



FMUC FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOÃO PEDRO FARIA DIAS

***Biomarcadores precoces na Nefropatia Diabética***  
***Do presente para o futuro***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

DRA. MARGARIDA BASTOS

***Biomarcadores precoces na Nefropatia Diabética***  
***Do presente para o futuro***

**Aluno:** João Pedro Faria Dias

**Afiliação:** Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

**Endereço de Correio Eletrónico:** [joaodias1994@live.com.pt](mailto:joaodias1994@live.com.pt)

Doutora Margarida Bastos  
Unidade Curricular de Endocrinologia – FMUC  
Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo – CHUC

[margaridabastos@chuc.min-saude.pt](mailto:margaridabastos@chuc.min-saude.pt)

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1. RESUMO.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUÇÃO.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
5. NEFROPATIA DIABÉTICA – DEFINIÇÃO.....	10
6. FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA DIABÉTICA.....	11
7. FATORES DE RISCO.....	15
8. RASTREIO DA NEFROPATIA DIABÉTICA.....	18
9. BIOMARCADOR – DEFINIÇÃO.....	19
10. BIOMARCADORES DE NEFROPATIA DIABÉTICA.....	20
10.1 ALBUMINÚRIA.....	21
10.1.1 Limitações da TFG e albuminúria.....	21
10.2 BIOMARCADORES ASSOCIADOS À PATOGÉNESE DA NEFROPATIA DIABÉTICA.....	23
10.2.1 BIOMARCADORES DO STRESSE OXIDATIVO.....	24
10.2.1.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanina (8-OHdG).....	24
10.2.1.2 AGES (produtos finais de glicação avançada) - Pentosidina.....	25
10.2.1.3 Glutatião s-transferase (GST) e Malondialdeído (MDA).....	25
10.2.1.4 Heme oxigenase-1 urinária (uHO-1).....	26
10.2.2 BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO.....	26
10.2.2.1 Proteína quimiotática de monócitos (MCP-1).....	27
10.2.2.2 Citocinas pro-inflamatórias.....	27
10.2.2.3 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	28
10.2.2.4 CD40 ligante solúvel (sCD40L), glicoproteína 40 da cartilagem (YKL-40) e quitotriosidase (CHIT1).....	28
10.2.3 BIOMARCADORES DA ATIVAÇÃO DO SRAA (SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA) – ANGIOTENSINOGENIO.....	29
10.3 BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO GLOMERULAR.....	30
10.3.1 Transferrina.....	31
10.3.2 Colagénio tipo IV.....	31
10.3.3 Proteínas específicas de podócitos: Podocina, Sinaptopodina, Nefrina e Podocalixina.....	32
10.3.4 Ceruloplasmina.....	33
10.3.5 Fator de transformação de crescimento $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).....	33
10.4 BIOMARCADORES TUBULARES.....	34
10.4.1 Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL).....	34

10.4.2 Kidney injury molecule-1 (KIM-1).....	35
10.4.3 Alfa-1-Microglobulina ( $\alpha$ 1-microglubulina).....	36
10.4.4 N-acetil - $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG).....	36
10.4.5 Cistatina C.....	37
10.4.6 Proteína de ligação aos ácidos gordos hepáticos (L-FABP) .....	38
10.4.7 Proteína ligante do retinol (RBP).....	38
11. INVESTIGAÇÃO NA NEFROPATIA DIABÉTICA .....	39
11.1 Proteómica .....	39
11.2 Metabolómica .....	40
11.3 Micro-RNA (mi-RNA) .....	40
12. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	41
13. AGRADECIMENTOS .....	43
14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AGES - Produtos finais de glicação avançada
- AGT - Angiotensinogénio
- ANG II - Angiotensina II
- AOPP - Produtos proteicos de oxidação avançada
- BMP-7 - Proteína óssea morfogenética 7
- CHIT1 - Quitotriosidase
- Da - Dalton
- DM - Diabetes *mellitus*
- DM1 - Diabetes *mellitus* tipo 1
- DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2
- DNPH - 2,4-dinitrophenylhydrazine
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DRT - Doença renal terminal
- DRD - Doença Renal no doente com diabetes
- EUA - Excreção urinária de albumina
- FR - Fator de risco
- GST - Glutatio s-transferase
- HNE - 4-hydroxy-nonenal;
- HbA1c - Hemoglobina glicada A1c
- HO-1 - Heme oxigenase 1
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-6 - Interleucina-6
- IL18 - Interleucina-18
- IP-10 - Proteína 10 induzida por interferão
- KIM-1 - Kidney injury molecule-1
- LDL-C - Colesterol LDL
- L-FABP - Proteína de ligação aos ácidos gordos hepáticos

LPO - Lipoperoxidação

MBG - Membrana basal glomerular

MCP-1 - Proteína quimiotóxica de monócitos;

MDA - Malondialdeído

MEC - Matriz extracelular

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAG - N-acetil - $\beta$ -D-glucosaminidase

ND - Nefropatia Diabética

NGAL - Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos

8-OHdG - 8-hidroxi-2'-desoxiguanina

PEDF - Fator derivado do epitélio pigmentado

PGDS - Prostaglandina sintetase tipo lipocalina

PKC - Proteína cinase C

RBP4 - Proteína ligante do retinol tipo 4

RAC - Relação albuminina/creatinina

ROS - Espécies reativas de oxigénio

sCD40L - CD40 ligante solúvel

SRAA - Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TFG - Taxa de filtração glomerular

TFGe - Taxa de filtração glomerular estimada

TGF-  $\beta$  - Fator de crescimento transformador- $\beta$

TNF-  $\alpha$  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

TNFR - Recetor do fator necrose tumoral

TG - Triglicéridos

uHO-1 - Heme oxigenase-1 urinária

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

YKL-40 - Glicoproteína 40 da cartilagem

## 1. RESUMO

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais causas de doença renal crónica, e representa a complicação microvascular mais frequente e séria da Diabetes *mellitus*. Atualmente, a albuminúria tem sido considerada como o marcador tradicional na deteção precoce do surgimento e progressão da ND. No entanto, alguns doentes com DM apresentam-se com alterações renais avançadas e declínio progressivo da função renal mesmo com níveis de albumina urinários normais, indicando que a albuminúria não corresponde à potencial chave de diagnóstico em estadios iniciais da ND.

A patogénese exata desta patologia é complexa e não muito elucidativa. Inúmeros fatores e mecanismos contribuem para o desenvolvimento e conseqüente aparecimento da ND. Um diagnóstico e tratamento precoces podem retardar a progressão da doença, favorecendo assim o prognóstico.

Na presente revisão científica é exposta uma visão geral da literatura, descrevendo alguns biomarcadores que foram associados à ND com potencial para a sua aplicação clínica, no intuito de prever o início e/ou monitorizar a progressão da ND.

Em particular, biomarcadores de lesão renal, inflamação e stresse oxidativo podem vir a ser ferramentas úteis na previsão desta patologia. A descoberta e a investigação centrada na proteómica, metabolómica e nos micro-RNAs representam uma nova estratégia para melhorar o diagnóstico, prognóstico e tratamento da ND. No entanto, a abordagem baseada nestas áreas ainda não está disponível na maioria dos laboratórios de química clínica.

O uso de um painel multimarcaadores ao invés da albuminúria e TFGe, parece integrar uma apreciação clínica interessante na deteção precoce da ND, incluindo marcadores de lesão glomerular, lesão tubular e marcadores associados à patogénese da doença, nomeadamente de inflamação e stresse oxidativo.

## PALAVRAS-CHAVE

Biomarcadores; Diabetes *mellitus*; Nefropatia Diabética; Lesão glomerular; Stresse Oxidativo.

## 2. ABSTRACT

Diabetic Nephropathy is one of the main causes of chronic kidney disease and represents the most common and severe microvascular obstruction of Diabetes *Mellitus*. Currently, albuminuria has been considered the traditional marker in ND premature detection and progress. However, some patients with DM have shown advanced renal alterations and declined renal function, despite having ordinary urinary albumin levels, meaning that albuminuria does not correspond to the potential key to an early stage diagnosis of ND.

The exact pathogenesis of this pathology is complex and not very clear. Various factors and mechanism contribute to the development and emergence of ND. An early diagnosis and treatment may slow down the progression of the illness, favouring the prognostic.

In this review it is aimed to expose an overall view of the literature, describing some biomarkers that have been associated to ND with potential for clinical applications, with the purpose to predict the beginning and/or monitor ND progression.

In particular, biomarkers for kidney damage, inflammation and oxidative stress may be useful tools to this pathology's prediction. The discovery and investigation centered in proteomics, metabolomics and in micro-RNAs represents a new strategy to improve the diagnosis, prognosis and treatment of ND. However, the approach based on these fields is not yet available in most clinical chemistry labs.

The use of a multimarker panel instead of albuminuria and TFG<sub>e</sub>, seems to integrate an interesting clinical appraisal in the early detection of ND, including glomerular and tubular lesion markers and markers linked to the pathogenesis of the illness, mainly the inflammation and oxidative stress.

### KEY-WORDS

Biomarkers; Diabetes *Mellitus*; Diabetic Nephropathy; Glomerular damage; Oxidative Stress.

### 3. INTRODUÇÃO

A Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença endócrina e metabólica que tem sério impacto na saúde humana, em todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento.<sup>1</sup> A morbidade e mortalidade da DM aumentaram continuamente a uma taxa alarmante nos últimos anos, e a população com diabetes está previsto em cerca de 439 milhões em todo o mundo até 2030.<sup>2</sup>

Em Portugal, segundo dados do Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes em Dezembro de 2016, a prevalência da diabetes em pessoas com DRC (doença renal crónica) em terapêutica de substituição renal era de 28,1%, tendo aumentando em média 0,02% ao ano desde 2011.<sup>3</sup> Naqueles com DRC e que se encontram em hemodiálise, a diabetes estava presente em 28,7% dos casos.<sup>3</sup>

O aumento da prevalência da diabetes está associado a diversos fatores, como: rápida urbanização, transição epidemiológica, transição nutricional, maior frequência de estilo de vida sedentário, maior frequência de excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional e, também, à maior sobrevida dos indivíduos com diabetes.<sup>1</sup>

A classificação da DM tem sido baseada na sua etiologia. Assim sendo, apresentam-se dois tipos principais de DM: o tipo 1, onde se subdivide em 1A (deficiência de insulina por destruição autoimune das células  $\beta$  comprovada por exames laboratoriais) e 1B (deficiência de insulina de natureza idiopática), e o tipo 2 (perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina).<sup>4</sup> As complicações da DM incluem retinopatia diabética, doenças cardiovasculares diabéticas e nefropatia diabética (ND), que é a mais comum e grave complicação da DM.<sup>2</sup>

A nefropatia diabética (ND) é uma das principais complicações crónicas microvasculares da DM e uma das principais causas de doença renal terminal (DRT), para quase metade de todos os casos incidentes decorridos nos países desenvolvidos<sup>5</sup>. Na maioria das vezes, esta desenvolve-se concomitantemente com doença macrovascular incluindo cardiovascular, cerebrovascular e doença arterial periférica.<sup>6</sup>

A ND tornou-se a principal causa de lesão renal crónica, iniciando-se com albuminúria A1, albuminúria A2 ou microalbuminúria por hiperfiltração glomerular, seguida de albuminúria A3 e, finalmente, instala-se a deterioração acentuada da função renal e DRT, o que pode eventualmente requerer terapia renal substitutiva.<sup>2,7</sup>

Tendo em conta o aumento da incidência tanto da DM como da ND, a detecção precoce da ND é de extrema importância, a fim de fornecer uma terapia apropriada que impeça ou retarde a evolução para DRT.<sup>8</sup>

Os biomarcadores desempenham um papel importante na detecção precoce de ND. Por muito tempo, a proteinúria foi considerada o *gold-standard* para avaliação e monitorização da função renal. No entanto, a função renal diminui em cerca de um terço dos doentes antes da ocorrência de proteinúria, o que torna inadequado detetar a proteinúria isoladamente para monitorizar a incidência e progressão da ND.<sup>2</sup> Assim sendo, precisamos procurar biomarcadores laboratoriais que surjam antecipadamente à albuminúria A2 ou aqueles que aparecem simultaneamente.

A investigação sobre os novos biomarcadores da ND centrou-se principalmente na identificação de componentes da urina e do sangue que melhorem a previsão de *endpoints* posteriores, incluindo a DRT, uma perda de TFG de 0,40% ou a morte. Há sim, também, uma necessidade urgente de identificar biomarcadores de estadios iniciais da DRD, quando os avanços no tratamento podem ter uma maior possibilidade de atenuar a progressão da doença, uma vez que nestes estadios a TFG é ainda frequentemente normal e antes do início de níveis fortemente preditivos de albuminúria.<sup>9</sup>

As opções terapêuticas atuais para a prevenção e o tratamento de DRD são limitadas. Infelizmente, o elevado custo da terapia de substituição renal exclui a acessibilidade generalizada para muitos pacientes que a necessitam, especialmente em países de baixo e médio rendimento. Somente uma minoria de doentes em todo o mundo, que necessita de terapia substitutiva, irá recebê-la; assim, em muitas partes do mundo, a doença renal em estadio terminal é uma sentença de morte.

