

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE URINÁRIA DAS
ENZIMAS GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE E
FOSFATASE ALCALINA PARA A DETECÇÃO DA
NEFROPATIA EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

José Antonio Mainardi de Carvalho

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE URINÁRIA DAS ENZIMAS
GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE E FOSFATASE
ALCALINA PARA A DETECÇÃO DA NEFROPATIA EM
PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

por

José Antonio Mainardi de Carvalho

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

**Santa Maria, RS, Brasil
2011**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE URINÁRIA DAS ENZIMAS GAMA-
GLUTAMILTRANSFERASE E FOSFATASE ALCALINA PARA A
DETECÇÃO DA NEFROPATIA EM PACIENTES COM DIABETES
*MELLITUS TIPO 2***

elaborada por
José Antonio Mainardi de Carvalho

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Rafael Noal Moresco, Dr.
(Presidente/Orientador)

Michel Mansur Machado, Dr. (UNIPAMPA)

Angela Regina Maciel Weinmann, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 17 de junho de 2011

AGRADECIMENTOS

A Deus presença constante no meu caminho, fonte da vida, Pai Amoroso, pelo dom da vida

A Jesus, Mestre verdadeiro, luz do caminho, fonte da sabedoria

A Maria, “Servus Marie Nunquam Peribitae”.

Aos meus Pais, pelo amor, pelas lições de toda a vida, pelo incentivo, pelo apoio fiel, por me manterem no caminho, pela educação.....

A minha esposa, Jô, pelo carinho, pelo afeto, pelo cuidado, por compreender minha constante inquietação. ... “Ainda que eu falasse a língua dos homens e a língua dos homens, sem amor eu nada seria”.....

Ao meu amado filho, Guto, benção da minha vida, pelo sorriso de cada dia, pelo gesto, pelas brincadeiras, pela compreensão, pela nossa estudação....

Ao meu orientador, meu amigo, meu consultor.... Prof. Dr. Rafael, pela oportunidade, dedicação, respeito, compreensão, segurança e confiança. Por estar sempre disposto a dividir seus conhecimentos e suas experiências.

A todos meus colegas de mestrado e de laboratório de pesquisa Bruna, Guilherme, Etiane, Renata, Silvia, Helena, Rafael, Manoela, Carine, Vanessa, Thiago, Michelle, companheiros de trabalho, de risadas e de seminários. Meu muito obrigado, o apoio de vocês foi muito importante.

Ao meu amigo e meu irmão Clóvis, companheiro de todas as horas, parceiro de outras eras, bom conselheiro, só posso dizer “valeu cara”.

Aos diretores do LAC e LABIMED e amigos, Elehu e Marta Duarte, pelo apoio constante na minha vida profissional.

A Equipe do meu turno da tarde do LAC, muito obrigado por tudo.

Aos professores Dr. Michel, Dr^a. Angela e Dr^a. Marta, por disporem do seu tempo para compor a banca examinadora dessa dissertação.

Ao Cobas Mira (Roche) companheiro de vários e longínquos plantões e agora de pesquisa.

A Universidade Federal de Santa Maria que me acolhe desde 1992, que concedeu todas as bolsas possíveis enquanto estudante, que é responsável pelo pão de cada dia na mesa da minha família, pelas inúmeras oportunidades conquistadas a partir dela, por não distinguir a classe social oportunizando o saber a todos e por mais este título.

***“... Peçam, e lhes será dado.
Procurem, e encontrarão!
Batam, e abrirão a porta para vocês!
Pois, todo aquele que pede, recebe;
quem procura, acha;
e a quem bate a porta será aberta....”***

Jesus (Lucas 11, 9-11)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE URINÁRIA DAS ENZIMAS GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE E FOSFATASE ALCALINA PARA A DETECÇÃO DA NEFROPATIA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2

AUTOR: JOSÉ ANTONIO MAINARDI DE CARVALHO
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 17 de junho de 2011.

Introdução: A nefropatia diabética (ND) é definida como um aumento na taxa de excreção urinária de albumina, sendo esta frequentemente associada ao aumento da pressão sanguínea. A ND é a principal causa de doença renal em estágio final, estando também associada ao aumento do risco de mortalidade cardiovascular. A microalbuminúria é o primeiro sinal de dano renal ou nefropatia incipiente, sendo geralmente considerado o melhor preditor não-invasivo para o desenvolvimento de ND. Os marcadores urinários de dano tubular são principalmente compostos por enzimas ou proteínas plasmáticas de baixo peso molecular que são normalmente filtradas pelo glomérulo, sendo que estes biomarcadores podem ser úteis para o diagnóstico da ND. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar as características diagnósticas dos níveis urinários de gama-glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FAL) para o diagnóstico da ND.

Métodos: Glicemia de jejum, frutossamina, creatinina sérica, taxa de filtração glomerular (TFG), ácido úrico, albumina, além dos níveis urinários de albumina, GGT e FAL foram mensurados em 74 pacientes diabéticos tipo 2 sem nefropatia e 38 pacientes diabéticos tipo 2 com nefropatia.

Resultados: As enzimas GGT e FAL, mensuradas em amostras de urina, foram três vezes mais elevadas nos pacientes diabéticos tipo 2 com nefropatia. Foram observadas correlações significativas entre a albumina urinária e GGT ($r=0,439$, $P<0,001$) e albumina urinária e FAL ($r=0,305$, $P<0,01$). As áreas sob a curva para GGT e FAL foram 0,7696 ($P<0,001$) e 0,7233 ($P<0,001$), respectivamente. Ao considerar o ponto de corte de 72 U/g de creatinina, a GGT demonstrou uma sensibilidade de 96,0% e especificidade de 52,6%. Considerando o ponto de corte de 20 U/g de creatinina, a FAL demonstrou uma sensibilidade e especificidade de 83,8% e 36,8%, respectivamente.

Conclusões: As enzimas GGT e FAL mensuradas em amostras de urina apresentaram potencial valor para o diagnóstico de nefropatia em pacientes com diabetes tipo 2, mas a GGT apresentou uma habilidade discretamente superior à FAL nesta diferenciação.

Palavras-chave: albuminúria, fosfatase alcalina, nefropatia diabética; gama-glutamiltransferase

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

ASSESSMENT OF URINARY GAMMA-GLUTAMYLTRANSFERASE AND ALKALINE PHOSPHATASE ACTIVITIES FOR DIAGNOSIS OF NEPHROPATHY IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES

AUTHOR: JOSÉ ANTONIO MAINARDI DE CARVALHO
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
Date and Place: Santa Maria, 17 de junho de 2011.

Background: Diabetic nephropathy (DN) is defined as a rise in urinary albumin excretion rate, often associated with an increase in blood pressure. It is the leading cause of end-stage renal disease and carries an increased risk for cardiovascular mortality. Microalbuminuria is the first sign of diabetic renal impairment or incipient nephropathy and is generally considered the best noninvasive predictor for the development of DN. Urinary markers of tubular damage are mainly composed of enzymes or plasma proteins of low molecular weight that are normally freely filtered by the glomerulus, and these biomarkers can be useful for diagnosis of DN. Thus, the aim of this study was to test the diagnostic accuracy of the urinary excretion of gamma-glutamyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) for diagnosis of diabetic nephropathy (DN).

Methods: Fasting glucose, fructosamine, serum creatinine, glomerular filtration rate (GFR), serum uric acid, serum albumin, and urinary albumin, creatinine, GGT and ALP were assessed in 74 type 2 diabetic patients without nephropathy and 38 type 2 diabetic patients with nephropathy.

Results: Urinary GGT and ALP were threefold higher in type 2 diabetic patients with nephropathy. Significant correlations were observed between urinary albumin and GGT ($r=0.439$, $P<0.001$) and urinary albumin and ALP ($r=0.305$, $P<0.01$). Areas under the curve for GGT and ALP were 0.7696 ($P<0.001$) and 0.7233 ($P<0.001$), respectively. At a cut-off value of 72 U/g creatinine, GGT demonstrated a sensitivity of 96.0% and a specificity of 52.6%. At a cut-off value of 20 U/g creatinine, ALP demonstrated a sensitivity and specificity of 83.8% and 36.8%, respectively.

Conclusions: Urinary GGT and ALP have potential value in the diagnosis of nephropathy in type 2 diabetic patients, but GGT has a slightly higher ability to discriminate nephropathy than ALP.

Keywords: albuminuria; alkaline phosphatase; diabetic nephropathy; gamma glutamyltransferase.

LISTA DE ABREVIATURAS

A1C: Hemoglobina glicada

A1MG: α_1 -microglobulina

AAP: Alanina Aminopeptidase

ADA: *American Diabetes Association* (Associação Americana de Diabetes)

AGES: *Advanced glycosylation and products* (produtos finais da glicação avançada)

AST: *Aspartate aminotransferase* (aspartato aminotransferase)

ALP: *Alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina)

ALT: *Alanine aminotransferase* (alanina aminotransferase)

AVC: Acidente vascular cerebral

B2MG: β_2 -microglobulina

CID: Classificação internacional de doenças

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*

DCV: Doença Cardiovascular

DM: Diabetes *mellitus*

DM tipo 1: Diabetes *mellitus* tipo 1

DM tipo 2: Diabetes *mellitus* tipo 2

DMG: Diabetes *mellitus* gestacional

DMDI: Diabetes *mellitus* dependente da insulina

DMN: Diabetes *mellitus* da desnutrição

DMNDI: Diabetes *mellitus* não dependente de insulina

DN: *Diabetic nephropathy* (Nefropatia diabética)

DRC: Doença renal crônica

DVP: Doença vascular periférica

ECA: Enzima conversora de angiotensina

EROS: Espécies reativas de oxigênio

ESRD: *End stage renal disease* (doença renal em estágio final)

FAL: Fosfatase alcalina

GFR: *Glomerular filtration rate* (taxa de filtração glomerular, TFG)

GGT: Gama-glutamilttransferase

GST: Glutathiona-S-transferase

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

IL: Interleucina

IRA: Insuficiência renal aguda

ITG: Insuficiência de tolerância à glicose

LD: Lactato desidrogenase

PBM: Proteínas plasmáticas de baixo peso molecular

MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MDRD: *Modified diet in renal disease* (fórmula da dieta modificada na doença renal)

MODY: *Maturity onset diabetes of the young*

NAG: N- β -acetil-glucosaminidase

ND: Nefropatia diabética

NDDG: National Diabetes Data Group

NRD: Neuropatia diabética

OMS: Organização Mundial de Saúde

PKC: Proteína C Quinase

RBP: Proteína ligadora de retinol

RD: Retinopatia diabética

ROC: Receiver operator characteristic

SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes

TGF- β 1: Fator de crescimento β 1

TFG: Taxa de filtração glomerular

TOTG: Teste de tolerância oral à glicose

VEGF-A : Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação etiológica do diabetes <i>mellitus</i>	18
Tabela 2. Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos.....	23
Tabela 3. Definição das anormalidades na excreção urinária de albumina.....	35
Tabela 4. Principais biomarcadores para doença renal e a porção envolvida no néfron.....	38

ARTIGO

Table 1. Baseline characteristics of the study patients.....	50
Table 2. Biochemical parameters of the study patients.....	51
Table 3. Multiple regression analysis of urinary GGT and ALP as dependent variables adjusting for baseline fasting glucose, fructosamine and smoking.....	51
Table 4. Baseline characteristics of study patients.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da patogênese da Nefropatia Diabética.....	29
---	----

ARTIGO

Figura. 1. Venn diagram of positive albuminuria, positive urinary GGT (over 72 U/g creatinine), and positive urinary ALP (over 20 U/g creatinine). Subset areas are not proportional to the actual relative subset sizes. GGT: γ - glutamyltransferase; ALP: alkaline phosphatase.....	52
Figura. 2. ROC curves of urinary GGT and ALP for assessment of diabetic nephropathy. Areas under the curve for GGT and ALP were 0.7696 (95% CI, 0.6685 to 0.8706, $P < 0.001$) and 0.7233 (95% CI, 0.6207 to 0.8260, $P < 0.001$), respectively.....	52
Figura. 3. Significant correlations between (A) urinary albumin and GGT ($r = 0.439$, $P < 0.001$), and (B) urinary albumin and ALP ($r = 0.305$, $P < 0.01$).....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1.Diabetes <i>mellitus</i>: histórico e definição.....	15
2.2. Classificação do diabetes <i>mellitus</i>	16
2.2.1 Classificações anteriores.....	16
2.2.2 Classificação atual.....	17
2.2.2.1 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	19
2.2.2.2 Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	19
2.2.2.3 Diabetes <i>mellitus</i> gestacional.....	20
2.2.2.4 Outros tipos específicos.....	21
2.3 Diagnóstico laboratorial do diabetes.....	22
2.5 Complicações crônicas do DM.....	23
2.5.1 Retinopatia diabética.....	25
2.5.2 Neuropatia diabética.....	25
2.5.3 Doenças cardiovasculares.....	26
2.5.4 Nefropatia diabética.....	27
2.5.4.1 Patogênese da nefropatia diabética.....	28
2.5.4.2 Diagnóstico da nefropatia diabética.....	34
2.6 Proteínas tubulares.....	36
2.6.1 Proteínas de baixo peso molecular	38
2.6.2 Enzimúria tubular	39
2.6.1. Principais enzimas urinárias.....	40
3. OBJETIVOS.....	47
3.1. Objetivos Específicos.....	47
4. ARTIGO.....	48
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) se tornou uma das principais causas isoladas de doença renal em estágio final. Cerca de 20-30% dos pacientes com diabetes tipo 1 ou diabetes tipo 2 desenvolvem evidência de nefropatia, mas no DM tipo 2, uma fração consideravelmente menor evolui para doença renal em estágio final (MOLITCH et al., 2004).

O desenvolvimento das complicações crônicas do DM, incluindo as complicações cardiovasculares e a nefropatia, são responsáveis por uma proporção significativa do aumento das taxas de mortalidade em pacientes com DM (ADA, 2009; SCHRAMM et al., 2008). O exato mecanismo pelo qual o DM leva ao desenvolvimento destas complicações é complexo e não está ainda totalmente elucidado, mas envolve os efeitos tóxicos diretamente desencadeados pela hiperglicemia, juntamente com o aumento da pressão arterial, anormalidades lipídicas, estresse oxidativo, doença inflamatória crônica, hipóxia e isquemia (MARFELLA et al., 2002; PU et al., 2006; LEBECHE et al., 2008).

A nefropatia diabética (ND) ocorre em 20 a 40% dos pacientes com DM e é uma das complicações crônicas do DM que está associada a um importante aumento de mortalidade, principalmente relacionado à doença cardiovascular (VALMADRID et al., 2000; ADA, 2010). No Rio Grande do Sul, Brasil, no ano de 1996, a doença renal primária foi atribuída ao DM em 26% dos casos admitidos em programas de diálise (GROSS et al., 2000). A ND apresenta-se em três estágios evolutivos: nefropatia incipiente ou fase de microalbuminúria, nefropatia clínica ou fase de macroalbuminúria e insuficiência renal terminal (uremia) (MURUSSI et al., 2008). A albuminúria é definida como a taxa de excreção urinária de albumina, e tem sido considerada como um preditor do desenvolvimento da ND (PICCIRILLO et al., 2004).

A microalbuminúria é o primeiro sinal de insuficiência renal ou de ND incipiente (REMUZZI et al., 2002; MATHENSON et al., 2010), e é geralmente considerado o melhor preditor não-invasivo para o desenvolvimento de ND (NARITA et al., 2006). A microalbuminúria é aceita como um marcador diagnóstico precoce de nefropatia, e também um importante fator de risco para eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos e em não-diabéticos (LAMBERS HEERSPIJK et al., 2005;

RUGGENENTI & REMUZZI, 2006; BARRAT & TOPHAM, 2007; MATHESON et al., 2010).

Os marcadores urinários indicativos de lesão tubular incluem a avaliação laboratorial de enzimas urinárias ou de proteínas de baixo peso molecular que normalmente são filtradas pelo glomérulo (MATHESON et al., 2010). A excreção aumentada destes marcadores na urina é resultante da reabsorção deficiente de proteínas do plasma pelas células tubulares, ou de aumento da secreção de enzimas urinárias por células epiteliais tubulares, ambos levando à proteinúria tubular (HONG et al., 1998; BARRAT & TOPHAM, 2007; MATHESON et al., 2010). Da mesma forma, as enzimas na urina são marcadores altamente sensíveis de lesão tubular renal. Algumas das proteínas e enzimas tubulares melhores caracterizadas para a detecção da lesão tubular proximal são: α_1 e β_2 -microglobulina, cistatina C, proteína ligadora do retinol, α -glutathione S-transferase (GST), gama-glutamyltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), lactato desidrogenase (LD) e N- β -acetil-glucosaminidase (NAG) (HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; BAGASHAW et al., 2007).

Considerando que a nefropatia é uma das principais complicações crônicas do diabetes, o estudo de biomarcadores laboratoriais aplicados ao seu diagnóstico pode contribuir para o melhor conhecimento da fisiopatologia deste processo, bem como colaborar para a implantação de novas abordagens diagnósticas aplicadas à prática clínica. Dessa forma, o estudo envolvendo os biomarcadores GGT e FAL, duas enzimas amplamente mensuradas por técnicas bem estabelecidas nos laboratórios de análises clínicas, pode adicionar novas informações úteis aplicadas especialmente ao diagnóstico da nefropatia no DM tipo 2, além de outras condições associadas ao comprometimento renal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes *mellitus*: histórico e definição

O primeiro caso de diabetes foi constatado no Egito em 1500 a.C., como uma doença desconhecida. A denominação diabetes foi usada pela primeira vez por Apolonio e Memphis em 250 a.C. Diabetes em grego quer dizer sifão (tubo para aspirar à água), este nome foi dado devido à sintomatologia da doença que provoca sede intensa e grande quantidade de urina. O diabetes só adquire a terminologia *mellitus* no século I d.C.; *Mellitus*, em latim, significa mel, logo a patologia passa a ser chamada de urina doce (GAMA, 2002).

O termo diabetes *mellitus* (DM) aplica-se a um grupo de distúrbios metabólicos, de etiologia múltipla, que se caracterizam, bioquimicamente, por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção da insulina e/ou sua ação (ADA, 2004; CRAIG et al., 2009).

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM, sendo que estes vão desde a destruição auto-imune das células β do pâncreas (com consequente deficiência de insulina) até anormalidades que resultam em resistência à ação da insulina. As células β -pancreáticas desempenham um papel importante na manutenção da homeostase da glicose, secretando insulina, um hormônio chave para a regulação do metabolismo da glicose. Disfunções das células β e/ou uma diminuição da massa de células β são associadas estreitamente com a patogênese e fisiopatologia do DM (ADA, 2002).

A secreção inadequada da insulina, bem como a sua ação diminuída nos tecidos, são responsáveis pelas alterações no metabolismo dos carboidratos, lípidos e proteínas no DM. O comprometimento da secreção de insulina e os consequentes defeitos na sua ação, frequentemente, coexistem no mesmo paciente, no entanto, nem sempre é claro qual destes é a causa primária da hiperglicemia (ADA, 2004).

