como de outros estudos, revelarem uma associação entre a dislipidemia e marcadores de função renal em pacientes diabéticos, o papel da dislipidemia na iniciação e progressão da ND ainda é pouco compreendido. Alguns trabalhos iniciais, no entanto, revelam que as alterações desfavoráveis do perfil lipídico atuam no desenvolvimento da albuminúria e da glomeruloesclerose (FINEBERG; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2013; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). Essa afirmação pode justificar nosso achado de RAC mais elevada nos diabéticos com dislipidemia.

Quanto ao maior valor de GGT nos pacientes dislipidêmicos, isso pode ser justificado pela existência de uma associação entre essa enzima e os níveis de colesterol e a obesidade (YILMAZ *et al.*, 2013).

h) Hipotireoidismo

Sabe-se que os hormônios da tireoide, por influenciarem o metabolismo de forma geral, afetam tanto os níveis de creatinina quanto de cistatina C. A cistatina C se encontra mais baixa no estado de hipotireoidismo e mais elevada no estado de hipertireoidismo. A creatinina, por sua vez, apresenta valores mais elevados no hipotireoidismo e mais baixos no hipertireoidismo (ÖZDEN *et al.*, 2010; SCHMID *et al.*, 2012).

Os nossos resultados, entretanto, não apresentaram diferença significativa para nenhum dos biomarcadores avaliados com relação ao hipotireoidismo, tanto no plasma quanto na urina. Este achado pode ser justificado pelo fato de que todos os pacientes com hipotireoidismo envolvidos neste trabalho são tratados com a administração de T4.

i) Retinopatia

Nos pacientes com retinopatia foram observados valores mais elevados de cistatina C, creatinina e ureia plasmática, bem como de RAC e RCC. Este resultado pode ser explicado pela forte associação da retinopatia com a ND, condição em que estes marcadores também se encontram elevados. Sabe-se que estas duas complicações do diabetes apresentam fatores de risco e mecanismos patofisiológicos comuns (ADA, 2015; SBD, 2015).

j) Neuropatia

Nenhum dos biomarcadores avaliados, tanto no plasma quanto na urina, apresentou diferença significativa quanto à presença de neuropatia, apesar dessa doença também ser uma complicação do diabetes, assim como a ND. Uma limitação nesta análise seria o fato de que a neuropatia, muitas vezes, é diagnosticada com base apenas no relato clínico do paciente, o que pode ter levado à inserção de um viés nesta avaliação.

7.3 Correlações entre os biomarcadores plasmáticos, urinários, razões plasma/urina e TFG estimada por diferentes equações

7.3.1 Correlação entre os biomarcadores plasmáticos e destes com os demais biomarcadores e com a TFG

Os novos biomarcadores plasmáticos avaliados – cistatina C, FAL e GGT – além de apresentarem correlação moderada entre si, apresentaram correlações de moderada a forte com a maior parte dos parâmetros tradicionais de função renal (ureia e creatinina), bem como com os parâmetros empregados no diagnóstico da ND (RAC e TFG).

Nossos resultados concordam com os trabalhos de outros autores. Jeon *et al.* (2011), por exemplo, também verificaram uma correlação significativa da cistatina C com a creatinina, a RAC e a TFG em pacientes com DM2. Bulum *et al.* (2013), avaliando pacientes com DM1, observaram uma correlação significativa da

GGT com a creatinina e a RAC, e da FAL com a TFG. E Carvalho *et al.* (2011) também relatam uma correlação moderada entre a FAL e a RAC.

7.3.2 Correlação entre os biomarcadores urinários e destes com as razões plasma/urina e com a TFG

Dentre os novos biomarcadores urinários, apenas a RCC apresentou uma correlação moderada com a RAC. Este resultado pode assim indicar uma superioridade da cistatina C, em relação à FAL e à GGT, na avaliação da ND em pacientes com DM1.

De forma semelhante ao nosso trabalho, Kim *et al.* (2013) também observaram uma correlação positiva entre RCC e RAC em pacientes com DM2, e Nauta *et al.* (2011) verificaram uma associação entre cistatina C urinária e albuminúria em pacientes com DM1 e DM2. Já Carvalho *et al.* (2011), diferentemente dos nossos resultados, observaram uma correlação moderada da RAC com a RFC e a RGC em pacientes com DM2.

Assim como no plasma, a correlação entre a FAL e a GGT na urina também foi moderada. O que pode explicar este achado é o fato de que as duas enzimas têm uma origem comum, isto é, as células tubulares renais, e se elevam quando estas células são lesadas (MORESCO *et al.*, 2013).

Como a correlação entre a FAL e a GGT no plasma e na urina foram moderadas, entre a RFC e a razão plasma/urina da GGT, assim como entre a RGC e razão plasma/urina da FAL, as correlações também foram moderadas, como era esperado.

Quanto à TFG, apenas a RAC apresentou uma correlação moderada com ela. A RFC apresentou uma correlação fraca, e a RCC e RGC não apresentaram correlação. Este resultado revela, portanto, que a albumina urinária (RAC) foi o biomarcador que apresentou a correlação mais significativa com a TFG, que é considerada o melhor índice global da função renal (BASTOS, 2011). Diferentemente do nosso trabalho, Kim *et al.* (2013) e Nauta *et al.* (2011) relataram uma associação significativa também entre a RCC e a TFG.

7.3.3 Correlação entre as razões plasma/urina e destas com a TFG

A única correlação forte entre as razões plasma/urina foi observada entre a razão da creatinina e da ureia. Possivelmente, esse achado se justifica pelo comportamento semelhante da ureia e da creatinina no que tange à disfunção renal, tendo em vista que ambas sofrem uma elevação no plasma concomitante à sua redução na urina quando há perda de função renal.

A explicação anterior também pode justificar a correlação moderada observada entre a razão plasma/urina da FAL e da GGT, uma vez que tais enzimas têm seus valores urinários aumentados com o declínio da função renal.