Deste modo, o objetivo desta revisão científica será expor e descrever as recentes descobertas relativamente à detecção precoce da ND, focando-se nos novos biomarcadores e candidatos à prática clínica, que visam prevenir o início da ND e retardar a sua progressão, de modo a restringir urgentemente esta catástrofe na saúde humana, resultante da pandemia da DM.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

A consulta da literatura científica baseou-se em artigos de revisão nos últimos 8 anos, bem como nas normas mais recentes da Direção Geral da Saúde e outras instituições governamentais de saúde mundiais. As palavras-chave selecionadas foram “Diabetes mellitus”, “Diabetic Nephropathy”; “Biomarkers”.

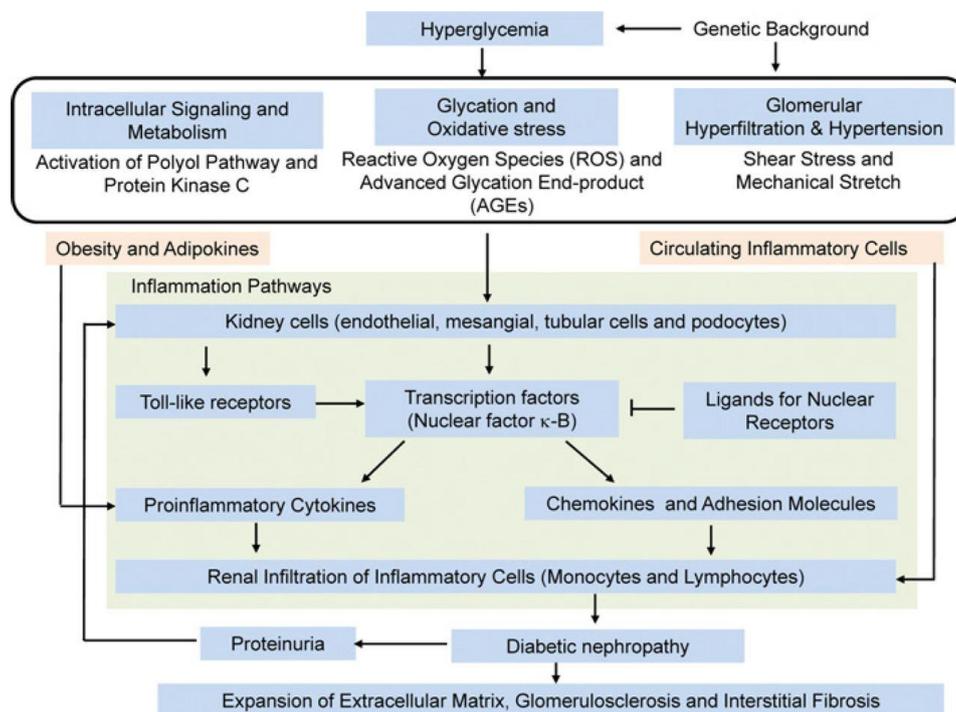
#### 5. NEFROPATIA DIABÉTICA – DEFINIÇÃO

A nefropatia diabética (ND) é uma das complicações renais microvasculares, comumente devida à DM1, e ocasionalmente devido à DM2, sendo em grande parte responsável pelo aumento da prevalência da DRT dependente de diálise, à qual temos assistido durante as últimas décadas.

Caracteriza-se como uma síndrome clínica que inclui os seguintes parâmetros: 1) albuminúria persistente (>300 mg/24h ou >200 µg/min) que é confirmada pelo menos 2 vezes em intervalos de 3-6 meses; 2) decréscimo progressivo da taxa de filtração glomerular (TFG); e 3) pressão arterial elevada.<sup>10</sup>

Em 2014, a “American Diabetes Association” (ADA) e “National Kidney Foundation” (NKF) descreveram a ND como doença renal crónica causada por DM, com taxa de filtração glomerular (TFGe) estimada persistente <60 ml por minuto por 1,73 m<sup>2</sup> ou uma relação albumina / creatinina urinária (RAC) de >30 mg/g por mais de 3 meses.<sup>5</sup> A “Joint Committee on Diabetic Nephropathy” recomendou a combinação da taxa de excreção de albumina nas 24 horas com a TFG como nova classificação de ND, sendo a conjugação destas duas taxas consideradas atualmente o *gold-standard* no diagnóstico de ND. Microscopicamente, a ND é caracterizada por glomeruloesclerose difusa ou nodular, arterioesclerose hialina aferente e eferente, fibrose e atrofia tubulointerstitial.<sup>5</sup>

## 6. FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA DIABÉTICA



**Figura 1:** Representação da fisiopatologia da nefropatia diabética. (retirado de<sup>11</sup>)

A hiperglicemia provoca uma alteração na homeostase do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular no glomérulo. O aumento do fluxo sanguíneo e da pressão intracapilar leva à diminuição da produção de óxido nítrico nos vasos eferentes dos capilares glomerulares e, eventualmente, um aumento da sensibilidade à angiotensina-II com efeitos pro-fibróticos.<sup>12</sup>

A glicose e os seus metabolitos ativam três vias principais responsáveis pela alteração do metabolismo intracelular no desenvolvimento de nefropatia diabética: i) a ativação da via dos polióis e da proteína cinase C (PKC); (ii) a formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs); e (iii) hipertensão intraglomerular induzida por hiperfiltração glomerular.<sup>13</sup>

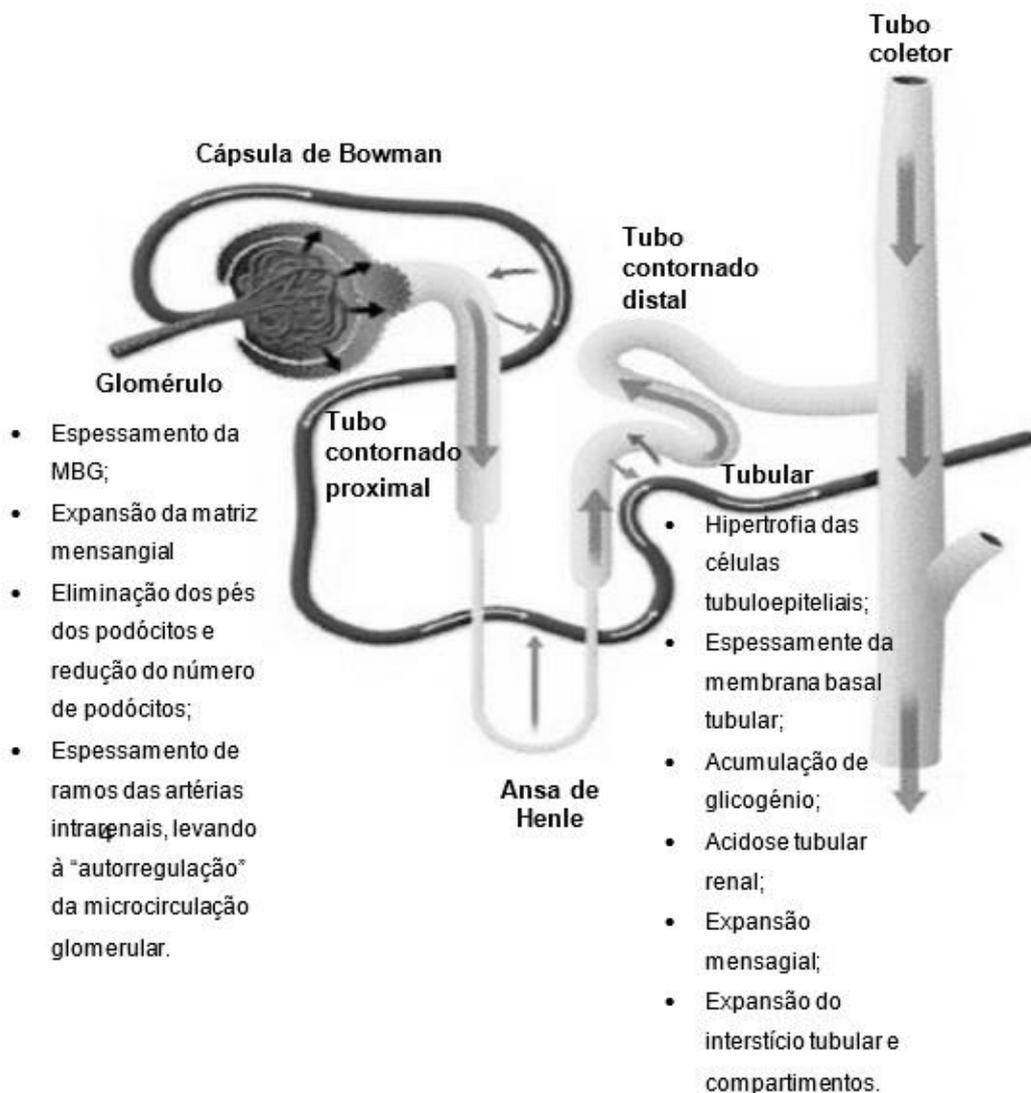
Embora a patogénese da ND seja multifatorial, os mecanismos que impulsionam o seu desenvolvimento permanecem pouco claros. Estas vias interagem entre si, numa cascata complexa de mecanismos moleculares, resultando na maior patogenicidade componentes da ND, que consiste nas suas três principais alterações histológicas: expansão mesangial, glomeruloesclerose e fibrose intersticial com espessamento da membrana basal glomerular (MBG).<sup>7</sup>

Estudos realizados em células endoteliais demonstraram as vias possivelmente envolvidas na ND, onde se investigam e atuam os principais biomarcadores desta patologia, com a constatação dos seguintes pontos:

- Existe um papel central das espécies reativas de oxigênio mitocondrial (ROS) que são geradas como subprodutos do metabolismo do oxigênio em células mesangiais.<sup>12</sup>
- Uma superprodução de superóxido mitocondrial durante a hiperglicemia, que foi postulado como sendo o principal mecanismo de iniciação, que ativa as vias de lesão do tecido vascular na diabetes, levando ao desequilíbrio celular Oxidação-Redução e ao stresse oxidativo.<sup>12</sup>
- Vários estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o stresse oxidativo está aumentado na ND. Além disso, a superprodução de ROS pelas elevadas concentrações de glicose comprometem os mecanismos de defesa antioxidante na ND, tais como níveis reduzidos de proteína específica da mitocôndria superóxido de manganês dismutase, que agrava o stresse oxidativo. Este incluindo ROS podem danificar o DNA mitocondrial e prejudicar a cadeia de transporte de elétrons, contribuindo consecutivamente para um aumento de ROS.<sup>12</sup>
- A acumulação de produtos avançados de glicação (AGEs): A glicação avançada que ocorre a um ritmo acelerado na DM1 é um fenômeno proeminente no rim. A excreção dos AGEs é principalmente renal, mas também, muitas das proteínas com uma semivida longa, como o colagênio, são extensivamente glicados por doentes com DM. Além disso, vários recetores dos AGEs, tais como os RAGE, foram descritos que desempenham um papel mediador de alguns dos efeitos deletérios dos AGEs, induzindo a expressão de TGF -  $\beta$  e outras citocinas, que estão propostas para mediar a transdiferenciação de células epiteliais, formando miofibroblastos, um passo fundamental no desenvolvimento da fibrose tubulointersticial.<sup>12</sup>
- Ativação de moléculas sinalizadoras intracelulares, como proteínas cinase C (PKC). A proteína cinase C é uma família de enzimas que fosforilam resíduos de serina ou treonina várias proteínas intracelulares e, portanto, está envolvida em várias funções celulares que podem levar à fisiopatologia das complicações diabéticas, incluindo hiperplasia da membrana basal glomerular (MBG), bem como sinais de transdução para fatores de crescimento. Pelo menos 11 isoformas de PKC foram identificadas. Estas isoformas foram descritas como mediadores da fibrose renal e expansão mesangial por meio da regulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em células mesangiais, bem como fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), colagêneo tipo IV, laminina e fibronectina nos glomérulos.<sup>7,12</sup>

- Inflamação de baixo grau parece desempenhar também um papel principal na patogênese da ND. A ativação de várias citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-18 estão todas envolvidas no desenvolvimento e progressão da ND.<sup>7,12</sup>

Com a evolução deste processo, no tecido renal acabam por surgir três principais alterações histológicas. Primeiro, a expansão mesangial que é induzida diretamente pela hiperglicemia, talvez por aumento da produção de matriz extracelular (MEC) ou da glicação das proteínas da matriz. Em segundo lugar, ocorre espessamento da membrana basal glomerular (MBG). Terceiro, a esclerose glomerular causada por hipertensão intraglomerular (induzida por dilatação da artéria renal aferente ou por lesão isquêmica induzida por estreitamento hialino dos vasos que suprem os glomérulos).<sup>10</sup> Estas alterações encontram-se sintetizadas na seguinte imagem – Figura 2.