Os sintomas de hiperglicemia acentuada incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes com polifagia e visão turva. Comprometimento do crescimento e susceptibilidade a certas infecções também podem acompanhar a hiperglicemia

crônica. Na hiperglicemia aguda, as consequências fatais do DM, não controlado, é a cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica (ADA, 2002; ADA, 2004).

Muitas vezes, os sintomas não são graves, ou podem estar ausentes, mas a hiperglicemia é suficiente para causar patologias e alterações funcionais que podem estar presentes por um longo tempo antes do diagnóstico ser feito. Os efeitos a longo prazo do DM incluem o desenvolvimento progressivo de complicações específicas como a retinopatia com potencial cegueira, nefropatia, que pode levar à insuficiência renal, e/ou neuropatia (com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de *Charcot*, disfunções autonômicas características, incluindo a disfunção sexual). Além disso, pessoas com DM têm um risco aumentado de doença cardiovascular, vascular periférica e cerebrovascular (WHO, 1999; ADA, 2002).

2.2 Classificação do diabetes *mellitus*

2.2.1 Classificações anteriores

Devido a multiplicidade etiológica do DM, até 1979 muitos eram os critérios para se diagnosticar a doença. Em 1979, o *National Diabetes Data Group* (NDDG), patrocinado pelo *National Institute of Health* (NIH), estabeleceu critérios para serem adotados nos Estados Unidos (NDDG, 1979). A primeira classificação amplamente aceita do DM foi publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1980, baseada nos critérios estabelecidos pelo NDDG (WHO, 1980), e modificada em 1985 (WHO, 1985).

Entre 1980 e 1985, as classificações do DM incluíam as classes clínicas de intolerância à glicose e duas classes de risco estatístico. Em 1980, o *Expert Committee* propôs duas classes principais do DM: diabetes *mellitus* dependente da insulina (DMDI) ou tipo 1 e diabetes *mellitus* não dependente de insulina (DMNDI) ou tipo 2. No relatório da OMS emitido em 1985, os termos tipo 1 e tipo 2 foram omitidos, mas as classes DMDI e DMNDI foram mantidas, e uma classe de diabetes *mellitus* da desnutrição (DMN) foi introduzida (WHO, 1985). Em ambos relatórios, 1980 e 1985, outras classes do DM foram incluídos, como, insuficiência de tolerância à glicose (ITG) e o diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Estas foram avaliadas na subsequente reunião do comitê de nomenclatura internacional de

doenças (NID) em 1991, na décima revisão da classificação internacional de doenças (CID-10), em 1992. A classificação de 1985 foi amplamente aceita e utilizada internacionalmente. Ela representou um compromisso entre a classificação clínica e etiológica e permitiu a classificação dos pacientes, individualmente de uma forma clinicamente útil, mesmo quando a causa específica ou etiologia fosse desconhecida. A classificação recomendada incluía tanto o estadiamento do DM, baseado em critérios clínicos, critérios descritivos e uma classificação etiológica complementar (WHO, 1999).

2.2.2 Classificação atual do diabetes *mellitus*

Em junho de 1997, um comite internacional de especialistas publicou um relatório com novas recomendações para a classificação e diagnóstico do DM. Estas novas recomendações foram o resultado de mais de dois anos de colaboração entre os especialistas da Associação Americana de Diabetes (ADA) e a OMS. A utilização de sistemas de classificação e critérios diagnósticos padronizados facilitam uma linguagem comum entre pacientes, médicos, demais profissionais de saúde e cientistas. A descoberta de outros tipos de DM com fisiopatologia específicas que não se encaixam nesse sistema de classificação até então em uso tornava mais complicada a classificação. Essas dificuldades, juntamente com novos conhecimentos sobre os mecanismos do DM, deram um grande impulso para o desenvolvimento de um novo sistema de classificação (MAYFIELD, 1998). Dessa maneira foi desenvolvido um novo sistema de classificação em que os termos DMID e DMNDI foram eliminados, sendo mantidos os termos tipo 1 e tipo 2. Com isso, foram criadas outras categorias, conforme apresentado na tabela 1 (BRAGA, 2002).

Atribuir um tipo de DM para um indivíduo, muitas vezes depende das circunstâncias presentes no momento do diagnóstico, sendo que muitos indivíduos diabéticos não se encaixam facilmente em uma única classe. Por exemplo, uma pessoa com DMG pode continuar a ser hiperglicêmica após o parto e pode ter, de fato, o DM tipo 2. Alternativamente, uma pessoa que adquire DM devido a grandes doses de esteróides exógenos pode restabelecer a normoglicemia quando os glicocorticóides forem interrompidos, mas pode desenvolver DM muitos anos mais tarde, após episódios recorrentes de pancreatite. Outro exemplo seria uma pessoa

tratada com tiazidas que desenvolve diabetes anos mais tarde. Como as tiazidas raramente causam hiperglicemia severa, esses indivíduos provavelmente tinham DM tipo 2, que foi agravada pela droga (ADA, 2002).

Tabela 1. Classificação etiológica do diabetes *mellitus*.

I. Diabetes tipo 1

- Destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina

A. auto-imune

B. idiopático

II. Diabetes tipo 2

- Graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina

III. Outros tipos específicos

A. Defeitos genéticos da função da célula β

B. Defeitos genéticos da ação da insulina

C. Doenças do pâncreas exócrino

D. Endocrinopatias

E. Indução por drogas ou produtos químicos

F. Infecções

G. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado

IV. Diabetes Gestacional

Fonte: ADA, 1997.

2.2.2.1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM tipo 1) ocorre geralmente pela destruição das células β , levando à absoluta deficiência de insulina. Pode ser dividido em dois subgrupos:

- Diabetes imunomediada

Nesta classificação do DM anteriormente integravam os termos diabetes insulino-dependente, DM tipo 1 ou diabetes de início juvenil, resultado da destruição das células β do pâncreas, mediado por processo autoimune celular (ATKINSON & MACLAREN, 1994).

No DM tipo 1, o intervalo máximo de tempo após o diagnóstico, em que o indivíduo pode permanecer sem usar obrigatoriamente insulina, ou seja, período em que não ocorre cetoacidose, é em geral de 1 a 2 anos. Este dado, algumas vezes, pode ser útil na classificação do indivíduo, pois o paciente que necessita de insulina apenas após 2 anos do diagnóstico de DM é em geral do tipo 2. O pico de incidência do DM tipo 1 ocorre dos 10 aos 14 anos de idade, havendo a seguir uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos, de tal maneira que casos de DM tipo 1 de início após esta idade são pouco frequentes. No entanto, indivíduos de qualquer idade podem desenvolver DM tipo 1 (GROSS et al., 2002).

- Diabetes Idiopática

Os indivíduos com esta forma de DM sofrem de cetoacidose episódica e apresentam diferentes graus de deficiência de insulina entre os episódios. Esta forma de DM é fortemente hereditária, mas não há evidências imunológicas para auto-imunidade celular, e não tem associação com antígeno de histocompatibilidade. Uma exigência absoluta para terapia de reposição de insulina em pacientes afetados pode ir e vir. Nesta categoria os indivíduos são na maioria de origem africana ou asiática (ADA, 2002; GROSS et al., 2002).

2.2.2.2 Diabetes *mellitus* tipo 2

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM tipo 2) é mais comum do que o tipo 1, perfazendo cerca de 90% dos casos de DM. É uma entidade heterogênea,

caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, com predomínio de um ou outro componente (WHO, 1999).

A etiologia específica deste tipo de DM ainda não está claramente estabelecida como no DM tipo 1. A destruição auto-imune do pâncreas não está envolvida. Ao contrário do DM tipo 1, a maioria dos pacientes apresenta obesidade. A idade de início do DM tipo 2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência ao redor dos 60 anos. Em finlandeses, 97% dos pacientes tipo 2 iniciaram o DM após os 40 anos de idade (ERIKSSON et al., 1992). Estudos que aliam a obesidade à idade superior a 40 anos indicam este ponto de corte da idade como discriminatório entre os dois tipos de DM (HOTHER-NIELSEN et al., 1988).

Por outro lado, outros autores associam a ausência de episódio agudo de cetoacidose e idade superior a 20 anos como indicadores da presença de DM tipo 2 (SERVICE et al., 1997). Portanto, a idade de forma isolada parece não definir a classificação, mas se aliada a outras variáveis como obesidade e ausência de cetoacidose, pode sugerir o tipo de DM. Deve ser levado em conta que, embora a ocorrência de cetoacidose seja característica do estado de deficiência insulínica do tipo 1, o paciente tipo 2 pode apresentar este quadro na vigência de intercorrências graves como infecções ou episódios agudos de doença cerebrovascular (KITABCHI et al., 2001).

A ocorrência de agregação familiar do diabetes é mais comum no DM tipo 2 do que no DM tipo 1. No entanto, estudos tem descrito uma prevalência duas vezes maior de DM tipo 1 em famílias com tipo 2, sugerindo uma possível interação genética entre os dois tipos de DM (LI et al., 2001). A diferenciação entre os dois tipos mais comuns de DM é em geral seletivamente simples e baseada fundamentalmente em dados clínicos (GROSS et al., 2002).

2.2.2.3 Diabetes *mellitus* gestacional

O DM gestacional é definido como a tolerância diminuída aos carboidratos, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (ADA, 1997; WHO, 1999). Os fatores de risco associados ao DMG são semelhantes aos descritos para o DM tipo 2, incluindo, ainda, idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual,

deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal.

O rastreamento do DM é realizado a partir da primeira consulta pré-natal, sendo a medida da glicose em jejum utilizada com o objetivo de detectar a presença de DM pré-existente. A partir da 20ª semana da gravidez, é realizada outra medida da glicose plasmática de jejum, com ponto de corte de 85mg/dL, visando a detecção do DMG (REICHELDT et al., 1998).

2.2.2.4 Outros tipos específicos de DM

Na medida em que são elucidados os processos de patogênese do DM, tanto em relação a marcadores genéticos como os mecanismos da doença, tem crescido o número de tipos distintos de DM, permitindo uma classificação mais específica e definitiva (GROSS et al., 2002). Portanto, novas categorias têm sido acrescentadas à lista de tipos específicos de DM, incluindo outros tipos específicos de DM devido a outras causas como, por exemplo, defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (tais como a fibrose cística) e DM induzida por drogas, como no tratamento da AIDS ou após transplante (ADA, 2010).

Recentemente, têm-se enfatizado dois tipos específicos de DM: *maturity onset diabetes of the young* (MODY) e diabetes de origem mitocondrial. O DM tipo MODY engloba um grupo heterogêneo de DM sem predisposição para a cetoacidose e sem obesidade, com hiperglicemia leve, com início antes dos 25 anos de idade e com várias gerações de familiares com DM, configurando uma herança autossômica dominante. É estimado que este tipo de DM seja responsável por cerca de 1 a 5% dos casos de DM (FAJANS et al., 2001). O DM de origem mitocondrial ou DM com surdez de herança materna é caracterizada por ocorrer em indivíduos jovens e sem obesidade. Ocorre devido a uma mutação do DNA mitocondrial interferindo com a produção de energia. Os pacientes usualmente apresentam surdez neurossensorial e distrofia macular; menos frequentemente pode haver miopatia, cardiomiopatia e doença renal (GUILLAUSSEAU et al., 2001).

2.3. Diagnóstico laboratorial do diabetes

A evolução para o DM tipo 2 ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem a denominação de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Tais estágios seriam decorrentes de uma combinação de resistência à ação insulínica e disfunção das células β . Já no DM tipo 1, o início geralmente é abrupto, com sintomas indicando de maneira sólida a presença da enfermidade (ADA, 1997; ENGELGAU et al, 1997). O critério diagnóstico modificado, em 1997, pela ADA, sendo posteriormente aceito pela OMS e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (ADA, 1997; ENGELGAU et al, 1997). As modificações foram realizadas com a finalidade de prevenir de maneira eficaz as complicações micro e macrovasculares do DM (FULLER et al, 1980; DECODE STUDY GROUP, 2001)

Atualmente são três os critérios aceitos e recomendados pela SBD para o diagnóstico de DM:

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual acima de 200mg/dL. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada à qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições (ADA, 1997; ENGELGAU et al., 1997);
- Glicemia de jejum \geq 126mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia (ADA, 1997; ENGELGAU et al., 1997);
- Glicemia de 2 horas pós sobrecarga de 75g de glicose acima de 200mg/dL (ADA, 1997; ENGELGAU et al., 1997);

O teste de tolerância à glicose deve ser efetuado com os cuidados preconizados pela OMS, com colheita para diferenciação de glicemia em jejum e 120 minutos após a ingestão de glicose. É reconhecido um grupo intermediário de indivíduos em que os níveis de glicemia não preenchem os critérios para o diagnóstico de DM. São, entretanto, muito elevados para serem considerados normais (ADA, 1997). Nesses casos foram consideradas as categorias de glicemia

de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, cujos critérios são apresentados na Tabela 2 (SBD, 2006).

No último consenso da ADA publicado em 2010, a hemoglobina glicada (A1C) foi incluída como novo critério diagnóstico para o DM. A A1C apresenta uma excelente aplicabilidade diagnóstica, pois não necessita de jejum ou de qualquer outra preparação do paciente, eliminando eventuais fatores pré-analíticos. No entanto, as sociedades brasileiras de diabetes e de endocrinologia ainda não adotaram este marcador para fins diagnósticos.

Tabela 2. Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos.

Categoria	Jejum*	2h após 75g de glicose	Casual**
Glicemia normal	< 100	<140	
Tolerância à glicose diminuída	>100 a <126	≥140 a <200	
Diabetes mellitus	≥126	≥200	≥ 200 (com sintomas clássicos)***

O jejum é definido como a falta de ingesta calórica por 8 horas; ** glicemia plasmática casual aquela realizada em qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo da última refeição; *** os sintomas clássicos de DM incluem polidipsia, poliúria e perda não-explicada de peso.

Fonte: SBD, 2006.

2.4 Complicações crônicas do diabetes *mellitus*

As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos. As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte (52%) em pacientes com DM tipo 2 (NATHAN et al., 1997). Diversos fatores de risco, passíveis de intervenção, estão associados ao maior comprometimento cardiovascular observado nos pacientes diabéticos. Entre eles estão a presença da nefropatia diabética (ND) e da hipertensão arterial sistêmica (HAS), além destes destacam-se a retinopatia

diabética (RD) e a neuropatia diabética (NRD) como as principais complicações crônicas do DM, as quais são chamadas de complicações microangiopáticas (GROSS & NEHME, 1999).

O comprometimento aterosclerótico das artérias coronarianas dos membros inferiores e das cerebrais é comum nos pacientes com DM tipo 2 e constitui a principal causa de morte nestes. Estas complicações macroangiopáticas podem ocorrer mesmo em estágios precoces do DM e se apresentam de forma mais difusa e grave do que em pessoas sem DM (ADA, 2001).

A frequência das complicações crônicas do DM tipo 2 varia de acordo com a população estudada. Os pacientes com DM tipo 2 têm uma propensão duas a quatro vezes maior de morrer por doença cardíaca em relação a não diabéticos, e quatro vezes mais chance de ter doença vascular periférica (DVP) e acidente vascular cerebral (AVC) (*CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 1998; KANTERS et al., 1999). O DM tipo 2 também é apontado como uma das principais causas de cegueira entre adultos com idade de 20 a 74 anos. Em alguns levantamentos, após 15 anos do diagnóstico de DM Tipo 2, a RD esteve presente em 97% dos usuários de insulina e em 80% dos não usuários (*CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION*, 1996). A prevalência de ND varia de 10% a 40% (MOGENSEN et al., 1983; GABIR et al., 2000) e a de NRD, de 60% a 70% (FRANKLIN et al., 1990).

Entre os fatores envolvidos na etiologia das complicações crônicas do DM do tipo 2, destacam-se a hiperglicemia, a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia e o tabagismo. Além destes, outros fatores de risco não convencionais têm sido descritos: disfunção endotelial, estado pré-trombótico e inflamação (SCHEFFEL et al., 2004)

No Brasil, dados do plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao DM de 2001 apontaram para uma prevalência de 10% na população brasileira acima de 40 anos de idade, onde se estimou mais de 3,6 milhões de usuários do sistema público; quase metade desconhecia este diagnóstico e apenas 2/3 destes indivíduos estão em acompanhamento nas unidades de atenção básica (MS, 2001). Do ponto de vista clínico, é conhecido que a presença de DM confere um aumento no risco de desenvolver eventos circulatórios, sendo que até 80% dos indivíduos com DM vão desenvolver, ou até mesmo morrer, de doença macrovascular (FURTADO & POLANCZYK, 2007).

Dados epidemiológicos brasileiros indicam que as amputações de membros inferiores ocorrem cem vezes mais frequentemente em pacientes com DM (SPILCHLER et al, 1998). Pacientes diabéticos com lesões graves nos pés constituem 51% dos pacientes internados em enfermarias dos serviços de endocrinologia nos Hospitais Universitários, com duração que pode chegar a 90 dias (GROSS & NEHME,1999).

2.4.1 Retinopatia Diabética

A RD acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de cegueira em pacientes entre 25 e 74 anos (AIELLO et al., 1998). A maioria dos casos de cegueira (90%) é relacionada à RD e pode ser evitada através de medidas adequadas, que incluem, além do controle da glicemia e da pressão arterial, a realização do diagnóstico em uma fase inicial e passível de intervenção. Estas medidas diminuem a progressão das alterações retinianas, não revertendo os danos já estabelecidos. Portanto, é imperativo que seja feito o diagnóstico da RD em suas fases iniciais antes que lesões que comprometem a visão tenham ocorrido (GROSS & NEHME et al., 1999).

Estudos epidemiológicos têm revelado a alta incidência de RD e sua associação com o controle glicêmico e da pressão arterial (KLEIN & KLEIN, 2010). Estes também têm descrito a raridade de exames de fundo de olho e tratamento oportuno infrequentes, com fotocoagulação em pacientes com estágios avançados da RD. Dados de estudos epidemiológicos têm mostrado melhorias notáveis no cuidado e tratamento do diabetes associado à diminuição significativa na prevalência e incidência de RD em indivíduos DM tipo 1 nos últimos 30 anos (PAMBIANCO et al., 2006; NATHAN et al., 2009; SUH et al., 2010).

2.4.2 Neuropatia Diabética

A NRD, uma das principais complicações que aparece com o tempo de evolução crônica do DM (PARTANEN et al., 1995), é caracterizada pela degeneração progressiva dos axônios das fibras nervosas. Existem evidências sugerindo que o estresse oxidativo causado pelo aumento da formação de radicais

livres também funciona como mecanismo patogênico importante (LOW et al., 1997). Sua prevalência ainda é incerta, diretamente influenciada pelo critério diagnóstico utilizado, variando de 13% a 47%, em estudos populacionais em pacientes ambulatoriais e de 19% a 50%, em pacientes hospitalizados (SHAW & ZIMMET, 1999).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2006) a NRD é classificada como polineuropatia simétrica e como polineuropatia focal e multifocal. As polineuropatias simétricas são aquelas relativamente estáveis e outras com sintomas episódicos. A mais frequente, é a polineuropatia sensitiva distal, envolvendo as fibras finas; excepcionalmente e tardiamente no curso da doença, a fibra grossa é envolvida. A neuropatia autonômica pode ocorrer de forma isolada ou, mais frequentemente, associada à polineuropatia sensitiva. A neuropatia autonômica diabética cursa com disautonomias cardiovasculares, anormalidades pupilares, geniturinárias, gastrintestinais e alterações da sudorese (SBD, 2006).