Nas correlações entre as razões plasma/urina, destaca-se também a cistatina C, cuja razão apresentou o maior número de correlações moderadas significativas, inclusive com a razão da creatinina e da ureia, que são biomarcadores consagrados da função renal.

As razões plasma/urina da ureia, creatinina e albumina apresentaram uma correlação moderada com todas as equações com as quais sua correlação foi avaliada; já as razões dos novos biomarcadores (cistatina C, FAL e GGT) não apresentaram correlação com a TFG. Dessa forma, quanto às razões plasma/urina, os biomarcadores tradicionais de função renal (ureia, creatinina, albumina) demonstraram estar correlacionados com o parâmetro que é considerado o melhor índice global da função renal (TFG), ao contrário dos novos biomarcadores.

7.3.4 Correlação entre diferentes equações da TFG

As 6 equações empregadas para a estimativa da TFG apresentaram uma correlação forte e positiva entre si. Este resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pela forte correlação que também apresentaram os biomarcadores plasmáticos empregados nestas equações, isto é, a creatinina e a cistatina C. De forma semelhante ao nosso trabalho, Woo *et al.* (2014) também observaram uma correlação forte entre a MDRD e a CKD-EPI_{cis} em pacientes com DM2 e ND.

7.4 Desempenho diagnóstico dos biomarcadores

7.4.1 Desempenho dos biomarcadores no diagnóstico da ND em pacientes com DM1

O bom desempenho apresentado pela cistatina C, creatinina e ureia no diagnóstico da ND nos pacientes com DM1 pode ser explicado, em parte, pelas suas correlações com os parâmetros que foram empregados para estabelecer o diagnóstico da ND, isto é, a RAC e a TFG. Estes três biomarcadores apresentaram correlação de moderada a forte tanto com a RAC quanto com a TFG.

No caso específico da cistatina C, é crescente o número de trabalhos que vem apontando um desempenho superior desse biomarcador ou, no mínimo, equivalente à creatinina na avaliação da função renal (GABRIEL; NISHIDA; KIRSZTAJN, 2011; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). Nossos resultados corroboram tais estudos, uma vez que foi demonstrado que a cistatina C apresentou desempenho semelhante à creatinina.

No trabalho de Maclsaac *et al.* (2007), no entanto, verificou-se que a cistatina C teve melhor desempenho do que a creatinina na detecção de DRC leve (TFG <90 mL/min/1,73m²) e de DRC moderada (TFG <60 mL/min/1,73m²) em pacientes com DM1 e DM2. E Jeon *et al.* (2011) relataram que a cistatina C apresentou alta acurácia na detecção de TFG <60 mL/min/1,73m² em pacientes com DM2.

Quanto à acurácia moderada da FAL e da GGT no diagnóstico da ND, o que pode explicar este achado é o fato de que estas enzimas também demonstraram estar correlacionadas com o estado da função renal. Foi observado que as correlações da FAL e da GGT com a ureia, creatinina, cistatina C e RAC apresentaram intensidade moderada.

Quanto à especificidade e sensibilidade, todos os biomarcadores plasmáticos apresentaram especificidade superior à sensibilidade, o que significa que eles demonstraram uma maior capacidade de classificar corretamente os diabéticos sem ND.

Dentre a ureia, a creatinina e a cistatina C, que apresentaram desempenhos equivalentes, a cistatina C foi que apresentou a maior especificidade e sensibilidade; sendo assim, a cistatina C seria o biomarcador de escolha no

plasma para o diagnóstico da ND em pacientes com DM1. Quanto à FAL e a GGT, que também apresentaram desempenhos semelhantes, a melhor escolha seria a FAL, tendo em vista sua maior especificidade e sensibilidade.

A alta acurácia da RAC justifica-se pelo fato de que a classificação dos pacientes, quanto à presença da ND, foi realizada levando-se em consideração, além da TFG, a própria RAC. Mas apesar de apresentar alta acurácia, quando se compara a AUC, a RAC apresenta desempenho equivalente à cistatina C plasmática; porém, a RAC apresentou maior especificidade e sensibilidade. Dessa forma, a RAC seria o biomarcador de escolha em comparação à cistatina C, bem como quando comparada a todos os outros biomarcadores no plasma, na urina e às razões plasma/urina.

No nosso trabalho, a RFC e a RGC demonstraram baixa acurácia no diagnóstico da ND nos pacientes com DM1. Jung *et al.* (1988) também verificaram que a GGT urinária não apresentou um bom desempenho para a avaliação da ND em diabéticos tipo 1. Já Carvalho *et al.* (2011) relataram que, em pacientes com DM2, a RFC e a RGC apresentaram uma acurácia moderada no diagnóstico da ND. No nosso estudo, além de trabalharmos com diabéticos tipo 1, foram empregados kits diagnósticos cujo fabricante difere dos kits utilizados por Carvalho *et al.* (2011), o que pode ter influenciado os resultados.

Assim como os biomarcadores plasmáticos, os biomarcadores urinários apresentaram uma capacidade maior de classificar corretamente os diabéticos sem ND. A RAC, no entanto, apresentou sensibilidade elevada e bem próxima da sua especificidade.

No que se refere às razões plasma/urina, a ureia apresentou o melhor desempenho, sendo seguida pela creatinina, FAL e GGT; tendo as duas enzimas apresentado desempenhos equivalentes. Assim, no grupo das razões plasma/urina, a ureia seria o biomarcador de escolha.

Tanto a razão plasma/urina da ureia quanto da creatinina apresentaram desempenhos equivalentes com seus respectivos valores no plasma. A razão da ureia, além disso, apresentou a soma dos valores de especificidade e sensibilidade idênticos ao plasma; assim, a opção pela ureia no plasma se justificaria pelo menor custo. Já a razão da creatinina apresentou a soma dos valores de especificidade e sensibilidade inferior ao plasma, o que também justificaria a sua escolha no plasma.

