

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

Manuela Borges Sangoi

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA URINA COMO INDICADORES DE
DANO RENAL EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Santa Maria, RS
2016

Manuela Borges Sangoi

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA URINA COMO INDICADORES DE DANO
RENAL EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Beatriz Moretto

Santa Maria, RS
2016

Manuela Borges Sangoi

**CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA URINA COMO INDICADORES DE DANO
RENAL EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 20 de dezembro de 2016:

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Maria Beatriz Moretto, Dr^a. (UFSM)
(Co-orientadora)

Michele Rorato Sagrillo, Dr^a. (UNIFRA)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UFPel)

Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)

Miguel Roehrs, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família: meu esposo, meus pais, minha irmã e meu cunhado. A vocês que me incentivaram nos momentos de desânimo, me consolaram nos momentos de tristeza e estiveram presentes nas alegrias de minhas conquistas. Essa vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

“Todos querem viver no topo da montanha, mas toda a felicidade e o crescimento ocorrem quando você está escalando-a” (William Shakespeare). Durante estes últimos anos realizei uma intensa “escalada”, repleta de desafios e obstáculos, os quais trouxeram consigo construção e amadurecimento. Chego até aqui com a certeza de que nada na vida é realizado de forma fácil e sem esforço. Não posso deixar de expressar minha gratidão aos incentivos e apoios que permitiram que eu chegasse ao topo de uma das muitas montanhas que ainda terei de escalar em minha vida.

Sou profundamente grata à Deus, que até aqui me ajudou e que me faz desfrutar todos os dias de sua maravilhosa graça. Ele tem me proporcionado vida, força e sabedoria para que eu possa seguir em frente. Pai, tu és quem me sustenta e à Ti agradeço por tudo o que tenho e tudo o que sou.

Agradeço ao meu esposo Giandre, sempre presente com suas palavras carinhosas de apoio e incentivo nos momentos de desânimo e de cansaço. Obrigada pelo teu companheirismo, pela tua paciência e pela tua compreensão nas minhas ausências. És uma benção em minha vida! Eu te amo muito.

Aos meus pais, Marcos e Sandra, à minha gratidão. Obrigada por tudo o que sempre fizeram e continuam fazendo por mim. Obrigada pela dedicação, pelas renúncias, pelos ensinamentos, pelas orações e pelo amor que vocês têm por mim.

À minha querida irmã Sabrina, só posso agradecer pela amizade, pela preocupação com minha felicidade, pelas palavras de incentivo em momentos de desânimo e pelo consolo em momentos de tristeza.

Agradeço imensamente ao meu orientador professor Rafael pela oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisas. Obrigada por acreditar em meu potencial, por me orientar a aprender, a refletir, a pesquisar e a interrogar. Agradeço não só pelos conhecimentos, mas também pelas experiências transmitidas e pela amizade. És para mim um grande exemplo, o qual levarei para sempre em minha caminhada!

Obrigada professora Maria Beatriz, minha co-orientadora, por aceitar participar deste trabalho e me acolher com serenidade, paciência e dedicação.

Merece um especial agradecimento o meu colega José. Zé, não posso deixar de te agradecer pela amizade, por tantas vezes que em que pude contar contigo, seja para assuntos científicos ou não. Obrigada por tornar este trabalho possível!

Minha gratidão aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica (LabiClin). Este tempo em que tive a oportunidade de conviver com vocês foi precioso para mim. Vocês foram colegas e, acima de tudo, vocês foram e sempre serão meus amigos. Cada um deixa em mim uma marca de seu jeito especial. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelos sorrisos e pelas palavras. Enfim, obrigada por fazerem parte da minha vida e da minha história Bruna, Etiane, Guilherme, Lara, Luiz Carlos, Luiz, Naiara, Natieli, Vanessa e Yãnaí.

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Ângela, Helena, Marines, Natália, Paula e Rosane agradeço pela amizade e disposição em me auxiliar.

Agradeço à banca examinadora desta tese pela honra de tê-los como avaliadores deste trabalho. Obrigada por aceitarem o convite de integrar a banca, disponibilizando de seu tempo e ofertando suas contribuições para o enriquecimento do meu trabalho.

Obrigada à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e à todos os professores que contribuíram para minha formação. Neste agradecimento merece menção especial o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) que tornou possível a conquista deste título.

Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço à Universidade Regional Integrada (URI)-Campus de Santiago por me acolher em minha primeira experiência como docente e, através do Programa de Qualificação Docente, incentivar minha formação. Durante este tempo de trabalho tenho vivido experiências intensas e, o mais importante: conheci muitas pessoas especiais, docentes, funcionários e acadêmicos. Muitas destas pessoas posso chamar de amigos e não meramente de “colegas”.

Minha especial, profunda e sincera gratidão a todos vocês que são parte desta conquista!

Não diminua os teus sonhos, aumente a tua fé. A nós foi dado o direito de sonhar e em Deus está o poder para realizar os nossos sonhos.

(Autor desconhecido)

RESUMO

CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NA URINA COMO INDICADORES DE DANO RENAL EM PACIENTES COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2

AUTORA: Manuela Borges Sangoi

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Maria Beatriz Moretto

A doença renal do diabetes (DRD) é uma complicação microvascular altamente prevalente em pacientes com diabetes *mellitus* (DM) e representa a principal causa de doença renal em estágio final na maioria dos países. Até o presente momento, a excreção urinária de albumina (EUA) é um dos marcadores mais utilizados na prática clínica para avaliação do dano renal. No entanto, muitos pacientes diabéticos podem desenvolver DRD mesmo quando os níveis urinários de albumina ainda estão dentro da normalidade. Neste contexto, existe a necessidade de identificar biomarcadores mais sensíveis, específicos e com maior poder preditivo que a EUA. Algumas observações clínicas têm suportado a hipótese de que o processo inflamatório renal contribui para o desenvolvimento e para a progressão da DRD, e que a excreção urinária de marcadores inflamatórios pode ser útil na avaliação do dano renal. Desta forma, este estudo visa avaliar a concentração urinária das citocinas inflamatórias interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) na identificação da DRD e suas associações com o dano renal em pacientes com DM tipo 2. Foi realizado um estudo transversal prospectivo incluindo pacientes admitidos no Ambulatório do serviço de Endocrinologia e Metabolismo do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) com diagnóstico de DM tipo 2. Nestes pacientes, foi avaliada a concentração urinária das citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ), a razão albumina/creatinina urinária (uACR) e os níveis urinários de lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (uNGAL). Além disso, foram avaliadas características clínicas dos pacientes do estudo e biomarcadores séricos/plasmáticos associados ao perfil lipídico e ao controle glicêmico. Os níveis urinários das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) foram mais elevados nos pacientes com DRD, enquanto que as concentrações urinárias da citocina anti-inflamatória IL-10 foram menores neste grupo, em comparação com os pacientes sem DRD. Foi demonstrado que todas as citocinas inflamatórias urinárias estudadas apresentam boa capacidade na identificação da DRD entre os pacientes com DM tipo 2 (áreas sob a curva ROC superiores à 0,9). Ao estratificar os pacientes de acordo com as faixas de albuminúria (uACR < 10 mg/g creatinina, uACR 10–30 mg/g de creatinina e uACR > 30 mg/g creatinina) foi possível observar alterações nos níveis de IL-6 e IL-10 no grupo com uACR 10–30 mg/g de creatinina. Isto sugere que os marcadores inflamatórios estão alterados mesmo em uma faixa de EUA considerada como normoalbuminúria. Além disso, foi demonstrada uma associação entre os níveis das citocinas inflamatórias urinárias IL-6, IL-10 e TNF- α e os biomarcadores associados com a patogênese e a progressão da DRD em relação ao dano glomerular (uACR) e tubular (uNGAL). Estes resultados indicam que as citocinas inflamatórias urinárias podem ser biomarcadores úteis na avaliação da DRD, possuindo potencial para a utilização na prática clínica.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2. Doença Renal do Diabetes. Citocinas. Inflamação. Urina.

ABSTRACT

URINARY INFLAMMATORY CYTOKINES AS INDICATORS OF KIDNEY DAMAGE IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

AUTHOR: Manuela Borges Sangoi
ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
CO-ADVISOR: Prof.^a Dr^a. Maria Beatriz Moretto

Diabetic kidney disease (DKD) is a highly prevalent microvascular complication in patients with diabetes *mellitus* (DM) and is the leading cause of end-stage renal disease in most countries. Until now, urinary albumin excretion (UAE) is one of the most commonly used markers in clinical practice for kidney damage assessment. However, some diabetic patients may develop DKD even when urinary albumin levels are still within normal range. In this context, there is a need to identify more sensitive, specific and more predictive biomarkers than the UAE. Some clinical observations have supported the hypothesis that the renal inflammatory process contributes to the development and progression of DKD, and that the urinary excretion of inflammatory markers may be useful in assessing renal damage. Thus, the aim of this study was to evaluate the urinary concentration of inflammatory cytokines interleukin 1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), tumor necrosis factor α (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) in the identification of DKD and its associations with renal damage in patients with type 2 DM. A prospective cross-sectional study was carried out, including patients admitted to the outpatient department of Endocrinology and Metabolism at the University Hospital of Santa Maria (HUSM) with diagnosis of type 2 DM. In these patients, the urinary concentration of inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ), urinary albumin/creatinine ratio (uACR), and urinary levels of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) were assessed. In addition, clinical characteristics of the study patients and serum/plasma biomarkers associated with the lipid profile and glycemic control were determined. The urinary levels of the proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ) were higher in patients with DKD, whereas urinary concentrations of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were lower in this group, compared to patients without DKD. All the urinary inflammatory cytokines studied have been shown to have a good ability to identify DKD among patients with type 2 DM (areas under the ROC curve above 0.9). When stratifying patients according to the albuminuria ranges (uACR <10 mg/g creatinine, uACR 10-30 mg/g creatinine and uACR > 30 mg/g creatinine), changes in IL-6 and IL-10 levels in the uACR group 10-30 mg/g creatinine were observed. This suggests that inflammatory markers are altered even in a UAE range considered as normoalbuminuria. In addition, an association between the levels of IL-6, IL-10 and TNF- α urinary inflammatory cytokines and the biomarkers associated with pathogenesis and progression of DRD regarding both glomerular (uACR) and tubular damage (NGAL). These results indicate that urinary inflammatory cytokines may be useful biomarkers in the evaluation of DRD, having potential for use in clinical practice.