2.4.3 Doenças Cardiovasculares

A doença cardiovascular (DCV) é a principal causa de mortalidade para indivíduos com DM e também um importante fator que contribui para a morbidade (MS, 2006). A doença cardíaca em pacientes diabéticos é usualmente atribuída à isquemia miocárdica decorrente de um processo aterosclerótico coronário acelerado e mais extenso. Pacientes diabéticos são mais predispostos a desenvolverem insuficiência cardíaca congestiva, independentemente da presença de hipertensão arterial ou de doença coronariana (GROSS et al, 2007).

O DM tipo 2 é um fator de risco independente para doença macrovascular e coexiste geralmente em condições como hipertensão e dislipidemia. Estudos têm mostrado a eficácia da redução de fatores de risco cardiovascular na prevenção ou no retardo das doenças cardiovasculares. A ênfase deve ser direcionada à redução dos fatores de risco cardiovascular, quando possível, e os clínicos devem estar alertas para os sinais e sintomas da aterosclerose (FURTADO & POLANCZYK, 2007).

Do ponto de vista clínico, é conhecido que a presença de DM confere um aumento no risco de desenvolver eventos circulatórios, sendo que até 80% dos

indivíduos com DM vão desenvolver, ou até mesmo morrer, de doença macrovascular (FURTADO & POLANCZYK, 2007).

2.4.4 Nefropatia Diabética

A nefropatia diabética é definida como um aumento na taxa de excreção urinária de albumina, muitas vezes associada a um aumento da pressão arterial e, normalmente, com RD concomitante, mas sem evidência de outras causas de doença renal. É caracterizada inicialmente por albuminúria e, em seguida, por um progressivo declínio na taxa de filtração glomerular (TFG), resultando finalmente na fase final da doença renal crônica (DRC) (GNUDI & GOLDSMITH, 2010). A ND é uma complicação microvascular séria, principalmente em pacientes com DM que fazem uso de insulina. Apesar de numerosos estudos, a fisiopatologia da doença renal do diabético não é totalmente compreendida (ALLURU et al., 1990). A microalbuminúria é considerada um marcador precoce da ND. A prevenção do aparecimento da microalbuminúria, portanto, pode ser considerado como o principal meio de prevenção da ND (REMUZZI et al., 2006).

A ND nos EUA é a causa mais comum de doença renal em estágio final (HELD et al., 1991), sendo que a incidência ND no país tem aumentado substancialmente nos últimos anos. O avanço da ND é também a principal causa de glomeruloesclerose e de DRC em todo o mundo (MAUER et al., 1984; MAKINO et al., 1996). Entre 20% e 40% dos pacientes com DM desenvolverão nefropatia, embora a razão pela qual nem todos os pacientes com diabetes desenvolvem esta complicação ainda é desconhecida (KOVÁCS, 2009).

A história natural da ND varia de acordo com o tipo de DM e se a microalbuminúria está presente. Sem tratamento, 80% das pessoas que têm DM tipo 1 e microalbuminúria irão progredir para franca nefropatia se não tratadas, enquanto que apenas 20-40% das pessoas com DM tipo 2, ao longo de um período de 15 anos, irão ter a mesma progressão (KOVÁCS, 2009). Como NIELSEN et al. (1997) demonstraram mais de uma década atrás, um indicador claro de progressão da doença é o aumento da pressão arterial sistólica, mesmo dentro da faixa de pré-hipertensos. Entre os pacientes que tem DM tipo 1 com nefropatia e hipertensão, 50% irão progredir para a doença renal em estágio final dentro de uma década (RAILE et al., 2007). A mortalidade entre pacientes de diálise com DM é 22% maior

no primeiro ano após o início da diálise e 15% maior em 5 anos do que entre pacientes de diálise sem diabetes (REMUZZI et al., 2002).

Vários mecanismos contribuem para o desenvolvimento da ND, como a interação da hiperglicêmica com fatores metabólicos, alterações hemodinâmicas e predisposição genética (ZIYADEH, 2004). Os fatores hemodinâmicos e ativação de vários sistemas vasoativos, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona; a resposta a secreção de citocinas, como fator de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), levam a ocorrer mais alterações hemodinâmicas, como aumento da pressão sistêmica e intraglomerular. O comprometimento das vias metabólicas, entre outras características, leva à glicação não enzimática, aumento da atividade da proteína C quinase (PKC), e ao metabolismo anormal da via dos polióis. Os resultados de vários estudos suportam uma associação entre o aumento da secreção de moléculas inflamatórias (como citocinas, os fatores de crescimento e metaloproteinases) e o desenvolvimento da ND (ICHINOSE et al., 2007). O estresse oxidativo também parece desempenhar um papel central (SINGH et al., 2008). Estudos que utilizaram inibidores das vias envolvidas na gênese da ND têm ajudado a esclarecer sobre a patogênese dessa condição; porém, os mesmos não levaram a expansão da terapêutica para deter o processo da doença (RAPTIS & VIBERTI, 2001).

2.4.4.1 Patogênese da nefropatia diabética

Conforme foi discutido na seção anterior, vários mecanismos contribuem para o desenvolvimento da ND, como a interação hiperglicêmica com fatores metabólicos, alterações hemodinâmicas e predisposição genética. Nos últimos 20 anos, três vias principais para o desenvolvimento da ND têm sido identificadas, conforme apresentado na Figura 5.

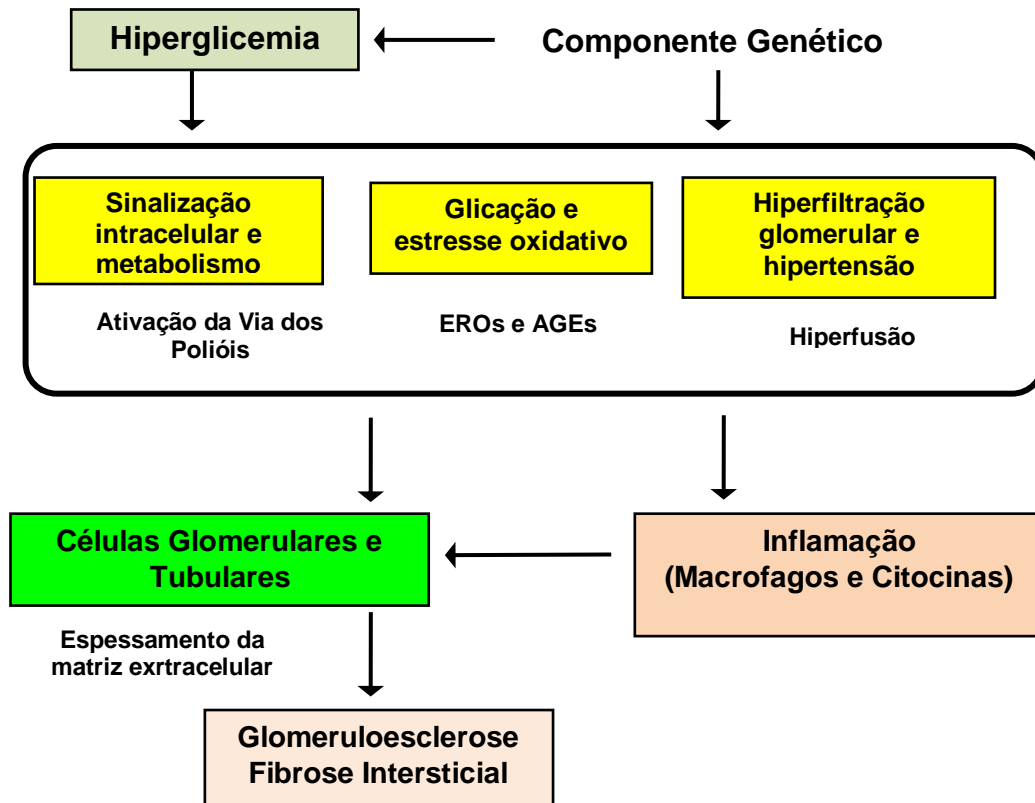


Figura 5. Esquema da patogênese da Nefropatia Diabética (adaptado de WADA & MAKINO, 2009).

A) Ativação das vias do polioli e PKC

Um dos mecanismos propostos pelo qual a hiperglicemia promove o desenvolvimento da ND inclui a ativação da PKC (COOPER, 1998). Especificamente, a ativação dessa enzima leva ao aumento da secreção de prostanóides vasodilatadores, o que contribui para hiperfiltração glomerular. Pela ativação do TGF- β 1, a PKC pode também aumentar produção de matriz extracelular por células mesangiais (YAMAGISHI et al., 2007). O mecanismo pelo qual a hiperglicemia leva à ativação da PKC envolve a indução do estresse oxidativo e de diacilglicerol (KUNISAKI et al., 1994). Ativação da PKC induz a atividade de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) em resposta aos estímulos extracelulares através da dupla fosforilação, são conservados os resíduos de treonina e tirosina. A coativação da PKC e MAPK, na presença de altas concentrações de glicose, indica que estas duas famílias de enzimas estão ligadas (HANEDA et al., 1995). A via dos polióis, ou via da aldolase redutase, está implicada na patogênese da ND. Vários estudos têm mostrado uma diminuição da excreção

urinária de albumina em animais em que foram administrados inibidores da aldose redutase (TILTON et al., 1989), mas nos seres humanos, esses agentes não têm sido amplamente estudados e os resultados são inconclusivos (BAGASHAW et al., 2007).

B) Glicação e estresse oxidativo

A hiperglicemia é um fator crucial para o desenvolvimento da ND devido aos seus efeitos sobre as células glomerulares e mesangiais, mas não pode ser considerada unicamente como fator causal da doença (KOVÁCS, 2009). As células mesangiais são importantes para a manutenção da estrutura capilar glomerular e modulação da filtração glomerular através da atividade do músculo liso. A hiperglicemia está associada a um aumento da proliferação das células mesangiais e hipertrofia, bem como o aumento da produção de matriz e espessamento da membrana basal. Em estudos *in vitro* foi demonstrado que a hiperglicemia está associada com o aumento da produção de matriz da célula mesangial (HARRIS et al., 1991; HEILIG et al., 1995) e apoptose das células mesangiais (MISHRA et al., 2005; LIN et al., 2006). A expansão da célula mesangial parece ser mediada em parte por um aumento da concentração da glicose celular, uma vez que mudanças semelhantes na função mesangial podem ser induzidas em um meio normal de glicose por superexpressão de transportadores de glicose, como GLUT1 e GLUT4, aumentando assim a entrada de glicose nas células (HEILIG et al., 1995).

A glicação de proteínas do tecido contribui para o desenvolvimento do DM e da nefropatia, além de outras complicações microvasculares. Na hiperglicemia crônica, o excesso de glicose, combinado com os aminoácidos livres na circulação ou proteínas teciduais, este processo não enzimático atinge a membrana basal glomerular e outros componentes da matriz do glomérulo e levando à formação de precursores reversíveis dos produtos finais da glicação e, depois, a produtos finais da glicação avançada (AGES), que são irreversíveis (KOVÁCS, 2009). Estes produtos avançados podem estar envolvidos na patogênese da ND, alterando a transdução do sinal através da alteração no nível dos sinais solúveis, como citocinas, hormônios e radicais livres. Os níveis circulantes de AGES estão elevados em pessoas com DM, particularmente aqueles com insuficiência renal (MAKITA et

al., 1991). Dessa forma ocorre o acúmulo de AGES nos tecidos (em parte pela ligação com o colágeno), que contribui para a associação de complicações renais e microvasculares (SINGH et al., 1998). Além disso, os AGES interagem com os seus receptores, e as concentrações de óxido nítrico são reduzidas de forma dose-dependente (HOGAN et al., 1992).

Geralmente, a atividade metabólica dentro do néfron produz uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS) que são contrabalançadas por um grande número de enzimas antioxidantes e sistemas de eliminação de radicais livres (KOVÁCS, 2009). Os EROS fazem o intermédio de muitos efeitos negativos biológicos, incluindo a peroxidação dos lipídios da membrana celular, oxidação de proteínas, vasoconstrição renal e danos ao DNA. Infelizmente, a hiperglicemia inclina a balança para a produção de EROS, a maioria dos quais parecem ser geradas na mitocôndria (NISHIKAWA et al., 2007). O metabolismo da glicose através de vias alternativas prejudiciais, como a via da ativação da PKC e da formação dos AGES, parece também depender em parte dos EROS (VASAVADA & AGARWAL, 2005; NISHIKAWA et al., 2007). A hiperglicemia induz especificamente o estresse oxidativo, mesmo antes do DM se tornar clinicamente aparente. As concentrações de marcadores de dano ao DNA induzido pelos EROS são maiores em pacientes com nefropatia mais grave. Além disso, a análise histológica da biópsia do rim humano detectou amostras de produtos de glico-oxidação (produtos combinados da glicação e oxidação protéica) e lipoxidação na matriz mesangial e glomérulos, sendo estas lesões muito menos comuns em amostras de indivíduos sem DM (SUZUKI et al., 1999; VASAVADA & ARGAWAL, 2005).

C) Hipertensão arterial sistêmica e hiperfiltração glomerular

Os primeiros sinais de hiperperfusão e hiperfiltração glomerular são resultado da menor resistência nas arteríolas aferentes e eferentes dos glomérulos. A arteríola aferente parece ter uma maior diminuição da resistência do que a eferente. Muitos fatores têm sido relatados por estarem associados a este defeito de auto-regulação, incluindo prostanóides, óxido nítrico, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), TGF- β 1, e o sistema-renina-angiotensina (especificamente da angiotensina II). Essas alterações hemodinâmicas iniciais facilitam a perda de albumina através dos capilares glomerulares, ocorrendo simultaneamente a

superprodução de matriz das células mesangiais, bem como o espessamento da membrana basal glomerular e lesão dos podócitos (ZIYADEH & WOLF, 2008). As alterações hemodinâmicas renais são mediadas, em parte, pela ação de hormônios vasoativos, como a angiotensina II e endotelina (BAGASHAW et al, 2007).

A hipertensão e hiperfiltração glomerular contribuem para o desenvolvimento da ND, pois o uso de bloqueadores do sistema-renina-angiotensina preservam a função renal e a sua morfologia. O bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona antagoniza os efeitos pró-fibroticos da angiotensina II, reduzindo a estimulação do TGF- β 1 (HILGERS & VEELKEN, 2005). Um bloqueio transitório por sete semanas do sistema-renina-angiotensina em ratos pré-diabéticos reduziu a proteinúria e houve uma melhora da estrutura glomerular (NAGAI et al., 2005). Além disso, a administração de um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) para pacientes com DM tipo 1 e nefropatia, diminuiu as concentrações séricas de TGF- β 1 (SHARMA et al., 1999).

A ativação de citocinas, elementos pró-fibroticos, inflamação e fatores de crescimento vascular, como VEGF-A, poderiam estar envolvidos no acúmulo da matriz que surge na ND (SHARMA & ZIYADEH, 1995; HOHENSTEIN et al., 2006). Apesar de algumas evidências sugerirem que o VEGF-A aumenta a permeabilidade da barreira de filtração glomerular às proteínas (CHEN et al., 2007), os níveis deste fator de crescimento pode ser baixo em pacientes com ND. Assim, o papel da VEGF-A na fisiopatologia da nefropatia é obscuro.

A hiperglicemia parece estimular a expressão do VEGF-A e, portanto, atua como um mediador de lesão endotelial no DM em humanos (DE VRIESE et al., 2001; HOHENSTEIN et al., 2006). Estudos mostraram inicialmente que, em pacientes com ND, o grau de neovascularização foi aumentado e associado com a expressão de VEGF-A e angiopoetina (TSILIBARY, 2003; KANESAKI et al., 2005). Mais tarde achados, no entanto, mostraram que os níveis de RNA mensageiro do VEGF-A foram realmente diminuídos em pacientes com ND (BAELDE et al., 2007). Evidências apontam um papel patogênico para VEGF-A na ND através da observação de que o bloqueio do VEGF-A melhora albuminúria em um modelo experimental da doença (SHARMA & ZIYADEH, 1995; DE VRIESE et al., 2001).

Estudos em animais que utilizaram um anticorpo neutralizante de VEGF-A têm demonstrado o envolvimento deste fator de crescimento na hipertrofia glomerular e acúmulo na matriz mesangial (DE VRIESE et al., 2001; FLYVBJERG et

al., 2002). Altos níveis de glicose, TGF- β 1 e angiotensina II estimulam a expressão de VEGF-A, o que leva à síntese do óxido nítrico endotelial. Esta ação promove a vasodilatação e hiperfiltração, que são os processos iniciais da ND. O VEGF-A também estimula a produção da cadeia α do colágeno IV, um importante componente da membrana basal glomerular. Evidências indiretas sugerem que este aumento da produção da cadeia de colágeno contribui para o espessamento da membrana basal glomerular observada na ND. Em estudos com animais, a administração de um anticorpo VEGF-A levou a diminuição da excreção de albumina urinária quando os diabéticos não tratados foram comparados aos controles (CHEN et al., 2007).

As citocinas inflamatórias também contribuem para o desenvolvimento e progressão da ND, especialmente a interleucina (IL) 1, IL-6, IL-18 e do fator de necrose tumoral. As concentrações de todas estas citocinas estavam aumentadas em modelos de ND e parecem afetar a doença através de vários mecanismos. Além disso, níveis séricos elevados de várias dessas citocinas se correlacionam com a progressão da nefropatia, evidenciada pelo aumento da excreção de albumina urinária (NAVARRO-GONZALEZ & MORA-FERNANDEZ, 2008).

D) Susceptibilidade genética

O genótipo parece ser um determinante importante da incidência e severidade da ND (COOPER, 1998; ADLER, 2004; ICHINOSE et al., 2007). O aumento do risco não pode ser explicado pela duração do DM, hipertensão ou do grau de controle glicêmico. Os fatores ambientais e genéticos devem, portanto, ter um papel na patogênese da ND. Em pacientes com DM tipo 1 ou DM tipo 2, a probabilidade de desenvolvimento de ND é significativamente maior para aqueles que têm um irmão ou pai com ND (PETITT et al., 1990; TREVISAN & VIBERTI, 1995). Um estudo avaliou famílias de índios Pima por duas gerações sucessivas com DM tipo 2 (TREVISAN & VIBERTI, 1995). A probabilidade da proteinúria evidente na prole em desenvolvimento foi de 14% se nenhum dos pais tinha proteinúria, 23% se um dos pais tinha proteinúria e de 46% se ambos os pais tinham proteinúria (BAGASHAW et al, 2007).

Os maiores riscos parecem estar associados com os genes que codificam a enzima angiotensina, receptor de angiotensina II, citocinas, proteínas envolvidas no

metabolismo da glicose ou lipídios e proteínas da matriz extracelular (KOVÁCS, 2009). O gene da ECA e seu polimorfismo tem sido explorado em vários estudos. Em pacientes com DM tipo 2, o polimorfismo DD do gene da ECA tem sido associado com um risco aumentado de desenvolvimento de ND, proteinúria grave, insuficiência renal progressiva e de mortalidade durante a diálise (KUNZ et al., 1998; MOVVA et al., 2007). Além disso, uma análise de mais de 1000 pacientes brancos com DM tipo 1 demonstraram uma forte correlação entre a variação genética no gene da ECA e o desenvolvimento da nefropatia (BORIGHT et al., 2005).