As razões da FAL e da GGT apresentaram desempenhos equivalentes aos seus valores na urina, mas inferiores ao plasma; o que justificaria a opção pela FAL e GGT no plasma. Se a escolha fosse feita entre a urina e a razão plasma/urina, para a FAL a melhor opção seria a urina, uma vez que a soma da sua especificidade e sensibilidade foi maior na urina. Já para a GGT, que apresenta uma soma idêntica para a urina e a razão plasma/urina, a opção pela urina se justificaria pelo menor custo.

Para a cistatina C, a melhor opção seria a sua determinação no plasma, tendo em vista que, no plasma, o seu desempenho foi superior à urina e à razão plasma/urina. Já para a albumina, a melhor opção seria sua concentração urinária, que apresentou desempenho superior ao plasma e à razão plasma/urina.

7.4.2 Desempenho dos biomarcadores na detecção da macroalbuminúria em pacientes com DM1

Os biomarcadores plasmáticos, com exceção da albumina, apresentaram desempenhos equivalentes na detecção da macroalbuminúria nos pacientes com DM1. Além disso, todos eles demonstraram uma maior capacidade de classificar corretamente os diabéticos sem macroalbuminúria. A FAL, no entanto, apresentou a maior soma da especificidade e sensibilidade, o que a torna a melhor opção dentre os biomarcadores plasmáticos.

Assal *et al.* (2013), assim como nós, verificaram que a cistatina C plasmática apresentou um desempenho superior às enzimas urinárias por eles avaliadas (NGAL e NAG) na identificação da macroalbuminúria em pacientes com DM2. Já Maclsaac *et al.* (2007) verificaram que, em pacientes com DM1 e DM2, a cistatina C teve um desempenho superior à creatinina na detecção de DRC moderada (TFG <60 mL/min/1,73m²), que normalmente coincide com o estágio de macroalbuminúria.

Quanto aos biomarcadores urinários, a RAC, obviamente, apresentou acurácia perfeita na detecção da macroalbuminúria, tendo em vista que ela é o parâmetro empregado na classificação dos estágios da albuminúria. O cutoff obtido para a RAC na identificação da macroalbuminúria (329,3 mg/g) foi próximo ao valor já estabelecido na literatura, que é de 300 mg/g.

Abaixo da RAC, a RCC demonstrou o melhor desempenho dentre os biomarcadores urinários, apresentando também a maior especificidade e sensibilidade; sendo, portanto, a melhor opção na urina para a detecção da macroalbuminúria. De forma semelhante ao nosso trabalho, Jeon *et al.* (2011) relatam acurácia moderada da RCC na detecção de TFG <60 mL/min/1,73m² em pacientes com DM2.

A RFC e a RGC apresentaram desempenhos equivalentes, além de sensibilidade idênticas e especificidade muito próximas. Dessa forma, a opção por uma ou outra enzima não teria grande impacto quanto à capacidade de detecção da macroalbuminúria.

Assim como os biomarcadores plasmáticos, os biomarcadores urinários também apresentaram uma capacidade maior de classificar corretamente os diabéticos sem macroalbuminúria.

No que se refere às razões plasma/urina, a ureia, creatinina, FAL e GGT apresentaram desempenhos equivalentes entre si, e todas as razões também apresentaram uma capacidade maior de classificar corretamente os diabéticos sem macroalbuminúria. A razão da ureia, entretanto, apresentou a maior soma de especificidade e sensibilidade, assim, ela seria a melhor opção para a detecção da macroalbuminúria.

A razão plasma/urina da ureia apresentou desempenho equivalente à sua concentração no plasma e superior à urina. Além disso, sua sensibilidade foi idêntica a do plasma e a especificidade foi maior. Dessa forma, a melhor opção para a ureia seria a razão plasma/urina. A razão da creatinina também apresentou desempenho equivalente ao plasma, porém a soma da sua especificidade e sensibilidade foi maior no plasma, assim, sua melhor opção seria a determinação plasmática.

A razão da FAL apresentou desempenho inferior ao plasma e equivalente à urina, sendo a soma da especificidade e sensibilidade maior para a razão, o que torna sua razão plasma/urina a melhor opção. A razão da GGT, por sua vez, foi equivalente ao seu valor no plasma e na urina, sendo a soma da especificidade e sensibilidade maior para a urina; dessa forma, a determinação urinária seria a melhor opção para a GGT.

Para a cistatina C, o plasma e a urina apresentaram desempenhos equivalentes e superiores à razão plasma/urina, sendo a especificidade e

sensibilidade maiores para a urina; assim, a melhor opção para a cistatina C seria a urina. Quanto à albumina, a melhor opção é a urina, uma vez que seu desempenho foi superior ao plasma e à razão plasma/urina.

7.4.3 Desempenho dos biomarcadores na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria em pacientes com DM1

A cistatina C, ureia, creatinina e FAL apresentaram desempenhos equivalentes entre si na detecção da microalbuminúria ou macroalbuminúria nos pacientes com DM1. A GGT, por sua vez, foi equivalente à ureia, creatinina e à FAL, mas inferior à cistatina C. Além disso, estes biomarcadores plasmáticos apresentaram uma capacidade maior de classificar corretamente os diabéticos sem microalbuminúria ou macroalbuminúria, porém, a cistatina C apresentou a maior especificidade e sensibilidade. Dessa forma, ela é a melhor opção dentre os biomarcadores plasmáticos para a detecção da microalbuminúria/macroalbuminúria.

Diferentemente do nosso achado, Maclsaac *et al.* (2007) avaliando pacientes com DM1 e DM2, observaram que a cistatina C teve melhor desempenho do que a creatinina na identificação de DRC leve (TFG <90 mL/min/1,73m²), que normalmente coincide com o estágio de microalbuminúria, bem como na identificação de DRC moderada (TFG <60 mL/min/1,73m²), que normalmente coincide com a macroalbuminúria.