Keywords: Type 2 Diabetes *mellitus*. Diabetic Kidney Disease. Cytokines. Inflammation. Urine.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 – Categorias de excreção urinária de albumina conforme as diretrizes da <i>National Kidney Foundation and Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i> (NKF-KDOQI) e <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i> (KDIGO).....	19
Tabela 2 – Valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de doença renal do diabetes, conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.....	19
Tabela 3 – Estágios da Doença Renal Crônica.....	20
Tabela 4 – Principais fatores e rotas envolvidas na patogênese da doença renal do diabetes.....	26
Tabela 5 – Efeitos relacionados às citocinas pró-inflamatórias potencialmente envolvidos no desenvolvimento e progressão do dano renal no diabetes.....	32
Tabela 6 – Biomarcadores urinários na avaliação da DKD.....	41

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 – Baseline clinical characteristics of study participants	65
Table 2 – Characteristics of urinary inflammatory cytokines in the assessment of diabetic kidney disease (DKD).....	66

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Table 1 – Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population	79
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Triagem e diagnóstico da DKD.....	21
Figura 2 – Resumo esquemático dos mecanismos patogênicos envolvidos na doença renal do diabetes	27
Figura 3 – Resumo esquemático da participação de mecanismos inflamatórios na fisiopatologia da doença renal do diabetes.....	28
Figura 4 – Desenho esquemático representando a sequência de eventos relevantes ao dano inflamatório renal durante a progressão da DRD.....	30

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 – Urinary levels of inflammatory cytokines, (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IFN- γ , (E) IL-1- and (F) IL-6/IL-10 ratio of study participants.....	67
Figure 2 – Urinary levels of inflammatory cytokines, (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IFN- γ , (E) IL-1- and (F) IL-6/IL-10 ratio of study participants stratified at different concentrations of urinary albumin/creatinine ratio (uACR): uACR <10 mg/g creatinine, uACR 10–30 mg/g creatinine and uACR >30 mg/g creatinine.....	68

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Figure 1 – Box and whisker plots of urinary levels of IL-6, IL-10 and TNF- α according to urinary albumin/creatinine ratio (uACR) and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) quartiles.....	80
--	----

DISCUSSÃO

Figura 5 – Resumo esquemático demonstrando o papel das citocinas inflamatórias no desenvolvimento e na progressão do dano renal associado ao diabetes <i>mellitus</i>	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-OHdG: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
A1 MG: α_1 -microglobulina
ADA: *American Diabetes Association* (Associação Americana de Diabetes)
ADAM-17: Enzima Conversora do TNF- α 17
AGEs: *Advanced Glycation End-Products* (Produtos Finais de Glicação Avançada)
AUC: Área sob a curva ROC
CKD-EPI: *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*
CSF-1: Fator Estimulador de Colônias-1
CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DAG: Diacilglicerol
DM: Diabetes *mellitus*
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DRC: Doença Renal Crônica
DRD: Doença Renal do Diabetes
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio
EUA: Excreção Urinária de Albumina
FGF-2: Fator de Crescimento de Fibroblastos 2
GAGs: Glicosaminoglicanos Associados a Matriz Extracelular
GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias Granulócitos-Monócitos
ICAM-1: Molécula de Adesão Intercelular Tipo 1
IFN- α 2: Interferon α 2
IFN- γ : Interferon γ
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-18: Interleucina 18
IL-1 α : Interleucina 1 α
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IP-10: Proteína 10 Induzida pelo Interferon
JNK: Proteína Quinase c-Jun N-terminal
KDIGO: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*
KIM-1: Molécula de injúria renal tipo 1
LDL-ox: Lipoproteína de baixa densidade oxidada
M1: Macrófagos subtipo 1
M2: Macrófagos subtipo 1
MAPK : Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MAPK p38: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno p38
MCP-1: Proteína Quimiotática de Monócitos tipo 1
MCP-3: Proteína Quimiotática de Monócitos tipo 3
MDC: Quimiocina Derivada dos Macrófagos
MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*
MIP-1 α : Proteína Inflamatória de Macrófago-1 α

MIP-1 β : Proteína Inflamatória de Macrófago-1 β
mRNA: RNA mensageiro
NAG: N-acetil- β -D-glicosaminidase
NF-KDOQI: *National Kidney Foundation and Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*
NF- κ B: Fator de Transcrição Nuclear κ B
NGAL: Lipocalina Associada à Gelatinase de Neutrófilos
PDGF-AA/BB: Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas-BB
PKC: Proteína Quinase C
RAGES: Receptores para Produtos Finais de Glicação Avançada
RANTES: Quimiocina Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais
RBP: Proteína Ligadora do Retinol
ROC: *Receiver Operating Characteristic*
SAPKs: Proteínas Quinases Ativadas por Estresse
SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes
sCD40L: Ligante CD40 Solúvel
SRAA: Sistema Renina-angiotensina-aldosterona
TFG: Taxa de Filtração Glomerular
TGF- β 1: Fator de Crescimento Transformante β 1
TIMP-1: Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1
TNFR1: Receptor de TNF 1
TNFR2: Receptor de TNF 2
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral α
TNF- β : Fator de Necrose Tumoral β
uACR: Razão Albumina/creatinina Urinária
VCAM-1: Molécula de Adesão Celular Vascular Tipo 1
VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular
 β 2 MG: β 2-microglobulina

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1.1 Doença Renal do Diabetes	16
<i>1.1.1.1 Definição, diagnóstico e triagem</i>	16
<i>1.1.1.2 História natural da doença</i>	21
<i>1.1.1.3 Mecanismos patogênicos</i>	24
1.1.2 Doença Renal do Diabetes e inflamação	27
<i>1.1.2.1 Citocinas inflamatórias</i>	31
<i>1.1.2.2 Interleucinas, fator de necrose tumoral α e interferon γ</i>	33
1.1.3 Estratégias emergentes na avaliação da Doença Renal do Diabetes	38
<i>1.1.3.1 Limitações dos marcadores tradicionais no diagnóstico da Doença Renal do Diabetes</i>	38
<i>1.1.3.2 Novas perspectivas: biomarcadores urinários emergentes na avaliação da Doença Renal do Diabetes</i>	40
1.1.4 Citocinas inflamatórias urinárias na avaliação da Doença Renal do Diabetes	44
1.3 OBJETIVOS	49
1.3.1 Objetivo geral	49
1.3.2 Objetivos específicos	49
2 ARTIGO CIENTÍFICO	50
3 MANUSCRITO CIENTÍFICO	69
4 DISCUSSÃO	81
5 CONCLUSÕES	85
ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	104

1 APRESENTAÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM), especialmente o DM tipo 2, representa um dos mais importantes problemas de saúde a nível mundial, uma vez que sua prevalência tem atingido proporções extraordinárias e as projeções são surpreendentes. A prevalência do DM foi estimada em 171 milhões no ano de 2000, aumentando para 415 milhões em 2015. Projeções indicam que os números podem alcançar 642 milhões em 2040, o que representará aproximadamente 10,4% da população mundial (IDF, 2015).

Paralelamente a esta epidemia, a doença renal do diabetes (DRD) se tornou a maior causa de doença renal em estágio final na maioria dos países (LIM, 2014), inclusive no Brasil (SBD, 2015-2016). Embora a incidência varie entre as diversas regiões, aproximadamente 30 a 40% dos pacientes com DM desenvolvem DRD (GONZALEZ SUAREZ et al., 2013). Além disso, a DRD está associada com a doença cardiovascular e com aumento do risco de mortalidade em indivíduos diabéticos (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Sendo assim, a DRD possui um considerável impacto na sociedade no que se refere a aspectos econômicos e de saúde pública (WADA e MAKINO, 2009), o que salienta a importância da prevenção desta complicação microvascular do DM, bem como do seu diagnóstico precoce e tratamento (LEE e CHOI, 2014).

Atualmente, a disfunção da barreira de filtração glomerular, que resulta em aumento da excreção urinária de albumina (EUA), é considerada o primeiro sinal clínico de DRD e um preditor da progressão da doença (MORESCO et al., 2013). No entanto, muitos pacientes diabéticos podem desenvolver DRD, mesmo quando os níveis urinários de albumina ainda estão dentro da normalidade. Além disso, alguns pacientes considerados normoalbuminúricos podem apresentar lesões histopatológicas renais avançadas (MATHESON et al., 2010). Estas observações indicam que a EUA não é o marcador ideal para detecção precoce da DRD (BARRATT e TOPHAM, 2007). Desta forma, existe a necessidade de identificar biomarcadores mais sensíveis e específicos que a EUA, os quais possam permitir a detecção precoce da DRD, além de predizer e monitorar a progressão do dano renal. Neste sentido, alguns biomarcadores urinários associados com a fisiopatologia do dano renal no DM têm sido estudados.

Tem sido reconhecido que o dano tubular desempenha um importante papel na patogênese e na progressão da DRD, sendo que os marcadores tubulares podem ser mais sensíveis que EUA na identificação desta patologia (KIM et al., 2013; MORESCO et al., 2013). Dentre estes, a lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) parece ser um

marcador promissor (ABDEL-RAHMAN et al., 2011), uma vez que a elevação de seus níveis na urina pode preceder o desenvolvimento de albuminúria, além de predizer a progressão e a severidade da doença renal em pacientes diabéticos (BOLIGNANO et al., 2009; VAIDYA et al., 2011).

Do ponto de vista fisiopatológico, já está bem estabelecido que o DM é uma patologia multifatorial associada a diversas alterações metabólicas e hemodinâmicas, as quais resultam em mudanças funcionais e estruturais nos rins. Estas, por sua vez, estão associadas com o desenvolvimento e com a progressão da DRD (BOOYA et al., 2005). Entretanto, o dano renal associado ao DM não pode ser completamente explicado por estes fatores. Algumas evidências têm indicado que a inflamação desempenha um papel essencial na patogênese da DRD (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014).

A resposta inflamatória, uma vez ativada pelas alterações hemodinâmicas e metabólicas renais, pode ocorrer em estágios precoces do diabetes (LIM e TESCH, 2012). Isto resulta no aumento da expressão de citocinas inflamatórias nos tecidos renais de pacientes diabéticos, bem como na elevação dos níveis séricos e urinários destas moléculas (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Os efeitos das citocinas na DRD incluem alterações hemodinâmicas intra-renais, modificações estruturais nos rins, anormalidades na expressão de diversas moléculas, necrose e apoptose celular, mudanças na permeabilidade glomerular, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Algumas das citocinas relacionadas à DRD são a interleucina 1 (IL-1), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 10 (IL-10), o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ) (NAVARRO-GONZÁLEZ e MORA-FERNÁNDEZ, 2008).

De fato, algumas observações clínicas têm suportado a hipótese de que o processo inflamatório renal contribui para o desenvolvimento e para a progressão da DRD, e que a excreção urinária de marcadores inflamatórios pode ser útil na avaliação do dano renal (CHERNEY et al., 2012; WOLKOW et al., 2008). No entanto, estudos investigando os níveis urinários das citocinas inflamatórias em diferentes faixas de EUA, especialmente verificando se estas moléculas podem estar alteradas em pacientes normoalbuminúricos, ainda são escassos na literatura. É de suma importância também avaliar as características das citocinas inflamatórias urinárias na identificação da doença renal em pacientes diabéticos, incluindo o ponto de corte, a sensibilidade e a especificidade das mesmas. Estas questões são fundamentais para corroborar o uso desses marcadores na avaliação da DRD. Além disso, pouco se sabe a respeito da associação de marcadores tubulares, como a NGAL, com as

citocinas inflamatórias, o que poderia agregar mais conhecimentos sobre fisiopatologia da DRD.