E) Outros fatores envolvidos

Pequenos lipídios derivados do ácido araquidônico têm sido implicados na patogênese da ND. A ciclo-oxigenase-2 decompõe o ácido araquidônico em vários prostanóides diferentes. Em um modelo com ratos, a DM induzida por estreptozotocina, os níveis de prostanóides inflamatórios, como prostaglandinas E₂ e I₂, foram aumentados (IMIG, 2006). Além disso, o aumento da expressão de ciclo-oxigenase-2 tem sido relatada em estudos de animais com DM e na mácula densa dos rins de pessoas com DM (POPE et al., 1993). Em ratos diabéticos, a inibição da ciclo-oxigenase-2 está associada com a diminuição da hiperfiltração (HAO & BREYER, 2007). Uma caracterização mais detalhada de como a produção de prostanóides afeta a patogênese da ND é necessária. O ácido araquidônico também pode ser oxidado pelo lipoxigenases (HAO & BREYER, 2007 II). A prova é a acumulação de que alguns dos produtos derivados das ações de lipoxigenases contribuem para a ND. Especificamente, os níveis de lipoxigenases estão aumentadas em animais diabéticos. Além disso, aumentar os níveis de glicose eleva a expressão das lipoxigenases em cultura de células mesangiais. Este caminho tem um papel fundamental de mediação nos processos críticos de hipertrofia da célula mesangial e acúmulo de matriz extracelular mediada por TGF-β1 e angiotensina II (HAO & BREYER, 2007 II).

2.4.4.2 Diagnóstico da Nefropatia Diabética

Segundo o Consenso de 2010 da ADA, basicamente a triagem dos pacientes diabéticos para detecção da ND deve ser realizada da seguinte maneira:

- Realizar um teste anual para avaliar a excreção de albumina na urina (valores preconizados encontram-se na tabela 3) em pacientes com DM tipo 1, com duração de DM maior que 5 anos, e em todos os pacientes com DM tipo 2 a partir do momento do diagnóstico;
- Medida da creatinina sérica, pelo menos, uma vez por ano em todos os adultos com DM, independentemente do grau da excreção de albumina na urina. A creatinina sérica deve ser usada para estimar a TFG e a fase da doença renal crônica (DRC), se esta estiver presente.

Tabela 3. Definição das anormalidades na excreção urinária de albumina

Categoria	Amostra de urina (mg/g creatinina)
Normoalbuminúria	< 30
Microalbuminúria	30 – 299
Macroalbuminúria	≥ 300

Fonte: ADA, 2010.

A investigação da ND deve ser iniciada no momento do diagnóstico em pacientes com DM tipo 2 (ADA, 2004), uma vez que aproximadamente 7% deles já têm microalbuminúria nesse momento (ADLER, 2003). Para os pacientes com DM tipo 1, a primeira triagem tem sido recomendada 5 anos após o diagnóstico (ADA, 2004), no entanto, a prevalência de microalbuminúria neste grupo antes do período recomendado pode chegar a 18%, principalmente em pacientes com pior controle glicêmico e lipídico e com HAS (STEPHENSON & FULLER, 1994). Se a microalbuminúria está ausente, esta análise deve ser repetida anualmente tanto para os pacientes com DM tipo 1 e tipo 2 (ADA, 2004).

O primeiro passo para o rastreamento diagnóstico da ND é a medida da albumina em uma amostra de urina, coletada tanto como a primeira urina da manhã ou ao acaso, a classificação de acordo com os valores da excreção de albumina na urina estão descritos na tabela 3. Este método é preciso, fácil de executar e

recomendado pela ADA (2004). A urina de vinte e quatro horas (mais comumente utilizada) e outras com tempo marcado são coletas complexas e propensas a erros relacionados à coleta de amostras ou marcação do tempo (GROSS et al., 2005). A investigação diagnóstica não deve ser realizada na presença de condições que aumentam a excreção urinária de albumina como: infecção do trato urinário, hematúria, doença febril aguda, exercício vigoroso, hiperglicemia acentuada transitória, hipertensão não controlada e insuficiência cardíaca (MOGENSEN et al, 1995).

As técnicas de imunoenaios são rotineiramente utilizadas para a determinação da albumina urinária, pois estas apresentam adequada sensibilidade para a detecção e diagnóstico da ND, no entanto estes métodos detectam apenas a fração imunoreativa da albumina, o que em algumas situações poderia apresentar resultados subestimados (OSICKA & COMPER, 2004). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) detecta a albumina total na amostra de urina, detectando a fração imunoreativa e a fração não imunoreativa e pode permitir a detecção precoce da ND incipiente (GROSS et al., 2005). Embora a mensuração dos níveis de excreção urinária de albumina seja considerado padrão-ouro para o diagnóstico da ND, existem alguns pacientes com DM tipo 1 ou tipo 2 que apresentam diminuição da TFG na presença de níveis normais de albumina urinária (MACISSAC et al., 2004). Com isso, existem evidências de que a utilização de outros marcadores, incluindo as proteínas tubulares, pode contribuir para a detecção precoce do dano renal (HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; BAGASHAW et al., 2007; LISOWSKA-MYJAK, 2010).

2.6 Proteínas tubulares

Os marcadores urinários característicos de lesão tubular são essencialmente compostos de enzimas urinárias (enzimúria) e proteínas plasmáticas de baixo peso molecular (PBM) que normalmente são filtradas pelo glomérulo. A sua excreção aumentada na urina resulta da reabsorção deficiente de proteínas do plasma pelas células tubulares, ou do aumento da secreção de enzimas urinárias por células

epiteliais tubulares, ambos levando à proteinúria tubular (FLYNN et al., 1990; HONG et al., 1998; BARRAT & TOPHAM, 2007).

Dois mecanismos principais são responsáveis por este aumento patológico da enzimúria ou microproteinúria. A lesão aguda ou crônica das células tubulares induz a perda no lúmen tubular de enzimas ou micro proteínas fisiologicamente presentes nessas células. A excreção da enzima na urina aumenta devido à liberação a partir das células danificadas ou que estão se regenerando (em que a indução da enzima esta intensificada) (BURCHARDT et al., 1992). As PBM, que em condições fisiológicas são livremente filtradas através da parede do capilar glomerular e quase completamente reabsorvidas pelas células tubulares proximais, são excretadas em quantidade aumentada na urina. Isso ocorre quando há uma reabsorção reduzida por essas células, decorrentes de um aumento da carga reabsortiva (aumento da passagem transglomerular de proteínas que alcançam o lúmen tubular), ou de danos funcionais ou estruturais (efeitos tóxicos de substâncias alcançam o lúmen tubular) (BURTON & WALLS, 1994, REMUZZI et al., 1997).

Na verdade, as proteínas com peso molecular inferior a 40 kDa são livremente filtradas através da membrana glomerular (BARRAT & TOPHAM, 2007), sendo que algumas delas como a proteína ligadora de retinol (RBP), a α_1 -microglobulina (A1MG) e a β_2 -microglobulina (B2MG) têm sido utilizadas para o diagnóstico e acompanhamento de dano tubular em várias doenças renais (FLYNN et al., 1990; BARRAT & TOPHAM, 2007).

Da mesma forma, as enzimas na urina são marcadores altamente sensíveis de lesão tubular renal. Algumas das proteínas e enzimas tubulares melhores caracterizadas para a detecção da lesão tubular proximal são: A1MG e B2MG, cistatina C, RBP, glutathione-S-transferase (GST), gama-glutamyltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), lactato desidrogenase (LD) e N- β -acetil-glucosaminidase (NAG) (HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; BAGASHAW et al., 2007). Devido ao seu alto peso molecular, as enzimas não são filtradas através do glomérulo, sendo originadas das células tubulares renais e excretadas na urina (HONG et al., 1998; BASTURK et al., 2006). Desta forma, muito destes marcadores apresentam potencial para a detecção de dano tubular em pacientes com disfunção renal. Outros marcadores de proteinúria tubular são descritos na Tabela 4.

É proposto que as células tubulointersticiais desempenham um papel importante na progressão da insuficiência renal, independentemente da etiologia

subjacente (NATH, 1992). A proteinúria tubular e enzimúria, marcadores de disfunção tubular, têm sido relatados em pacientes com diferentes formas de doenças renais (WOLF et al., 1990; CATALNO et al., 1993). Parece haver uma íntima relação entre proteinúria e enzimúria tubular. Em pacientes com ND incipiente o dano tubular parece preceder a proteinúria glomerular, sugerindo seu papel numa fase inicial da doença diabética (PINTER & ATKINS, 1990; YAQOOB et al., 1993).

Atualmente vários métodos automatizados estão disponíveis para determinar as enzimas urinárias e PBM. A determinação das proteínas é realizada por métodos imunonefelométricos ou por ensaios imunoenzimáticos. A medida da atividade das enzimas é realizada por métodos enzimáticos utilizando diferentes substratos para cada enzima, sendo a variação da absorbância dos produtos da hidrólise é medida espectrofotometricamente (D'AMICO & BAZZI, 2003).

Tabela 4. Principais biomarcadores para doença renal e a respectiva região do néfron envolvida.

Biomarcador	Segmento do néfron envolvido
B2MG	Túbulo proximal
RBP	Túbulo proximal
A1MG	Túbulo proximal
Albumina	Glomerular
Transferrina	Glomerular
Imunoglobulinas	Glomerular
NGAL	Túbulo proximal
AAP	Túbulo proximal
GGT	Túbulo proximal
FAL	Túbulo proximal
LD	Túbulo proximal
Catepsina B	Túbulo proximal
NAG	Túbulo proximal > Túbulo distal
Calicreína	Túbulo distal
Glicoproteína de Tamm-Horsfall	Túbulo distal

Fonte: HAN & BONVENTRE, 2004

2.6.1 Proteínas de baixo peso molecular

As PBM (com peso molecular menor que 40 kDa) são produzidas pela maioria das células do organismo e são excretadas na corrente sanguínea, sofrendo livre filtração na urina primária, e reabsorção completa nas células tubulares proximais. As maiores concentrações dessas proteínas urinárias (proteinúria tubular) pode ser um indicador prático da sobrecarga das células tubulares ou de lesão e disfunção. As PBM que têm sido utilizadas para detecção de lesões dos túbulos proximais são: A1MG, B2MG, RBP e cistatina C (UCHIDA & GOTOH, 2002; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; TROF et al., 2006; BONVENTRE, 2007). No entanto, entre as PBM, principalmente a A1MG e B2MG têm sido usadas como marcadores de disfunção das células tubulares (D'AMICO & BAZZI, 2003).

2.6.2 Enzimúria Tubular

A detecção de proteínas (particularmente enzimas) liberadas a partir de células tubulares danificadas têm sido útil no estudo da lesão aguda e da insuficiência renal crônica em uma variedade de situações clínicas e experimentais (SCHERBERICH, 1990; CHEW et al., 1993). Além da informação do local segmentar da lesão, a origem ultra-estrutural protéica da enzima (citoplasmática, lisossomal ou membranosa) fornece informações sobre a natureza e extensão da lesão celular (YAQOOB et al., 1994).

Muitas enzimas foram estudadas até o final da década de 90, sendo consideradas potenciais marcadores de dano necrótico nas células tubulares ou de sua disfunção reversível. Três grandes locais de liberação das enzimas foram identificados: os lisossomos, as bordas em escova da membrana e o citoplasma das células. A NAG é o exemplo típico de uma enzima lisossômica encontrada predominantemente nos túbulos proximais. A FAL, GGT e a AAP são enzimas das bordas em escova dos túbulos renais. A α e π -GST são isômeros citosólicos das enzimas, encontradas nas células tubulares proximais e distais, respectivamente (GROENEVELD et al., 1991; BRIVET et al., 1996; LIEBERTHAL & NYGAM, 1998).

O aumento da excreção da NAG, uma enzima lisossomal encontrada predominantemente nos túbulos proximais (PRICE, 1992), tem sido relatada em uma grande variedade de condições tais como a toxicidade ao metotrexate (WILAND et

al., 1997) e toxicidade induzida por contraste (HARTMANN et al., 1985). O aumento da atividade desta enzima sugere lesão de células tubulares, mas o aumento das concentrações também pode indicar um aumento da atividade lisossomal sem rompimento celular (GUDER & HOFMAN, 1992; WESTHUYZEN et al., 1996).

No entanto, a maioria das enzimas na urina é proveniente das bordas em escova das células dos túbulos proximais como a FAL, GGT e a AAP (SCHERBERICH, 1990; CHEW et al., 1993). O aumento da excreção destas proteínas implica em lesão na membrana da borda em escova com perda de estrutura das microvilosidades. A perda de uma significativa fração da área de superfície dos microvilos também leva à reabsorção reduzida e aumento da excreção das proteínas filtradas como a B2MG e RBP (GUDER & HOFMAN, 1992).

A excreção de albumina aumentada na urina é um dos primeiros indicadores firmemente associado ao desenvolvimento recente da ND (BURCHARDT et al., 1992; REMUZZI et al., 1997). Ela precede o aparecimento da "proteinúria clínica" ou de valores elevados de creatinina sérica (REMUZZI et al., 1997). Alguns estudos também mostraram enzimas urinárias aumentadas e PBM na urina de pacientes que sofrem de ND. A gravidade da enzimúria se correlaciona com a extensão do dano tubular. No DM tipo 1 e tipo 2, a excreção patológica das enzimas tubulares pode ser encontrada antes do aparecimento de microalbuminúria, e parece ser devido a um efeito direto da hiperglicemia sobre a função das células tubulares (D'AMICO & BAZZI, 2003). A excreção aumentada de albumina na urina reflete alterações na membrana basal glomerular, ao passo que o aumento da excreção de enzimas urinárias, ou de proteínas de baixo peso molecular, supostamente indica disfunção tubular (JUNG et al., 1988).

2.6.3. Principais enzimas urinárias

N-acetil- β -D-glicosaminidase

A NAG é uma enzima lisossomal presente em altas concentrações nas células tubulares proximais renais. Seu peso molecular de 140 kDa não permite filtração glomerular, assim a atividade urinária aumentada da NAG é um dos indicadores mais sensíveis de doença renal (KUNIN et al., 1978). Ela reflete predominantemente lesões tubulointersticiais renais, incluindo as causadas por aminoglicosídeos e outras drogas nefrotóxicas (RING et al., 1998).

As primeiras tentativas de utilização da NAG como um marcador de lesão renal falharam devido a sua aparente alta sensibilidade (TOLKOFF-RUBIN et al., 1988). No entanto, a excreção urinária aumentada da NAG foi relatada na doença renal aguda, de etiologia diversa, induzida por agentes tóxicos, após uma cirurgia cardíaca e após o transplante renal (BERNARD et al., 1987; DONADIO et al., 1998; BOLDT et al., 2003; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004).

A NAG é uma enzima envolvida no metabolismo de carboidratos. Um aumento significativo na excreção urinária da NAG foi observado em pacientes com DM tipo 2 em comparação com indivíduos saudáveis (TANAKA et al., 1989; CHEUNG et al., 1990; USLU et al., 2005; PIWOWAR et al., 2006; KALANSOORIYA et al., 2007), em até 90% dos casos de DM (KOH et al., 1993). HONG et al. (2000) relataram um significativo aumento na excreção da NAG para pacientes com DM tipo 2 que possuíam concomitante doença micro e macro-vasculares em comparação com aqueles sem complicações. A excreção urinária da NAG foi efetivamente associada com complicações cardiovasculares na população de DM tipo 2 (YOSHIKAWA et al., 2007), e foi dado comparável valor prognóstico a excreção urinária de albumina em prever o desenvolvimento de graves doença macrovascular (WEITGASSER et al., 1999).

Glutathione-S-transferases

São enzimas citosólicas, solúveis e presentes nas células do túbulo proximal (subtipo α , 51 kDa) e túbulos distais (subtipo π , 47 kDa). A sua presença na urina foi medida em diferentes formas de lesão renal. Em pacientes com transplante renal, os níveis urinários de π -GST foram significativamente elevados em indivíduos com rejeição aguda, enquanto α -GST urinária estava aumentado naqueles com toxicidade a ciclosporina A (SUNDBERG et al., 1994).

Os pacientes transplantados com necrose tubular aguda e infarto renal tinham níveis elevados de ambas isoformas. Níveis de GST urinária foram relatados na detecção precoce da lesão renal, porque eles aumentam 1-2 dias antes da concentração de creatinina sérica aumentar. Em pacientes com doença glomerular, a excreção urinária de ambas isoenzimas da GST estava aumentada, independente dos níveis sanguíneos destas isoenzimas (BRANTEN et al., 2000). Assim, a

detecção dos níveis urinários da GST pode ser útil na detecção e diferenciação entre os diferentes tipos de lesão renal aguda (HAN & BONVENTRE, 2004).

O aumento na excreção urinária de π -GST e α -GST, reflete o comprometimento de diferentes segmentos do túbulo renal. Em pacientes graves com doença renal aguda, a alta sensibilidade e especificidade da GST têm sido demonstradas. Eles são preditores desfavoráveis do desenvolvimento da IRA exigindo terapia de substituição renal. A determinação da GST requer correto armazenamento das amostras da urina, além de agentes de estabilização da atividade enzimática (BRANTEN et al., 2000; WESTHUYZEN et al., 2003; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; TROF et al., 2006).

A atividade enzimática na urina da GST é determinada na rotina, por métodos laboratoriais de baixo custo e amplamente disponíveis, com a utilização de substratos específicos para cada enzima, enquanto que as variações da absorvância, dos produtos da hidrólise, é medida espectrofotometricamente (BRANTEN et al., 2000; WESTHUYZEN et al., 2003; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; TROF et al., 2006). No entanto, a medida separada das isoformas da GST na urina requer o uso de técnicas de ELISA, o que torna a sua utilização pouco frequente na rotina diagnóstica (LISOWSKA-MYJAK, 2010).

Alanina Aminopeptidase

A Ala-(Leu-Gly)-aminopeptidase é uma enzima presente nas bordas em escova dos túbulos renais (WESTHUYZEN et al., 2003; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004), a excreção urinária aumentada dessa enzima implica em lesão tubular (TROF et al, 2006). Segundo o estudo de CHEUNG et al. (1990), foram verificados níveis elevados de AAP na urina de pacientes com DM tipo 2 comparados com os controles. Em um estudo posterior, a diferença não foi, contudo, significativa entre normoalbuminúricos e controles, mas surgiu como importante entre pacientes com nefropatia e normoalbuminúricos do grupo controle (KALANSOORIYA et al., 2007). Farvid et al. (2007) confirmou um aumento significativo dos níveis urinários de AAP entre pacientes normo e microalbuminúricos. Tal como acontece com a NAG, a excreção de AAP pode ser útil para detectar a disfunção tubular no DM tipo 2 na fase precoce da doença.