No grupo dos biomarcadores urinários, como esperado, a RAC apresentou acurácia perfeita na detecção dos pacientes com microalbuminúria ou macroalbuminúria, o que se justifica pelo fato de ser a RAC o parâmetro empregado na classificação dos estágios da albuminúria. O cutoff obtido para a RAC (33,6 mg/g) foi bem próximo do valor já estabelecido na literatura para o estágio de microalbuminúria, que é de 30 mg/g.

A RCC apresentou desempenho equivalente à RFC e superior à RGC, e a RFC e a RGC foram equivalentes entre si. Estes biomarcadores também apresentaram uma capacidade maior de classificar corretamente os diabéticos sem microalbuminúria ou macroalbuminúria. A RCC, no entanto, apresentou a maior soma de especificidade e sensibilidade, o que a torna a melhor opção dentre os biomarcadores urinários abaixo da RAC.

Quanto às razões plasma/urina, a razão da ureia apresentou desempenho superior às demais razões, bem como a maior soma de especificidade e sensibilidade, sendo assim a melhor opção no grupo das razões plasma/urina.

A razão plasma/urina da ureia apresentou desempenho superior à sua concentração urinária e equivalente ao plasma, sendo que a soma da sua especificidade e sensibilidade foi maior no plasma; o que significa que a melhor opção para a ureia é sua determinação plasmática. De forma semelhante, a razão da creatinina apresentou desempenho equivalente ao plasma, com a maior soma de especificidade e sensibilidade no plasma, sendo assim, sua melhor opção também é a determinação plasmática.

As razões da FAL e da GGT apresentaram desempenhos inferiores ao plasma e equivalentes à urina, assim, a melhor opção para estas enzimas seria a sua determinação plasmática. Se a escolha fosse feita entre a urina e razão plasma/urina, para a FAL, a melhor opção seria a urina, uma vez que a soma da sua especificidade e sensibilidade foi maior na urina. Já para a GGT, a soma foi maior na razão plasma/urina, sendo esta portanto, sua melhor opção.

Para a cistatina C, a melhor opção é sua determinação no plasma, tendo em vista que sua concentração plasmática apresentou desempenho superior à razão plasma/urina e equivalente à urina, porém com a soma da especificidade e sensibilidade maior no plasma do que na urina. Já para a albumina, a melhor opção é sua determinação urinária, uma vez que a albumina apresentou um desempenho na urina superior ao plasma e à razão plasma/urina.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Assim como os biomarcadores tradicionais empregados para a avaliação da função renal (ureia e creatinina) e da ND (RAC e TFG estimada pelas 6 equações), os novos biomarcadores avaliados (cistatina C no plasma e razão plasma/urina, FAL no plasma e na urina, e GGT na urina) foram capazes de discriminar indivíduos saudáveis de indivíduos com diabetes.
- A cistatina C e a FAL foram capazes de discriminar diabéticos sem ND de diabéticos com ND tanto no plasma quanto na urina; já a GGT só conseguiu discriminar estes dois grupos no plasma. Quanto às razões plasma/urina, os novos biomarcadores não discriminaram entre diabéticos sem e com ND, ao contrário da ureia, creatinina e albumina.
- As 6 equações empregadas para a estimativa da TFG foram capazes de discriminar diabéticos sem ND de diabéticos com ND. No entanto, apenas a equação proposta por Tan *et al.* (2002) diferenciou indivíduos saudáveis de diabéticos sem ND, o que pode indicar um melhor desempenho desta equação na avaliação e acompanhamento das alterações na TFG dos pacientes com DM1.
- Para o monitoramento da progressão da albuminúria, a cistatina C apresentou o melhor desempenho dos novos biomarcadores. No plasma, a cistatina C foi capaz de diferenciar os três estágios da albuminúria (normoalbuminúria x microalbuminúria x macroalbuminúria), ao contrário da FAL e GGT. Na urina e para a razão plasma/urina, a cistatina C apenas não conseguiu diferenciar normoalbuminúria de microalbuminúria, enquanto a FAL e a GGT não diferenciaram nenhum dos três estágios.
- Quanto às equações empregadas para a estimativa da TFG, todas foram capazes de distinguir os estágios de microalbuminúria e macroalbuminúria do estágio de normoalbuminúria, porém não diferenciaram microalbuminúria de macroalbuminúria.

- A cistatina e a GGT não apresentaram diferenças nos diabéticos quanto ao sexo, tanto no plasma quanto na urina, e a FAL apresentou-se maior no sexo masculino apenas no plasma. Estes achados facilitam o emprego dos novos biomarcadores na prática clínica, pela possibilidade de se adotar um único intervalo de referência.
- Os novos biomarcadores no plasma e a cistatina C também na urina não diferiram conforme o IMC, o que favorece a utilização destes na clínica, haja vista o número significativo de indivíduos com sobrepeso/obesidade na população de uma forma geral. Outro fator que favorece a utilização dos novos biomarcadores é o fato de não terem apresentado diferenças quanto ao tabagismo, tanto no plasma quanto na urina.
- Dos novos biomarcadores, apenas a cistatina C plasmática elevou-se conforme o tempo de diagnóstico do diabetes, o que pode indicar uma maior eficiência deste biomarcador no acompanhamento da função renal dos pacientes diabéticos.
- No plasma, os novos biomarcadores, além de apresentarem correlação moderada entre si, apresentaram correlações de moderada a forte com os marcadores clássicos de função renal (ureia e creatinina) e com os parâmetros empregados no diagnóstico da ND (RAC e TFG). Já na urina, a cistatina C foi o único biomarcador que apresentou uma correlação moderada com a RAC. Os novos biomarcadores apenas apresentaram uma correlação fraca entre si na urina e nenhum deles demonstrou uma correlação considerável com a TFG.
- Para o diagnóstico da ND, a cistatina C plasmática foi o biomarcador que mais se aproximou da RAC, apresentando segundo a AUC um desempenho equivalente a esta, além de especificidade muito próxima. O que pode tornar a RAC o biomarcador de escolha neste caso, no entanto, é o fato dela apresentar uma sensibilidade maior do que a cistatina C.
- Para a detecção da macroalbuminúria, a cistatina C urinária foi que apresentou o melhor desempenho dentre todos os biomarcadores. Apesar de possuir AUC

equivalente aos biomarcadores plasmáticos, a cistatina C urinária supera todos eles e as razões plasma/urina por apresentar a maior soma de especificidade e sensibilidade.