**Figura 2:** As diferentes lesões no decurso da nefropatia diabética (adaptado de<sup>12</sup>).

Além das alterações hemodinâmicas, os pacientes com nefropatia diabética manifesta (proteinúria positiva com fita reagente e taxa de filtração glomerular [TFG] decrescente) geralmente desenvolvem hipertensão sistêmica. A hipertensão é um fator adverso em todas as doenças renais progressivas e parece estar especialmente presente na nefropatia diabética. Evidências sugerem que a hipertensão associada à obesidade, síndrome metabólica e diabetes pode desempenhar um papel importante na patogênese da nefropatia diabética, e conseqüentemente à hipertensão.<sup>10</sup>

Em suma, a conexão e atuação de todas estas alterações estruturais e funcionais que decorrem no rim, vão definindo a história natural da ND. A ND apresenta-se frequentemente como uma tríada clínica: hipertensão, albuminúria, e, ultimamente, insuficiência renal. Os clássicos 5 estádios da ND, com base na avaliação da função renal, como descrito por Mogensen *et al*, continuam a ser a classificação mais aceitável para a categorização desta condição (Tabela 1).<sup>12</sup>

**Tabela I.** Os cinco estádios clássicos da nefropatia diabética (adaptado de<sup>12,14</sup>).

<b>Estadio</b>	<b>TFG</b>	<b>Albuminúria</b>	<b>Anos após diagnóstico</b>	<b>Alterações histológicas</b>	<b>Sintomas</b>
<b>I. Hiperfunção e Hipertrofia</b>	Acima do normal	Albuminúria A1 (<30 mg/dL)	0 (presente no momento do diagnóstico)	Nefromegalia/ hipertrofia	Frequentemente, sem sintomas.
<b>II. Silent stage</b>	Normal ou elevada	Albuminúria A2 (30 a 300 mg/dia)	Primeiros 5 anos	Glomeruloesclerose / expansão mesangial	Sem sintomas específicos.
<b>III. Estadio incipiente</b>	Normal ou diminuída	Albuminúria A3 (≥300 mg/dia)	6-15	Glomeruloesclerose nodular	Perda severa de proteínas, cálcio, outros nutrientes; Dispneia; Edema e retenção de líquidos; Urina pode surgir mais escura; Dor lombar.
<b>IV. Nefropatia diabética estabelecida</b>	Em declínio	Em progressão	15-25	Progressão das lesões	Agravamento do quadro sintomatológico do estadio III; Hematúria macroscópica (eventualmente); Edema e dispneia graves.
<b>V. Urémico</b>	<15mL/min	Maciça	25-30	Esclerose grave e global	Diálise ou transplante renal.

O envolvimento renal associado à DM foi alvo de maior investigação no âmbito da DM1, que é semelhante aquele observado na DM2.

O estudo da DM 1, dado que neste tipo é possível determinar o aparecimento da doença, permitiu caracterizar a história natural da ND. No entanto, o decurso da doença renal na DM2 pode apresentar diferenças significativas nas fases prévias à ND já estabelecida, dada a heterogeneidade deste tipo de DM, assim como a dificuldade em muitos casos de determinar o início da doença.<sup>15</sup> Até aproximadamente 20% dos doentes com DM2 já apresentam DRD aquando do diagnóstico de DM e mais de 30 a 40% acaba por desenvolver ND, sobretudo nos 10 anos decorrentes do diagnóstico.<sup>12</sup>

Os estudos na população de índios Pima, uma tribo norte-americana onde foi realizado um dos melhores cohorts, para quem o início e a duração da DM é mais seguramente determinado dado o rastreio sistemático desta patologia, demonstrou que em ambos os tipos de DM, a afeção renal é muito similar.<sup>16</sup>

## **7. FATORES DE RISCO**

A identificação e o controlo dos fatores de risco (FR) para a ND bem como o diagnóstico precoce e controlo atempado desta condição é de extrema importância na eficácia do seu tratamento. Uma variedade de FR promove o desenvolvimento e a progressão da ND, incluindo níveis elevados de glicose, duração da doença, hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia. A maioria destes FR é modificável por fármacos antidiabéticos, tratamento anti-hipertensor ou hipolipemiante e alterações do estilo de vida do doente. Outros, como fatores genéticos ou idade avançada, não podem ser alterados. Assim, a gestão rigorosa dos FR modificáveis é essencial para prevenir e retardar o declínio da função renal.

**Tabela II.** Fatores de risco para nefropatia diabética (adaptado de<sup>17</sup>).

Novos e estabelecidos fatores de Risco	Fatores de risco modificáveis	Fatores de risco não-modificáveis
<b>Fatores de risco estabelecidos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da excreção urinária de albumina</li> <li>• Elevação dos níveis de glicose</li> <li>• Hipertensão</li> <li>• Dislipidemia</li> <li>• Obesidade</li> <li>• Hipovitaminose D</li> <li>• Tabaco</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Duração prolongada da DM</li> <li>• Idade avançada</li> <li>• Sexo masculino</li> <li>• Retinopatia</li> </ul>
<b>Novos fatores de risco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stresse oxidativo</li> <li>• Inflamação sub-clínica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genética</li> <li>• Etnia (Afro-americanos e Índios Pima)</li> <li>• Hiperfiltração glomerular</li> </ul>

A **excreção urinária de albumina aumentada** é o FR *major* para a progressão da ND em ambos os tipos de DM. Na maioria dos doentes, o primeiro sinal de ND é o aumento moderado da excreção urinária de albumina (30-300 mg/g). Além disso, uma proporção substancial (>40%) de doentes com albuminúria moderada retoma para albuminúria A1. No entanto, mais de 50% dos doentes com diabetes tipo 1 e 2 sofrem um declínio da taxa de filtração glomerular (TFG), apesar da presença de apenas albuminúria moderada ou normal. Assim sendo, um aumento da EUA (excreção urinária de albumina) não se assume necessariamente como um pré-requisito para o desenvolvimento de ND.<sup>18</sup>

O controlo glicémico inadequado (hiperglicemia) é um FR crucial no desenvolvimento e progressão da ND. Elevados níveis de HbA1c estão associados a um risco aumentado para esta condição. Está estudada uma evidente diminuição da incidência da ND em doentes DM1 e DM2 que efetuaram um melhor controlo glicémico, sendo, de facto, segundo o estudo “Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC)”, que doentes com albuminúria moderada, mas baixos níveis de HbA1c, têm um menor risco de progressão para albuminúria severa ou mesmo DRT.<sup>18</sup>

A **hipertensão arterial** é um outro importante e independente FR para a ND, sugerindo-se que aparentemente os inibidores do sistema renina-angiotensina retardam a progressão da

ND mais do que outras classes de anti-hipertensores.<sup>18</sup> Associado à **dislipidemia**, constatou-se que baixos níveis de LDL-C e TG estão associados à redução do risco para progressão de albuminúria moderada para severa ou DRT. A **obesidade** está também associada a um aumento do risco de ND, propondo-se que a perda de peso reduz a EUA e previne o declínio da TFG. Segundo o estudo DCCT/EDIC, o **sexo feminino** tem menor risco associado na progressão de albuminúria moderada para severa ou mesmo DRT. Nos doentes com DM1, a **retinopatia** precede quase invariavelmente o desenvolvimento da ND, estando a sua ausência, segundo o estudo DCCT/EDIC, associada a baixo risco de progressão da albuminúria.<sup>18</sup>

No que toca aos novos fatores de risco para ND, as investigações assentam sobretudo no estudo dos intervenientes no **stresse oxidativo**, como os níveis urinários elevados de 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), bem como o foco nos marcadores de **inflamação subclínica**, destacando-se as citocinas pro-inflamatórias, interleucinas, proteína C reativa ou as moléculas de adesão, que constituem elevado risco de desenvolvimento de ND. A **hiperfiltração glomerular** está associada a um maior risco de ND, sendo esta associação mais pronunciada quando a TFG >125 mL/min.<sup>18</sup>

O controlo destes fatores de risco consolida a prevenção primária desta patologia, assentando em 3 pontos principais, segundo as orientações da norma da Direção-Geral da Saúde sobre a prevenção e avaliação da ND, que são: i) O controlo metabólico precoce da glicose, cujo valor alvo deverá ser uma hemoglobina glicada A1c de 6,5%, podendo ser adaptado individualmente; ii) Tensão arterial alvo <130/80 mmHg através da instituição de terapêutica farmacológica antihipertensora, sobretudo inibidores do enzima de conversão (IECA) ou bloqueadores da angiotensina (ARA), aliando o seu uso a uma vigilância exigente da creatininemia e da caliemia, pelos riscos de insuficiência renal aguda e hipercaliemia; iii) Promover a educação nutricional que conduza à normalização da ingestão de proteínas por dia para 1 g/kg de peso de referência contribui para a redução da progressão da albuminúria e do declínio da TFG. É recomendada uma ingestão de sódio <2,4 g por dia (equivalente a <6 g de sal de cozinha por dia).<sup>19</sup>

## 8. RASTREIO DA NEFROPATIA DIABÉTICA

O rastreio da ND no contexto da DRD, segundo as “guidelines” da American Diabetes Association (ADA) deve ser iniciado logo após diagnóstico de DM em todos os doentes com DM2, e após 5 anos do início nos casos de DM1. Este deve realizar-se anualmente, pelo menos uma vez, e basear-se na medição da albuminúria e na TFGe.<sup>1</sup>

A norma DGS 008/2011 foi publicada em 31/01/2011 e define o rastreio de nefropatia diabética, através do doseamento de albuminúria/proteinúria e de creatinémia, sendo este possível dada a alteração estrutural do nefrónio ocorrer precocemente nesta patologia.<sup>19</sup>

### i) Albuminúria / Proteinúria

O rastreio deve iniciar-se preferencialmente pela medida de albuminúria. Todo o teste de albuminúria anormal deve ser confirmado em duas de três amostras colhidas num intervalo de 3 a 6 meses, devido à variabilidade diária da EUA. Fatores como o exercício moderado a intenso nas 24 horas prévias à colheita de urina, febre, insuficiência cardíaca, hiperglicemia grave e hipertensão arterial não controlada podem elevar os valores da UEA, originando o falso positivo.<sup>1,19</sup>

A tabela seguinte descreve os pontos de corte atualmente aceites para o diagnóstico de ND.

**Tabela III.** Valores de albumina utilizados no diagnóstico de nefropatia diabética (adaptado de<sup>20</sup>).

Albuminúria	EUA (mg/24h)	RAC (mg/g)	Descrição
<b>A1</b>	<30	<30	Normal ou ligeiramente aumentado
<b>A2</b>	≥30 e <300	≥30 e <300	Moderadamente aumentado
<b>A3</b>	≥ 300	≥ 300	Gravemente aumentado**

\*\* Incluindo a síndrome nefrótica (EUA geralmente >2200 mg/24h ou RAC >2220 mg/g)

A “Kidney Disease Improving Global Outcomes” (KDIGO), que representa as orientações da Nefrologia, sugere a utilização de três faixas: albuminúria normal - A1 (<30 mg/g = mg de albumina/g de creatinina), albuminúria elevada – A2 (30 a 300 mg/g) e albuminúria muito elevada – A3 (>300 mg/g), as quais, estas duas últimas fariam a correspondência com as categorias de micro e macroalbuminúria, respetivamente, segundo as diretrizes da ADA.<sup>1</sup>

Segundo as normas da DGS, para avaliação anual da albuminúria A2 através de tira-teste, o procedimento clínico para as pessoas sem nefropatia conhecida é o seguinte:

- Se negativa, repete passado um ano;
- Se positiva, repete 3-6 meses (intervalo de tempo segundo a ADA) depois (próxima consulta, por regra).

Neste caso:

- Se negativa, repete ao fazer um ano sobre data da avaliação da 1ª tira-teste;
- Se positiva, realiza quantificação de albuminúria (urina ocasional em µg/mg de creatinina, urina minutada ou urina de 24 horas).