Sendo assim, o estudo de novos marcadores e de suas características diagnósticas é de extrema relevância, podendo oferecer novas oportunidades para o reconhecimento do início, da progressão e da resposta a intervenções terapêuticas na DRD. Neste contexto, este estudo visa avaliar as características das citocinas inflamatórias urinárias IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ na identificação da DRD e suas associações com o dano renal em pacientes com DM tipo 2.

Para contemplar este e outros objetivos, esta Tese de Doutorado está dividida em algumas seções. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO** e no **MANUSCRITO CIENTÍFICO** e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final deste trabalho, apresentam as interpretações e os comentários gerais sobre o artigo científico e o manuscrito científico contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta Tese, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo e do manuscrito estão mencionadas nos mesmos.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Doença Renal do Diabetes

1.1.1.1 Definição, diagnóstico e triagem

A DRD é uma complicação microvascular altamente prevalente, que se desenvolve a longo prazo em pacientes com DM. É caracterizada por alterações renais funcionais, estruturais e clínicas causadas pelo diabetes (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). Esta complicação microvascular do DM foi descrita pela primeira vez em 1936, ocasião na qual se demonstrou que pacientes com diabetes apresentavam lesões nodulares características, as quais foram mais tarde denominadas de glomerulosclerose nodular (KIMMELSTIEL e WILSON, 1936).

Tradicionalmente, a doença renal devido ao diabetes foi denominada de “nefropatia diabética”. No entanto, em 2007, na busca por unificar a definição e resolver limitações inerentes ao termo “nefropatia diabética”, a *National Kidney Foundation and Kidney Disease*

Outcomes Quality Initiative (NKF-KDOQI) descreveu em suas diretrizes uma nova terminologia para a doença renal causada pelo diabetes. Assim, o termo “doença renal do diabetes” tem substituído “nefropatia diabética”.

Neste sentido, tem-se observado uma ampliação do espectro das apresentações clínicas da doença renal causada pelo diabetes, sendo o fenótipo da doença renal não albuminúrica, caracterizado pela redução isolada da taxa de filtração glomerular (TFG), cada vez mais reconhecido. Portanto, atualmente, o termo “nefropatia diabética” deve ser reservado somente para pacientes com proteinúria detectável persistente, em geral associada à elevação da pressão arterial (SBD, 2015-2016). As diretrizes da NKF-KDOQI também determinam que o termo DRD se refira ao diagnóstico presuntivo de doença renal causada pelo diabetes. O termo “glomerulopatia diabética” deve ser utilizado para a doença renal causada pelo diabetes comprovada através de biópsia renal (NKF-KDOQI, 2007).

Cabe então ressaltar que, embora a biópsia renal seja requerida para o diagnóstico de doença renal causada pelo diabetes, isto não é usual na prática clínica, uma vez que a triagem cuidadosa dos pacientes permite a identificação da DRD (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014). Esta investigação é geralmente reservada para apresentações atípicas de doença renal, incluindo aquelas em que existem outras patologias sistêmicas associadas, sedimento urinário ativo, rápido declínio da TFG e rápido aumento da proteinúria (GOSMANOV et al, 2014; STANTON, 2014a). Desta forma, a triagem e o diagnóstico da DRD são baseados na mensuração da EUA (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

As diretrizes atuais recomendam a determinação da EUA em amostra isolada de urina, coletada aleatoriamente ou, preferencialmente, coletada como primeira urina da manhã, devido à acurácia diagnóstica e facilidade deste tipo de coleta (ADA, 2016; SBD, 2015-2016). A coleta de amostra de urina de 24 horas oferece maior dificuldade para o paciente e confere pouco poder preditivo ou acurácia (ADA, 2016).

Na amostra isolada de urina, pode ser realizada a determinação da razão albumina/creatinina (uACR) ou a determinação somente da concentração de albumina, sem a mensuração simultânea de creatinina. Esta última possui a vantagem de apresentar menor custo. No entanto, segundo as diretrizes da *American Diabetes Association* (ADA) (2016) esta medida isolada de albumina não é recomendada, por ser suscetível a resultados falsos positivos e falsos negativos devido às diferenças na concentração da urina do paciente inerentes a seu estado de hidratação.

Devido à variabilidade da EUA, duas a três amostras de urina devem ser coletadas durante um período de 3 a 6 meses, para confirmar o aumento da EUA (ADA, 2016; SBD,

2015-2016). É recomendado evitar a determinação da EUA em condições que causam sua elevação transitória, incluindo hipertensão arterial não controlada, insuficiência cardíaca congestiva, infecção do trato urinário, hematuria, hiperglicemia grave, gravidez, exercício extenuante nas 24 horas que antecedem a coleta da amostra e febre (ADA, 2016).

Além disso, é necessário definir em qual faixa de EUA o paciente será classificado. Para tal, 2 das 3 amostras coletadas devem estar na mesma faixa de EUA (ADA, 2016; NKF-KDOQI, 2012). A NKF-KDOQI estratifica os pacientes com DRD de acordo com a EUA em diferentes categorias:

1. Microalbuminúria: condição associada com a excreção de pequenas quantidades de albumina na urina. A função renal está tipicamente preservada, porém existe um elevado risco de progressão para a macroalbuminúria;

2. Macroalbuminúria: condição acompanhada por marcada elevação da EUA e declínio na função renal, o que é evidenciado pela TFG. Geralmente, ocorre o desenvolvimento de hipertensão e existe um elevado risco de progressão para doença renal em estágio final.

Recentemente, as diretrizes da *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (KDIGO, 2013), que representam as recomendações de nefrologia, propuseram uma nova classificação para a albuminúria (classes A1, A2 e A3). As classes A2 (albuminúria elevada) e A3 (albuminúria muito elevada) fazem correspondência às faixas de micro e macroalbuminúria respectivamente. Entretanto, reforça-se o abandono destes últimos termos. Os pontos de corte para as diferentes categorias de albuminúria preconizados pelas diretrizes da NKF-KDOQI e da KDIGO são similares e estão demonstrados na Tabela 1.

Já a ADA define duas categorias distintas de uACR: uACR <30 mg/g creatinina é definida como sendo normal e uACR ≥30 mg/g creatinina é definida como sendo aumentada (ADA, 2016). A classificação em uACR aumentada foi adotada em substituição aos termos microalbuminúria e macroalbuminúria. No entanto, estes termos ainda são amplamente utilizados (SBD, 2015-2016). Embora a KDIGO confirme esta modificação de nomenclatura, ainda divide a EUA em três faixas, conforme citado anteriormente.

A definição da ADA também foi adotada pela SBD. Os valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico da DRD preconizados pela SBD estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 1 – Categorias de excreção urinária de albumina conforme as diretrizes da *National Kidney Foundation and Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-KDOQI) e *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO).

Categorias de albuminúria	NFK-KDOQI			KDIGO		
	Normal	Microalbuminúria	Macroalbuminúria	A1 (Normal)	A2 (Elevada)	A3 (Muito elevada)
EUA, mg/24h	<30	30–300	>300	<30	30–300	>300
uACR, mg/g	<30	30–300	>300	<30	30–300	>300

Fonte: Adaptado de Gosmanov et al., 2014. EUA, excreção urinária de albumina; uACR, razão albumina/creatinina urinária.

Tabela 2 – Valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de doença renal do diabetes, conforme as diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Amostra	Valores
Urina casual	Concentração de albumina > 14 mg/L
Urina casual	Índice albumina/creatinina ≥ 30 mg/g
Urina de 24 horas	Concentração de albumina ≥ 30 mg/24 h

Fonte: Adaptado de Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016.

A função renal também deve ser avaliada rotineiramente com a medida da albuminúria, através da determinação da creatinina sérica e cálculo da TFG estimada. A TFG é útil para o estabelecimento do diagnóstico de doença renal crônica (DRC), independentemente do diagnóstico de DRD (ADA, 2016; NKF-KDOQI, 2012). Além disso, as informações de EUA e TFG estimada permitem determinar o estágio da DRC e monitorar sua progressão, se esta estiver presente (ADA, 2014).

A TFG deve ser estimada por meio de equações que empreguem a creatinina sérica e sejam ajustadas para idade, gênero e etnia (SBD, 2015-2016). É reportada pelos laboratórios clínicos ou pode ser calculada pelo uso de fórmulas como a *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) (LEVEY et al., 2006) e *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) (LEVEY et al., 2009). A utilização desta última equação é recomendada pelas diretrizes mais recentes da KDIGO (KDIGO, 2013), da ADA (ADA, 2016) e da SBD (2015-2016), uma vez que possui melhor acurácia do que as desenvolvidas anteriormente (Cockcroft-Gault e MDRD), especialmente na faixa de normalidade. A

classificação de doença renal da NKF (Tabela 3) é baseada no dano renal (uACR \geq 30 mg/g creatinina) e na TFG estimada.

Tabela 3 – Estágios da Doença Renal Crônica.

Estágio	Descrição	TFG (mL/min/1,73m²)
1	Dano renal* com TFG normal ou aumentada	\geq 90
2	Dano renal* com TFG levemente reduzida	60–89
3	TFG moderadamente reduzida	30–59
4	TFG severamente reduzida	15–29
5	Insuficiência renal	<15 ou diálise

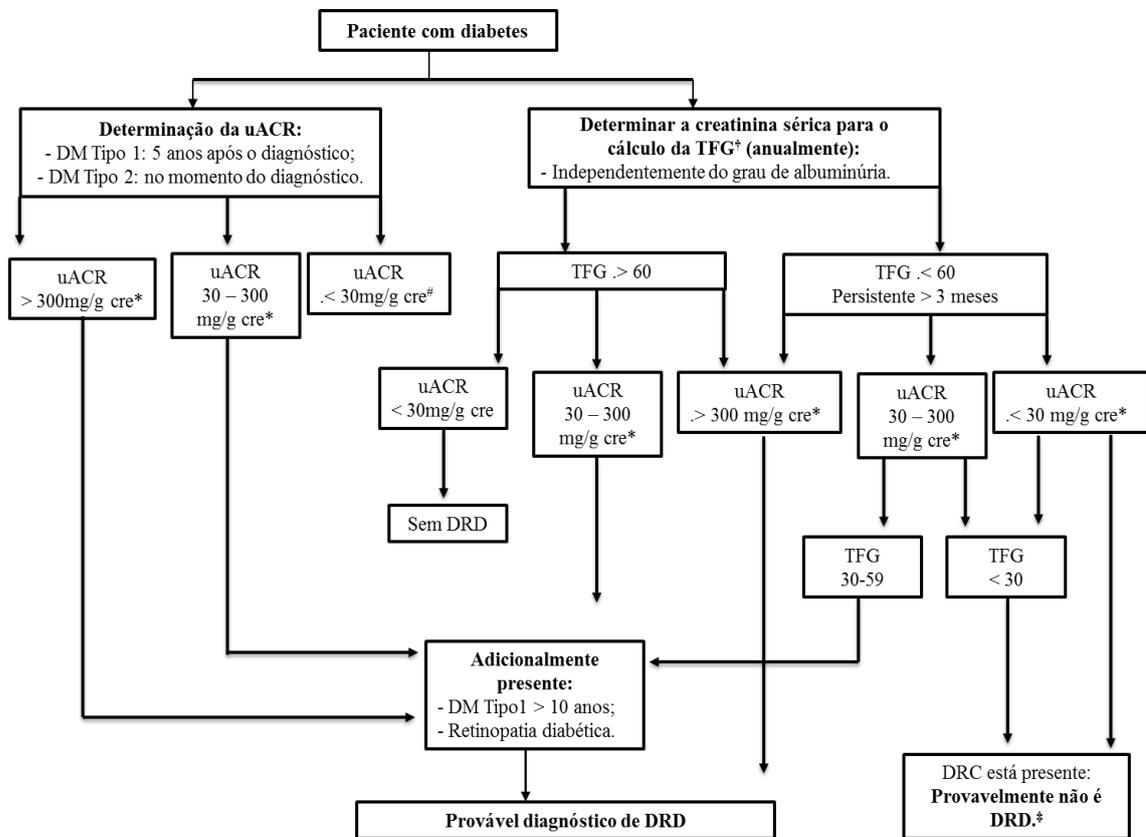
Fonte: Adaptado de ADA, 2016. TFG, taxa de filtração glomerular. *Dano renal é definido como anormalidades em testes patológicos, sanguíneos, urinários ou de imagem.