Fosfatase Alcalina

A fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1; ortofosfórico-monoéster fosfohidrolase) catalisa a hidrólise alcalina de uma grande variedade de substratos de ocorrência natural e sintéticos. Ocorre amplamente na natureza, é encontrada em muitos organismos, desde bactérias até o homem (McCOMB, 1979). É uma glicoproteína dimérica e dependente de zinco, que cliva a ligação fosfato de ésteres monofosfatos (CATHALA et al., 1975). Com poucas exceções, as isoenzimas da FAL são homodiméricas e cada sítio catalítico contém três íons metálicos, ou seja, dois de Zn^{2+} e um de Mg^{2+} , necessários para a atividade enzimática (MILLÁN, 2006). O peso molecular varia de acordo com o tecido de origem da enzima e oscila entre 70 e 120 kDa (KAPLAN et al., 2003). Os íons divalentes, como Mn^{2+} , Co^{2+} e Mg^{2+} são ativadores da enzima; o Zn^{2+} é o íon metálico constituinte (LE DU & MILLÁN, 2002).

A FAL está presente na maioria dos órgãos e está especialmente associada a membranas de superfícies celulares localizadas na mucosa do intestino delgado e nos túbulos contorcidos proximais do rim (principalmente nas bordas em escova das células epiteliais), no osso (osteoblastos), no fígado e na placenta (ARAGON & YOUNOSSI, 2010). Embora a função exata metabólica da enzima não esteja compreendida, parece que a FAL está associada com o transporte de lipídios do intestino e com o processo de calcificação óssea (GARNERO & DELMAS, 1993).

A FAL existe em múltiplas formas, algumas das quais são isoenzimas verdadeiras, codificadas em *loci* separados (BURTIS et al., 2008). As formas da FAL do osso, do fígado e do rim compartilham uma estrutura primária comum codificada pelo mesmo locus gênico, mas diferem no conteúdo de carboidratos (FISHMAN, 1990). As elevações da FAL sérica se originam geralmente no fígado e nos ossos. Conseqüentemente, as dosagens séricas de FAL são de particular interesse na investigação da doença hepatobiliar e na doença óssea associada à atividade osteoblástica aumentada (LIEBERMAN & PHILLIPS, 1990).

A excreção urinária aumentada resulta em deficiente reabsorção de proteínas do plasma pelas células tubulares, ou do aumento da secreção de enzimas urinárias por células tubulares epiteliais, ambas levando à proteinúria tubular (FLYNN, 1990; HONG et al. 1998; BARRAT & TOPHAM, 2007). Da mesma forma, enzimas na urina são marcadores altamente sensíveis do dano tubular na função renal, os mais amplamente utilizados são NAG, AAP (FLYNN, 1990), GGT, FAL e LD (MORITA et al., 1991, YAQOUB et al., 1995, BAGASHAW et al., 2007). Segundo FLANDROIS et

al. (1986), as enzimas e proteínas presentes no ultrafiltrado renal são aquelas que têm peso molecular menor que 70 KDa, que são totalmente reabsorvidas pelas células epiteliais tubulares, assim a presença de enzimas como FAL, que tem peso molecular maior que 70 KDa, têm sua origem relacionada com patologias renais tubulares e uma menos provável interferência da FAL plasmática, salvo os casos de extensa lesão glomerular.

As enzimas, que participam do metabolismo energético, como a FAL, são mais precoces para detecção da lesão tubular, aparecendo mesmo antes da microalbuminúria (JUNG et al., 1988; USLU et al., 2005). A excreção de FAL na urina foi encontrada no mesmo dia ou no dia seguinte à administração intra-arterial de contraste em pacientes após arteriografia renal. Também apresentou atividade urinária aumentada em pacientes submetidos a transplante de rim, com a rejeição aguda e necrose tubular aguda (HARTMANN et al., 1985; SARVARY et al., 1996).

MORITA et al. (1991) concluíram que a excreção de FAL na urina de pacientes com ND ocorre devido ao dano nas células epiteliais das bordas em escova dos túbulos proximais do rim. JUNG et al. (1988) relataram que as alterações estruturais características são encontradas nos rins de pacientes diabéticos, tanto na membrana basal glomerular como nas células tubulares renais. Por conseguinte, as funções glomerulares e tubulares podem refletir essas alterações metabólicas e estruturais nos estágios iniciais da ND. Assim, avaliaram-se alguns analitos que tem o seu comportamento alterado no caso da excreção glomerular (proteína total e albumina) e disfunção tubular (enzimas e PBM). Dentre as enzimas estudadas, a FAL apresentou aumento da atividade urinária em pacientes com ND, provavelmente porque as células tubulares foram danificadas, liberando assim a enzima no ultrafiltrado e, portanto, aumentando a atividade enzimática na urina (JUNG et al., 1988).

Gama-glutamyltransferase

A GGT é uma peptidase, que é um tipo de enzima que catalisa a clivagem hidrolítica de peptídeos para formar aminoácidos ou peptídeos menores. Ela faz parte de um grupo amplo de enzimas de especificidade variada (ROSALKI, 1975; GOLDBERG, 1980). Algumas enzimas individuais agem como transferases de aminoácidos e catalisam a transferência de um aminoácido de um peptídeo para outro peptídeo ou aminoácido (LIEBERMAN et al., 1995; TANIGUCHI & IKEDA,

1998). A GGT (EC 2.3.2.2) catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil de peptídeos e compostos para um receptor (KAPLAN et al., 2003; BURTIS et al., 2008). O peso molecular da GGT é em torno de 90 kDa, mas algumas isoenzimas podem ter o peso de até 200 kDa (KAPLAN et al., 2003). A GGT está presente (em ordem de abundância crescente): no túbulo renal proximal, no fígado, no pâncreas e no intestino (ZHANG et al., 1997; BURTIS et al., 2008). A enzima está presente no citoplasma (microsomas), mas a maior fração está localizada na membrana celular e pode transportar aminoácidos e peptídeos para células através da membrana celular na forma de γ -glutamilpeptídeos (GROSTAD & HUSEBY, 1990).

Mesmo o tecido renal tendo a maior concentração de GGT, a enzima presente no soro é originada primariamente do sistema hepatobiliar. É um indicador sensível de doença hepatobiliar, estando aumentada em indivíduos com doença hepática independente da causa. Sua utilidade clínica é limitada pela sua falta de especificidade (BURTIS et al., 2008). Assim como a FAL, ela é mais alta nos casos de obstrução biliar intra e pós hepática, alcançando cerca de 5 a 30 vezes o limite de referência superior. Aumentos da sua atividade sérica são observados em pacientes com neoplasmas hepáticos primários ou metastáticos, hepatite infecciosa, pancreatite aguda ou crônica e malignidades pancreáticas (SELINGER et al., 1982). A atividade está aumentada em amostras de pacientes com hepatite alcoólica ou de etilistas graves. A enzima também pode ter sua atividade induzida por drogas e álcool por seus efeitos nas estruturas microsomais das células hepáticas (OHNHAUS et al., 1983).

A GGT na urina tem sua origem a partir da superfície de células epiteliais da membrana das bordas em escova no lúmen do túbulo proximal, por isso, segundo AMBADE et al. (2006), é um excelente marcador de dano tubular podendo ser considerada um marcador sensível para detectar precocemente a ND. A GGT é um específico e sensível indicador de dano celular (BASTURK et al., 2006; PANCHENKO et al., 1994). A excreção de GGT aumentada na urina reflete o dano da membrana da borda em escova, com perda das microvilosidades (LISOWSKA-MYJAK, 2010).

CHEW et al (1993) verificaram os níveis urinários da GGT em um pequeno grupo de pacientes, de uma unidade de terapia intensiva, onde os níveis foram significativamente maiores naqueles que desenvolveram insuficiência renal aguda. A

GGT urinária teve um excelente desempenho para predizer IRA, sendo superior neste sentido a creatinina sérica e ao cálculo da depuração da creatinina endógena. HERGET-ROSENTHAL (2003) avaliaram se os padrões de PBM e excreção urinária de GGT seriam capazes de predizer a necessidade de suporte renal em pacientes com necrose tubular aguda. Apesar da enzima ter apresentado um bom desempenho na avaliação do dano tubular, não teve a mesma capacidade de prever precocemente a necessidade de suporte renal.

O valor diagnóstico da GGT foi confirmado em doenças glomerulares e lesões renais crônicas causadas por drogas e metais pesados (JUNG & MATTENHEIMER, 1992). A GGT é um marcador de lesão tubular proximal, conforme indicam alguns estudos prospectivos (KWON et al., 2003; WESTHUYZEN et al., 2003). A atividade urinária aumentada da GGT foi observada em pacientes com DM sem sinais de insuficiência ou distúrbios da função renal, ou mesmo microalbuminúria (JUNG & MATTENHEIMER, 1992). Esta excreção da enzima foi relacionada com a glicemia, o grau do dano da função renal e os níveis de A1C (JUNG & MATTENHEIMER, 1992; IKENAGA et al., 1993). IKENAGA et al. (1993), avaliaram várias enzimas tubulares renais e observaram que a GGT foi mais específica para a detecção da ND do que outras enzimas estudadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar o potencial diagnóstico das enzimas GGT e FAL para a detecção da nefropatia em pacientes com DM tipo 2 através da mensuração da atividade das mesmas em amostras de urina.

3.2. Objetivos específicos:

- Determinar as características diagnósticas (sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo e valor preditivo positivo) da GGT e FAL para a detecção da nefropatia no DM tipo 2.
- Avaliar a influência de algumas variáveis tais como glicemia, frutossamina e tabagismo sobre os níveis urinários de GGT e FAL na investigação da nefropatia no DM tipo 2.
- Investigar a associação entre os níveis urinários de GGT e FAL com os níveis urinários de albumina nos pacientes do estudo.

4. ARTIGO

O artigo apresentado a seguir inclui as seções “Materiais e Métodos” e “Resultados” desta dissertação. Além disso, também é apresentada uma discussão dos resultados e a relação das referências utilizadas para a elaboração deste artigo, o qual está disposto no formato publicado no periódico *Clinica Chimica Acta*.



Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy

José A.M. De Carvalho^{a,b,c}, Sílvia J. Piva^{a,b}, Bruna S. Hausen^{a,b}, Guilherme V. Bochi^{a,d}, Michelle Kaefer^c, Adriane C. Coelho^{c,e}, Marta M.M.F. Duarte^f, Rafael N. Moresco^{a,b,d,*}

^a Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^c Hospital Universitário de Santa Maria, RS, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^e Associação dos Diabéticos e Hipertensos, Santa Maria, RS, Brazil

^f Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2010

Received in revised form 3 April 2011

Accepted 11 April 2011

Available online 17 April 2011

Keywords:

Albuminuria

Alkaline phosphatase

Diabetic nephropathy

γ -glutamyltransferase

ABSTRACT

Background: Urinary biomarkers of tubular damage can be useful for early diagnosis of diabetic nephropathy. Thus, the aim of this study was to test the diagnostic accuracy of the urinary excretion of γ -glutamyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP) for diagnosis of diabetic nephropathy (DN).

Methods: Fasting glucose, fructosamine, serum creatinine, glomerular filtration rate (GFR), serum uric acid, serum albumin, and urinary albumin, creatinine, GGT and ALP were assessed in 74 type 2 diabetic patients without nephropathy and 38 type 2 diabetic patients with nephropathy.

Results: Urinary GGT and ALP were threefold higher in type 2 diabetic patients with nephropathy. Significant correlations were observed between urinary albumin and GGT ($r=0.439$, $P<0.001$) and urinary albumin and ALP ($r=0.305$, $P<0.01$). Areas under the curve for GGT and ALP were 0.7696 ($P<0.001$) and 0.7233 ($P<0.001$), respectively. At a cut-off value of 72 U/g creatinine, GGT demonstrated a sensitivity of 96.0% and a specificity of 52.6%. At a cut-off value of 20 U/g creatinine, ALP demonstrated a sensitivity and specificity of 83.8% and 36.8%, respectively.

Conclusions: Urinary GGT and ALP have potential value in the diagnosis of nephropathy in type 2 diabetic patients, but GGT has a slightly higher ability to discriminate nephropathy than ALP.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Diabetes has become the most common single cause of end-stage renal disease (ESRD) in the U.S. and Europe. About 20–30% of patients with type 1 or type 2 diabetes develop evidence of nephropathy, but in type 2 diabetes, a considerably smaller fraction of these patients progress to ESRD. A higher proportion of individuals with type 2 diabetes are found to have microalbuminuria and overt nephropathy shortly after having the diagnosis of diabetes. This happens because diabetes may be present for many years before its diagnosis is made and also because the presence of albuminuria may be less specific for the presence of diabetic nephropathy. Without specific interventions, 20–40% of type 2 diabetic patients with microalbuminuria progress to overt nephropathy, but by 20 years after the onset of the overt nephropathy, only ~20% may progress to ESRD [1].

Diabetic nephropathy (DN) is defined as a rise in urinary albumin excretion rate, often associated with an increase in blood pressure. It is the leading cause of ESRD and carries an increased risk for cardiovascular mortality [2,3]. Microalbuminuria is the first sign of diabetic renal impairment or incipient nephropathy [2–5] and is generally considered the best noninvasive predictor for the development of diabetic nephropathy (DN) [6]. Assessment of albuminuria status and renal function screening for microalbuminuria can be performed by measurement of the albumin to creatinine ratio in a random spot collection (preferred method); 24-h or timed collections are more burdensome and add little to prediction or accuracy [7,8]. Microalbuminuria is defined by urinary albumin levels ranging to 30–299 mg/g creatinine, and macroalbuminuria is defined by urinary albumin levels ≥ 300 mg/g creatinine [9,10].

DN is characterized by a series of ultrastructural changes in all renal compartments. The changes include basement membrane thickening, glomerular and tubular hypertrophy, mesangial expansion, glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. While most attention has focused on glomerular changes, it is now increasingly recognized that tubules play an important role in the pathogenesis of DN [11]. The proximal tubule is susceptible to a variety of metabolic, hemodynamic

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, 97105–900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941; fax: +55 55 32208018.

E-mail address: rnmoresco@yahoo.com.br (R.N. Moresco).

and inflammatory factors associated with hyperglycemia. Early tubular injury has been reported in patients with diabetes mellitus whose glomerular function is intact [12]. Chronic hypoxia could have a dominant pathogenic role in DN, not only in promoting progression but also during initiation of the condition. Early loss of tubular and peritubular cells reduces production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and erythropoietin, which, together with dysfunction of their receptors caused by the diabetic state, diminishes the local trophic effects of the hormones. This diminution could further compromise the functional and structural integrity of the parenchyma and contribute to the gradual decline of renal function [12].

Urinary markers, characteristic of tubular damage, are mainly composed of enzymes urinary or plasma proteins of low molecular weight that are normally freely filtered by the glomerulus [5]. Their increased excretion in urine results from the impaired reabsorption of plasma proteins by the tubular cells or from the increased secretion of urinary enzymes by tubular epithelia cells, leading to tubular proteinuria [5,13,14]. Similarly, enzymes in urine are highly sensitive markers of renal tubular damage. Some of the best characterized tubular proteins and enzymes used to detect proximal tubular injury are α_1 - and β_2 -microglobulin, cystatin C, retinol-binding protein, α -glutathione S-transferase (GST), γ -glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LD), and N-acetyl-glucosaminidase (NAG) [15,16]. Previous studies have demonstrated that determination of enzymuria could facilitate early detection of DN [11,17]. Thus, the aim of this study was to test the diagnostic accuracy of the urinary excretion of GGT and ALP, which are two enzymes commonly measured by well-established methods in the laboratory routine for diagnosis of DN.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study involved the following 2 groups: type 2 diabetic patients without nephropathy ($n = 74$; mean age \pm SD, 61.3 ± 10.6 y), and type 2 diabetic patients with nephropathy ($n = 38$; mean age \pm SD, 57.4 ± 12.6 y). Participants were recruited from the *Associação dos Diabéticos* (Diabetic Patient Association) located in Santa Maria city, Rio Grande do Sul, Brazil. Diabetic nephropathy has been defined based on the values of urinary albumin in a random urine sample according to the criteria previously described [9,10,18]. Exclusion criteria consisted in malignant disease, infectious disease, liver disease, chronic renal failure, renal surgery, renal transplantation, urinary tract diseases and the use of nephrotoxic drugs. All eligible subjects provided informed written consent, and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the local research ethics committee (registration number: 23081-018849/2007-67).

2.2. Laboratory analysis

Blood samples were collected from all patients after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA or with no anticoagulants. All patients also collected an early morning urine sample for the assessment of creatinine and urinary albumin. The results of urinary albumin were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [19]. Specimens were routinely centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose, while the serum was used to assess the levels of fructosamine, creatinine, uric acid, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and GGT. Urine was used to measure the levels of albumin, GGT and ALP. All measurements were performed using standard methods on Cobas MIRA[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated

analyzer. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation [20].

2.3. Statistics

Data are presented as mean and standard deviation (SD) or median and ranges. Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with χ^2 test. Statistical differences between groups were evaluated by Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests. Spearman's correlation was assessed to evaluate the correlations between the variables. Multiple regression analysis was assessed to investigate whether some factors interfere in urinary GGT and ALP. Receiver operator characteristic (ROC) curve was performed to quantify the overall ability of urinary GGT and ALP to discriminate between those type 2 diabetic patients with nephropathy and those without nephropathy. The sensitivity and specificity of such assays were assessed by ROC curve. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism ver 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) and Statistica 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

3. Results

Baseline characteristics of the study participants are described in Table 1. Biochemical parameters of the study participants are summarized in Table 2. Type 2 diabetic patients with nephropathy had significantly higher levels of fasting glucose, fructosamine, urinary albumin, urinary GGT and ALP. Urinary GGT and ALP activity was threefold higher in type 2 diabetic patients with nephropathy than those patients without nephropathy, although a similar GFR observed in the groups. Multiple regression showed that the association between higher urinary levels of these enzymes and nephropathy was independent of fasting glucose level, fructosamine level and smoking (Table 3). When the patients were divided according to the excretion of urinary albumin, patients with macroalbuminuria had significantly higher levels of fasting glucose, urinary GGT and ALP, as shown in Table 4. No significant differences were observed for fructosamine, GFR, serum creatinine, uric acid and serum albumin.

We have shown a Venn diagram of positive albuminuria, positive urinary GGT (over 72 U/g creatinine), and positive urinary ALP (over 20 U/g creatinine) to better understand the diagnostic values of urinary GGT and ALP for DN (Fig. 1). ROC curve was employed to quantify the overall ability of urinary GGT and ALP to discriminate

Table 1
Baseline characteristics of the study patients.

	Type 2 diabetes without nephropathy	Type 2 diabetes with nephropathy	P-value
n	74	38	
Age (y)	61.3 \pm 10.6	57.4 \pm 12.6	NS
Male (%)	35.1	42.1	NS
BMI (kg/m ²)	29.7 \pm 5.3	31.1 \pm 6.4	NS
Hypertension (%)	87.8	89.5	NS
Smokers (%)	2.7	13.5	0.030
Diabetes duration (years)	11.2 \pm 9.0	12.5 \pm 7.3	NS
Diabetic retinopathy (%)	12.2	21.0	NS
Insulin (%)	19.0	31.6	NS
Oral hypoglycemic agents (%)	51.3	42.1	NS
Insulin + oral hypoglycemic agents (%)	29.7	26.3	NS
ACE inhibitors (%)	67.6	57.9	NS
Angiotensin receptor blockers (%)	5.4	7.9	NS

Data are expressed as mean and SD or %. ACE: angiotensin-converting enzyme.