## ii) Taxa de filtração glomerular (TFG)

A função renal deve ser avaliada anualmente, através da TFG. A TFGe com equações deve ser realizada rotineiramente com a medida de albuminúria. Na prática clínica, a TFG deve ser estimada por meio de equações que empreguem a creatinina sérica e sejam ajustadas à idade, ao género e à etnia. Uma das equações mais usadas para tal estimativa é a do estudo "Modification of Diet in Renal Disease (MDRD).<sup>1</sup>

## 9. BIOMARCADOR – DEFINIÇÃO

De acordo com o *National Institute of Health Biomarkers Definitions Working Group*, os biomarcadores são definidos como características objetivamente calculadas e avaliadas como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos, ou respostas farmacológicas face a uma intervenção terapêutica.<sup>21</sup>

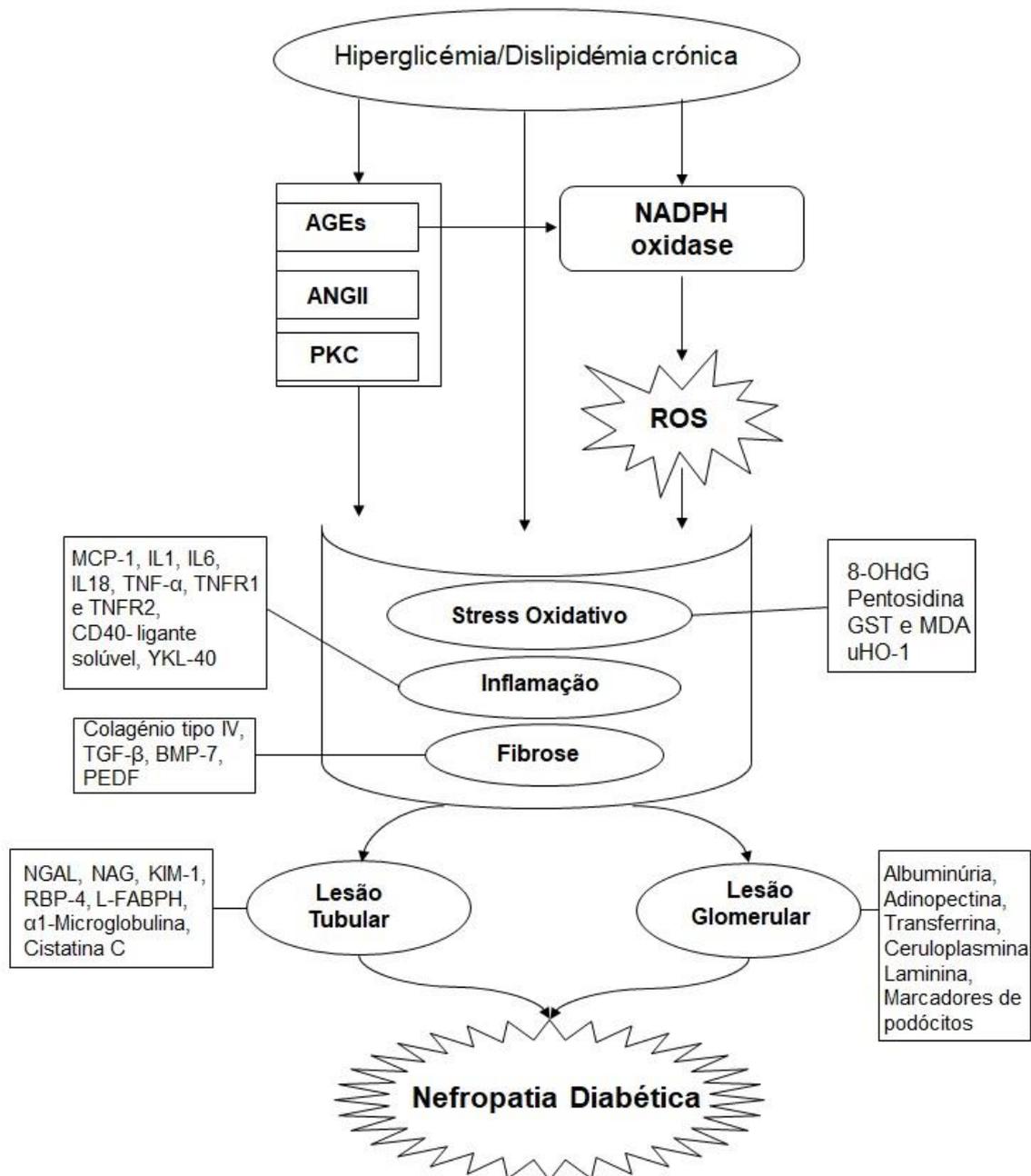
Apesar do aumento exponencial na investigação e publicação de biomarcadores, demonstrar a sua associação apenas, não é suficiente para impulsioná-los no uso clínico diário, e uma série de objetivos na descoberta destes e respetiva validação, deve primeiro ser alcançada.<sup>21</sup>

O biomarcador apropriado para a monitorização da DRD deve ter variabilidade biológica restrita para melhorar a avaliação de variáveis longitudinais. Devem ainda ser influenciados pela idade, estado nutricional ou problemas de saúde concomitantes.<sup>22</sup>

Um bom biomarcador deve fornecer rápida, não invasiva e específica medição que se correlacione bem com a patologia do tecido renal. Devem ainda ser altamente sensíveis,

específicos para doenças renais, correlacionar com os resultados histopatológicos da biópsia e progressão da doença, e permitir a identificação dos estádios iniciais da lesão renal e respetivo prognóstico.<sup>22</sup>

## 10. BIOMARCADORES DE NEFROPATIA DIABÉTICA



**Figura 3:** Biomarcadores de nefropatia diabética durante o desenvolvimento e progressão da doença renal. (adaptado de <sup>23</sup>)

**Abreviaturas:** AGEs, produtos finais de glicação avançada; ANG II, angiotensina II; BMP-7, Proteína óssea morfogenética 7; GST, glutatíon s-transferase; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanina; IL-1, interleucina-1; IL-6, interleucina-6; IL18, interleucina-18; KIM-1, *kidney injury molecule-1*; L-FABP, proteína de ligação aos ácidos gordos hepáticos; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos;

MDA, malondialdeído; NADPH, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*; NAG, N-acetil - $\beta$ -D-glucosaminidase; NGAL, lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos; PEDF, fator derivado do epitélio pigmentado; PKC, proteína cinase C; RBP4, proteína ligante do retinol tipo 4; ROS, espécies reativas de oxigênio; sCD40L CD40 ligante solúvel; TGF-  $\beta$ , fator de crescimento transformador- $\beta$ ; TNF-  $\alpha$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; TNFR-1 e TNFR2, receptores 1 e 2 do fator de necrose tumoral; uHO-1, Heme oxigenase-1 urinária; YKL-40, glicoproteína 40 da cartilagem.

## 10.1 ALBUMINÚRIA

A disfunção do processo de filtração da albumina e consequente reabsorção tubular pode resultar num aumento da sua excreção urinária. Tanto a lesão glomerular como o comprometimento tubular foram implicados nos eventos iniciais que conduzem à proteinúria. Assim, uma alteração na EUA é das primeiras manifestações clínicas assintomáticas de lesão microvascular na DM e tem sido usada para categorizar a albuminúria A2 e a albuminúria A3.

A albuminúria A2 tradicionalmente associada a nefropatia incipiente, é uma característica comum da DM. Um aumento da albuminúria evidencia uma lesão orgânica precoce relacionada com FR específicos para esta complicação microvascular, tendo sido reconhecida com um achado preditor da progressão para DRT em DM1 e DM2.

A medição da albuminúria tem sido o pilar da deteção precoce de ND, sendo que algumas evidências sugerem o seu desenvolvimento em doentes normoalbuminúricos (albuminúria A1).

### 10.1.1 Limitações da TFG e albuminúria

Existem vários fatores que tornam a TFG de aplicação limitada para o diagnóstico precoce da ND: 1) A precisão das fórmulas, ambas baseadas na creatinina sérica, como MDRD (“Modification of Diet in Renal Disease”) e CKD-EPI (“Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration”) tem-se revelado baixa na sua aplicação a doentes diabéticos (65% vs 69%, respetivamente); 2) A creatinina sérica é influenciada pela massa muscular, ou seja, a estimativa da TFG usando esta medição, pode ser altamente variável em doentes desnutridos ou com obesidade mórbida; 3) O estadio inicial da ND geralmente é caracterizado por um aumento relativo da TFG ou hiperfiltração glomerular; no entanto, as equações baseadas em estimativas oferecem muito menos precisão em níveis mais altos de TFG.<sup>21</sup>

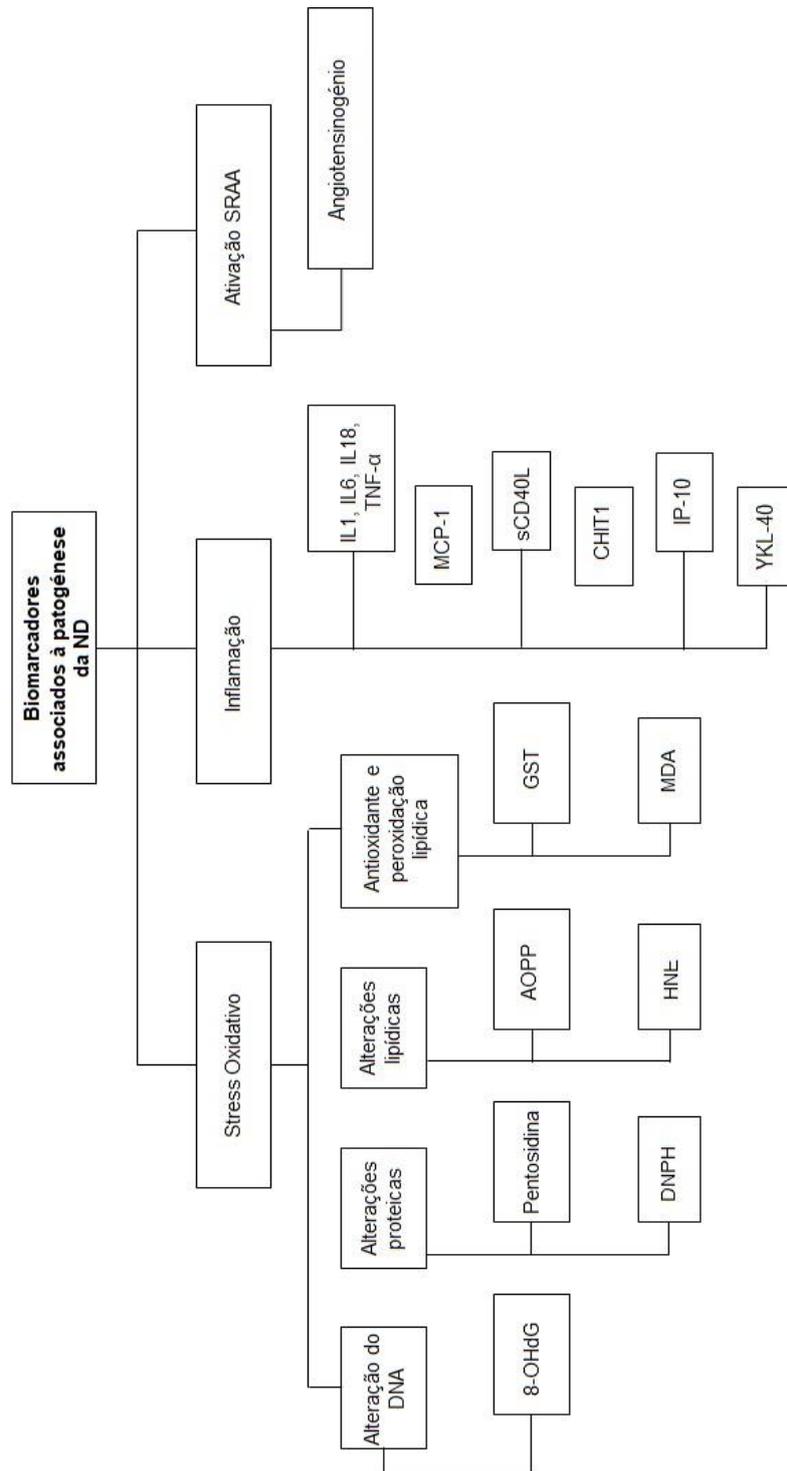
A albuminúria prevê fortemente a progressão da DRD, mas carece de especificidade e sensibilidade para DRT e na avaliação da TFGe.<sup>24</sup> Notavelmente, a albuminúria constitui um fator de risco para a DRC ou mesmo DRT, e também serve como um potencial preditor de morbidade e mortalidade cardiovascular em doentes com diabetes.<sup>7</sup>

No entanto, o verdadeiro dilema clínico situa-se na discordância entre a presença de albuminúria e o declínio da função renal.<sup>25</sup> Evidências recentes indicam que um notável número de pacientes com albuminúria A3 podem reverter para albuminúria A1, enquanto o conceito de ND não-albuminúrica está bem documentada. Há doentes com DM que apresentam redução da TFG, sem progredir de albuminúria A1 para albuminúria A3.<sup>7</sup> Perkins *et al.* relataram o desenvolvimento de DRC avançada (TFG <60 mL/min por 1,73 m<sup>2</sup>) sem progressão concomitante de albuminúria em diabéticos tipo 1, inscritos no “Joslin Kidney Study”.<sup>25</sup> Na terceira “National Health and Nutrition Examination Survey” (NHANES III), um exame à albumina urinária com resultado normal, foi identificado em 36% dos 1197 pacientes com DM2 que tinham DRC avançada.<sup>25</sup> No “United Kingdom Prospective Diabetes Study”, apenas 49% dos pacientes com insuficiência renal tinha albuminúria precedente.<sup>25</sup>

Portanto, apresentadas estas observações e as já mencionadas desvantagens ao seu uso, a albuminúria como o marcador convencional para detecção precoce da ND está, assim, a tornar-se pouco específica. Como resultado, outros biomarcadores (reflexo de lesão glomerular ou tubular) agora são considerados como mais confiáveis e preditores alternativos de risco de ND.