A DRD é uma patologia de natureza progressiva e a maioria dos pacientes desenvolve albuminúria gradualmente, o que é acompanhado por uma redução na TFG. Sendo assim, não é usual que o paciente apresente marcada redução da TFG na ausência de albuminúria. Desta forma, uma avaliação clínica criteriosa combinada à avaliação da albuminúria e dos níveis de TFG pode facilitar, além de tornar mais preciso o diagnóstico de DRD (GOSMANOV et al., 2014). Para entender melhor este conceito, a NFK-KDOQI desenvolveu uma grade de combinações de diferentes concentrações de albuminúria e TFG (NKF-KDOQI, 2012), conforme demonstrado na Figura 1.

Conforme as diretrizes da ADA, da NFK-KDOQI e da SBD é recomendado que a triagem para DRD em pacientes com DM seja realizada anualmente e seja baseada na medida da albuminúria e na estimativa da TFG. Em pacientes com DM tipo 1, a triagem da albuminúria deve ocorrer 5 anos após o diagnóstico da doença. No entanto, pacientes com DM tipo 1 que se encontrem na puberdade ou com DM persistentemente descompensado têm de ser rastreados independentemente dessas indicações (SBD, 2015-2016).

Já no DM tipo 2, a triagem para DRD deve ocorrer a partir do diagnóstico, devido à incapacidade de se estabelecer o momento do início da doença (ADA, 2016; NKF-KDOQI, 2012). A ADA também recomenda que a avaliação da EUA seja realizada anualmente em pacientes diabéticos que apresentem hipertensão arterial como comorbidade (ADA, 2016).

Figura 1 – Triagem e diagnóstico da DRD.



Fonte: Adaptado de GOSMANOV et al, 2014. DM, Diabetes *mellitus*; DRC, doença renal crônica; DRD, doença renal do diabetes; TFG, taxa de filtração glomerular estimada; uACR, razão albumina/creatinina urinária. * Resultado inicial deve ser confirmado durante um período de 3 a 6 meses, e 2 dos 3 testes devem se encaixar na mesma categoria para a classificação; # repetir anualmente; † TFG expressa em mililitros por minuto por 1,73m²; ‡considerar outras etiologias da DRC.

1.1.1.2 História natural da doença

Aproximadamente 20 a 40% dos pacientes com diabetes irão desenvolver microalbuminúria em até 10 a 15 anos após o diagnóstico da doença e, em torno de 80 a 90% destes, a microalbuminúria irá progredir para estágios mais avançados (REMUZZI et al., 2002). Neste sentido, a história natural da DRD é dividida em cinco estágios clínicos, que evoluem gradualmente com a duração da doença (GONZALEZ SUAREZ et al., 2013).

O primeiro estágio tem início antes mesmo da presença de dano renal (NELSON et al., 1993; RABKIN et al., 2003; RUDBERG e OSTERBY, 1997). Este estágio caracteriza-se pela vasodilatação renal e hiperfiltração glomerular reversível, que ocorrem no início do diabetes e são resultantes de alterações funcionais no néfron a nível de glomérulo. Alguns dos fatores

que podem contribuir para hiperfiltração incluem a hiperglicemia, a secreção de prostaglandinas e a reabsorção aumentada de sódio e glicose nos túbulos proximais (ISMAIL et al., 1999). A hiperfiltração glomerular é o primeiro sinal clínico sugestivo de DRD, sendo observada em 70% e 50% dos pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2, respectivamente (HELAL et al., 2012). Devido ao aumento na pressão intraglomerular, a elevação na TFG pode exceder 120 mL/min/1,73m² (ESPINEL et al., 2015). Em alguns pacientes, a hiperfiltração é sucedida pelo desenvolvimento de albuminúria (LIN et al., 2016).

O segundo estágio é caracterizado por filtração glomerular normal e normoalbuminúria (uACR <30 mg/g creatinina) (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). Durante esta fase, há o desenvolvimento de lesões morfológicas sem o aparecimento de sinais clínicos da doença (GONZALEZ SUAREZ et al., 2013). Desta forma, cabe salientar que alguns pacientes apresentam alterações renais patológicas e declínio progressivo da função renal mesmo quando os níveis de EUA estão normais (MATHESON et al., 2010). A anormalidade estrutural mais precoce no diabetes é o espessamento da membrana basal glomerular (FORBES e COOPER, 2013).

No terceiro estágio, a filtração glomerular ainda é normal e ocorre o aparecimento do primeiro sinal clínico da DRD, a microalbuminúria. Esta fase é também chamada de DRD incipiente, e se desenvolve entre 5 e 10 anos após o diagnóstico de diabetes (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). Uma elevação lenta e progressiva da EUA com o passar dos anos é uma característica deste estágio. Geralmente, existe dano endotelial na ausência de lesões renais específicas e esta fase está associada com o início da patologia renal avançada (PAPALE et al., 2010). O estágio seguinte corresponde à chamada DRD manifesta ou evidente e ocorre após 10 a 20 anos da evolução do diabetes (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). É caracterizado pela presença de macroalbuminúria (uACR ≥ 300 mg/g creatinina), a qual geralmente é acompanhada por uma redução progressiva na TFG (PACKHAM et al., 2011). Finalmente, o último estágio da DRD corresponde à doença renal em estágio final, definida pela presença de sinais e sintomas de insuficiência renal que necessitem de terapia de reposição renal (NKF-KDOQI, 2012).

As principais alterações fisiopatológicas na DRD, a nível de glomérulo, incluem o espessamento da membrana basal glomerular, a expansão mesangial e a esclerose glomerular (alteração de Kimmelstiel-Wilson). No início da DRD, a hipertrofia tubular está presente, entretanto a fibrose intersticial com atrofia tubular eventualmente se desenvolvem, juntamente com hialinose dos vasos sanguíneos renais. Em casos avançados, encontram-se infiltrados de

macrófagos e linfócitos-T. Além disso, a nível ultra-estrutural, existe a perda de podócitos e redução da fenestração de células endoteliais (TOYODA et al., 2007; WEIL, et al., 2012).

É importante ressaltar que, embora a maioria dos pacientes desenvolva a história natural “clássica” apresentada acima, a DRD pode ser uma patologia de evolução mais heterogênea. Sendo assim, há outras possibilidades para sua evolução como, por exemplo, pacientes que apresentam deterioração inicial da TFG ou aqueles em que ocorre regressão espontânea da microalbuminúria para normoalbuminúria. Também existem casos nos quais a função renal reduzida é acompanhada, e não precedida, pela macroalbuminúria ou até mesmo pode estar presente em indivíduos com microalbuminúria, ou naqueles em que o nível de albuminúria retorna ao normal ou ainda em indivíduos nos quais a EUA permanece dentro da normalidade (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

Em aproximadamente 80% dos pacientes com DM tipo 1 não tratado e com albuminúria persistente, a EUA aumenta em torno de 10–20% anualmente, até o desenvolvimento da DRD manifesta. Após o desenvolvimento desta, a TFG declina a uma taxa de 2–20 mL/min a cada ano e a doença renal em estágio final se desenvolve em 50% dos pacientes dentro de um período de 10 anos, e em 75%, em 20 anos (MOLITCH et al., 2004). Alterações estruturais, incluindo o espessamento da membrana basal glomerular e a expansão mesangial, podem preceder a albuminúria e a TFG reduzida e podem ser detectadas de 2 a 8 anos antes do início do diabetes (DRUMMOND e MAUER, 2002). No entanto, há diversas evidências demonstrando que a remissão espontânea da microalbuminúria ocorre em aproximadamente 40% dos pacientes com DM tipo 1. Além disso, em torno de 30–40% dos pacientes com DM tipo 1 permanecem na faixa de microalbuminúria e não progridem para níveis mais elevados de albuminúria ($EUA \geq 300$ mg/24h) durante um período de 5 a 10 anos (de BOER et al., 2011a; de BOER et al., 2011b; MOLITCH et al., 2010; NKF-KDOQI, 2012).

No DM tipo 2, uma maior proporção de pacientes pode apresentar DRD no momento do diagnóstico de diabetes, uma vez que o DM tipo 2 pode permanecer desapercibido durante anos. Em torno de 20–40% dos pacientes com DM tipo 2 e microalbuminúria progridem para DRD manifesta e, após o desenvolvimento desta, aproximadamente 20% irá desenvolver doença renal em estágio final (BRUNO et al., 2003; MOLITCH et al., 2004).

1.1.1.3 Mecanismos patogênicos

A patogênese da DRD é complexa e ainda não está completamente elucidada (KITADA et al., 2014). Dentre os diversos mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da DRD e de seus desfechos, está a interação entre alterações metabólicas e hemodinâmicas induzidas pela hiperglicemia. As células renais respondem à condição de hiperglicemia desencadeando diversos processos intracelulares, incluindo a alteração da produção de energia celular, a ativação de diferentes enzimas (por exemplo, proteína quinase C (PKC) e aldose redutase) e o aumento do fluxo de polióis e hexosaminas, além da geração de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e de EROs (FORBES e COOPER, 2013; KANWAR et al., 2011). As células teciduais que são propensas às complicações decorrentes do diabetes não são capazes de modular o transporte de glicose e prevenir seu acúmulo intracelular. Desta forma, o processo de produção de energia intracelular está alterado no contexto do diabetes devido ao excesso de disponibilidade de substrato, no caso a glicose (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

A PKC é uma enzima que se destaca entre as quinases sinalizadoras que atuam na patogênese da DRD. Uma vez ativada por múltiplas rotas, incluindo diacilglicerol (DAG), via dos polióis e AGEs, a PKC influencia diversas vias (óxido nítrico sintase endotelial, endotelina-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), fator de transcrição nuclear κB (NF- κB), NADPH oxidorreductase). Isto resulta em modificações fisiopatológicas que alteram o fluxo sanguíneo e a permeabilidade capilar, além de aumentar a produção de proteínas de matriz extracelular (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

Ainda, em condições em que glicose intracelular está elevada, a glicólise é desviada da rota da frutose-6-fosfato para a UDP-N-acetilglicosamina, o qual é um precursor de proteínas de matriz extracelular como, por exemplo, os proteoglicanos (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). O excesso de glicose intracelular também é desviado para a via dos polióis, onde ocorre redução à sorbitol através da enzima aldose redutase. A ativação desta enzima resulta em depleção do NADPH e da glutatona reduzida, redução na atividade da glutatona peroxidase, da razão NADH/NAD⁺ e diminuição dos níveis de óxido nítrico. Isto contribui para o estresse oxidativo e osmótico (SRIVASTAVA et al., 2005; WILLIAMSON et al., 1993).