- Para a detecção da microalbuminúria/macroalbuminúria, a cistatina C plasmática foi o biomarcador de melhor desempenho. Apesar de possuir AUC equivalente a sua determinação na urina, bem como à ureia, creatinina e FAL plasmáticas e à razão plasma/urina da ureia, a cistatina C plasmática supera todos eles por possuir a maior soma de especificidade e sensibilidade.

9 CONCLUSÃO

- A melhor opção para a avaliação da cistatina C nos pacientes com DM1 é sua determinação no plasma, uma vez que a cistatina C plasmática foi capaz de diferenciar indivíduos saudáveis de diabéticos e diabéticos sem ND de diabéticos com ND, além de diferenciar os três estágios da albuminúria e apresentar o seu melhor desempenho no diagnóstico da ND.
- A melhor opção para a avaliação da FAL nos pacientes com DM1 também é sua determinação no plasma, tendo em vista que a FAL plasmática diferenciou indivíduos saudáveis de diabéticos, diabéticos sem ND de diabéticos com ND e os estágios de normoalbuminúria e microalbuminúria do estágio de macroalbuminúria, além de ter apresentado o seu melhor desempenho no diagnóstico da ND.
- Como os outros dois novos biomarcadores, a melhor opção para a avaliação da GGT nos pacientes com DM1 é sua determinação no plasma, uma vez que a GGT plasmática foi capaz de diferenciar diabéticos sem ND de diabéticos com ND e o estágio de normoalbuminúria dos estágios de microalbuminúria e macroalbuminúria, além ter apresentado o seu melhor desempenho no diagnóstico da ND.
- Dos novos biomarcadores merece especial destaque a cistatina C, pois além de diferenciar indivíduos saudáveis de diabéticos e diabéticos sem ND de diabéticos com ND, ela foi o biomarcador que melhor acompanhou a progressão da albuminúria. Além disso, abaixo da RAC, a cistatina C apresentou o melhor desempenho no diagnóstico da ND.
- Os novos biomarcadores, portanto, sobretudo a sua determinação plasmática e, em especial a cistatina C, podem ser úteis na avaliação e no monitoramento da função renal, bem como no diagnóstico da ND em pacientes com DM1.

10 PERSPECTIVAS DE ESTUDO

- Avaliar a validade externa dos achados deste estudo em pacientes com DM2, a fim de verificar se as conclusões obtidas podem ser generalizadas aos dois tipos mais frequentes de diabetes (DM1 e DM2).
- Verificar, por meio de estudos longitudinais, se os novos biomarcadores são mais precoces que a RAC na identificação da ND.
- Avaliar se os novos biomarcadores são capazes de diferenciar a DRC clássica da DRC não-albuminúrica.
- Avaliar um grupo de diabéticos mais homogêneo em termos metabólicos e hemodinâmicos, a fim de verificar se a razão plasma/urina da FAL será capaz de diferenciar diabéticos de indivíduos saudáveis e diabéticos sem ND de diabéticos com ND.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.36, sup.1, p.S67-S74, jan. 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.37, sup.1, p.S81-S90, jan. 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2015. **Diabetes Care**, v.38, sup.1, p.S1-S94, jan. 2015.
- ANGUIZOLA, J. *et al.* Review: glycation of human serum albumin. **Clin. Chim. Acta**, p.64-76, out. 2013.
- ARORA, M. K.; SINGH, U. K. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. **Vas. Pharmacology**, v.58, p.259-271, 2013.
- ASSAL, H. S. *et al.* Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Clin. Med. Insights: Endocrinology and Diabetes**, n.6, p.7-13, 2013.
- ATKINSON, M. A.; CHERVONSKY, A. Does the gut microbiota have a role in type 1 diabetes? Early evidence from humans and animals models of the disease. **Diabetologia**, n.55, p.2868-2877, ago. 2012.
- ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v.383, n.9911, p.69-82, 2014.
- BADAL, S. S.; DANESH, F. R. New insights into molecular mechanisms of diabetic kidney disease. **Am. J. Kidney Dis.**, v.63, n.2, sup.2, p.S63-S83, 2014.
- BASTOS, M. G. Biomarcadores de função renal na DRC. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **E-book: biomarcadores na nefrologia**. Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2011. cap.1.
- BONVENTRE, J. V. Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes? **Semin. Nephrol.**, v.32, n.5, p.452-462, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 160p. (Cadernos de Atenção Básica, n. 36).
- BROTT, D. A. *et al.* Characterization of renal biomarkers for use in clinical trials: biomarker evaluation in healthy volunteers. **Drug Des. Devel. Therapy**, n.8, p.227-237, 2014.
- BULUM, T. *et al.* Alkaline phosphatase is independently associated with renal function in normoalbuminuric type 1 diabetic patients. **Diabetologia**, n.56, sup.1, p. S476, 2013.

BURN, P. Type 1 diabetes. **Nature Reviews – Drug Discovery**, v.9, p.187-188, mar. 2010.

CARACENI, P.; TUFONI, M.; BONAVITA, M. E. Clinical use of albumin. **Blood Transfus.**, n.11, sup.4, p. s18-s25, 2013.

CARVALHO, J. A. M. de *et al.* Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. **Clin. Chim. Acta**, n.412, p.1407-1411, 2011.

D'ARRIGO, G. *et al.* I test diagnostici e l'analisi della curva roc. **G. Ital. Nefrol.**, v.28, n.6, p.642-647, 2011.