Na abordagem dos biomarcadores de ND, serão descritos os atualmente disponíveis, os que estão em estudo e os que foram promissores, sendo que esta será dividida em 3 grupos: biomarcadores associados à patogênese da ND, associados à patologia e marcadores associados às alterações da função renal.

## 10.2 BIOMARCADORES ASSOCIADOS À PATOGÊNESE DA NEFROPATIA DIABÉTICA



**Figura 4.** Sumário de alguns biomarcadores associados à patogênese (adaptado de<sup>2</sup>).

**Abreviaturas:** ND, nefropatia diabética; GST, glutatíon s-transferase; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanina; IL-1, interleucina-1; IL-6, interleucina-6; IL18, interleucina-18; MCP-1, proteína quimiotática de monócitos; MDA, malondialdeído; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; AOPP, produtos proteicos de oxidação avançada; HNE, 4-hydroxy-nonenal; sCD40L, CD40 ligante solúvel; CHIT1, quitotriosidase; IP-10, proteína 10 induzida por interferão; YKL-40, glicoproteína 40 da cartilagem.

Um grande número de estudos prospectivos confirma que a hiperglicemia é o fator de risco mais importante para a ND. A hiperglicemia promove o transporte de elétrons na cadeia mitocondrial, a fim de gerar um excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e ativação da via do poli(ol, hexosamina via metabólica, proteína cinase C (PKC) e angiotensina II. As ROS iniciam ou aumentam o stresse oxidativo e eventualmente causam resposta inflamatória e formação de fibrose. Além disso, a anormalidade do metabolismo lipídico, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), a hipertensão sistêmica e glomerular, deficiência na sinalização da insulina, o aumento de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias, e a ativação da via de sinalização intracelular também desempenham um papel na ocorrência e progressão da ND.<sup>2</sup>

### 10.2.1 BIOMARCADORES DO STRESSE OXIDATIVO

#### **10.2.1.1 8-hidroxi-2'-desoxiguanina (8-OHdG)**

A 8-OHdG é uma das formas predominantes de lesão do DNA induzida por radicais livres. Esta passa diretamente para a urina, sem sofrer metabolização, por filtração glomerular e serve como um índice de dano oxidativo sistêmico do DNA, sendo considerado um biomarcador sensível na avaliação do stresse oxidativo.<sup>2,26</sup> Segundo o estudo Hinokio *et al.* a excreção urinária de 8-OHdG está acentuadamente aumentada em doentes com DM tipo 2 em comparação com indivíduos saudáveis, e um elevado nível de 8-OHdG urinário foi correlacionado com valores altos de hemoglobina glicada, bem como associada à gravidade da lesão tubulointersticial, esta última segundo o estudo Kanauchi *et al.*<sup>8,26,27</sup> Foi demonstrada uma maior excreção de 8-OHdG em doentes com DM tipo 1, 9 anos após o início da doença, principalmente relacionado com um deficiente controlo glicémico.<sup>8</sup>

No entanto, resultados controversos foram observados num estudo mais recente, em que se conclui que não houve diferença nos níveis de 8-OHdG urinário entre os grupos com e sem ND em cromatografia líquida-espectrometria de massa. Isto sugere que 8-OHdG na urina não era um biomarcador sensível em relação ao *ratio* albumina/creatinina para distinguir doentes com ND dos doentes com apenas DM. Os diferentes fluidos biológicos e as técnicas usadas como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) podem ter contribuído para a falta de consistência nestes estudos, de modo que o valor preditivo da 8-OHdG em estadios precoces da ND necessita que mais pesquisas sejam determinadas.<sup>2</sup>

### **10.2.1.2 AGES (produtos finais de glicação avançada) - Pentosidina**

Os produtos finais de glicação avançada são potenciais mediadores pelos quais a hiperglicemia causa DRD. Os AGEs são formados durante o envelhecimento no rim e filtrados pelo glomérulo como um processo fisiológico. No doente com ND, acumulam-se no interstício glomerular e nas paredes dos capilares, onde induzem a síntese de matriz extracelular através do estímulo do fator de crescimento do tecido conjuntivo.<sup>9,26</sup>

Um dos AGEs melhores caracterizados, encontrados em humanos, é a pentosidina, tendo sido considerada como um marcador de formação e acumulação de AGEs. Foram descobertos níveis elevados de pentosidina no soro e na urina doentes com DM2 portadores de nefropatia quando comparada com sujeitos controle. Ambos os níveis urinário e plasmático de pentosidina demonstraram correlacionar-se positivamente com a gravidade da albuminúria em doentes com diabetes. O estudo conduzido por Kern *et al.* demonstrou que excreção urinária de pentosidina em pacientes com DM1 previu a progressão da albuminúria, com um aumento do risco em sete vezes por cada aumento de 50% na pentosidina urinária.<sup>23,25,26</sup>

Recentemente, Kerkeni *et al.* destacou o papel da pentosidina como um biomarcador de complicações microvasculares em diabéticos tipo 2. Apesar da evidência sugerir que a pentosidina poderia ser um marcador útil da ND, a sua aplicação requer mais investigação, no sentido de uma comparação mais precisa em relação à albumina urinária e avaliar as limitações relacionadas com outras causas não diretamente associadas à DM que aumentem o stresse oxidativo.<sup>26</sup>

### **10.2.1.3 Glutatião s-transferase (GST) e Malondialdeído (MDA)**

Dados experimentais mostraram que o nível de expressão de GST em ratos diabéticos induzidos por Estreptozocina foi notavelmente maior do que nos ratos controle, sugerindo que a hiperglicemia pode ser a principal causa para valores de GST elevado. Oito semanas após o tratamento com resveratrol, a expressão de GST diminuiu e vários indicadores que sugerem a ocorrência de ND, como a excreção urinária de proteínas, creatinina, apoptose celular e hipertrofia renal foram todos melhorados, levando os investigadores a supor que o resveratrol provavelmente desempenhou um papel na renoproteção diminuindo o nível de expressão de GST.<sup>2</sup>

A pesquisa em humanos foi consistente com os estudos experimentais referidos acima. Em comparação com indivíduos saudáveis, o aumento da atividade do GST e níveis

aumentados de MDA, um importante biomarcador de LPO (lipoperoxidação), foram encontrados em doentes com DM2. Estes resultados sugeriram que o stresse oxidativo estava envolvido na ocorrência de DM e o GST era suscetível de desempenhar um importante papel na antioxição. No estudo sobre GST e ND, Noce *et al.* relataram que a atividade de GST nos portadores de DM2 com e sem nefropatia foram ambos significativamente mais altos que os de controlo, sugerindo estar intimamente relacionado com as fases de ND e indicando que o GST provavelmente seria um potencial biomarcador na fase inicial da ND.<sup>2</sup>

#### **10.2.1.4 Heme oxigenase-1 urinária (uHO-1)**

As heme oxigenase são enzimas essenciais no catabolismo do grupo heme, que atuam como moléculas antioxidantes bem como potentes proteínas anti inflamatórias durante o processo de lesão oxidativa.<sup>28</sup>

Os resultados de um estudo realizado na China, em doentes com diabetes tipo 2, forneceram dados preliminares a sugerir a HO-1 como um novo biomarcador renal associado ao aumento da albuminúria e à diminuição da TFGe. Este também demonstrou que os níveis urinários de HO-1 aumentaram antes do início da albuminúria A2, colocando a HO-1 urinária como candidata a biomarcador precoce de lesão tubular em doentes albuminúricos grau A1 com DM2, favorecendo assim um diagnóstico precoce e intervenções avançadas na ND.<sup>28</sup>

#### **10.2.2 BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO**

A resposta inflamatória pode ser ativada por distúrbios bioquímicos, metabólicos ou hemodinâmicos quando um largo número de leucócitos se concentra no rim, ocorrendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias e uma variedade de quimiocinas por estas células. Deste modo, um novo ciclo de resposta inflamatória é induzido, tendo sido estas moléculas candidatas a potenciais biomarcadores de ND.<sup>2</sup>

Estudos sugerem que indivíduos que desenvolvem ND apresentam inflamação de baixo grau anos antes do início da doença, e que a excreção elevada de marcadores inflamatórios na urina foi associada a um declínio progressivo da função renal em doentes portadores de DM1.<sup>27</sup>

### **10.2.2.1 Proteína quimiotóxica de monócitos (MCP-1)**

O MCP-1 tem sido a quimiocina pro-inflamatória mais extensivamente estudada no contexto de ND. Considerada a mais potente quimiocina a recrutar monócitos/macrófagos no processo inflamatório, é uma candidata forte para biomarcador de ND.<sup>2,23</sup> Os níveis urinários de MCP-1 estão associados a um rápido declínio da TFGe em indivíduos com DM1 e albuminúria A1, bem como em indivíduos com DM2 e doença renal avançada (albuminúria A3 e DRC estadio igual ou superior a 3).<sup>9</sup>

Estudos constataram que altos níveis urinários de MCP-1 têm sido demonstrados em doentes com DM2 em estádios precoces da ND, porém esses valores seriam mais elevados com a progressão da ND e com lesões tubulointersticiais avançadas.<sup>23,29-31</sup> Além disso, uma correlação direta de MCP-1 urinária foi observada entre a albuminúria, a infiltração de macrófagos no interstício tubular, e a excreção urinária de NAG (N-acetyl-b-D-glucosaminidase, um potencial biomarcador de lesão tubular). Estes resultados são ultimamente consistentes com a utilidade potencial de MCP-1 como marcador não-invasivo da detecção precoce e progressão da ND. No entanto, o seu papel diagnóstico continua por ser validado.<sup>23,30</sup>

### **10.2.2.2 Citocinas pro-inflamatórias**

Entre os mecanismos mais exaustivamente estudados envolvidos na patogénese da ND, destacam-se as ações da Interleucina 1 (IL-1), IL-6 e IL-18. A IL-1 tem sido implicada no desenvolvimento de alterações intraglomerulares e também está ligada ao aumento da permeabilidade de células vasculares endoteliais. A IL-6 mostrou-se envolvida no processo de resposta imunitária bem como a sua influência sobre a dinâmica da matriz extracelular, promovendo alterações globais no rim.

O aumento da expressão da Interleucina 6 está correlacionada com a albuminúria, e pesquisas recentes mostram que os níveis de IL-6 na urina e no soro são elevados, mesmo em doentes em que ainda não ocorreu um aumento da excreção de albumina.<sup>29</sup> Além disso, os níveis urinários de IL-6 correlacionaram-se diretamente com a sua própria expressão do gene renal, bem como com a excreção urinária de albumina e espessamento da MBG.<sup>23</sup>

No entanto, alguns outros estudos descobriram que a IL-6 sérica foi elevada em doentes com albuminúria A3 isolada, pelo que o seu valor de diagnóstico precoce não era tão bom quanto o da excreção urinária de albumina.<sup>2</sup>

Quanto à IL-18, alguns estudos têm mostrado elevados níveis séricos em doentes com ND e associado à HbA1c ou ao RAC, sugerindo que esta pode ter um papel no desenvolvimento das complicações renais microvasculares na DM, tornando-se um expectável biomarcador desta patologia.<sup>2,23,29</sup>

### **10.2.2.3 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

O fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é um mediador chave da inflamação e um dos principais participantes na patogénese da lesão renal. Este promove a inflamação, a apoptose e acumulação de matriz extracelular, reduzindo a TFG e aumentando a permeabilidade da albumina.<sup>27</sup>

Foram encontrados níveis urinários e séricos aumentados de TNF- $\alpha$  em doentes com nefropatia secundária a DM quando comparados com indivíduos sem albuminúria (grupo de controlo) e com albuminúria A1. Além disso, estes valores elevados estavam significativamente relacionados com a EUA.<sup>2</sup>

A transdução do sinal do TNF- $\alpha$  é iniciada através de dois recetores distintos, o recetor TNF 1 (TNFR1) e TNFR2.<sup>25</sup> Níveis séricos de TNFR1 e TNFR2 foram correlacionados com a diminuição da TFG em doentes com DM, e estes eram independentes do estado da albuminúria.<sup>25</sup>

Estas evidências sugerem que as concentrações no soro de TNFR1 e TNFR2 podem ser utilizadas como preditores da progressão da DRD.<sup>25,29</sup>

### **10.2.2.4 CD40 ligante solúvel (sCD40L), glicoproteína 40 da cartilagem (YKL-40) e quitotriosidase (CHIT1)**

Foram observados valores significativamente elevados de sCD40L, uma proteína transmembranar que regula a resposta inflamatória através da ligação com CD40, em doentes portadores de DM1 e DM2 com ND quando comparados com doentes com albuminúria A1, bem como a sua associação com a severidade da lesão renal e o nível de controlo glicémico.<sup>2,23</sup> No entanto, noutro estudo foi demonstrado que elevados níveis plasmáticos de Scd40L em doentes diabéticos tipo 1 com nefropatia, não foram preditores de mortalidade ou deterioração da função renal, sendo necessário mais estudos para determinar a aplicabilidade desta particular proteína como biomarcador renal.<sup>23</sup>