Sob condições de hiperglicemia, os AGEs são formados em elevadas concentrações, através de reações não-enzimáticas entre açúcares redutores com grupos amino livres de

proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Os AGEs são capazes de modular vários eventos a nível intracelular, como a ativação da PKC e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e de fatores de transcrição, como o NF- κ B. Estes eventos regulam a expressão de diversas citocinas e fatores de crescimento, especialmente o TGF- β 1, que desempenha um papel chave na esclerose glomerular e fibrose túbulo-intersticial (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). Os AGEs também podem desencadear seus efeitos ao interagir com receptores específicos (RAGEs) presentes em diferentes células, incluindo podócitos, células mesangiais e epiteliais tubulares. A interação AGEs-RAGEs também determina a ativação de diversas vias pró-oxidantes e pró-inflamatórias intracelulares. Extracelularmente, quando os AGEs são formados em sítios críticos de enzimas ou proteínas, eles são capazes de alterar a estrutura e a função dessas moléculas no plasma, bem como na parede arterial, mesângio e membrana basal glomerular (BUSCH et al., 2010; HUEBSCHMANN et al., 2006; SHIMOIKE et al., 2000; TAN et al., 2007). Além disso, a glicação de proteoglicanos sulfatados pode reduzir sua eletronegatividade, modificando as propriedades de filtração carga-seletiva da membrana basal (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

O estresse oxidativo também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da DRD (GIACCO e BRONWLEE, 2010). A capacidade dos diferentes tipos celulares de processar a glicose é o fator determinante na produção excessiva de EROs induzida pela hiperglicemia. Neste contexto, o controle do influxo de glicose é crítico para manter a homeostase intracelular. No entanto, certas populações de células renais, como as endoteliais, mesangiais, epiteliais e tubulares, são particularmente suscetíveis, uma vez que são incapazes de diminuir o transporte de glicose adequadamente (HAYDEN et al., 2005). A produção de EROs atua em diversas vias, incluindo a ativação da PKC, o aumento da formação de AGEs, a ativação da via dos polióis e a hiperatividade da via das hexosaminas. Estes fatores podem dar início ou mesmo perpetuar a geração intracelular de EROs (VASAVADA e AGARWAL, 2005).

Dentre as alterações hemodinâmicas em pacientes com diabetes estão a hipertensão intraglomerular, a hiperfiltração e a elevação da pressão arterial sistêmica. O estado de hiperglicemia prejudica o mecanismo fisiológico auto-regulatório que mantém a pressão glomerular capilar normal, protegendo as estruturas intra-glomerulares da elevação da pressão arterial sistêmica. Consequentemente, a pressão sistêmica é rapidamente transmitida para os capilares glomerulares, resultando em elevação da pressão hidráulica transcápsular e no desenvolvimento de hiperfiltração (MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014).

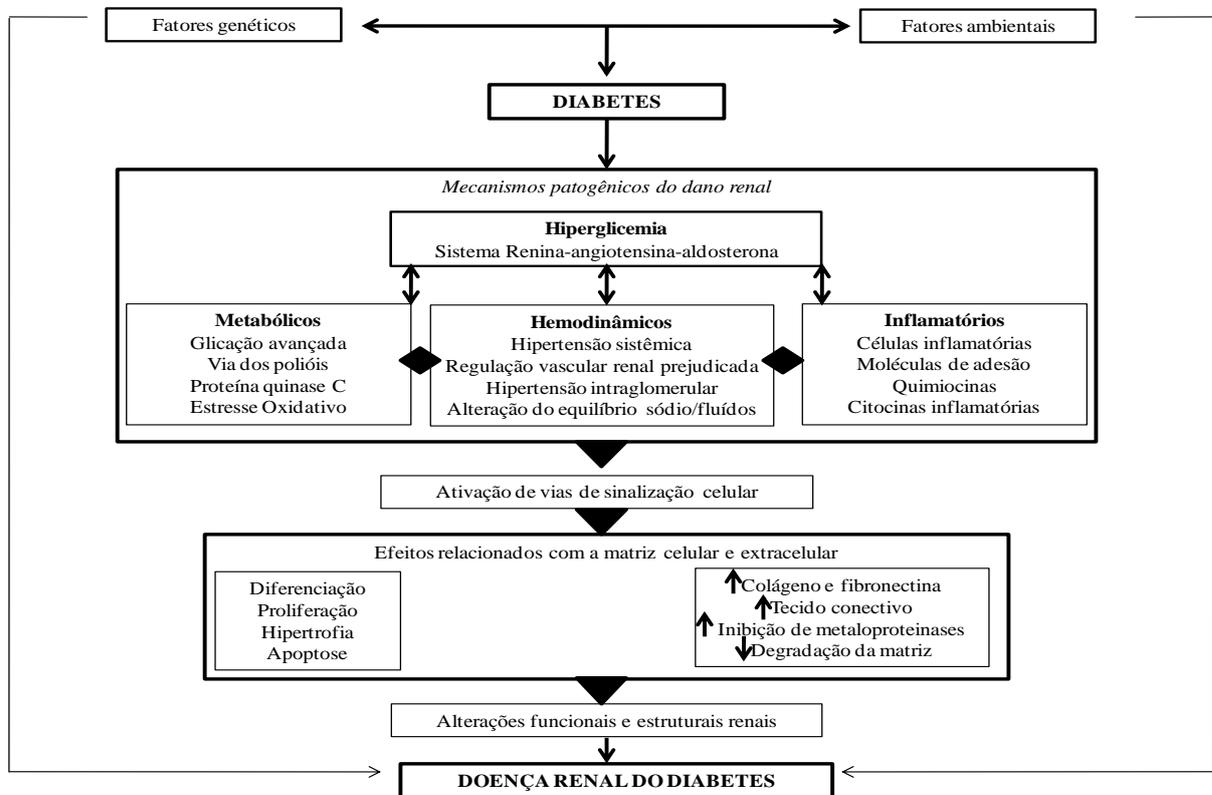
Um dos elementos mais importantes que participa das disfunções hemodinâmicas na DRD é o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual está diretamente envolvido com a regulação da pressão sanguínea e volume de fluidos, participando no dano vascular e na inflamação. A hiperglicemia induz a ativação do SRAA localmente e aumenta a produção de angiotensina II, o que leva à vasoconstrição arteriolar eferente e ativa múltiplas vias de sinalização intracelulares envolvidas na inflamação, crescimento de células renais, mitogênese, apoptose, migração e diferenciação (MACIA-HERAS et al., 2012).

De fato, os fatores metabólicos e hemodinâmicos são críticos para o desenvolvimento e progressão da DRD. No entanto, os mecanismos que levam desde a hiperglicemia crônica até o dano renal no DM não podem ser explicados somente por estes elementos. Estudos recentes têm indicado que estes fatores contribuem apenas parcialmente para um cenário muito mais complexo, que envolve a interação de determinantes genéticos e ambientais, os quais precipitam uma série de eventos fisiopatológicos (MARTINI et al., 2008; WOLF, 2004). Além disso, tem sido demonstrado que a inflamação é um processo essencial no desenvolvimento das complicações do DM, especialmente na DRD (LUIS RODRÍGUEZ et al., 2012). Os principais fatores e rotas destes mecanismos estão descritos na Tabela 4. Uma representação esquemática dos mecanismos patogênicos envolvidos na DRD é demonstrada na Figura 2.

Tabela 4 – Principais fatores e rotas envolvidas na patogênese da doença renal do diabetes.

Hemodinâmicos		
Prostanóides	SRAA	Óxido nítrico
VEGF	TGF- β 1	
Metabólicos		
Transportadores de glicose: GLUT-1, GLUT-4, glicoquinase/hexoquinase		
AGEs e RAGEs	Aldose redutase	DAG
NADPH oxidorreductase	PKC	Estresse oxidativo
UDP-N-acetilglicosamina		
Fatores de crescimento		
TGF- β 1	VEGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF)
Inflamatórios		
Proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1)		
Moléculas de adesão: molécula de adesão intercelular tipo1 (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular tipo 1 (VCAM-1)		
Citocinas inflamatórias: IL-1, IL-6, interleucina 18 (IL-18) e TNF- α		
Fatores de transcrição: NF- κ B		

Figura 2 – Resumo esquemático dos mecanismos patogênicos envolvidos na doença renal do diabetes.



Fonte: Adaptado de Mora-Fernández et al., 2014.