DHARNIDHARKA, V. R.; KWON, C.; STEVENS, G. Serum cystatin c is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. **Am. J. Kidney Dis.**, v.40, n.2, p.221-226, ago. 2002.

DIB, S. A.; GOMES, M. B. Etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus: prognostic factors for the evolution of residual β cell function. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.1, n.25, p.1-8, 2009.

DISTEFANO, J. K.; TAILA, M.; ALVAREZ, M. L. Emerging roles for miRNAs in the development, diagnosis and treatment of diabetic nephropathy. **Curr. Diab. Rep.**, v.13, p.582-591, 2013.

EVANGELOPOULUS, A.A. *et al.* The impact of demographic characteristics and lifestyle in the distribution of cystatin C values in a healthy greek adult population. **Card. Res. Practice**, 2011.

FARMER, A. J. *et al.* Optimal strategies for identifying kidney disease in diabetes: properties of screening tests, progression of renal dysfunction and impact of treatment – systematic review and modelling of progression and cost-effectiveness. **Health Technol. Assess.**, v.18, n.14, 162p., fev. 2014.

FERGUSON, M. A.; WAIKAR, S. S. Established and emerging markers of kidney function. **Clinical Chemistry**, v.58, n.4, p.680-689, 2012.

FILLER, G.; YASIN, A.; MEDEIROS, M. Methods of assessing renal function. **Pediatr. Nephrol.**, n.29, p.183-192, 2014.

FINEBERG, D.; JANDELEIT-DAHLM, K. A. M.; COOPER, M. E. Diabetic nephropathy: diagnosis and treatment. **Nat. Rev. Endocrinol**, v.9, p.713-723, 2013.

FURUKAWA, M. *et al.* Pathogenesis and novel treatment from the mouse model of type 2 diabetic nephropathy. **Sci. World J.**, p.1-8, 2013.

GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **J. Bras. Nefrol.**, v.33, n.2, p.261-267, 2011.

GOSMANOV, A. R.; WALL, B. M.; GOSMANOVA, E. O. Diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. **Am. J. Med. Sci.**, v.347, n.5, p.406-413, 2014.

GRUBB, A. *et al.* First certified reference material for cystatin c in human serum ERM-DA 471/IFCC. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.48, n.11, p.1619-1621, 2010.

ICHIHARA, K.; SAITO, K.; ITOH, Y. Sources of variation and reference intervals for serum cystatin C in a healthy Japanese adult population. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v.45, n.11, p.1570., 2007.

INKER, L. A. *et al.* Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin c. **N. Engl. J. Med.**, n.367, p.20-29, jul. 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: ciclos de vida – Brasil e grandes regiões. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 92p.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas. 6nd ed.** Bruxelas, Bélgica: International Diabetes Federation, 2013. 160p.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas: poster – 2014 Update. 6nd ed.** Bruxelas, Bélgica: International Diabetes Federation, 2014. 2p.

JARRAYA, F. *et al.* Microalbuminuria: a useful marker of cardiovascular disease. **Iranian J. Kidney Dis.**, v.7, n.3, p.178-186, maio 2013.

JHA, J. C.; JANDELEIT-DAHM, K. A. M.; COOPER, M. E. New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. **Adv. Chr. Kidney Dis.**, v.21, n.3, p. 318-326, mai. 2014.

JEON, Y. K. *et al.* Cystatin C as na early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. **J. Korean Med. Sci.**, n.26, p.258-263, 2011.

JUNG, K. Urinary enzymes and low-molecular-mass proteins as indicators of diabetic nephropathy. **Clin. Chem.**, v.34, n.3, p.544-547, 1988.

JURASCHEK, S.P. *et al.* Comparison of serum concentrations of β -trace protein, β 2-microglobulin, cystatin C and creatinine in the US population. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v.8, p.584-592, abr. 2013.

KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int. Supp.**, v.3, n.1, 150p., jan. 2013.

KIM, S.S. *et al.* Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, v.36, p.656-661, mar.2013.

KUNUTSOR, S. K. *et al.* Liver enzymes and risk of all-cause mortality in general populations: a sistematic review and meta-analysis. **Int. J. Epidemiology**, n.43, p.187-201, 2014.

KWIATKOWSKA, E. *et al.* Gamma-glutamyl transpeptidase as the marker of kidney graft function. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v.23, n.6, p.947-952, 2014.

LACQUANITI, A. *et al.* "Normoalbuminuric" diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL. **Acta Diabetol.**, n.50, p.935-942, jun. 2013.

LEE, D-H. *et al.* Serum γ -glutamyltransferase was differently associated with microalbuminúria by status of hypertension or diabetes: the coronary artery risk development in Young adults (CARDIA) study. **Clinical Chemistry**, v.51, n.7, p.1185-1191, 2005.

LEE, S-Y.; CHOI, M. E. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. **Pediatr. Nephrol.**, jul. 2014.

LEVEY, A. S. *et al.* A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of Internal Medicine**, v.150, n.9, p.604-612, mai. 2009.

LEVEY, A. S. *et al.* Expressing the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate with standardized serum creatinine values. **Clinical Chemistry**, v.53, n.4, p.766-772, 2007.

LI, M.; SONG, L.; QIN, X. Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. **J. Cell. Mol. Med.**, v.18, n.5, p.749-758, mai. 2014.

LIM, S. C. *et al.* Adipocytokine zinc α -2 glycoprotein (ZAG) as a novel urinary biomarker for normo-albuminuric diabetic nephropathy. **Diabet. Med.**, n.29, p.945-949, 2012.

MACISAAC, R. J. *et al.* The accuracy of cystatin C and commonly used creatinine-based methods for detecting moderate and mild chronic kidney disease in diabetes. **Diabet. Med.**, n.24, p.443-448, 2007.

MACISAAC, R. J.; EKINCI, E. I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **Am. J. Kidney Dis.**, v.63, n.2, sup.2, p.S39-S62, 2014.