Alguns estudos revelaram que os níveis de YKL-40 e a atividade CHIT1 se encontram elevados em doentes com diabetes tipo 2, quando comparados com os sujeitos de controlo. Ambas aumentavam gradualmente com os estadios da ND de acordo com o RAC, tendo sido associados à lesão renal na ND. No entanto, dada a sua alta sensibilidade e especificidade, a atividade da CHIT1 foi melhor no diagnóstico de albuminúria A2 comparativamente com o nível sérico de YKL-40.<sup>2,32</sup>

### 10.2.3 BIOMARCADORES DA ATIVAÇÃO DO SRAA (SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA) – ANGIOTENSINOGENIO

O SRAA é responsável por regular a pressão arterial através da produção de aldosterona e desempenha um papel crucial na patogénese da ND. O angiotensinogénio (AGT), produzido no fígado e secretado ao nível do túbulo contornado proximal, foi identificado em doentes portadores de glomerulonefrite crónica em estudos prévios.<sup>2,27</sup>

Estudos demonstraram que o AGT urinário está altamente correlacionado com a expressão no tecido renal da angiotensina II e, portanto, um marcador potencialmente adequado da atividade intrarrenal do SRAA. Além disso, o AGT urinário está associado a um risco aumentado de deterioração da função renal em pacientes com DRC e, portanto, preditivo da perda da TFG em estudos longitudinais.<sup>27</sup> Em doentes com DM1, elevados níveis de AGT urinário precedem a albuminúria A2, mostrando também uma ação preditiva para os diabéticos tipo 1 normotensos. Em doentes com DM2 sem albuminúria, o AGT urinário foi maior do que nos indivíduos de controlo, e aumenta ainda mais naqueles com albuminúria A2, e em maior medida, naqueles com albuminúria A3.<sup>31</sup>

Numa investigação recente, Van den Heuvel *et al.* demonstraram que os níveis de renina estavam aumentados em diabéticos, e que o tratamento com IECA (inibidores da enzima conversora de angiotensinogénio) e/ou ARA (antagonista dos recetores de aldosterona) reduziu a renina urinária, mas não o AGT, apesar de níveis elevados de renina plasmática.<sup>27</sup>

Estes achados permitem assim atribuir um papel promissor ao AGT urinário, um alto valor de sensibilidade e especificidade nos estadios iniciais da ND, fundamental ao diagnóstico desta patologia.

### 10.3 BIOMARCADORES DE DISFUNÇÃO GLOMERULAR

O dano glomerular na ND caracteriza-se por alterações da permeabilidade e estrutura glomerular que podem ocorrer como resultado da lesão de qualquer um dos componentes da barreira de filtração glomerular, incluindo a MBG, podócitos e endotélio capilar. Grande parte da seletividade da filtração ocorre na MBG. Aqui, esta exclui proteínas com base no seu tamanho e carga, pelo que a perturbação da estabilidade desta estrutura resulta no aparecimento na urina de um excesso de proteínas séricas, que normalmente são filtradas livremente através do glomérulo, incluindo macromoléculas como a transferrina, albumina e da matriz extracelular.<sup>26,27</sup>

Alterações estruturais na ND incluem a acumulação de matriz mesangial e o espessamento da membrana basal nos glomérulos, bem como a hipertrofia tubular e alterações tubulointersticiais. Essas anormalidades estão associadas à superprodução renal de proteínas da matriz extracelular, como o colagénio tipo IV e outras proteínas.<sup>26</sup>

**Tabela IV.** Sumário de biomarcadores glomerulares de nefropatia diabética.

<b>Biomarcador</b>	<b>Mecanismo</b>
Podocina	Lesão dos podócitos
Sinaptopodina	Lesão dos podócitos
Nefrina	Lesão dos podócitos
Podocalixina	Lesão dos podócitos
Colagénio tipo IV	Lesão da membrana basal
Fator de von Willebrand	Lesão células endoteliais
VEGF	Lesão células endoteliais
TGF- $\beta$ 1	Expansão mesangial/Fibrose
PEDF	Expansão mesangial/Fibrose
Adiponectina	Lesão da membrana basal
Ceruloplasmina	Lesão da membrana basal
Laminina	Lesão da membrana basal
Transferrina	Aumento da pressão intra-glomerular
Fibronectina	Progressão de lesões difusas glomerulares
PGDS	Lesão da parede capilar glomerular
IgG	Progressão de lesões difusas glomerulares

### 10.3.1 Transferrina

A transferrina é uma proteína plasmática com um peso molecular ligeiramente maior que a albumina e menos aniónica que esta, pelo que é mais facilmente filtrada na cápsula de Bowman. Assim, a transferrina espera-se que seja excretada mais precocemente e/ou numa proporção maior do que a albumina.<sup>26,33</sup>

Narita *et al.* relataram que aumento da transferrina urinária foi encontrado em doentes com DM2 não albuminúricos, juntamente com a ceruloplasmina e imunoglobulina G (IgG), sugerindo que as alterações hemodinâmicas renais, como o aumento pressão intraglomerular pode ser a principal causa subjacente deste achado. Outro estudo mostrou que indivíduos com DM2, que inicialmente apresentavam níveis elevados de excreção urinária de transferrina, foram propensos ao desenvolvimento de albuminúria A2, independentemente da idade, duração da DM, pressão arterial, HbA1c e valores lipídicos basais. Observações recentes têm relatado correlações entre a excreção urinária de transferrina e outras complicações diabéticas microvasculares, tal como a retinopatia, uma vez que esta molécula tem uma ação antioxidante extracelular, e uma diminuição dos seus níveis pode contribuir para um desequilíbrio pró-oxidante/oxidante, processo este envolvido na génese de tais complicações.<sup>7,12,26,31,33-35</sup>

De facto, a transferrina urinária tem sido considerada uma ferramenta útil e sensível na avaliação da lesão glomerular na DM, uma vez que a sua excreção está associada a estadios precoces da ND.

### 10.3.2 Colagénio tipo IV

O colagénio tipo IV é o principal componente da matriz mesangial e da MBG, que em circunstâncias normais, não atravessa a barreira de filtração glomerular.<sup>31</sup>

Várias investigações observaram que a excreção de colagénio tipo IV aumentou gradualmente à medida que a DRD progrediu, podendo este ser um biomarcador útil para a avaliação da progressão da doença renal em diabéticos.<sup>8,26,35</sup>

Além disso, numa análise que acompanhou doentes diabéticos tipo 1 e 2, os normoalbuminúricos (albuminúria A1) apresentaram uma diminuição da excreção urinária do colagénio tipo IV, enquanto aqueles que desenvolveram albuminúria A2 surgiram-se com um maior aumento da sua excreção.<sup>31</sup>

Esta elevação também foi constatada em doentes normoalbuminúricos com intolerância à glicose.<sup>8</sup>

Evidências mostraram que o surgimento do colagénio tipo IV precede a albuminúria A2 na deteção de danos glomerulares e associado à albumina urinária e creatinina sérica, sugerindo que este pode ser um biomarcador promissor para diagnóstico precoce de ND.<sup>2,26</sup>

### **10.3.3 Proteínas específicas de podócitos: Podocina, Sinaptopodina, Nefrina e Podocalixina**

Nos últimos anos, a excreção urinária de podócitos ou as proteínas a eles associados têm capturado grande atenção como potenciais marcadores precoces de glomerulopatia.<sup>23</sup> Pesquisas têm vindo a demonstrar que o declínio no número de podócitos ocorre em estadios precoces da ND devido à apoptose ou degenerescência dos mesmos.<sup>2</sup> A podocitopenia em doentes com albuminúria A1 sugeriu que lesões nos podócitos aparecem antes do desenvolvimento da proteinúria, tendo sido também já descrita em diabéticos com albuminúria A2 e A3.<sup>23,27</sup>

Atualmente, os estudos focam-se nos produtos das proteínas específicas dos podócitos, tal como a nefrina, sinaptopodina, podocalixina, e a podocina (aumentados em doentes com DM quando comparados com grupos de controlo saudáveis), uma vez que era difícil a deteção direta de podócitos na urina.<sup>2,23</sup> No entanto, apenas a excreção urinária de nefrina e de sinaptopodina demonstraram ter uma correlação positiva com proteinúria e com a deterioração da função renal. Uma investigação recente revelou que os níveis urinários de nefrina estavam elevados em todos os doentes com ND desse estudo e 54% tinham níveis normais de albumina. Juntamente a isto, a nefrinúria mostrou uma associação forte com RAC e, por isso, pode ser um biomarcador útil da nefropatia em estadios pré-clínicos.<sup>2,27</sup>

Investigações posteriores conduzidas por *Hara et al.* revelaram que a sinaptopodina urinária em doentes com DM2 com nefropatia apresentava valores elevados em relação aos indivíduos de controlo (sem nefropatia), indicando que a sinaptopodina seria um biomarcador com elevada sensibilidade na avaliação do dano podocitário em doentes com DM<sup>2</sup>

Um estudo recente tem demonstrado altos níveis de podocalixina urinária em doentes com DM e foi encontrada uma correlação positiva entre a podocalixina urinária e a  $\beta$ 2-microglobulina,  $\alpha$ 1-microgloubulina, e NAG urinária, mas não com a creatinina sérica, a TFGe, ou proteinúria.<sup>23,36</sup> Além disto, estudos do perfil do mRNA (microRNA) urinário sugerem que a quantificação da expressão do mRNA da podocalixina, e outras moléculas associadas aos podócitos como a sinaptopodina e a podocina, podem vir a ser biomarcadores úteis na deteção antecipada da lesão dos podócitos e da progressão da ND.

No entanto, a estratégia de utilização do mRNA urinário é limitada dada a suscetibilidade do mRNA à degradação pelas RNAses. Há também o problema da especificidade dado que a podocalixina é expressa não só pelos podócitos, mas está presente também em muitos outros tipos de células (epiteliais, endoteliais, plaquetas, megacariócitos) e não pode ser considerada um biomarcador específico de podócitos.<sup>27</sup> Efetivamente, a podocitúria e a excreção de proteínas específicas de podócitos como a nefrina, sinaptopodina e podocalixina ocorre noutras formas de DRC não-diabética.<sup>23</sup>

#### **10.3.4 Ceruloplasmina**

A ceruloplasmina é um co-transportador sérico, e é carregado mais negativamente que a albumina, daí ser filtrada com dificuldade a nível glomerular. Níveis elevados de ceruloplasmina urinária foram encontrados em doentes com DM2 normoalbuminúricos (albumina A1), comparativamente a um grupo de controlo com doentes já com albuminúria A2, contribuindo a favor do seu uso para a deteção precoce de lesões renais: a ceruloplasmina pode ter um efeito preditivo em doentes com DM tipo 2.<sup>8,23</sup> De acordo com *Yamazaki et al.* o *ratio* de excreção da ceruloplasmina urinária e a clearance da ceruloplasmina aumentam paralelamente com a progressão da albuminúria.<sup>8</sup>

#### **10.3.5 Fator de transformação de crescimento $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)**

A hiperglicemia induz a expressão TGF- $\beta$ 1, que é considerada ser a citocina mais importante na glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial, sendo ainda responsável pelo início e progressão da ND.<sup>2,37</sup> Foram encontrados níveis urinários elevados em doentes com ND quando comparados com doentes normoalbuminúricos com diabetes e com um grupo de controlo de indivíduos saudáveis.<sup>27</sup>

Curiosamente, estes valores de TGF- $\beta$ 1 estavam já elevados em indivíduos normoalbuminúricos e aumentavam gradualmente com a progressão da ND, pelo que este pode ser considerado um biomarcador sensível em fases iniciais da ND.<sup>2</sup>

Relativamente aos restantes biomarcadores mencionados na tabela IV, dada a sua escassa pesquisa ou falta de consistência dos seus resultados, a sua abordagem mais profunda não será abordada. Entre eles, a Fibronectina que ainda não tem dados suficientes que suportam o seu valor preditivo de diagnóstico precoce da ND,<sup>8,33</sup> a L-PGDS (prostaglandina sintetase tipo lipocalina) que funciona apenas como preditor de disfunção renal<sup>8,38</sup> ou a

Adinopectina, cuja validade como biomarcador precoce ou de prognóstico da ND necessita de mais estudos.<sup>23,39</sup>

Outras moléculas foram destacadas para pesquisa do seu potencial dada a sua excreção estar associada ao aumento da excreção de outros potenciais biomarcadores, como é o caso da Laminina urinária, que surgiu concomitantemente com o colagénio tipo IV, NAG e  $\alpha$ 1-microglobulina, e o caso da Imunoglobulina G (IgG) urinária cuja sua excreção associou-se também a valores elevados de transferrina urinária, ceruloplasmina urinária e orosomucóide urinário antes do início da albuminúria A2.<sup>7,8,23</sup>

Por último, dados os significativos valores elevados em diabéticos com nefropatia, pesquisas revelaram que o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF) urinário seria provavelmente um biomarcador efetivo de ND, bem com o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), sendo este último mais focado em estádios precoces da ND.<sup>2</sup>