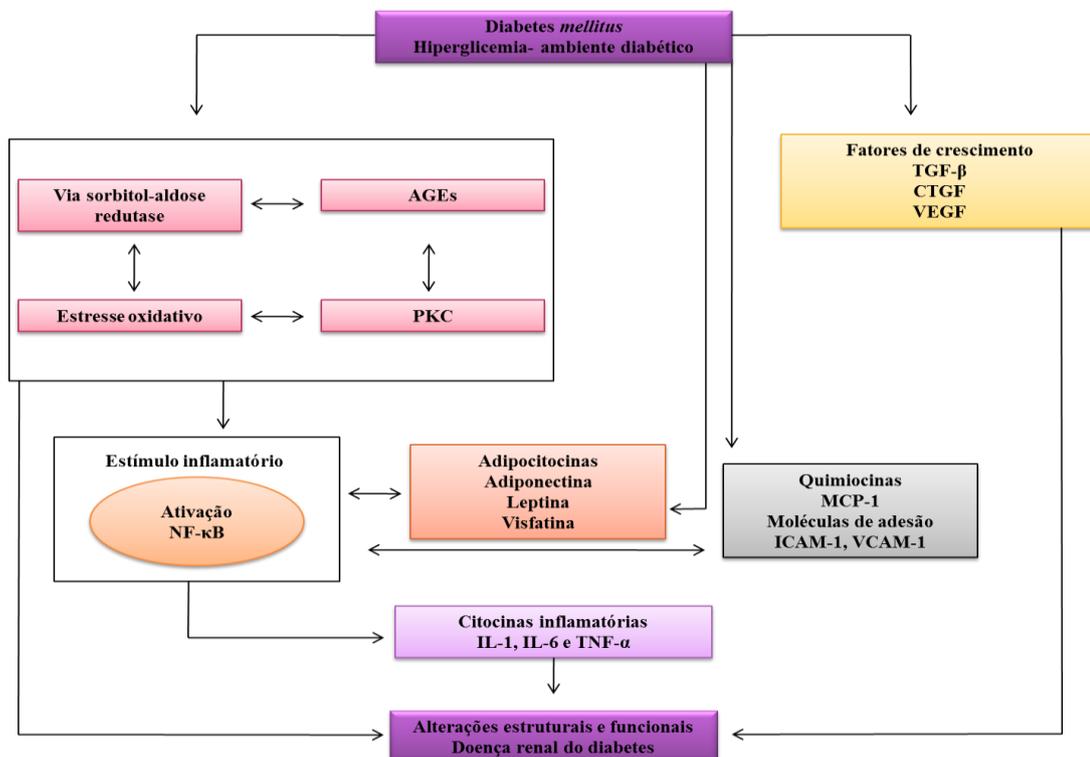
1.1.2 Doença Renal do Diabetes e inflamação

Nas últimas décadas, diversas evidências têm suportado a noção de que a inflamação crônica e ativação do sistema imune inato estão intimamente associadas à patogênese do DM. Diversos componentes da patogênese do DM, como a hiperglicemia, o SRAA e o estresse oxidativo podem ativar o processo inflamatório renal, o que resulta em infiltração de monócitos e linfócitos, os quais secretam diversas moléculas, incluindo as citocinas pró-inflamatórias e as EROs. Esta atividade leucocitária amplifica a resposta inflamatória e promove o dano celular e o desenvolvimento de fibrose (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Além disso, diversas células intrínsecas renais, incluindo células mesangiais, glomerulares e tubulares epiteliais, são capazes de sintetizar citocinas inflamatórias (NAKAMURA et al., 1993; SUGIMOTO et al., 1999). Sendo assim, a associação entre o estado inflamatório e o início e a evolução da DRD envolve um conjunto de processos complexos, onde diversas moléculas inflamatórias e células do sistema imune

desempenham importantes papéis (LUIS RODRÍGUEZ et al., 2012; MORA-FERNÁNDEZ et al., 2014). A Figura 3 representa um resumo esquemático da participação de mecanismos inflamatórios na fisiopatologia da DRD.

Os elementos celulares envolvidos na inflamação são monócitos, linfócitos e macrófagos. Os macrófagos são reconhecidos como as principais células inflamatórias envolvidas no dano renal. Seu acúmulo está relacionado com a severidade da DRD em modelos experimentais. Estas células são responsáveis pelo chamado “remodelamento renal”. Dois subtipos de macrófagos estão especialmente envolvidos na DRD: subtipo 1 (M1) e subtipo 2 (M2). Os macrófagos M1 são ativados pelas células Th1 e capazes de aumentar a resposta inflamatória pela expressão de citocinas, como TNF- α e IFN- γ . Os macrófagos M1 também intensificam a resposta inflamatória pela superprodução de EROs. Já os macrófagos M2, são ativados por células Th2 e promovem o reparo, o remodelamento e a neovascularização tecidual através da expressão de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a IL-10. Os linfócitos T além de possuírem efeitos citotóxicos nos rins, promovem a ativação de macrófagos teciduais (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014).

Figura 3 – Resumo esquemático da participação de mecanismos inflamatórios na fisiopatologia da doença renal do diabetes.



Evidências corroboram que os macrófagos são as principais células inflamatórias infiltradas nos rins no contexto da inflamação crônica subclínica associada ao dano renal no DM. Após o acúmulo no glomérulo e/ou no interstício, os macrófagos dão início a uma série de eventos envolvendo interações com as células renais, induzindo-as a secretar citocinas pró-inflamatórias, as quais resultam no dano renal associado ao DM. No “ambiente diabético”, alguns fatores incluindo a hiperglicemia, os AGEs, a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) e as EROs, bem como a angiotensina II podem ativar as células renais intrínsecas através da indução de proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs), como a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) e a proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK). Estas, por sua vez, aumentam a secreção de quimiocinas, incluindo a MCP-1 e o fator estimulador de colônias-1 (CSF-1), bem como a expressão de moléculas de adesão como a VCAM e a ICAM (LAMPROPOULOU et al., 2014; SUN e KANWAR, 2015).

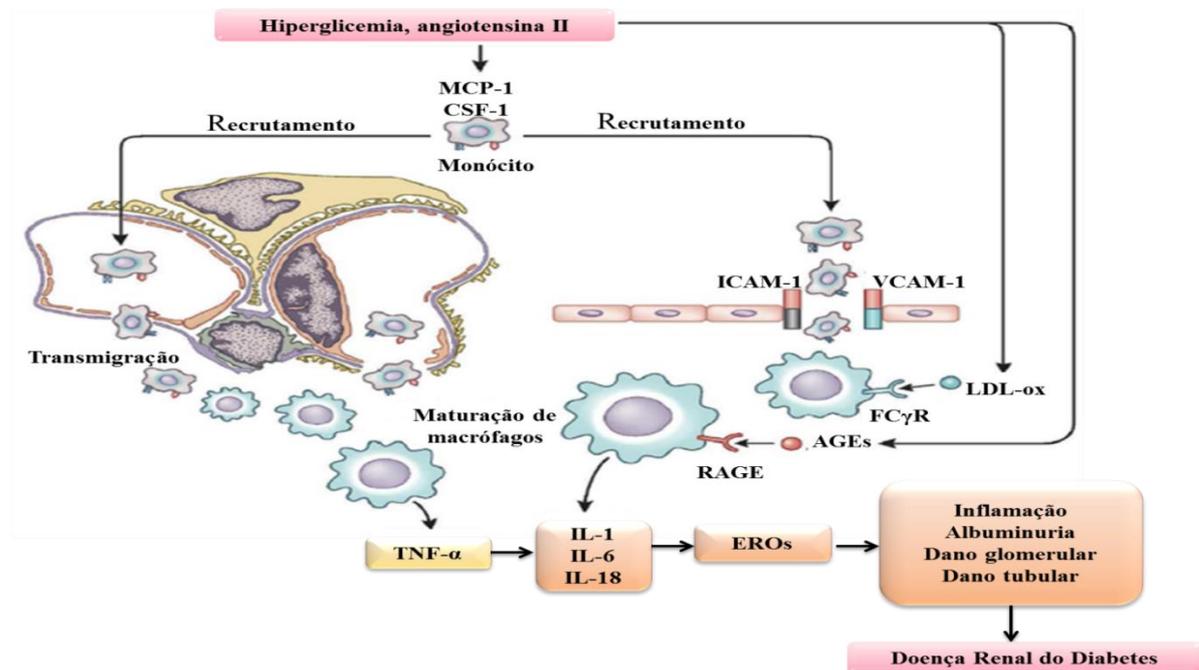
Esta cascata de sinalização facilita o recrutamento de monócitos e linfócitos-T, os quais, em conjunto com as células do parênquima renal, produzem citocinas pró-inflamatórias e EROs de uma maneira autócrina e parácrina. Desta forma, é estabelecido um ciclo vicioso de dano inflamatório nos compartimentos glomerular e túbulo-intersticial dos rins. As principais citocinas inflamatórias que são induzidas neste cenário incluem o TNF- α , a IL-1, a IL-6 e a IL-18. Existe também aumento da ativação do NF- κ B, o principal regulador da imunidade inata, o que contribui para promover a progressão da DRD (LAMPROPOULOU et al., 2014; SUN e KANWAR, 2015). Na Figura 4, está representado um desenho esquemático contendo os eventos mais relevantes que contribuem para o dano renal associado à inflamação no contexto do DM.

As moléculas inflamatórias associadas com a DRD incluem as moléculas de adesão e os fatores de transcrição, além das citocinas. As moléculas de adesão celular são proteínas localizadas na superfície das células e estão envolvidas na ligação com outras células ou com a matriz extracelular (LUIS RODRÍGUEZ et al., 2012), promovendo a fixação de leucócitos na parede vascular e sua penetração na camada íntima arterial (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014).

Clinicamente, foi demonstrado que a infiltração de macrófagos e a expressão de ICAM-1 estão elevadas nos rins de pacientes com DRD (HIRATA et al., 1998) e que pacientes com DM tipo 1 e tipo 2 apresentam concentrações urinárias e séricas de ICAM-1 mais elevadas, quando comparados com indivíduos sem dano renal (CLAUSEN et al., 2000; RUBIO-GUERRA et al., 2009). Além disso, foi relatado que os níveis circulantes e renais de VCAM-1 estão elevados em pacientes com DRD (MURAKAMI et al., 2001; SERON et al.,

1991) e em pacientes diabéticos com albuminúria, os quais apresentam maior risco de doença renal em estágio final e morte (JENKINS et al., 2007). Também foi reportado que os níveis de VCAM-1 se correlacionam com a severidade da albuminúria em pacientes diabéticos hipertensos (RUBIO-GUERRA et al., 2009).

Figura 4 – Desenho esquemático representando a sequência de eventos relevantes ao dano inflamatório renal durante a progressão da DRD.



Fonte: Adaptado de Sun e Kanwar, 2015. Hiperglicemia, produtos finais de glicação avançada (AGEs), lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox) e angiotensina II induzem a expressão de proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1) e fator estimulador de colônias-1 (CSF-1), bem como da molécula de adesão intercelular tipo 1 (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular tipo 1 (VCAM-1) em vários compartimentos renais. Isto aumenta o recrutamento de monócitos/macrófagos para o rim sob condições de hiperglicemia. Além disso, a expressão aumentada de MCP-1 e CSF-1 nas células renais promove a transmigração endotelial de macrófagos. Os AGEs se ligam a seus receptores (RAGEs), expressos na superfície dos macrófagos, o que promove a ativação e maturação de monócitos/macrófagos e induz a liberação da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral α (TNF- α) e sua elevada expressão. Com isso, ocorre o estímulo da expressão de outras citocinas, incluindo a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 18 (IL-18). Consequentemente há estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à inflamação crônica subclínica (micro-inflamação), dano glomerular e tubular e, por último, albuminúria.

Dentre os fatores de transcrição envolvidos na patogênese da DRD, destaca-se o NF- κ B. Este fator de transcrição controla a expressão de uma ampla variedade de genes, incluindo os envolvidos na codificação de moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas inflamatórias, óxido nítrico sintase e outras moléculas relacionadas à inflamação e à proliferação celular (GUIJARRO, 2001). A ativação do NF- κ B ocorre por diversos estímulos (WADA e

MAKINO, 2013), dentre eles citocinas inflamatórias e alterações metabólicas, como a hiperglicemia. Concentrações elevadas de glicose produzem a ativação do NF- κ B em várias células como, por exemplo, células endoteliais e vasculares do músculo liso e células do túbulo proximal (PIEPER, 1997; YERNENI et al., 1999). Neste contexto, o NF- κ B é um fator central na interação entre diferentes fatores, moléculas e vias que resultam em alterações funcionais e estruturais na DKD, tais como o SRAA e o acúmulo de AGEs (CHUANG e GUH, 2001).