Table 2
Biochemical parameters of the study patients.

	Type 2 diabetes without nephropathy	Type 2 diabetes with nephropathy	P-value
Fasting glucose (mmol/L)	6.6 (4.1–20.4)	9.1 (4.3–22.3)	<0.001
Fructosamine (μmol/L)	294 (144–891)	344 (220–678)	0.039
GFR (mL/min/1.73 m ²)	109 (34–319)	112 (25–286)	NS
Creatinine (μmol/L)	66.3 (31.8–163.5)	74.3 (29.2–203.3)	NS
Uric acid (mmol/L)	0.27 (0.13–0.54)	0.27 (0.15–0.61)	NS
AST (U/L)	23 (10–53)	21 (14–42)	NS
ALT (U/L)	26 (9–47)	25 (13–81)	NS
GGT (U/L)	29 (17–68)	24 (16–38)	NS
Serum albumin (g/L)	37 (28–42)	36 (26–42)	NS
Urinary albumin (mg/g creatinine)	2.1 (0.0–27.4)	102.7 (31.6–907.4)	<0.001
Urinary GGT (U/g creatinine)	34.0 (9.2–267.9)	73.8 (6.3–470.6)	<0.001
Urinary ALP (U/g creatinine)	8.1 (0.0–47.6)	18.4 (3.6–211.8)	<0.001

Data are expressed as medians and ranges.

between those type 2 diabetic patients with nephropathy and those without nephropathy. Areas under the curve for GGT and ALP were 0.7696 (95% CI, 0.6685 to 0.8706, $P < 0.001$) and 0.7233 (95% CI, 0.6207 to 0.8260, $P < 0.001$), respectively. Thus, both GGT and ALP have ability to discriminate diabetic nephropathy; however, GGT has a slightly higher ability to discriminate nephropathy than ALP, as shown in Fig. 2. At a cut-off value of 72 U/g creatinine, GGT demonstrated a sensitivity of 96.0% (95% CI, 88.6% to 99.2%) and a specificity of 52.6% (35.8% to 69.0%) for the assessment of nephropathy, and the positive and negative predictive values (PPV and NPV) were 87.5% and 80.7%, respectively. At a cut-off value of 20 U/g creatinine, ALP demonstrated a sensitivity of 83.8% (95% CI, 73.4% to 91.3%) and a specificity of 36.8% (21.8% to 54.0%), and the PPV and NPV were 53.8% and 72.1%, respectively. In addition, significant correlations were observed between urinary albumin and GGT ($r = 0.439$, $P < 0.001$), and urinary albumin and ALP ($r = 0.305$, $P < 0.01$), as shown in Fig. 3.

4. Discussion

Previous studies have demonstrated that enzymuria can detect tubular injury [5,15,21]. Although the increase of urinary GGT and ALP activity in DN has already been previously described [17,22,23], to our knowledge, this is the first report to demonstrate the diagnostic accuracy of the urinary excretion of GGT and ALP for diagnosis of DN. These markers were selected to possibly reflect early tubular injury, which is believed to be an early event in the pathophysiologic process of clinical DN. Urinary enzymes such as GGT and ALP are highly sensitive markers of renal tubular damage [5], and their increased excretion into urine reflects damage of the brush border membrane with loss of the microvillous structure [21,24–26]. The renal tissue is the main source of the excreted urinary enzymes and the evaluation of these enzymes level is known to be a good and sensitive noninvasive method to measure the tubular cells integrity [27]. Renal enzymes are characteristic and located at different specific sites. GGT is mainly located at proximal tubule and Henle loop, and ALP is found on the epithelial cells of proximal tubule [28]. In addition, GGT and ALP activity was commonly measured in the laboratory routine by the use of well-established methods.

Urinary albumin levels were significantly higher in type 2 diabetic patients with nephropathy. Albuminuria has been accepted as an established marker of both early nephropathy and increased risk of cardiovascular events in diabetic patients [5]. Damage to tubular cells or interstitium may cause increased albuminuria by impairing endocytosis, degradation or transport of albumin and its degradation products [29]. Albuminuria is caused by changes in proximal tubule handling of filtered albumin in the hyperglycemic state [30]. Many evidence have shown that the maintenance of near-normal glucose control usually prevents the development of chronic complications of diabetes, which are the main causes of mortality and morbidity in these patients [31,32]. We observed in this study a poor glycemic control demonstrated by higher fasting glucose and fructosamine levels in type 2 diabetic patients with nephropathy in comparison with those without nephropathy. Hyperglycemia and enhanced reactive oxygen species (ROS) lead to an increase of vascular endothelial growth factor, cytokines, and other inflammatory mediators, which, in

Table 3
Multiple regression analysis of urinary GGT and ALP as dependent variables adjusting for baseline fasting glucose, fructosamine and smoking.

	Urinary GGT				Urinary ALP			
	b	SE _b	t	P-value	b	SE _b	t	P-value
Fasting glucose	3.939	2.517	1.565	NS	0.603	0.901	0.669	NS
Fructosamine	-0.045	0.087	-0.515	NS	-0.002	0.031	-0.064	NS
Smoking	53.333	30.475	1.750	NS	3.988	10.915	0.365	NS

Regression coefficients (b), standard error of b (SE_b) and t statistic with corresponding P-value.**Table 4**
Baseline characteristics of study patients.

	Normoalbuminuria	Microalbuminuria	Macroalbuminuria	P-value
n	74	31	7	
Age (y)	61 (30–79)	56 (35–75)	59 (50–87)	NS
Fasting glucose (mmol/L)	6.6 (4.1–20.4)	8.9 (4.3–22.3)	10.1 (5.1–19.7)	0.004
Fructosamine (μmol/L)	294 (144–891)	344 (220–678)	283 (228–678)	NS
GFR (mL/min/1.73 m ²)	109 (34–319)	112 (25–286)	92 (70–230)	NS
Creatinine (μmol/L)	66.3 (31.8–163.5)	68.9 (29.2–203.3)	77.8 (39.8–89.3)	NS
Uric acid (mmol/L)	0.27 (0.13–0.54)	0.27 (0.15–0.61)	0.28 (0.21–0.43)	NS
Serum albumin (g/L)	37 (28–42)	36 (26–42)	37 (32–39)	NS
Urinary albumin (mg/g creatinine)	2.1 (0.0–27.4)	81.8 (31.6–210.0)	639.8 (458.8–907.4)	<0.001
Urinary GGT (U/g creatinine)	34.0 (9.2–267.9)	74.3 (6.3–470.6)	52.3 (32.7–465.3)	<0.001
Urinary ALP (U/g creatinine)	8.1 (0.0–47.6)	16.7 (4.7–211.8)	19.5 (3.6–94.1)	<0.001

Data are expressed as medians and ranges.

1410

J.A.M. De Carvalho et al. / Clinica Chimica Acta 412 (2011) 1407–1411

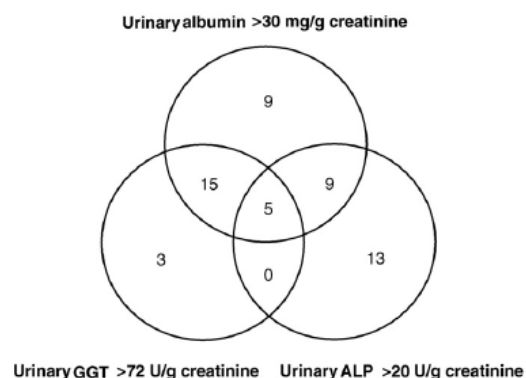


Fig. 1. Venn diagram of positive albuminuria, positive urinary GGT (over 72 U/g creatinine), and positive urinary ALP (over 20 U/g creatinine). Subset areas are not proportional to the actual relative subset sizes. GGT: γ -glutamyltransferase; ALP: alkaline phosphatase.

tum, cause damage to the glomerular endothelial glycocalyx leading to the onset of urinary albumin excretion in diabetes [33].

GGT (EC 2.3.2.2), a membrane-bound enzyme, is present (in decreasing order of abundance) in proximal renal tubule, liver, pancreas (ductules and acinar cells), and intestine. ALP (EC 3.1.3.1), which is involved in metabolite transport across cell membranes, is found (in decreasing order of abundance) in placenta, ileal mucosa, kidney, bone, and liver. In this study, urinary GGT and ALP activity was threefold higher in type 2 diabetic patients with nephropathy in comparison with those diabetics without nephropathy. We observed that both enzymes have ability to discriminate diabetic nephropathy; however, GGT has a slightly higher ability to discriminate nephropathy than ALP. Urinary GGT and ALP activity was significantly higher in patients with macroalbuminuria. In addition, significant correlations were observed between urinary albumin, GGT, and ALP. Yaqoob et al. [17] previously reported the association between urinary albumin and GGT. Under normal circumstances, practically all the low molecular

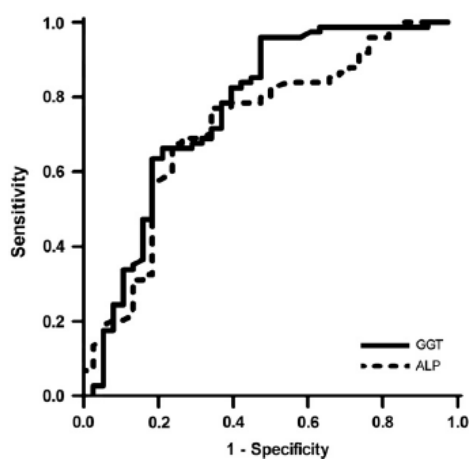


Fig. 2. ROC curves of urinary GGT and ALP for assessment of diabetic nephropathy. Areas under the curve for GGT and ALP were 0.7696 (95% CI, 0.6685 to 0.8706, $P < 0.001$) and 0.7233 (95% CI, 0.6207 to 0.8260, $P < 0.001$), respectively.

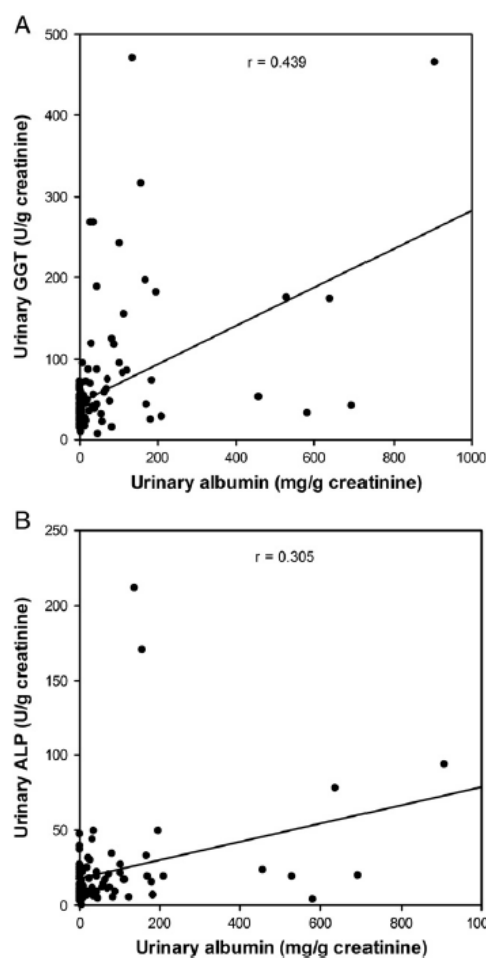


Fig. 3. Significant correlations between (A) urinary albumin and GGT ($r = 0.439$, $P < 0.001$), and (B) urinary albumin and ALP ($r = 0.305$, $P < 0.01$).

weight proteins (molecular weight < 70 kDa) are filtered freely through the glomerular basement membrane. Defects of charge-selectivity and size-selectivity in the glomerular basement membrane, together with the increase in transglomerular filtration pressure, are responsible for an increased excretion of albumin (66 kDa) [22,34], whereas increased urinary GGT and ALP reflect brush border damage of proximal tubules, which may be caused by diabetic nephropathy [35]. Enzymes in urine are highly sensitive markers of renal tubular damage because of their high molecular weight. They are not filtered through the glomerulus but originate in the renal tubular cells and are excreted in urine [15,16]. In this study, we speculate that the massive amount of urinary GGT and ALP is due to defect in tubular reabsorption, because these enzymes have molecular weight of 90 kDa and 120 kDa, respectively, and they are not filtered by the glomerulus, but can be derived from renal tubules. However, the increase in urinary levels of enzymes as NAG, GGT, ALP and lysozyme may reflect either functional or structural changes, and the cause cannot be attributed entirely to the site from which the enzyme originates [14]. Additional

studies are required to determine whether the increase of these enzymes in urine is due to defect in glomerular filtration or tubular reabsorption.

In patients with incipient DN tubular damage appears to precede glomerular proteinuria, suggestive of its role in the initiation of diabetic renal disease [17,36]. Early tubular injury has been reported in patients with diabetes mellitus whose glomerular function is intact [12]. In this study we present the diagnostic accuracy of the urinary GGT and ALP, and we are suggesting that the combined use of albuminuria in these enzymes may contribute to the investigation of DN because an increased excretion of GGT and ALP implies injury to the brush border membrane with loss of microvillous structure [21,24–26].

In conclusion, urinary GGT and ALP activity was higher in type 2 diabetic patients with nephropathy than those patients without nephropathy, and both enzymes have potential value in the diagnosis of nephropathy in type 2 diabetic patients but GGT has a slightly higher ability to discriminate nephropathy than ALP. Urinary excretion of tubular enzymes may show renal changes before they are identified using conventional measurements, such as changes in GFR or serum creatinine. We speculate that the massive amount of urinary GGT and ALP reflects the damage of proximal tubules due to their high molecular weight, but additional studies are required to determine whether the increase of these enzymes in urine is due to defect in glomerular filtration or tubular reabsorption. The cheapness and wide availability of automated assays for GGT and ALP suggests that the detection of these enzymes in random urine samples may be particularly useful clinically to identify patients with DN. However, further studies are required to investigate the clinical applicability of urinary GGT and ALP for diagnosis of DN and other kidney damages in a larger population.

Acknowledgements

The authors thank Biotécnica (Varginha, MG, Brazil) for providing biochemical reagents.

References

- [1] Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, et al. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:579–83.
- [2] Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice: nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002;346:1145–51.
- [3] Gnudi L, Thomas SM, Viberti G. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2226–32.
- [4] An JH, Cho YM, Yu HG, et al. The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean type 2 diabetic patients: a possible early stage renal complication. *J Korean Med Sci* 2009;24:575–81.
- [5] Matheson A, Wilcox MD, Hanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:150–71.
- [6] Narita T, Hosoba M, Kakei M, Ito S. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:142–4.
- [7] Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis* 2003;42:617–22.
- [8] Levey AS, Coresh J, Balk E, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137–47.
- [9] American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:579–83.
- [10] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2010. *Diabetes Care* 2010;33:S11–61.
- [11] Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *Eur J Int Med* 2009;20:551–5.
- [12] Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2008;4:216–26.
- [13] Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Can Med Assoc J* 2007;177:361–8.
- [14] Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 1998;12:43–60.
- [15] Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hüsing J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50:552–8.
- [16] Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2007;33:1285–96.
- [17] Yaqoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, Bell GM. Tubular damage in microalbuminuric patients with primary glomerulonephritis and diabetic nephropathy. *Ren Fail* 1995;17:43–9.
- [18] Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005;28:164–76.
- [19] Newman DJ, Pugia MJ, Lott JA, Wallace JF, Hiar A. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 2000;294:139–55.
- [20] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
- [21] Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltis D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:543–51.
- [22] Jung K, Pergande M, Schimace E, Ratzmann KP, Illus A. Urinary enzymes and low-molecular-mass proteins as indicators of diabetic nephropathy. *Clin Chem* 1988;34:544–7.
- [23] Mohammadi-Karakani A, Asgharzadeh-Haghighi S, Ghazi-Khansari M, Hosseini M. Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients. *J Clin Lab Anal* 2007;21:413–7.
- [24] Scherberich JE. Urinary proteins of tubular origin: basic immunological and clinical aspects. *Am J Nephrol* 1990;10(Suppl 1):43–51.
- [25] Chew SL, Lins RL, Daelmans R, Nuyts GD, De Broe ME. Urinary enzymes in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8:507–11.
- [26] Hartmann HG, Braedel HE, Jutzler GA. Detection of renal tubular lesions after abdominal aortography and selective renal arteriography by quantitative measurements of brush-border enzymes in the urine. *Nephron* 1985;39:95–101.
- [27] Price RG. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology* 1982;23:99–134.
- [28] Melo DAS, Saciura VC, Poloni JAT, et al. Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as a marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats. *Clin Chim Acta* 2006;373:88–91.
- [29] Kern EF, Erhard P, Sun W, Genuth S, Weiss MF. Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Am J Kidney Dis* 2010;55:824–34.
- [30] Russo LM, Sandoval RM, Campos SB, Molitoris BA, Comper WD, Brown D. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:489–94.
- [31] Patel A, MacMahon S, Chalmers J, et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2560–72.
- [32] Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577–89.
- [33] Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008;51:714–25.
- [34] Abrass CK. Diabetic proteinuria: glomerular or tubular origin? *Am J Nephrol* 1984;4:337–46.
- [35] Morita E, Kaizu K, Uru K, Hashimoto O, Komine N, Eto S. Clinical significance of urinary enzymes in diabetic nephropathy. *J Diabet Complications* 1991;5:158–9.
- [36] Pinter GG, Atkins JL. What causes diabetic renal failure? *Lancet* 1990;335:590–1.

5. DISCUSSÃO

Estudos anteriores têm demonstrado que a enzimúria pode contribuir para a detecção da lesão tubular (WESTHUYZEN et al, 2003; HEGERT-ROSENTHAL et al, 2004; MATHESON et al, 2010). Embora o aumento da atividade urinária da GGT e da FAL na ND já tenha descrito anteriormente (JUNG et al, 1988; YAQOOB et al, 1995; MOHAMMADI-KARAKANI et al, 2007), para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que demonstra as características diagnósticas (sensibilidade, especificidade, VPN e VPP) dos níveis urinários de GGT e FAL na avaliação da ND. Estes marcadores foram selecionados porque, possivelmente, têm a capacidade de refletir a lesão tubular em estágio inicial, o que parece ser o evento inicial na fisiopatologia da ND clínica. As enzimas urinárias tais como a GGT e a FAL são marcadores altamente sensíveis de lesão tubular renal (MATHESON et al, 2010), e sua excreção aumentada na urina reflete dano da membrana da borda em escova com a perda da estrutura das microvilosidades (HARTMANN et al, 1985; SCHERBERICH, 1990; WESTHUYZEN et al, 2003). O tecido renal é a principal fonte das enzimas excretadas na urina e a avaliação dos níveis dessas enzimas é conhecido por ser um bom método não-invasivo e sensível para medir a integridade das células tubulares (PRICE, 1982). As enzimas renais se localizam em diferentes sítios específicos. A GGT está localizada principalmente no túbulo proximal e na alça de Henle, e a FAL é encontrada no epitélio das células do túbulo proximal (MELO et al, 2006). Além disso, a atividade da GGT e da FAL são comumente medidas na rotina do laboratório através da utilização de métodos bem estabelecidos.