MACISAAC, R. J.; PREMARATNE, E.; JERUMS, G. Estimating glomerular filtration rate in diabetes using serum cystatin c. **Clin. Biochem. Rev.**, v.32, p.61-67, mai. 2011.

MATYS, U. *et al.* Assessment of kidney function in diabetic patients. Is there a role for new biomarkers NGAL, cystatin C and KIM-1? **Adv. Med. Sciences**, v.58, n.2, p.353-361, 2013.

MCCMAHON, G. M.; WAIKAR, S. S. Biomarkers in nephrology: core curriculum 2013. **Am. J. Kidney Dis.**, v.62, n.1, p.165-178, 2013.

MILLER, W. G. *et al.* Questões atuais relativas à dosagem e à descrição da excreção urinária de albumina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.46, n.3, p.187-206, jun. 2010.

MOHAMMADI-KARAKANI, A. *et al.* Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients. *J. Clin. Labor. Analysis*, n.21, p.413-417, 2007.

MORESCO, R. N. *et al.* Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. *Clinica Chimica Acta*, v.421, p.17-30, 2013.

MORITA, E. *et al.* Clinical significance of urinary enzymes in diabetic nephropathy. *J. Diabetic Complications*, v.5, n.2-3, p.158-159, 1991.

MOTTL, A. K. *et al.* Normoalbuminuric diabetic kidney disease in the U.S population. *J. Diabetes Complic.*, n.27, p.123-127, 2013.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDOQI™ Clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.*, v.49, n.2, sup.2, p.S1-S180, fev. 2007.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDOQI Clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update. *Am. J. Kidney Dis.*, v.60, n.5, p.850-886, 2012.

NAUTA, F. L. *et al.* Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care*, v.34, p.975-981, abr. 2011.

NOKOFF, N.; REWERS, M. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, n.1281, p.1-15, 2013.

OH, S.W.; HAN, K.H.; HAN, S.Y. Associations between renal hyperfiltration and serum alkaline phosphatase. *Plos One*, v.10, n.4, abr. 2015.

ÖZDEN, T.A. *et al.* Effect of hypo- and euthyroid status on serum cystatin C levels. *J. Clin. Res. Ped. Endo.*, v.2, n.4, p.155-158, 2010.

PATRICK, A.W. *et al.* Urinary excretion of intestinal alkaline phosphatase in early diabetic nephropathy. *Diabetologia*, v.36, sup.1, p.823, set. 1993.

PENNEMANS, V. *et al.* Establishment of reference values for novel urinary biomarkers for renal damage in the healthy population: are age and gender an issue? *Clin. Chem. Lab. Med.*, v.51, n.9, p.1795-1802, 2013.

PHILLIPS, A. Diabetic nephropathy. *Medicine*, v.39, n.8, p.470-474, 2011.

RATNER, B. The correlation coefficient: its values range between +1/-1, or do they? *J. Targ. Measur. Anal. Marketing*, n.17, p.139-142, 2009.

REIDY, K. *et al.* Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J. Clin. Invest.*, v.124, n.6, p.2333-2340, jun. 2014.

RODRÍGUEZ, S. A. *et al.* Diabetes mellitus. *Medicine*, v.11, n.17, p.995-1002, 2012.

ROSHAN, B.; STANTON, R. C. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. **J. Nephropathology**, v.2, n.4, p.234-240, 2013.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.34, p.e61-e99, jun. 2011.

SANDILANDS, E. A. *et al.* Measurement of renal function in patients with chronic kidney disease. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v.76, n.4, p.504-515, jun. 2013.

SANTOS, M.; WAGNER, R. Cistatina C: marcador precoce para doença renal crônica em pacientes com diabetes melito tipo 2. **Cadernos de Escola de Saúde**, v. 2, p.85-101, 2013.

SATOH-ASAHARA, N. *et al.* Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v.6, p.265-273, fev. 2011.

SCHMID, C. *et al.* Triiodothyronine stimulates cystatin C production in bone cells. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, n.419, p.425-430, 2012.

SHLIPAK, M. G.; MATTES, M. D.; PERALTA, C. A.; Update on cystatin c: incorporation into clinical practice. **Am. J. Kidney Dis.**, v.62, n.3, p.595-603, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diagnóstico e tratamento do diabetes tipo 1: atualização 2012**. Posicionamento oficial SBD nº1, nov. 2012. 32p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes 2014-2015**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015. 390p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de diálise SBN 2013**. [S.l.:s.n.], [2013 ou 2014]. 41 slides, color.

SPEECKAERT, M. M. *et al.* Immunochemically unreactive albumin in urine: fiction or reality? **Crit. Rev. Clin. Labor. Sciences**, v.48, n.2, p.87-96, 2011.

SUN, Y-M. *et al.* Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v.433, p.359-361, 2013.

SWETS, J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, v.240, p.1285-1293, jun.1988.

TAGLE, R.; GONZÁLEZ, F.; ACEVEDO, M. Microalbuminuria y excreción urinaria de albúmin em la práctica clínica. **Rev. Med. Chile**, n.140, p.797-805, 2012.

TALIERCIO, J. J. *et al.* Prognostic importance of serum alkaline phosphatase in CKD stages 3 – 4 in a clinical population. **Am. J. Kidney Dis.**, v.62, n.4, p.703-710, out. 2013.

TAN, G. D. *et al.* Clinical usefulness of cystatin c for the estimation of glomerular filtration rate in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v.25, n.11, p. 2004-2009, nov. 2002.

TAVAFI, M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. **J. Ren. Inj. Prev.**, v.2, n.2, p.59-62, 2013.

THOMAS, S. Diabetic nephropathy. **Medicine**, v.38, n.12, p.639-643, dez. 2010.

TIDMAN, M.; SJÖSTRÖM, P.; JONES, I. A comparasion of GFR estimating formulae based upon s-cystatin c and s-creatinine and a combination of the two. **Nephrol. Dial. Transplant.**, n.23, p.154-160, 2008.