## **10.4 BIOMARCADORES TUBULARES**

As lesões do interstício tubular desempenham um papel fundamental no processo de desenvolvimento da ND e mesmo antes da lesão glomerular. Além do mais, cerca de um terço dos doentes com DM têm diminuído a sua função renal antes da proteinúria.<sup>2</sup>

Os biomarcadores de lesão tubular consistem essencialmente em enzimas urinárias (enzimúria) e proteínas plasmáticas de baixo peso molecular. O aumento da sua excreção na urina origina-se através da reabsorção deficiente de proteínas plasmáticas pelas células tubulares (danificadas ou em regeneração), ou pelo aumento da secreção de enzimas na urina por células epiteliais tubulares, sendo que ambas conduzem à proteinúria.<sup>26,33</sup>

O túbulo contornado proximal pode ter maior impacto no desenvolvimento de albuminúria do que se pensava anteriormente, e, portanto, alguns marcadores de dano tubular comprovaram-se altamente sensíveis quando comparados com a albuminúria A2 e outros marcadores glomerulares, independentemente de defeitos na permeabilidade glomerular.<sup>7,8,27</sup>

### **10.4.1 Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL)**

A NGAL é uma glicoproteína presente nos rins, expressa pelas células epiteliais tubulares em resposta à lesão tubulointersticial que frequentemente ocorre no decurso da patologia renal, sendo considerada protetora contra o dano renal.<sup>8, 22</sup> A NGAL é hiper-produzido nos

túbulos renais em poucas horas depois de um estímulo agressivo, como a isquemia-reperfusão.<sup>26</sup> Estudos têm confirmado uma associação entre NGAL e obesidade, insulino-resistência e hiperglicemia em humanos.<sup>33</sup>

Os marcadores tubulares como a NGAL, têm recentemente adquirido bastante atenção porque são considerados bastante sensíveis e específicos a detecção de lesão renal. Por isso, NGAL é um excelente preditor precoce de lesão tubular aguda.<sup>23,26</sup>

A NGAL urinária é um biomarcador usado na avaliação de lesões tubulares na DM, e os seus valores aumentados estão presentes mesmo em fases iniciais da doença, nomeadamente em doentes normoalbuminúricos (albuminúria A1).<sup>8</sup>

*Nielsen et al.* demonstraram que a NGAL urinária estava elevada em doentes com DM tipo 1 com ou sem albuminúria, indicando dano tubular em estadios iniciais.<sup>26</sup> Portanto, na DM1 elevados valores de NGAL urinário podem preceder a albuminúria A2.<sup>8</sup>

Um estudo mais recente relatou que a NGAL urinária foi significativamente maior em pacientes com DM2 do que em controles, e também maior em doentes com albuminúria A2 e A3 do que em pacientes normoalbuminúricos, tendo sido positivamente correlacionada com a excreção urinária de albumina. *Fu et al.* mostrou que a NGAL foi marcadamente aumentada nos pacientes com DM2 em comparação como grupo de controle e foi significativamente maior do grupo da albuminúria A1 para albuminúria A2. Este marcador mostrou correlações positivas mais fortes com o RAC e uma correlação negativa com TFGe. O estudo sugeriu que o dano tubular é comum diabéticos tipo 2, e que a NGAL urinária pode ser um marcador precoce promissor para monitorizar o comprometimento renal neste tipo de doentes.<sup>40</sup>

#### **10.4.2 *Kidney injury molecule-1 (KIM-1)***

A KIM-1 é uma proteína transmembranar expressa na membrana apical das células tubulares proximais em resposta a uma agressão e promove a fibrose renal, sendo portanto indetetável na urina sob condições normais. Elevados níveis de KIM-1 surgem na urina na sua forma estável após isquemia ou lesão renal aguda nefrotóxica, além de doenças renais com proteinúria, sugerindo o seu potencial papel como marcador de dano renal.<sup>23,25,41</sup>

*Petrica et al.* reportou em doentes normoalbuminúricos com DM2, valores elevados de KIM-1 urinária, que indiciavam lesões no túbulo proximal em estadios precoces da doença. Pacientes com albuminúria A2 têm valores de KIM-1 urinários mais elevados do que os normoalbuminúricos. *Carvalho et al.* identificou níveis de KIM-1 elevados em doentes com

DM2 normoalbuminúricos, e estes aumentavam progressivamente nos doentes com albuminúria A2 e A3.<sup>8</sup>

Observações recentemente concluíram que os níveis plasmáticos de KIM-1 eram fortemente preditivos do risco de DRT em doentes com DM1 e albuminúria.<sup>41</sup>

Assim, apesar do papel desta proteína ainda não se encontrar bem definido no processo da ND, a excreção urinária de KIM-1 poderá tornar-se um biomarcador não-invasivo de lesão tubulointersticial na ND.<sup>6,23</sup>

#### **10.4.3 Alfa-1-Microglobulina ( $\alpha$ 1-microglobulina)**

A  $\alpha$ 1-microglobulina é uma proteína sérica de baixo peso molecular, que é facilmente filtrada através da parede capilar glomerular. Uma vez chegada ao túbulo proximal, a  $\alpha$ 1-microglobulina é reabsorvida e metabolizada. A disfunção tubular leva a alterações da reabsorção com o aumento da sua excreção na urina.<sup>8,12</sup> A  $\alpha$ 1-microglobulina está diretamente relacionada com a duração da DM e a sua progressão, bem como com o deficiente controlo glicémico.<sup>26</sup>

Em doentes com DM2 normoalbuminúricos (albuminúria A1) foram demonstrados elevados níveis urinários deste biomarcador, dado que a lesão tubular precede o início da albuminúria A2, tornando-o mais sensível e num marcador urinário precoce. No entanto, a  $\alpha$ 1-microglobulina pode estar ausente em alguns doentes com albuminúria e, por isso, a avaliação através do seu uso está associada com a associação de outros biomarcadores urinários, incluindo a albumina urinária.<sup>8</sup> Nos doentes com diabetes tipo 1, também foram detetados valores elevados deste marcador, mesmo naqueles sem nefropatia clínica.<sup>26</sup>

Além disto, a  $\alpha$ 1-microglobulina urinária em estadios iniciais da DM poderá desempenhar um papel na previsão da ND, e tem sido identificada como um biomarcador de baixo custo para o diagnóstico precoce da ND.<sup>7</sup>

#### **10.4.4 N-acetil - $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)**

A NAG é uma enzima localizada nos lisossomas das células do túbulo proximal. Em caso de disfunção, nomeadamente, de lesão das células do túbulo proximal, a NAG é eliminada pela urina em grandes quantidades, sendo um biomarcador tubular sensível.<sup>8</sup>

Diversos estudos têm mostrado que a NAG urinária desempenha um papel importante no diagnóstico precoce e na monitorização da doença renal na DM, mesmo antes do surgimento da albuminúria A2. *Kern et al.* relatou que a excreção basal de NAG e o seu aumento ao longo do tempo previram o aparecimento de albuminúria A2 e A3. Recentemente, observaram-se que os níveis urinários de NAG estavam associados com a regressão da albuminúria A2 em doentes com diabetes tipo 1, sugerindo que a disfunção tubular é um componente crítico durante o curso da ND.<sup>26</sup> Em portadores de DM2, a excreção urinária de NAG aumentou proporcionalmente à duração da DM. Ocorreu muito mais cedo que a albuminúria, podendo ser considerado um biomarcador tubular precoce.<sup>7,42</sup>

No entanto, as concentrações de NAG urinária aumentam diretamente com a hiperglicemia e diminuem com a melhoria da glicémia, sendo por isso esta glicose-dependência potencialmente limitadora da utilidade da NAG como biomarcador de ND.<sup>23,26</sup>

Apesar disto, *Assal et al.* considera que a NAG urinária é o biomarcador mais sensível para a deteção precoce de lesão tubular em doentes diabéticos.<sup>8</sup>

#### 10.4.5 Cistatina C

A cistatina C é uma proteína plasmática filtrada através do glomérulo, reabsorvida e metabolizada no túbulo proximal, tendo sido identificada como um marcador promissor da TFG.<sup>6,25,27</sup> A sua concentração sérica, ao contrário da creatinina, não depende da massa muscular nem da dieta. A determinação da cistatina C sérica é útil na deteção precoce do declínio da TFG.<sup>42</sup>

*Uslu et al.* constatou que níveis urinários de cistatina C foram significativamente mais elevados no grupo com indivíduos com albuminúria A2 comparativamente ao da albuminúria A1 e foram correlacionados positivamente com RAC em ambos os tipos de DM e na pré-diabetes.<sup>40</sup> Na DM2 encontraram-se valores elevados de cistatina C urinária associados ao declínio da TFG, particularmente em doente com TFG  $\geq 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ , sugerindo que a excreção destes níveis elevados possa ser um melhor preditor da precocidade da nefropatia.<sup>27,40</sup>

Recentemente foi demonstrado que a cistatina C constitui um preditor significativo de ND entre os doentes com DM e que o teste de cistatina C é mais económico e mais conveniente comparativamente ao método *standard* para a TFG.<sup>5</sup>

#### **10.4.6 Proteína de ligação aos ácidos gordos hepáticos (L-FABP)**

A L-FABP é uma proteína de baixo peso molecular expressa no citoplasma de células tubulares proximais.<sup>8</sup> É produzida em resposta a uma agressão ao interstício tubular, e daí constituir um potencial marcador de dano tubular renal estrutural e funcional.<sup>33</sup> Nielson *et al.* descreveu níveis urinários de L-FABP aumentados em doentes com DM antes dos sinais de dano glomerular, albuminúria A2 ou albuminúria A3.<sup>26</sup>

Em doentes com DM1 normoalbuminúricos (albuminúria A1) foram encontrados valores elevados de L-FBAP urinária, tendo mostrado um papel preditor na progressão de albuminúria A1 para albuminúria A2 e conseqüentemente para albuminúria A3.<sup>8</sup> O mesmo se relatou em doentes com DM2 normoalbuminúricos, tendo esta proteína a ser considerada como um útil biomarcador para o diagnóstico precoce de ND, bem como um preditor independente da progressão desta complicação microvascular da DM.<sup>7,8</sup>

A L-FBAP está relacionada com a severidade da ND.<sup>8</sup> No estudo de Nauta *et al.* entre os marcadores de dano tubular investigados, a L-FABP foi a mais fortemente correlacionada com a TFGe.<sup>42</sup>

#### **10.4.7 Proteína ligante do retinol (RBP)**

Esta proteína foi detetada em elevados níveis em doentes com DM2 com complicações micro- e macrovasculares, quando comparada com doentes sem complicações.<sup>23</sup>

Apesar de ser visto como um biomarcador sensível da função tubular e auxiliador na deteção precoce de disfunção renal, a sua aplicabilidade deverá ser complementada com a avaliação de outros biomarcadores de dano glomerular, tais como a albuminúria.<sup>26</sup>

**Tabela 5.** Vários biomarcadores de nefropatia diabética (adaptado de<sup>7</sup>).

Biomarcador	Tipo de lesão renal	DM1	DM2	Pré-microalbuminúria®	Prevê microalbuminúria
Transferrina urinária	Lesão glomerular	+	+	+	+
TNF- $\alpha$ urinário	Lesão glomerular	+	+	+	+
Colagénio tipo IV urinário	Lesão glomerular/tubular	+	+	+	+
Fibronectina urinária	Lesão glomerular	+	+		
GAGs urinário	Lesão glomerular	+	+	+	
NAG urinária	Lesão tubular	+	+	+	+
L-PGDS urinária	Lesão glomerular		+	+	+

**Nota:** ®Surge na urina antes da microalbuminúria

**Abreviaturas:** DM1, Diabetes Mellitus tipo 1; DM2, Diabetes Mellitus tipo 2; TNF- $\alpha$ , Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; GAGs, glicosaminoglicanos; NAG, N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase; L-PGDS, sintetase prostaglandina D tipo lipocalina

## 11. INVESTIGAÇÃO NA NEFROPATIA DIABÉTICA

Atualmente, a perspectiva de descobrir novos biomarcadores na DM e ND respetivamente está incumbida à proteómica e genómica, transcriptómica, e metabolómica.<sup>8</sup>

### 11.1 Proteómica

A Proteómica corresponde ao estudo do proteoma completo ou pelo menos um largo número de proteínas expressas numa amostra biológica.<sup>21</sup> Os métodos da proteómica que utilizam a espectrometria de massa parecem ter um ótimo potencial no fornecimento de dados sobre perfis proteicos constituindo a “impressão digital” das doenças. Esta área tem vindo a ser designada como a “biópsia renal líquida”, sendo uma ferramenta não-invasiva que poderá potencialmente ser usada em fases pré-clínicas de doenças renais.<sup>42</sup>

Entre os estudos proteómicos no diagnóstico da ND, destacam-se o de Züribig *et al.* onde reportou que fragmentos de colagénio foram um proeminente biomarcador 3 a 5 anos antes do surgimento da albuminúria A2.<sup>8</sup> Rossing *et al.* identificou perfis peptídicos na urina num grupo de doentes com DM1 e DM2, que pareceram ser melhores preditores da progressão da DRD do que a albuminúria.