Nesse estudo, os níveis urinários de albumina foram significativamente maiores em pacientes com nefropatia. A albuminúria é aceita como um marcador bem estabelecido para o diagnóstico precoce da nefropatia e também para a avaliação do risco de eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos (MATHESON et al, 2010). Danos nas células tubulares ou no interstício podem causar aumento da albuminúria em decorrência de endocitose, ou ainda por alterações ao transporte da albumina e de seus produtos de degradação (KERN et al, 2010). A albuminúria também é causada por mudanças ocorridas no túbulo proximal durante o estado hiperglicêmico (RUSSO et al, 2009). Muitas evidências têm demonstrado que a manutenção do controle glicêmico próximo do normal geralmente impede o desenvolvimento de complicações crônicas do DM, que são as

principais causas da mortalidade e morbidade nesses pacientes (PATEL et al, 2008; HOLMAN et al, 2008). Observamos neste estudo que o controle glicêmico, demonstrado pelos índices da glicemia em jejum e pelos níveis da frutossamina, foram mais elevados nos pacientes diabéticos com nefropatia em comparação com aqueles pacientes diabéticos sem nefropatia. A hiperglicemia e a maior produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) levam ao aumento do fator de crescimento do endotélio vascular, citocinas e de outros mediadores inflamatórios que, por sua vez, causam danos ao glicocálix endotelial glomerular levando ao aparecimento da excreção urinária de albumina no diabetes (SATCHELL et al, 2008).

A GGT (EC 2.3.2.2) é uma enzima ligada à membrana e está presente (em ordem crescente de abundância) no túbulo proximal renal, fígado, pâncreas (ductos e as células acinares), e no intestino. A FAL (EC 3.1.3.1), que está envolvida no transporte de metabólitos através da membrana celular, é encontrada (em ordem decrescente de abundância) na placenta, na mucosa ileal, rins, ossos e fígado. Neste estudo, a atividade urinária da GGT e da FAL foi aproximadamente três vezes maior nos pacientes diabéticos com nefropatia em comparação com os diabéticos sem nefropatia. Foi observado que ambas as enzimas têm capacidade de detectar a nefropatia diabética, no entanto, a GGT apresenta uma capacidade discriminatória igeiramente superior à FAL. A atividade urinária da GGT e da FAL também foi significativamente maior em pacientes com microalbuminúria e macroalbuminúria em comparação aos normoalbuminúricos. Além disso, foram observadas correlações significativas entre a albumina urinária, GGT e a FAL. YAQOOB et al (1995), anteriormente relataram a associação entre albumina urinária e a GGT. Em circunstâncias normais, praticamente todas as proteínas de baixo peso molecular (peso molecular <70 kDa) são filtradas livremente através da membrana basal glomerular. Defeitos na seletividade de carga e no tamanho na membrana basal glomerular, juntamente com o aumento da pressão de filtração transglomerular, são responsáveis por um aumento da excreção da albumina (66 kDa) (ABRASS, 1984; JUNG et al, 1988), enquanto que o aumento da atividade urinária da GGT e da FAL reflete o dano das bordas em escova dos túbulos proximais, que podem ser causados pela nefropatia diabética (MORITA et al, 1991).

As enzimas na urina são marcadores altamente sensíveis de lesão tubular renal devido ao seu alto peso molecular. Elas não são filtradas pelos glomérulos,

mas se originam nas células tubulares renais e são excretadas na urina (HEGERT-ROSENTHAL et al, 2004; BAGASHAW et al, 2007). Neste trabalho, nós especulamos que a grande quantidade de GGT e da FAL urinária possa ser decorrente de defeitos na reabsorção tubular, porque essas enzimas têm peso molecular de 90 kDa e 120 kDa, respectivamente, e dessa maneira não são filtradas pelo glomérulo, mas podem ser derivadas dos túbulos renais. No entanto, o aumento nos níveis urinários de enzimas como NAG, GGT, FAL e lisozima pode refletir tanto alterações funcionais como estruturais, e as causas não podem ser atribuídas inteiramente ao local a partir do qual a enzima é originária (HONG & CHIA, 1998). Estudos adicionais são necessários para determinar se o aumento destas enzimas na urina decorre de defeitos na filtração glomerular ou na reabsorção tubular.

Em pacientes com ND incipiente o dano tubular parece preceder a proteinúria glomerular, sugerindo seu papel inicial na doença renal diabética (PRINTER & ATKINS, 1990; YAQOOB et al, 1995). O início da lesão tubular tem sido relatado em pacientes com DM cuja função glomerular está intacta (SINGH et al, 2008). Neste estudo são apresentadas as características diagnósticas da GGT e da FAL urinária, sendo sugerido que o uso combinado da albuminúria e dessas enzimas pode contribuir para a investigação da ND, pois um aumento da excreção urinária de GGT e de FAL implica em danos à membrana das bordas em escova com perda da estrutura das microvilosidades (HARTMANN et al, 1985; SCHERBERICH et al, 1990; WESTHUYZEN et al, 2003).

Assim, a atividade urinária da GGT e da FAL foi maior nos pacientes DM tipo 2 com nefropatia quando comparado àqueles sem nefropatia, e ambas as enzimas têm potencial para o diagnóstico da nefropatia em pacientes com DM tipo 2, apesar da GGT apresentar uma capacidade discriminatória ligeiramente superior à FAL. A excreção urinária das enzimas tubulares pode mostrar alterações renais antes de serem identificadas por meio de medidas convencionais, tais como alterações na creatinina sérica ou na taxa de filtração glomerular. Nós acreditamos que o aumento da GGT e da FAL urinária reflete o dano nos túbulos proximais devido aos seus altos pesos moleculares, mas estudos adicionais são necessários para determinar se o aumento destas enzimas na urina é decorrente de defeitos na filtração glomerular ou na reabsorção tubular. O baixo custo e a ampla disponibilidade de uma variedade de testes automatizados para a mensuração da GGT e da FAL sugerem que a mensuração dessas enzimas em amostras aleatórias de urina pode ser

particularmente útil em termos clínicos para a identificação de pacientes com ND. No entanto, estudos complementares são necessários para investigar a aplicabilidade clínica da GGT e da FAL urinária no diagnóstico da ND e outras patologias renais em uma população maior.

6. CONCLUSÕES

- Os pacientes com nefropatia apresentaram níveis três vezes mais elevados de GGT e FAL na urina em comparação aos pacientes sem nefropatia, apesar da taxa de filtração glomerular ser semelhante entre os grupos.
- As enzimas GGT e FAL, mensuradas em amostras de urina de pacientes com DM tipo 2, apresentaram potencial diagnóstico para a detecção de nefropatia na população do estudo, sendo que a GGT apresentou uma habilidade discretamente superior à FAL.
- Ao considerar o ponto de corte de 72 U/g creatinina, a GGT apresentou as seguintes características diagnósticas na avaliação da nefropatia: sensibilidade (96,0%), especificidade (52,6%), VPN (80,7%) e VPP (87,5%).
- Ao considerar o ponto de corte de 20 U/g creatinina, a FAL apresentou as seguintes características diagnósticas na avaliação da nefropatia: sensibilidade (83,8%), especificidade (36,8%), VPN (72,1%) e VPP (53,8%).
- A associação entre os níveis urinários das enzimas avaliadas e a nefropatia não foi influenciada pela glicemia de jejum, frutossamina e nem pelo tabagismo.
- Os pacientes com microalbuminúria e macroalbuminúria apresentaram níveis mais elevados de GGT e FAL na urina em comparação àqueles normoalbuminúricos, sendo também observadas correlações positivas entre a albuminúria, GGT e FAL.
- A mensuração dos níveis urinários de GGT e FAL, enzimas comumente avaliadas nos laboratórios de análises clínicas, pode contribuir para o diagnóstico da nefropatia no DM tipo 2, especialmente se utilizadas em conjunto com a albuminúria, uma vez que isso contribuiria para detecção de danos em diferentes porções do néfron.

7. REFERÊNCIAS

ABRASS, C.K. Diabetic proteinuria: glomerular or tubular origin? **Am J Nephrol**, v. 4, p. 337-346, 1984.

ADA, American Diabetes Association. The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 20, p. 1183-1197, 1997.

ADA, American Diabetes Association. **Diabetes complications. In: Diabetes 2001 vital statistics.** Virginia: Port City Press, Inc; 2001. p. 43-74.

ADA, American diabetes association. Clinical Practice. Recommendations. Gestational Diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, s. 1, p. s77, 2001.

ADA, American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 25, s. 1, p. s5-s20, 2002.

ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 27, s. 1, p. s5-s10, 2004.

ADA, American Diabetes Association. **Intensive Diabetes Management.** Alexandria, VA, 2009.

ADA, American Diabetes Association Standards of Medical Care in Diabetes—2010. **Diabetes Care**, v. 33, s. 1, p. s11-s61, 2010.

ADA II, American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 33, s. 1, p. s62-s69, 2010.

ADLER, S. Diabetic nephropathy: Linking histology, cell biology, and genetics. **Kidney Int**, v. 6, p. 2095-2106, 2004.

AIELLO, L.P. et al. Diabetic retinopathy. Technical review. **Diabetes Care**, v. 21. p. 143-156, 1998.

ALLURU, S.; REDDI, A.S.; CAMERINI-DAVALOS, R. Diabetic Nephropathy. **Arch Intern Med.**, v. 150, p. 31-43, 1990.

AMBADE, v. et al. Urinary N-Acetyl-Beta-Glucosaminidase and Gamma Glutamyl Transferase as early markers of diabetic nephropathy. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 142-148, 2006.

ARAGON, A.; YOUNOSSI, Z.M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 773, n. 3, p. 195-204, 2010.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin dependent diabetes. **N Engl J Med**, v. 331, p.1428–1436, 1994.

BAELDE, H.J. et al. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. **Kidney Int**, v. 71, p. 637-645, 2007.

BAGASHAW, S.M. et al. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. **Intensive Care Med**, v. 33, p. 1285-1296, 2007.

BARRAT, J.; TOPAHAM, P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. **Can Med Assoc J**, v. 177, n.4, p.361–368, 2007.

BASTURK, T. et al. Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. **Ren Fail**, v. 28, n. 2, p. 125-128, 2006.

BERNARD, A.M. et al. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. **Clin Chem**, v. 33, p. 775-779, 1987.

BOLDT, J. et al. Influence of two different volume replacement regimens on renal function in elderly patients undergoing cardiac surgery: comparison of a new starch preparation with gelatin. **Intensive Care Med**, v. 29, p. 763-769, 2003.

BOLDT, J. et al. Kidney-specific proteins in elderly patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. **Anesth Analg**, 97, p. 1582-1589, 2003.

BONVENTRE, J.V. Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers. **Contrib Nephrol**, v. 156, p. 213-219, 2007.

BORIGHT, A.P. et al. Genetic variation at the ACE gene is associated with persistent microalbuminuria and severe nephropathy in type 1 diabetes: the DCCT/ EDIC Genetics Study. **Diabetes**, v. 54, p. 1238-1244, 2005.

BRANTEN, A.J. et al. Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. **Nephron**, v. 85, p. 120-126, 2000.

BRAGA, W. R.C. Diabetes mellitus. 1 ed. Rio de Janeiro. Medsi, 2002.

BRIVET, F.G. et al. Acute renal failure in intensive care units—causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study. French Study Group on Acute Renal Failure. **Crit Care Med**, v. 24, p. 192-198, 1996.

BURCHARDT, U.; SCHERBERICH. Mechanisms of enzyme release and causes of altered enzyme excretion. In: JUNG K, MATTENHEIMER U, BURCHARDT U, editors **Urinary enzymes**. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag; 1992. p 21–41.

BURTIS, C.A. et al. **Fundamentos de Química Clínica (Tietz)**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2008.

BURTON, C.J.; WALLS, J. Proximal tubular cell, proteinuria and tubule-interstitial scarring. **Nephron**, v. 68, p. 287-293, 1994.

CATALNO, C.; WINOCOUR, P.H.; GILLESPIE, S. et al. Effects of posture and acute glycemic control on the excretion of retinol binding protein in normoalbuminúricos insulin-dependent diabetic patients. **Clin Sic**, v. 84, p.461-467,1993.

CATHALA, G.; BRUNEL, C. Bovine kidney alkaline phosphatase. Purification, sub-unit structure, and metalloenzyme properties. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6040-6045, 1975.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION . Blindness caused by diabetes - Massachusetts,1987-1994. **JAMA**, v. 276, p. 1865-1886, 1996.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Diabetes-related amputations of lower extremities in the Medicare population. Minnesota, 1993-1995. **Morb Mortal WklyRep**, v. 47, p. 649-652, 1998.

CHEN, Z.J. et al. Expression of VEGF in kidney of diabetic rats [Chinese]. **Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v.38, p. 633-636, 2007.

CHEUNG, C.K. et al. Urinary excretion of albumin and enzymes in non-insulin-dependent Chinese diabetics. **Clin Nephrol**, v. 34, n. 3, p. 125-130, 1990.

CHEW, S.L. et al. Urinary enzymes in acute renal failure. **Nephrol Dial Transplant**, v 8, p. 507-511, 1993.

COOPER, M.E. Pathogenesis prevention and treatment of diabetic nephropathy. **Lancet**, v. 352, p. 213-219,1998.

CRAIG, M.E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 10, s. 12, p. 3-12, 2009.

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 12, p. 639-643, 2003.

DECODE STUDY GROUP. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. **Arch Intern Med**, v.161, p. 397-405, 2001.

DE VRIESE AS, et al. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. **J Am Soc Nephrol**, v. 12, p. 993-1000, 2001.

DONADIO, C.; et al. Urinary excretion of proteins and tubular enzymes in renal transplant patients. **Renal Fail**, v. 20, p. 707-715, 1998.

ENGELGAU, M.M. et al. Comparison of fasting and 2 hours glucose and HbA1c levels for diagnosing diabetes. Diagnostic criteria and performance revisited. **Diabetes Care**, v. 20, p. 785-791, 1997.

ERIKSSON, J. et al. Clinical and metabolic characteristics of type 1 and type 2 diabetes: an epidemiological study from the Närpes community in Western Finland. **Diabet Med**, v. 9, p. 654-660, 1992.

FAJANS SS, BELL GI, POLONSKY KS. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young. **N Engl J Med**, v. 345, p. 971-980, 2001.

FARVID, M.S. et al. Association of glomerular and tubular dysfunction with glycaemic control, lipid, lipoprotein, apolipoprotein and antioxidant status in type 2 diabetes mellitus. **Singapore Med J**, v. 48, n. 9, p. 840-846, 2007.

FISHMAN, W.H. Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress. **Clin Biochem**, v. 23, n.2, p. 99-104, 1990.

FLANDROIS, C. et al. Enzymuria. *Ano Biol. Clin (Paris)*, v. 44, n.5, p. 486-490, 1986.

FLYNN, F.V. Assessment of renal function: selected developments. **Clin Biochem**, v.23, n.1, p. 49-54, 1990.

FLYVBJERG, A. et al. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. **Diabetes**, v. 51, p. 3090-3094, 2002.

FRANKLIN, G.M. et al. Sensory neuropathy in noninsulindependent diabetes mellitus. The San Luis Valley Diabetes Study. **Am J Epidemiol**, v. 131, 633-643, 1990.

FULLER, J.M. et al. Coronary heart disease risk and impaired glucose: the Whitehall study. **Lancet**, V. 1, P. 373-376, 1980.

FURTADO, M.V.; POLANCZYK, C.A. Prevenção Cardiovascular em Pacientes com Diabetes: Revisão Baseada em Evidências. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 2, p. 312-318, 2007.

GABIR, M.M. et al. Plasma glucose and prediction of microvascular disease and mortality: evaluation of 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, p. 1113-1118, 2000.

GAMA, M. P. R. Do milagre canadense do século XX às esperanças de cura do século XXI (Editorial). **Endocrinologia & Diabetes Clínica e Experimental**, v. 2, s. 2, p. 3-5, 2002.

GARNERO, P.; DELMAS, P.D. Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 77, p. 1046-1053, 1993.

GNUDI, L.; GOLDSMITH, D. Renin angiotensin aldosterone system (RAAS) inhibitors in the prevention of early renal disease in diabetes. **Medicine Reports**, v. 6, p. 319-330, 2010.

GOLDBERG, D.M. Structural, functional, and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. **CRC Crit Rev Clin Lab Sci**, v. 12, p. 1-58, 1980.

GROENEVELD, A.; et al. Acute renal failure in the medical intensive care unit: Predisposing, complicating factors and outcome. **Nephron**, v. 59, p. 602-610, 1991.

GROSTAD, M.; HUSEBY, N.E. Clearance of different multiple forms of human gammaglutamyltransferase. **Clin Chem**, v. 36, p. 1654-1656, 1990.

GROSS, J. L.; NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, n. 3, p. 279-284, 1999.

GROSS, J.L. et al. Diagnóstico e classificação do diabetes mellito e tratamento do diabetes melito tipo 2: recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 44, s.4, p. S8-S35, 2000.

GROSS, J.L. et al. DM: Diagnóstico e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v 46, n 1, p. 16-26, 2002.

GROSS JL, DE AZEVEDO MJ, SILVEIRO SP, et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v.28, p.176-188, 2005.

GROSS, J.L. et al. Nefropatia Diabética e Doença Cardíaca. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 51, n. 2, p. 244-256, 2007.

GUDER, W.G.; HOFMAN, W. Markers for the diagnosis and monitoring of renal tubular lesions. **Clin Nephrol**, v.38, s1, p. S3-S7, 1992.

GUILLAUSSEAU, P.J. et al. Maternally inherited diabetes and deafness: a multicenter study. **Ann Intern Med**, v. 134, p. 721-728, 2001.

HAN, W.K.; BONVENTRE, J.V. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, v.10, p. 476-482, 2004.

HANEDA, M.; et al. Abnormalities in protein kinase C and MAP kinase cascade in mesangial cells cultured under high glucose conditions. **J Diabetes Complications**, v. 9, p. 246-248, 1995.

HAO, C.M.; BREYER, M.D. Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney. **Kidney Int**, v. 71, 1105-1115, 2007.

HAO, C.M.; BREYER, M.D. Roles of lipid mediators in kidney injury. **Semin Nephrol**, v. 27, 338-351, 2007.

HARRIS, R.D. et al. Global glomerular sclerosis and glomerular arteriolar hyalinosis in insulin dependent diabetes. **Kidney Int**, v. 40, p. 107-114, 1991.

HARTMANN, H.G.; BRAEDEL, H.E.; JUTZLER, G.A. Detection of renal tubular lesions after abdominal aortography and selective renal arteriography by quantitative measurements of brush-border enzymes in the urine. **Nephron**, v. 39, p. 95-101, 1985.

HEILIG, C.W. et al. Over expression of glucose transporters in rat mesangial cells cultured in a normal glucose milieu mimics the diabetic phenotype. **J Clin Invest**, v. 96, p. 1802-1814, 1995.

HELD, PJ; et al. The United States Renal Data System's 1991 annual data report: an introduction. **Am J Kidney Dis**, v. 18, p. 1-16, 1991.

HERGET-ROSENTHAL, S.; et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. **Clin Chem**, v. 50, p.552-558, 2004.

HILGERS, K.F.; VEELKEN, R. Type 2 diabetic nephropathy: never too early to treat? **J AM Soc Nephrol**, v. 16, p. 574-575, 2005.