1.1.2.1 Citocinas inflamatórias

As citocinas são um grupo de polipeptídios de baixo peso molecular e farmacologicamente ativos, que apresentam efeitos autócrinos, parácrinos e justácrinos, exercendo atividades muito complexas. Estas moléculas são subdivididas em várias classes, como quimiocinas, fatores de crescimento, interleucinas, fatores de necrose tumoral e interferons. A função clássica das citocinas está relacionada à regulação do processo inflamatório, no entanto também são efetoras essenciais do sistema imune. São produzidas por diversas células do organismo e atuam sobre diferentes células-alvo. Uma determinada citocina pode ser responsável pela ativação de diversas reações dependendo do tipo de célula, tempo de ação e ambiente. Além disso, as citocinas podem compartilhar subunidades de receptores e vias de sinalização intracelular, agindo de maneira sinérgica (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014) para amplificar seus efeitos ou ainda induzindo a síntese ou expressão de outras citocinas quando necessário (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Na Tabela 5 encontram-se algumas das diversas ações das citocinas que contribuem para a patogênese da DRD.

As quimiocinas macrófago-específicas são componentes ativos do recrutamento de células inflamatórias nos rins e estão presentes na fase precoce do dano renal (EL MESALLAMY et al., 2012). Dentre estas, a MCP-1 é a mais potente (GU et al., 1999) e desempenha um importante papel na patogênese da DRD (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). A MCP-1 é expressa por monócitos, células endoteliais vasculares, células musculares lisas, células mesangiais glomerulares e células osteoblásticas. Muitas citocinas podem estimular a produção de MCP-1, incluindo IL-1, TNF- α e TGF- β (CRAIG, 2006; NIU, 2009). Além disso, a MCP-1 pode promover a transformação de monócitos em macrófagos, os quais produzem diversas citocinas, como IL-6 e TNF- α (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Em estudos clínicos têm sido demonstrado que níveis elevados de MCP-1

na urina e em biópsias renais estão associados com o recrutamento de macrófagos, albuminúria, dano túbulo-intersticial e progressão da DRD (CHIARELLI et al., 2002; MORII et al., 2003; TAKEBAYASHI et al., 2006; TASHIRO et al., 2002).

Tabela 5 – Efeitos relacionados às citocinas pró-inflamatórias potencialmente envolvidos no desenvolvimento e progressão do dano renal no diabetes.

Aumento da expressão e da síntese de quimiocinas, moléculas de adesão, fatores de transcrição, citocinas, fatores de crescimento e mediadores da inflamação
Alteração da síntese de prostaglandinas e ácido hialurônico
Indução da produção de EROs
Indução de anormalidades hemodinâmicas intraglomerulares
Aumento da permeabilidade de células endoteliais vasculares
Indução da proliferação e contração celular e inibição do relaxamento do endotélio
Aumento da expressão de fibronectina
Indução da apoptose e necrose celular
Indução da hipertrofia glomerular
Estímulo da produção do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)
Redução do fator inibidor tecidual e expressão de trombomodulina
Estímulo do recrutamento e ativação de células inflamatórias
Indução da expressão de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade
Alteração da reabsorção tubular de sódio, conteúdo protéico renal e volume glomerular
Citotoxicidade direta às células renais

Fonte: Adaptado de Navarro-González e Mora-Fernández, 2008; Luis-Rodríguez et al., 2012.

Os fatores de crescimento são moléculas que participam na regulação da formação e da renovação da matriz extracelular. Evidências têm sugerido que desempenham um importante papel na patogênese das complicações do DM. Neste contexto, o TGF- β 1 é considerado o principal fator pró-fibrótico na DRD (LUIS RODRÍGUEZ et al., 2012). É uma citocina e também é considerado um fator de transcrição (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Sua atividade é essencial na indução e manutenção da fibrose intersticial, devido a seu efeito regulatório na proliferação celular e no estímulo da síntese e inibição da degradação de matriz extracelular (BORDER et al., 1996; ZIYADEH e HAN, 1997).

O CTGF é ativado pelo TGF- β 1, sendo considerado o principal mediador dos seus efeitos. CTGF e TGF- β 1 apresentam propriedades fibrogênicas e angiogênicas em comum, incluindo o estímulo da adesão, da migração, da proliferação e da diferenciação celular e da produção de colágeno, desempenhando assim um importante papel na manutenção de lesões pró-fibróticas (PERBAL, 2004; RISER et al., 2000). Ambos, CTGF e TGF- β 1, estão ativados na DRD e há uma correlação entre suas concentrações (EL MESALLAMY et al., 2012). Além disso, o CTGF pode modular outros fatores como o VEGF (SCHMIDT-OTT, 2008), o qual está envolvido no processo de neovascularização renal e esclerose glomerular.

1.1.2.2 Interleucinas, fator de necrose tumoral α e interferon γ

As interleucinas são um grupo de citocinas produzido por diversas células em diferentes tecidos. De acordo com suas ações fisiológicas, as interleucinas são classificadas em moléculas pró-inflamatórias, como a IL-1 e IL-6, ou anti-inflamatórias, como a IL-10 (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). Cabe ressaltar que, um desequilíbrio entre as citocinas pró e as anti-inflamatórias tem sido observado em diversas patologias (DINARELLO, 1996). Na patogênese do DM tipo 2, por exemplo, o desequilíbrio entre as citocinas pró e as anti-inflamatórias pode apresentar-se como um fator chave (SCARPELLI et al., 2006). Alguns estudos têm investigado o papel das interleucinas no desenvolvimento e na progressão da DRD e demonstrado que a modulação de suas atividades pode representar uma importante estratégia terapêutica (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014; LUIS-RODRIGUEZ et al., 2012).

A família da IL-1 consiste em duas citocinas pró-inflamatórias, a interleucina 1 α (IL-1 α) e a interleucina 1 β (IL-1 β), e um agente anti-inflamatório de ocorrência natural, o antagonista do receptor de IL-1. Recentemente, também foi descrito que a IL-18 também é um membro da superfamília da IL-1 (BANERJEE e SAXENA, 2012). Os efeitos sistêmicos da IL-1 são refletidos na regulação da taxa metabólica basal, níveis sanguíneos de glicose, pressão arterial, metabolismo do ferro e remodelamento ósseo (DINARELLO, 1996). Além disso, a IL-1 tem emergido como uma molécula crítica vinculando o sistema imune e neuroendócrino, desempenhando um papel chave em processos como a regulação termostática, a percepção da dor e o controle do apetite (BIANCHI et al., 1998; INOUI, 2001; WATKINS e MAIER, 1999).

A IL-1 promove a expressão de fatores quimiotáticos e moléculas de adesão, o aumento da permeabilidade vascular, além de estimular a proliferação de células mesangiais e

a síntese de matriz extracelular (NAVARRO-GONZALEZ e MORA-FERNANDEZ, 2008; RIVERO et al., 2009). Especificamente, a IL-1 aumenta a produção de ICAM-1 e VCAM-1 por diferentes células renais, incluindo células mesangiais, endoteliais e epiteliais tubulares (BRADY, 1994; PARK et al., 2000). As alterações promovidas pela IL-1 na hemodinâmica intra-glomerular são secundárias às modificações na síntese de prostaglandinas pelas células mesangiais, especialmente prostaglandina E2, a qual está relacionada com o aumento da permeabilidade endotelial vascular (PFEILSCHIFTER et al., 1989; PFEILSCHIFTER e MUHL, 1990; ROYALL et al., 1990). Finalmente, a IL-1 aumenta a produção de ácido hialurônico pelas células epiteliais do túbulo proximal, o que está relacionado com a proliferação celular (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014). Em modelos experimentais de DRD, a expressão renal de IL-1 se apresentou elevada e se relacionou com a albuminúria e com o acúmulo de macrófagos (HASEGAWA et al., 1991; NAVARRO-GONZALEZ et al., 2006a; SASSY-PRIGENT et al., 2000).

A IL-6 é outra interleucina que tem sido estudada no contexto da DRD, devido a seus efeitos pleiotrópicos (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). A IL-6 possui muitas propriedades biológicas, como a indução da expressão de moléculas de adesão, bem como de outras citocinas. Sendo assim, esta citocina está relacionada com algumas anormalidades funcionais e estruturais relacionadas à DRD e à progressão do dano renal (GARCÍA-GARCÍA et al., 2014). Possui efeitos diretos nas células glomerulares e em células infiltradas, incluindo alterações na permeabilidade do endotélio glomerular, indução da proliferação de células mesangiais, aumento da expressão de fibronectina (COLEMAN e RUEF, 1992) e do espessamento da membrana glomerular basal (DALLA VESTRA et al., 2005; NOSADINI et al., 2000).

Em modelos experimentais, foi demonstrado que a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de IL-6 está aumentada no córtex renal de ratos diabéticos e está associada com a concentração urinária desta citocina e com o peso úmido do rim, um marcador de hipertrofia renal (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2006a; THOMSON et al., 2001). Já em estudos clínicos, foi reportado que os níveis séricos de IL-6 são mais elevados em pacientes com DRD, quando comparados com indivíduos sem DRD (SEKIZUKA et al., 1994; SHIKANO et al., 2000). Os níveis séricos de IL-6 também foram mais elevados em pacientes com macroalbuminúria e em pacientes com proteinúria, comparados àqueles com microalbuminúria (DALLA VESTRA et al., 2005; MORIWAKI et al., 2003; PICKUP et al., 2000). Em pacientes com DM 2, foi encontrada uma associação significativa entre níveis séricos de IL-6 e o espessamento da membrana basal, uma lesão crítica na DRD e um forte

preditor da progressão do dano renal (DALLA VESTRA et al., 2005; NOSADINI et al., 2000). Além disso, análises histopatológicas de amostras renais humanas demonstraram um aumento da expressão de IL-6 em células infiltradas no mesângio, interstício e túbulos, o que foi positivamente relacionado com a severidade da glomerulopatia (expansão mesangial) (SUZUKI et al., 1995). Todas estas observações clínicas e experimentais evidenciam o papel da IL-6 na progressão da DRD.

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica imunorregulatória produzida por células Th2, células T regulatórias e monócitos/macrófagos. É uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, que auxilia na regulação do sistema imune ao inibir de maneira potente a expressão e/ou a produção de citocinas pró-inflamatórias (LI e FLAVELL, 2008; MOORE et al., 2001), incluindo a produção de IL-6, IL-1 β , IL-1 α e TNF- α por macrófagos ativados, bem como a produção de IFN- γ por células T (D'ANDREA et al., 1993). Tem sido proposto que a IL-10 pode desempenhar um papel na patogênese da DRD. Em um estudo em ratos com glomerulonefrite induzida experimentalmente, utilizando anticorpo anti-membrana basal glomerular, demonstrou-se que o tratamento sistêmico com IL-10 reduziu significativamente o grau de proteinúria, inflamação sistêmica, bem como atenuou a lesão renal (HUANG et al., 2000). Esses ratos com glomerulonefrite mesangial proliferativa, que receberam tratamento com IL-10, mostraram um menor grau de lesões histológicas, proliferação celular limitada e uma menor expressão de mediadores inflamatórios (KITCHING et al., 2002).