TOGASHI, Y.; MIYAMOTO, Y. Urinary cystatin c as a biomarker for diabetic nephropathy and its immunohistochemical localization in kidney in zucker diabetic fatty (ZDF) rats. **Exper. Tox. Pathology**, n.65, p.615-622, 2013.

TONOLO, G.; CHERCHI, S. Tubulointerstitial disease in diabetic nephropathy. **Int. J. Nephrol. Renov. Disease**, n.7, p.107-115, mar. 2014.

TRAMONTI, G.; KANWAR, Y.S. Review and discussion of tubular biomarkers in the diagnosis and management of diabetic nephropathy. **Endocrine**, v.43, p.494-503, 2013.

UCHIDA, K.; GOTOH, A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. **Clin. Chim. Acta**, n.323, p.121-128, 2002.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. **2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States**. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014. 2v.

USLU, S. Serum cystatin C and urinary enzymes as screening markers of renal dysfunction in diabetic patients. **J. Nephrol.**, v.18, n.5, p.559-567, 2005.

WANG, C. *et al.* New urinary biomarkers for diabetic kidney disease. **Biomarker Research**, v.1, n.9, 2013.

WEI, L. *et al.* Reference intervals for serum cystatin c and factors influencing cystatin c levels other than renal function in the elderly. **Plos One**, v.9, n.1, jan. 2014.

WOO, K. *et al.* Clinical usefulness of serum cystatin C as a marker of renal function. **Diabetes Metab. J.**, n.38, p.278-284, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of a WHO Consultation**. Geneva: World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, 1999. 65p.

YAMAGISHI, S.; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. **Oxid. Med. Cel. Long**, v.3, n.2, p.101-108, mar./abr. 2010.

YILMAZ, M. I. *et al.* Serum gamma-glutamyltransferase levels are inversely related to endothelial function in chronic kidney disease. **Int. Urol. Nephrol.**, n.45, p.1071-1078, 2013.

ZHANG, P.P. *et al.* Evaluation of glomerular filtration rate using cystatin C in diabetic patients analysed by multiple factors including tubular function. **J. Int. Med. Res**, n.38, p.473-483, 2010.

ZELMANOVITZ, T. *et al.* Diabetic nephropathy. **Diabetol. Metab. Syndrome**, v.1, n.10, [s.p.], 2009.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE - 0392.0.203.000-11

**Interessado(a): Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de setembro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral".

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte



Registro CEP: 006/2012 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

Belo Horizonte, 30 de março de 2012.

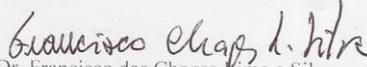
Ilma. Sra.
Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes
Pesquisadora Responsável

Informamos-lhe que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 30 de março de 2012, analisou e **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado: "Estudo de enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose.", registrado neste CEP sob número 006/2012, no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

OBS.:

Após o início da pesquisa, o pesquisador responsável deverá enviar ao CEP relatórios semestrais e final (para o primeiro semestre o prazo é 30 de junho; para o segundo semestre é 31 de dezembro).

Atenciosamente,


Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva
Coordenador do CEP

ANEXO C – Ficha Clínica**FICHA CLÍNICA**

Projeto: **“Estudo da enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose.”**

Número de identificação: _____ Número do prontuário: _____

Data da coleta: _____

1. Identificação

Nome: _____

Nascimento: _____ Sexo: M__ F__ Naturalidade: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Tel: _____ Cel: _____

2. Dados clínicos

Peso (kg): _____ Altura (m): _____ IMC (kg/m²): _____

Circunferência abdominal (cm): _____

Pressão sanguínea (mmHg): _____

Espessura íntimo-medial das artérias carótidas (mm): _____

Data do diagnóstico do diabetes: _____

História familiar: () sim () não

Patologias associadas: _____

Medicamentos em uso: _____

Complicações do diabetes: _____

ANEXO D – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)****PROJETO DE PESQUISA: “Estudo da enzima ADAMTS13 e de outros marcadores de hipercoagulabilidade em pacientes diabéticos e a relação com o desenvolvimento de nefropatia e aterosclerose”**

Prezado (a) Sr.(a),

Este projeto tem por objetivo estudar a coagulação do sangue, os processos inflamatórios e as doenças renais que podem ocorrer nos pacientes diabéticos. Para obter a conclusão da pesquisa, será necessário comparar os resultados dos exames dos pacientes com diabetes que possuem problemas renais com os resultados de pacientes com diabetes que não possuem problemas renais e de indivíduos não diabéticos (grupos controles).

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar poderá fazê-lo doando 10 mL de seu sangue e uma amostra da sua urina para o uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas para pesquisas. Se você não quiser participar, não haverá qualquer problema e se você fizer parte do grupo de pacientes, não haverá alteração no seu tratamento e assistência recebida pelo seu médico caso você não aceite participar do estudo. As amostras coletadas serão utilizadas para a realização de alguns exames de laboratório com o objetivo de estudar os problemas circulatórios e renais que podem ocorrer nos pacientes diabéticos.

Seu nome será mantido em segredo, não sendo divulgado em nenhuma hipótese.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

De acordo: _____

(Assinatura)

Nome: _____

Data: ___/___/_____

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo, por favor, entre em contato com a Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes da Faculdade de Farmácia / UFMG no telefone 3409-6884 ou com a farmacêutica Caroline Pereira Domingueti no telefone 3409-6902.

Desde já agradecemos sua valiosa participação.

Profa. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Caroline Pereira Domingueti

Data: ___/___/_____

**Santa Casa de Misericórdia – Av. Francisco Sales, 1111, Bairro Santa Efigênia
Belo Horizonte, MG – Brasil – Cep 30.150.221
Telefone (31) 3238-8100**

**COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade
Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG –
Brasil. Telefax (31) 3409-4592. coep@prpq.ufmg.br.**