HOGAN, M. et al. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 90, p. 1110-1115, 1992.

HOHENSTEIN, B. et al. Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man. **Kidney Int** , v.69, p. 1654-1661, 2006.

HOLMAN, R.R. et al. 10-year follow-up of intensive glucose control in diabetes. **N Engl J Med**, v. 359, p. 1577-1689, 2008.

HONG, C.Y.; CHIA, K.S. Markers of diabetic nephropathy. **J Diabetes Complications**, v. 12, n. 1, p. 43-60, 1998.

HONG, C.Y.; CHIA, K.S.; LING, S.L. Urinary protein excretion in type 2 diabetes with complications. **J Diabetes Complications**, v.14, n.5, p. 259-265, 2000.

HOTHER-NIELSEN, O. et al. Classification of newly diagnosed diabetic patients as insulin-requiring or non-insulin-requiring based on clinical and biochemical variables. **Diabetes Care**, v. 11, p. 531-537, 1988.

ICHINOSE, K. et al. Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. **Am J Nephrol**, v. 7, p. 554-564, 2007.

IKENAGA, H. et al. Enzymuria in non insulin dependent diabetic patients: signs of tubular cell dysfunction. **Clin Sci**, v. 84, p. 469-475, 1993.

IMIG, J.D. Eicosanoids and renal vascular function in diseases. **Clin Sci (Lond)**, v. 111, p. 21-34, 2006.

JUNG, K. et al. Urinary Enzymes and Low-Molecular-Mass Proteins as Indicators of Diabetic Nephropathy. **Clin Chem**, v. 34, n.3, p. 544-547, 1988.

JUNG, K.; MATTENHEIMER, H. **Urinary enzymes in clinical and experimental medicine**. New York: Springer-Verlag; 1992.

KALANSOORIYA, A. et al. Serum cystatin C, enzymuria, tubular proteinuria and early renal insult in type 2 diabetes. **Br J Biomed Sci**, v.64, n.3, p. 121-123, 2007.

KALANSOORIYA, A. et al. Urinary enzyme measurements as early indicators of renal insult in type 2 diabetes. **Br J Biomed Sci**, v. 64, n. 4, p. 153-156, 2007.

KANESAKI Y, et al. Vascular endothelial growth factor gene expression is correlated with glomerular neovascularization in human diabetic nephropathy. **Am J Kidney Dis**, v. 45, p. 288-294, 2005.

KANTERS, S.D. et al. Incidence and determinants of mortality and cardiovascular events in diabetes mellitus: a meta-analysis. **Vasc Med**, v. 4, p. 67-75, 1999.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J.; KAMIECZAK, S. **C. Clinical chemistry: theory, analysis, correlations**. 4. ed. Sant Louis: Mosby, 2003.

KERN, E.F. et al. Early urinary markers of diabetic kidney disease: a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **Am J Kidney Dis**, v. 55, p. 824-834, 2010.

KITABCHI, A.E. et al. Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, p. 131-153, 2001.

KLEIN, R.; KLEIN, B.E.K. Are Individuals With Diabetes Seeing Better? A Long-Term Epidemiological Perspective. **Diabetes**, v. 59, n. 8, 2010.

KOH, K.T.; CHIA, K.S.; TAN, C. Proteinuria and enzymuria in non-insulin-dependent diabetics. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 20, n. 3, p. 215-221, 1993.

KOVÁCS, G.L. Diabetic Nephropathy. **eJIFCC**, v. 20, n. 1, p. 40-52, 2009.

KUNIN, C.M. et al. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: studies of N-acetyl- α -glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. **Pediatrics**, v. 62, p. 751-760, 1978.

KUNISAKI, M. et al. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. **Diabetes**, v. 43, p. 1372-1377, 1994.

KUNZ, R. et al. Association between the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 1653-1663, 1998.

KWON, O. et al. Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained ARF after ischemia injury in renal allografts. **Am J Kidney Dis**, v. 41, p. 1074-1087, 2003.

LAMBERS HEERSPINK, H.J. et al. Update on microalbuminuria as a biomarker in renal and cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 15, n. 6, p. 631-636, 2006.

LE DU, M.H.; MILLÁN, J.L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, v. 277, p. 49808-49814, 2002.

LEBECHE, D.; DAVIDOFF, A.J.; HAJJAR, R.J. Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v.5, p. 715-724, 2008.

LI, H. et al. Possible human leukocyte antigen-mediated genetic interaction between type 1 and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, p. 574-582, 2001.

LIEBERMAN, D.; PHILLIPS, D. "Isolated" elevation of alkaline phosphatase: significance in hospitalized patients. **J Clin Gastroenterol**, v. 7, p. 415-419, 1990.

LIEBERMAN, M.W. et al. Gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions? **Am J Pathol**, v. 147, p. 1175-1185, 1995.

LIEBERTHAL, W.; NYGAM, S.K. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. **Am J Physiol**, v. 272, p. 622-632, 1998.

LIN, C.L.; et al. Wnt/ β -catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. 2812-2820, 2006.

LISOWSKA-MYJAK, B. Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury. **Blood Purify**, v. 29, p. 357-365, 2010.

LOW, P.A.; NICKANDER, K.K.; TRITSCHLER, H.J. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 46, s. 2, p. S38-S42, 1997.

MACISAAC, R.J. et al. Nonalbuminuric Renal Insufficiency in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v.27, n. 1, p. 195-200, 2004.

MAKINO, H. et al. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. **Diabetes**, v. 45, p. 488-495, 1996.

MAKITA, Z.; et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. **N Engl J Med**, v. 325, p. 836-842, 1991.

MARFELLA, R. et al. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. **Diabetologia**, v. 45, p. 1172-1181, 2002.

MATHESON, A. et al. Urinary Biomarkers in Type 2 Diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**, v.26, n.3, p.150-171,2010.

MAUER, S.M. et al. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J Clin Invest** , v. 74, p. 1143-1155, 1984.

MAYFIELD, J. Diagnosis and classification of DM: New Criteria. **Am Fam Physican**, v. 58, s. 6, p. 1355-1362, p. 1369-1370, 1998.

McCOMB, R.B.; BOWERS, G.N.JR.; POSEN, S. **Alkaline Phosphatase**. New York: Plenum 1979.

MELO, D.A.S. et al. Evaluation of renal enzymuria and cellular excretion as an marker of acute nephrotoxicity due to an overdose of paracetamol in Wistar rats. *Clin Chim Acta*, v. 373, p. 88-91, 2006.

MISHRA, R.; et al. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. **Kidney Int**, v. 67, p.82-93, 2005.

MILLÁN, J.L. Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 335-341, 2006.

MOGENSEN, C.E.; CHRISTENSEN, C.K.; VITTINGHUS, E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 32, s. 2, p. 64-78, 1983.

MOGENSEN, C.E. et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. **The Lancet**, v.346, ed. 8982, p. 1080 - 1084, 1995.

MOHAMMADI-KARAKANI A, ASGHARZADEH-HAGHIGHI S, GHAZI-KHANSARI M, HOSSEINI M. Determination of urinary enzymes as a marker of early renal damage in diabetic patients. **J Clin Lab Anal**, v. 21, p. 413-417, 2007.

MOLITCH, M.E. et al. American Diabetes Association. Nephropathy in diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p. S79-S83, 2004.

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

MOVVA, S. et al. Relationship of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism with nephropathy associated with type 2 diabetes mellitus in Asian Indians. **J Diabetes Complications**, v 21, p. 237-241, 2007.

MS, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Plano de reorganização da atenção à hipertensão arterial e ao diabetes melito: hipertensão arterial e diabetes melito**. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. Brasília: Ministério da Saúde, 2001. p. 104.

MS, Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 56.

MURUSSI M, MURUSSI N, CAMPAGNOLO N, *et al.* Early detection of diabetic nephropathy. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, p. 442-451, 2008.

NAGAI, Y. et al. Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the development of renal injury in type 2 diabetic rats. **J Am Soc Nephrol**, v.16, p. 2005;16:703-11.

NARITA, T. et al. Increased urinary excretions of immunoglobulin g, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 142–144, 2006.

NATH, K.A. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. **Am J Kidney Dis**, v. 20, p. 1-17, 1992.

NATHAN, D.M.; MEIGS, J.; SINGER, D.E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is...or is it? **The Lancet**, v. 350, s. 1, p. 4-9, 1997.

NATHAN, D.M. et al. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group: Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983–2005). **Arch Intern Med**, v. 169, p. 1307-1316, 2009.

NAVARRO-GONZALEZ, J.F.; MORA-FERNANDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, p. 443-442, 2008.

NDDG, National Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. **Diabetes**, v. 28, p. 1038-1057, 1979.

NIELSEN, S. et al. The clinical course of renal function in NIDDM patients with Normand microalbuminuria. **J Intern Med**, v. 241, p. 133-141, 1997.

- NISHIKAWA, T. et al. Impact of mitochondrial ROS production on diabetic vascular complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 77, s. 1, p. S41-S45, 2007.
- OHNHAUS, E.E.; GERBER-TARAS, E.; PARK, B.K. Enzyme-inducing drug combinations and their effects on liver microsomal enzyme activity in man. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 24, p. 247-250, 1983.
- OSICKA, T.M.; COMPER, W.D. Characterization of Immunochemically Nonreactive Urinary Albumin. **Clinical Chemistry**, v. 50, p. 2286-2291, 2004.
- PAMBIANCO, G. et al. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. **Diabetes**, v. 55, p. 1463-1469, 2006.
- PANCHENKO, E.L. et al. The differential diagnostic value of urinary enzyme and amino acid excretion in children with nephrotic syndrome. **Pediatr Nephro**, v. 82, n. 2, p. 142-147, 1994.
- PARTANEN, J. et al. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **N Eng J Med**, v. 333, p. 89-94, 1995.
- PATEL, A. et al. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 358, p. 2560-2572, 2008.
- PETITT, D.J. et al. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 33, p. 438-443, 1990.
- PICCIRILLO, L.J. et al. Markers of inflammation in type 1 diabetic patients. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, p. 253-260, 2004.
- PINTER, G.G.; ATKINS, J.L. What causes diabetic renal failure? **Lancet**, v. 335, p. 590-591, 1990.
- PIWOWAR, A. et al. Urinary activities of cathepsin B, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **Med Sci Monit**, v. 12, n.5, p. CR210-CR214, 2006.
- POPE, J.E. et al. A meta-analysis of the effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on blood pressure. **Arch Intern Med**, v. 153, p. 477-484, 1993.
- PRICE, R.G. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. **Toxicology** v. 23, p. 99-134, 1982.
- PRICE, R.G. The role of NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clin Nephrol**, v.38, S1, p. S14-S19, 1992.

PU, L.J. et al. Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C reactive protein levels in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. **Cardiovasc Diabetol**, v.5, p. 27-30, 2006.

RAILE, K. et al. Diabetic nephropathy in 27,805 children, adolescents, and adults with type 1 diabetes: effect of diabetes duration, A1C, hypertension, dyslipidemia, diabetes onset, and sex. **Diabetes Care**, v. 30, p. 2523-2528, 2007.

RAPTIS, A.E.; VIBERTI, G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 9, s. 2, p. S424-S437, 2001.

REICHEL, A.J. et al. Brazilian Study of Gestational Diabetes (EBDG) Working Group. Fasting plasma glucose is a useful test for the detection of gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1246-1249, 1998.

REMUZZI, G; RUGGENENTI, P; BENIGNI, A. Understanding the nature of renal disease progression. **Kidney Int**, v. 51, p. 2-15, 1997.

REMUZZI, G. et al. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 346, p. 1145-1151, 2002.

REMUZZI, G.; MARCIA, M.; RUGGENENTI, P. Prevention and Treatment of Diabetic Renal Disease in Type 2 Diabetes: The BENEDICT Study. **J Am Soc Nephrol**, v. 17, p. S90-S97, 2006.

RING, E.; et al. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in patients with cystic fibrosis on long term gentamicin inhalation. **Arch Dis Child**, v. 78, p. 540-543, 1998.

ROSALKI, S.B. Gamma-glutamyl transpeptidase. **Adv Clin Chem**, v. 17, p. 53-107, 1975.

RUSSO, L.M. et al. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 489-494, 2009.

RUGGENENTI, G.; REMUZZI, G. Time to abandon microalbuminuria? **Kidney Int.**, v. 70, p. 1214-1222, 2006

SARVARY, E. et al. Diagnostic value of urinary enzyme determination in renal transplantation. **Transpl Int**, v. 9, s. 1, p. S68-S72, 1996.

SATCHELL, S.C.; TOOKE, J.E. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? **Diabetologia**, v. 51, p. 714-725, 2008.

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Atualização Brasileira sobre Diabetes, 2006**. São Paulo, 2006.

SCHRAMM, T.K. et al. Diabetes patients requiring glucose-lowering therapy and non diabetics with a prior myocardial infarction carry the same cardiovascular risk: a population study of 3.3 million people. **Circulation**, v.117, p. 1945-1954, 2008.

SCHERBERICH, J.E. Urinary proteins of tubular origin: Basic immunological and clinical aspects. **Am J Nephrol**, v. 10, S1, p. 43-45, 1990.

SCHEFFEL, R.S. et al. Prevalência de complicações micro e macrovasculares em pacientes com Diabetes Melito do Tipo 2 em atendimento ambulatorial. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 3, p. 263-267, 2004.

SELINGER, M.J.; MATLOFF, D.S.; KAPLAN, M.M. Gamma-Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. **Clin Chim Acta**, v. 10, p. 283-290, 1982.

SERVICE, F.J.I. et al. The classification of diabetes by clinical and C-peptide criteria. A prospective population-based study. **Diabetes Care**, v. 20, p. 198-201, 1997.

SHARMA K, ZIYADEH FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. **Diabetes**, v. 44, p. 1136-1146, 1995.

SHARMA K, et al. Captopril-induced reduction of serum levels of transformin growth factor- β 1 correlates with long-term renoprotection in insulindependent diabetic patients. **Am J Kidney Dis**, v. 34, p. 818-823, 1999.

SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. The epidemiology of diabetic neuropathy. **Diabetes Reviews**, v. 7, p. 245-252, 1999.

SINGH, S. et al. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. **Gastroenterology**, v. 103, p. 1625-1629, 1992.

SINGH, A.K. et al. Effect of glycated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, p. 802-810, 1998.

SINGH, A.K. et al. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 4, p. 216-226, 2008.

SPIELCHLER E.R.S. et al. Diabetic lower extremities amputation - Rio de Janeiro, BR.. **Diabetologia**, v. 41, p. 90-96, 1998.

STEPHENSON, J.M.; FULLER, J.H. Microalbuminuria is not rare before 5 years of IDDM. EURODIAB IDDM Complications Study Group and the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes Study Group. **J Diabetes Complications**. v. 8, n. 3, p. 166-73, 1994.

SUH, D.C. et al. Impact of comorbid conditions and race/ethnicity on glycemic control among the US population with type 2 diabetes, 1988–1994 to 1999–2004. **J Diabetes Complications**, v. 24, s. 6, p. 382-391, 2010.

SUNDBERG, A.G. et al. Urinary π -class glutathione transferase as an indicator of tubular damage in the human kidney. **Nephron**, v. 67, p. 308-316, 1994.

SUZUKI D, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. **J Am Soc Nephrol**, v. 10, p. 822-832, 1999.

TANIGUCHI, N.; IKEDA, Y. Gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol**, v. 72, p. 239-278, 1998.

TANAKA, A. et al. Tubular dysfunction in the early stage of diabetic nephropathy. *Med J Osaka Univ*, v. 38, p. 57-63, 1989.

TILTON, R.G. et al. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. **Diabetes**, v. 38, p. 1258-1270, 1989.

TOLKOFF-RUBIN, N.E.; RUBIN, R.H.; BONVENTRE, J.V. Noninvasive renal diagnostic studies. *Clin Lab Med*, v. 8, p. 507-526, 1988.

TREVISAN, R.; VIBERTI, G. Genetic factors in the development of diabetic nephropathy. **J Lab Clin Med**, v. 126, p. 342-349, 1995.

TROF, R.J. et al. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. **Shock**, v.26, p. 245-253, 2006.

TSILIBARY, E.C. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. **J Pathol**, v. 200, p.537-546, 2003.

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

USLU, S. et al. 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.

VALMADRID, C. T. et al. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. **Arch Intern Med**, v. 160, p. 1093-1100, 2000.

VASAVADA, N.; AGARWAL, R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. **Adv Chronic Kidney Dis**, V. 12, P. 146-154, 2005.

WADA, J.; MAKINO, H. Historical chronology of basic and clinical research in diabetic nephropathy and contributions of Japanese scientists. **Clin Exp Nephrol**, v.67, p. 20-27, 2009.

WEITGASSER, R. et al. Prospective evaluation of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase with respect to macrovascular disease in elderly type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.22, n.11, p. 1882-1886, 1999.

WESTHUYZEN, J. et al. Urinary protein excretion following coronary angiography using a non-ionic radiocontrast agent. **Ann Clin Biochem**, v. 33, p. 349-351, 1996.

WESTHUYZEN, J. et al. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 543-551, 2003.

WHO, World Health Organization. **Expert Committee on Diabetes Mellitus. Second Report. Technical Report Series 646**. Geneva, 1980.

WHO, World Health Organization. **Diabetes Mellitus: Report of a WHO Study Group. Technical Report Series 727**. Geneva, 1985.

WHO, World Health Organization. Department of Non communicable Disease Surveillance. **Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications - Report of a WHO Consultation**. Geneva, 1999.

WILAND, P.; SWIERKOT, J.; SZECHINSKI, J. N-Acetyl- β -D-glucosaminidase urinary excretion as an early indicator of kidney dysfunction in rheumatoid arthritis patients on LOW-dose methotrexate treatment. **Br J Rheumatol**, v.36, p.59-63, 1997.

WOLF, G.; SCHERBERICH, J.E.; NOUACK, A. et al. Urinary excretion of dipeptidyl aminopeptidase IV in patients with renal diseases. **Clin Nephrol**, v.33, n. 3, p.136-142, 1990.

WOLF, S.; GASSEN, H.G. Gamma-glutamyl transpeptidase, a blood-brain barrier associated membrane protein. Splitting peptides to transport amino acids. **Adv Exp Med Biol**, v. 421, p. 37-45, 1997.

YAQOUB, M. et al. Relationship between markers of endothelial dysfunction, oxidant injury and tubular damage in patients with insulin dependent diabetes mellitus. **Clin Sci**, v. 85, p. 557-562, 1993.

YAQOUB, M. et al. Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy. **Q J Med**, v. 87, p. 601-607, 1994.

YAMAGISHI, S. et al. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. **Curr Drug Targets**, v. 8, p. 952-959, 2007.

YOSHIKAWA, R. et al. Urinary PGDS levels are associated with vascular injury in type 2 diabetes patients. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 765, n.3, p. 358-367, 2007.

ZHANG, H.F. et al. Species differences in the localisation of gamma-glutamyltranspeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface. **J Brain Res**, v. 38, p. 323-330, 1997.

ZIYADEH, F.N. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β 1 as the major mediator. **J Am Soc Nephrol**, v. 5, s. 1, p. S55-S57, 2004.

ZIYADEH, F.N.; WOLF, G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. **Curr Diabetes Ver**, v. 4, p. 39-45, 2008.