Estes achados têm importantes implicações clínicas e sugerem que a abordagem através da proteômica mantém-se como uma promessa na base dos testes de diagnóstico bem como na compreensão da patogênese e evolução da ND.<sup>26</sup>

## 11.2 Metabolômica

A metabolômica é uma série de tecnologias recentes que tentam identificar e quantificar todos ou grupos selecionados de moléculas de pequenos metabolitos endógenos (<1500 Da) a partir de uma pequena quantidade de amostras biológicas numa experiência única.<sup>43</sup>

Vários estudos têm explorado a aplicabilidade desta análise na abordagem da doença renal. Han *et al.* descreveu diversos perfis de ácidos gordos no plasma em diferentes estadios da DRD. Em 82 doentes com DM2, Zhu *et al.* demonstrou que um painel de seis fosfolípidos plasmáticos foi capaz de distinguir entre doentes com e sem DRD. Em 78 doentes com DM, Hirayama *et al.* identificou um painel de 19 metabolitos séricos correlacionados significativamente com o RAC. No Cohort da DM2 DE “Joslin Kidney Study”, Niewczas *et al.* identificou um painel de 5 metabolitos capazes de predizer a progressão para DRT.<sup>25</sup>

Apesar destes resultados parecerem promissores, a complexidade da análise técnica e a incompleta compreensão do metaboloma humano são problemas que necessitam de ser esclarecidos antes da aplicação da metabólica na prática clínica.<sup>25</sup>

## 11.3 Micro-RNA (mi-RNA)

Os mi-RNAs maduros são uma classe de RNAs evolutivamente conservados, curtos (20-22 nucleótidos) e não-codificados que constituem potentes reguladores da expressão génica.<sup>44</sup>

Recentemente, os micro-RNAs têm-se revelado de grande interesse como biomarcadores de diagnóstico sensíveis, não-invasivos, e estadio-específicos da ND, especialmente devido à sua estabilidade nos fluidos (urina e plasma) e em exossomas, e graças também às técnicas estabelecidas para a sua deteção.<sup>34</sup>

Xu *et al.* reportou o papel dos seguintes miRNAs: miR-216<sup>a</sup>, miR-217, miR-192, miR-377, miR-21, miR-29c no prognóstico da DRD.<sup>42</sup> Níveis plasmáticos de miR-16 e miR-210 foram descritos como reduzidos em doentes DRC severa comparados com doentes com função renal moderada ou normal.<sup>45</sup> Outro exemplo foi a expressão miR21 e miR-216<sup>a</sup> urinários associado ao declínio da função renal.<sup>27</sup> Argyropoulos destacou o papel preditivo do microRNA urinário em relação à albuminúria na DM1.<sup>8</sup>

No geral, apesar de diversos desafios de investigação permanecerem, é claro que os miRNAs são muito atrativos como biomarcadores simples e exatos, particularmente na ND.<sup>34</sup>

## 12. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No trajeto de pesquisa e destrinça de uma das mais comuns complicações crónicas da DM, destacou-se de facto a importância do seu diagnóstico precoce, por um lado dada a evolução favorável na deteção em estadios iniciais e, por outro, a redução dos encargos económicos e prevalência a ela associada.

De acordo com o relatório "Factos e Números da Diabetes do Observatório Nacional de 2016", publicado em 2017, a DM, em Portugal, apresentou um custo direto estimado entre 1893 milhões de euros, um acréscimo aproximado de 300 milhões, em relação a 2015. Este valor representa 1% do PIB (produto interno bruto) português à data e cerca de 12% das despesas em saúde em Portugal. Portanto, uma intervenção adequada e eficaz passaria pela prevenção primária e secundária desta patologia, visto que apresentar-se-ia como vantajosa em termos económicos e com bom prognóstico no percurso clínico.

O diagnóstico precoce aliado a um tratamento multidirecional constituem a única via efetiva na paragem da progressão da doença renal e na melhoria do seu prognóstico.

Associadas a extensas validações, a albuminúria A2 e a TFGe continuam atualmente na vanguarda dos critérios de diagnóstico da DRD. As suas limitações, aqui referenciadas, promoveram a necessidade de biomarcadores com maior sensibilidade e especificidade na deteção precoce da ND, bem como maior precisão na previsão da progressão da DRT.

Com a amplificação do conhecimento sobre a patogénese da ND, diversos biomarcadores abordados neste trabalho, apresentaram-se promissores na deteção em estadios iniciais da ND. Todavia, até o momento, tem-se concluído que nenhum superou a albuminúria A2 em associação com a TFGe, em estudos prospetivos longitudinais em larga escala.

Atualmente, NGAL e KIM-1 começaram já a ser envolvidos como indicadores clínicos para avaliar a resposta destes doentes ao tratamento renoprotetor da ND, bem como a Cistatina C e NAG. Além disto, obtiveram o devido destaque dada o potencial na previsão da diminuição da TFG bem como da albuminúria.

No momento atual, as investigações centram-se numa abordagem através de painéis de multimarcadores como a metabolómica e proteómica, onde são particularmente atraentes, uma vez que oferecem uma visão sobre os múltiplos processos complexos da fisiopatologia

da ND e melhoram a avaliação do prognóstico e resposta ao tratamento. Outro grande foco são também os micro-RNAs, onde se tem destacado a sua capacidade de diagnóstico precoce, tratamento e prevenção da ND, em doentes mesmo antes do surgimento dos sintomas de declínio da função renal.

Contudo, estas novas abordagens ainda não estão disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos, dada a sofisticação das técnicas utilizadas e dos custos elevados.

Em síntese, a avaliação contínua pela abordagem da proteômica, metabolômica e micro-RNAs sugere-nos levar as novas estratégias na deteção precoce da ND, visto o forte valor preditivo associado comparativamente aos marcadores já estudados, mas os custos extremamente altos colocam em causa a sua aplicabilidade na rotina clínica.

### **13. AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Margarida Bastos, por ter aceite o meu convite e por todo o profissionalismo e apoio imprescindível na realização desta dissertação de mestrado.

Aos meus pais e irmão, por estarem sempre presentes ao longo deste percurso nos últimos seis anos.

Por fim, aos meus amigos por todo o companheirismo diário e motivação.

#### 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Airton G, Rocha AM, Vasques ACJ, Ribeiro ALCP, Vianna AGD, Bauer AC, et al. Diretrizes - Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. 2018. 11-77 p.
2. Zhang Ji, Liu J, Qin X. Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy. *Rev Assoc Med Bras.* 2018;64(1):85-92.
3. Correia LG, Boavida JM, Almeida JF, Anselmo J, Cardoso MS, Costa AL. Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2015 – Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes - Edição de 2016. 2015. 33-34 p.
4. American Diabetes Association (ADA). Introduction. Vol. 40, *Diabetes Care.* 2017. p. S1-2.
5. Zhou B, Zou H, Xu G. Clinical Utility of Serum Cystatin C in Predicting Diabetic Nephropathy Among Patients with Diabetes Mellitus: a Meta-Analysis. *Kidney Blood Press Res.* 2018;43(1):296-296.
6. Satirapoj B. Tubulointerstitial Biomarkers for Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2018;
7. Uwaezuoke SN. The role of novel biomarkers in predicting diabetic nephropathy: A review. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2017;10:221-31.
8. Gluhovschi C, Gluhovschi G, Petrica L, Timar R, Velciov S, Ionita I, et al. Urinary biomarkers in the assessment of early diabetic nephropathy. *J Diabetes Res.* 2016;
9. Looker HC, Mauer M, Nelson RG. Role of Kidney Biopsies for Biomarker Discovery in Diabetic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2018;25(2):192–201.
10. Vecihi B. Diabetic Nephropathy [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 22]. p. 36-50. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/238946-overview>
11. Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci.* 2013;124(3):139-52.
12. Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33(2):1-9.
13. Shikata K, Makino H. Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig.* 2013;4(2):142-9.
14. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, et al. A new Classification of Diabetic Nephropathy 2014: A report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Investig.* 2015;6(2):242-6.
15. Navarro-gonzález JF, Mora-fernández C, Luis J, Teruel G, Martínez-castelao A. Etiopatogenia , fisiopatología e historia natural de la nefropatía diabética. 2016;1-7.
16. Gheith O, Othman N, Nampoory N, Halimb M, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: difference in the prevalence and risk factors worldwide. *J Egypt Soc Nephrol Transplant.* 2016;16(3):65.
17. Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1):110-8.
18. Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis. *Rev Diabet Stud.* 2015;12(1–2):110-8.

19. Boavida MJ, Baptista C, Oliveira Sá H, Santos JR, Raimundo L, Bastos M, et al. Prevenção e Avaliação da Nefropatia Diabética. Norma da DGS. 2011;1-7.
20. Porto JR, Gomes KB, Fernandes AP, Domingueti CP. Evaluation of Renal Function in Chronic Kidney Disease. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2017;49(1):26-35.
21. Currie G, Delles C. Urinary Proteomics for Diagnosis and Monitoring of Diabetic Nephropathy. *Curr Diab Rep*. 2016;16(11).
22. Rysz J, Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Jablonowski Z, Cialkowska-Rysz A. Novel biomarkers in the diagnosis of chronic kidney disease and the prediction of its outcome. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
23. Jha JC, Jandeleit-Dahm KAM, Cooper ME. New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21(3):318-26.
24. Colhoun HM, Marcovecchio ML. Biomarkers of diabetic kidney disease. *Diabetologia*. 2018;61(5):996-011.
25. Lin C-H, Chang Y-C, Chuang L-M. Early detection of diabetic kidney disease: Present limitations and future perspectives. *World J Diabetes*. 2016;7(14):290.
26. Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho JAM, Tatsch E, Bochi G V. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta*. 2013;421:17-30.
27. Huaman MA, Fiske CT, Jones TF, Warkentin J, Shepherd BE, Maruri F, et al. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: Beyond albuminuria. 2015;143(5):951-9.
28. Li Z, Xu Y, Liu X, Nie Y, Zhao Z. Urinary heme oxygenase-1 as a potential biomarker for early diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2017;22(1):58-64.
29. Alicic RZ, Johnson EJ, Tuttle KR. Inflammatory Mechanisms as New Biomarkers and Therapeutic Targets for Diabetic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2018;25(2):181-91.
30. Shoukry A, Bdeer SEA, El-Sokkary RH. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 and vitamin D-binding protein as biomarkers for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Biochem*. 2015;408(1–2):25-35.
31. Papadopoulou-Marketou N, Kanaka-Gantenbein C, Marketos N, Chrousos GP, Papassotiriou I. Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(5):326-42.
32. Umapathy D, Dornadula S, Krishnamoorthy E, Mariappanadar V, Viswanathan V, Ramkumar KM. YKL-40: A biomarker for early nephropathy in type 2 diabetic patients and its association with inflammatory cytokines. *Immunobiology*. 2018;223(11):718-27.
33. Currie G. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World J Diabetes*. 2014;5(6):763.
34. Kato M, Natarajan R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1353(1):72-88.
35. Champion CG, Sanchez-Ferras O, Batchu SN. Potential role of serum and urinary biomarkers in diagnosis and prognosis of diabetic nephropathy. *Can J Kidney Heal Dis*. 2017;4:1-18.
36. Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K. Novel urinary biomarkers in early diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep*. 2014;14(8).

37. Takir M, Unal AD, Kostek O, Bayraktar N, Demirag NG. Cystatin-C and TGF- $\beta$  levels in patients with diabetic nephropathy. *Nefrologia*. 2016;36(6):653-9.
38. Motawi TK, Shehata NI, ElNokeety MM, El-Emady YF. Potential serum biomarkers for early detection of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;136:150-8.
39. Pabalan N, Tiongco RE, Pandac JK, Paragas NA, Lasta S Lo, Gallego N, et al. Association and biomarker potential of elevated serum adiponectin with nephropathy among type 1 and type 2 diabetics: A meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(12):e0208905.
40. Siddiqi Z, Karoli R, Kaul A, Fatima J, Varshney S, Beg MS. Evaluation of Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin and Cystatin C as Early Markers of Diabetic Nephropathy. 2018;16(3):101–6.
41. Coca SG, Nadkarni GN, Huang Y, Moledina DG, Rao V, Zhang J, et al. Plasma Biomarkers and Kidney Function Decline in Early and Established Diabetic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(9):2786-93.
42. Żyłka A, Gala-błądzińska A, Rybak K. Role of new biomarkers for the diagnosis of nephropathy associated with diabetes type 2. *Folia Med Cracov*. 2015;4:21-33.
43. Zhang Y, Zhang S, Wang G. Metabolomic biomarkers in diabetic kidney diseases - A systematic review. *J Diabetes Complications*. 2015;29(8):1345-51.
44. Badal SS, Danesh FR. Diabetic nephropathy: Emerging biomarkers for risk assessment. *Diabetes*. 2015;64(9):3063-5.
45. Alvarez ML, DiStefano JK. The role of non-coding RNAs in diabetic nephropathy: Potential applications as biomarkers for disease development and progression. *Diabetes Res Clin Pract*. 2013;99(1):1-11.