Em estudos clínicos, foram encontrados níveis séricos elevados de IL-10 em indivíduos com DM tipo 1 (MYSLIWSKA et al., 2005) e tipo 2 (WONG et al., 2007; ZAMAUSKAITE et al., 1999) com DRD. Além disso, foi descrito que as concentrações séricas de IL-10 se correlacionam positivamente com EUA (ZHANG et al., 2014). Neste contexto, Mysliwska et al. (2005) sugeriram que a produção excessiva de IL-10 pode contribuir indiretamente para a progressão DRD, por outro lado, pode explicar relativamente o longo curso desta patologia. No entanto, os estudos associando IL-10 e DM tipo 2 são limitados a avaliação das concentrações séricas desta citocina e as contribuições existentes não são suficientes para esclarecer o seu papel causal ou protetor no dano renal associado ao DM.

O TNF- α é uma proteína transmembrana homotrimérica, com peso molecular de 34 kDa e, após clivagem pela enzima conversora do TNF- α 17 (ADAM-17), é liberado na circulação e se liga ao receptor de TNF 1 (TNFR1) ou receptor de TNF 2 (TNFR2) modulando uma série de respostas imunes e inflamatórias. É uma citocina pró-inflamatória que apresenta efeitos relevantes no dano renal associado ao DM (GARCÍA-GARCÍA et al.,

2014; SUN e KANWAR, 2015). De maneira similar a outras citocinas inflamatórias, a produção de TNF- α não está restrita somente às células hematopoiéticas, sendo também produzido por células renais intrínsecas, como células mesangiais, glomerulares, endoteliais, dendríticas e tubulares. No entanto, é produzido principalmente por monócitos/macrófagos e células T infiltrados nos rins, onde a hiperglicemia e os AGEs servem como potentes indutores da produção de TNF- α nas células renais (DONG et al., 2007; NAKAMURA et al., 1993; SUGIMOTO et al., 1999; SUN e KANWAR, 2015; ZHANG et al., 2007).

Quando o TNF- α se liga a seus receptores específicos, diversas ações podem ser desencadeadas nas células renais, incluindo a ativação de sistemas de segundos mensageiros e fatores de transcrição, bem como a síntese de citocinas (por exemplo, IL-1, IL-18) e fatores de crescimento, receptores, moléculas de adesão celular, enzimas envolvidas na síntese de outros mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda. Esta variedade de atividades biológicas resulta em diversos efeitos, tais como a apoptose e necrose, que desempenham importantes papéis no desenvolvimento do dano renal no DM. Contudo, o TNF- α também pode causar citotoxicidade direta às células renais, incluindo podócitos glomerulares e células tubulares, induzindo o dano renal, a apoptose e a necrose (NAVARRO-GONZALEZ e MORA-FERNANDEZ, 2008; NAVARRO-GONZALEZ et al., 2009; SUN e KANWAR, 2015).

Além disso, o TNF- α pode produzir alterações no fluxo sanguíneo intra-glomerular e redução na filtração glomerular como consequência de um desequilíbrio entre fatores que promovem a vasoconstrição e vasodilatação (BAUD et al., 1998; SUN e KANWAR, 2015). O TNF- α também pode causar mudanças na permeabilidade das células endoteliais, através da modificação da distribuição de moléculas envolvidas no processo de adesão celular e nas junções celulares (WÓJCIAK-STOTHARD et al., 1998). Esta ação afeta de maneira adversa a integridade da barreira de filtração glomerular, causando aumento na permeabilidade da mesma e albuminúria (SUN e KANWAR, 2015). Outra ação promovida pelo TNF- α é a indução direta da produção de EROs pelas células renais, independentemente de mecanismos hemodinâmicos (RADEKE et al., 1990), resultando em alterações na função da parede dos capilares glomerulares e aumentando a permeabilidade à albumina (MCCARTHY et al., 1998). Finalmente, o TNF- α pode apresentar efeitos sinérgicos às ações de outra citocina pró-fibrogênica, o TGF- β , promovendo o acúmulo de matriz extracelular através do aumento da expressão de fibronectina e inibidor tecidual de metaloproteinase 1 (TIMP-1) (LIM e TESCH, 2012).

Estudos experimentais têm demonstrado que o TNF- α está relacionado com a hipertrofia e hiperfiltração renal, alterações presentes durante o estágio inicial da DRD

(DIPETRILLO et al., 2003; DIPETRILLO e GESEK, 2004). Estudos *in vivo*, utilizando ratos diabéticos, evidenciaram uma elevada excreção urinária de TNF- α , o que foi relacionado à retenção de sódio e hipertrofia renal (DIPETRILLO e GESEK, 2004; SCHREINER e KOHAN, 1990). Algumas observações experimentais também têm suportado a noção de que há uma estreita relação entre a proteinúria e a inflamação. Corroborando com esta afirmação, foi reportado que a expressão de mRNA no córtex renal e a excreção urinária de TNF- α se correlacionaram de maneira independente e positiva com a albuminúria (NAVARRO-GONZALEZ et al., 2005; NAVARRO-GONZALEZ et al., 2006a). Estudos utilizando técnicas de microdiálise demonstraram um aumento significativo nos níveis de TNF- α no fluido intersticial e na urina, mesmo na ausência de infiltrados celulares, o que foi observado antes do desenvolvimento de albuminúria. Também foi descrito que há uma elevação nos níveis de TNF- α após o aumento da EUA, sugerindo que a elevação da albuminúria possui um efeito estimulatório na produção renal de TNF- α (KALANTARINIA et al., 2003).

Em estudos clínicos em pacientes com DRD têm sido reportado que as concentrações séricas e urinárias de TNF- α estão elevadas quando comparadas às concentrações encontradas em indivíduos controle ou em pacientes com DM, e que estas concentrações se elevam concomitantemente com a progressão da doença renal. Estes achados indicam uma relação entre níveis elevados desta citocina e o desenvolvimento e progressão do dano renal no DM (MORIWAKI et al., 2003; NAVARRO et al., 2003a; NAVARRO et al., 2006b).

O IFN- γ é uma citocina potencialmente pró-inflamatória pertencente à família dos interferons. Está envolvido com a produção de mediadores derivados de macrófagos, incluindo TNF- α , IL-1, interleucina 12 (IL-12) e óxido nítrico, além de participar na regulação negativa da síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10. Seu papel na DRD tem sido pouco investigado (EL-HASHEMITE et al., 2004; FARRAR e SCHREIBER, 1993). Em pacientes com DRD manifesta, foi demonstrado que os níveis séricos de IFN- γ estão mais elevados quando comparados com um grupo contendo pacientes diabéticos normoalbuminúricos e microalbuminúricos. Além disso, estes níveis se correlacionam com a proteinúria (WU et al., 2010). Também foi reportado que as concentrações séricas de IFN- γ estão elevadas em pacientes com DM tipo 2 com DRD, comparados com indivíduos controles, e se correlacionam com EUA (ZHANG et al., 2014). No entanto, outro estudo descreveu que as concentrações séricas de IFN- γ não diferem entre pacientes com DM tipo 1 e indivíduos controles saudáveis (ELLINA et al., 2012).

Sendo assim, todas estas evidências sugerem o envolvimento de diferentes moléculas e vias inflamatórias no desenvolvimento e progressão da DRD. Além disso, diversos estudos

utilizando modelos experimentais de DRD têm reportado que a administração de substâncias com propriedades anti-inflamatórias é capaz de reduzir a expressão de mediadores de dano renal, prevenindo sua iniciação e progressão (BOLICK et al., 2003; DÁVILA-ESQUEDA et al., 2005; YANG et al., 2008). Corroborando com estas observações experimentais, estudos clínicos também têm demonstrado que algumas estratégias baseadas na modulação de moléculas inflamatórias apresentam implicações significativas (LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2008; NAVARRO et al., 2003b; RODRIGUEZ-MORÁN et al., 2006).

1.1.3 Estratégias emergentes na avaliação da Doença Renal do Diabetes

1.1.3.1 Limitações dos marcadores tradicionais no diagnóstico da Doença Renal do Diabetes

A detecção precoce da DRD é fundamental para um monitoramento clínico adequado da doença (ABDEL-RAHMAN et al., 2011). Até o presente momento, o diagnóstico clínico da DRD é baseado na avaliação da função renal, através da TFG estimada, e na avaliação do dano renal, usualmente verificado pela mensuração da uACR em amostras de urina (ADA, 2016; NKF-KDOQI, 2012). No entanto, embora estes testes sejam facilmente realizados e estejam amplamente disponíveis na prática laboratorial e clínica, eles apresentam certas limitações (LIN et al., 2016). Desta forma, é importante entender estas limitações para aplicá-los de forma adequada na clínica e também para a pesquisa de novos métodos diagnósticos.

Na avaliação das funções excretórias renais, a TFG é considerada o melhor parâmetro. Devido ao tempo consumido e aos inconvenientes relacionados à coleta de urina de 24 horas, a mensuração da depuração da creatinina endógena para avaliar a TFG não é facilmente aplicada a cenários clínicos. Sendo assim, a avaliação da função renal através de equações que utilizam os níveis séricos de creatinina, como a MDRD e CKD-EPI, tem sido bastante utilizada na prática clínica (LIN et al., 2016). No entanto, existem algumas limitações para o uso da TFG estimada como um marcador no diagnóstico precoce de DKD. Uma destas limitações reside no fato de que os níveis séricos de creatinina são afetados pela massa muscular e pelo padrão dietético, o que pode afetar o cálculo da TFG estimada (BAXMANN et al., 2008; PERRONE et al., 1992).

Além disso, as estimativas da TFG refletem alterações funcionais tardias e não alterações estruturais precoces dos rins (LIN et al., 2016). A equação MDRD se torna menos fidedigna em pacientes com TFG >60 mL/min/1,73m² (LEVEY et al., 2006; RULE et al., 2004). Este fato poderia ser um problema no diagnóstico precoce da DRD, uma vez que a

hiperfiltração glomerular está presente nos estágios precoces da doença (LIN et al., 2016). Por outro lado, a CKD-EPI é mais precisa em pacientes nos quais a TFG >90 mL/min/1,73m² (MICHELS et al., 2010) e, desta forma, preferida quando aplicada em pacientes com diabetes (ADA, 2016). Assim, as estimativas da TFG estão comprometidas por limitações metodológicas para avaliá-la tanto em faixas normais, quanto em faixas elevadas (LEVEY et al., 2012; MacISAAC et al., 2014). Deve-se, portanto, ter cautela ao utilizar a TFG como único marcador para o diagnóstico da DRD (LIN et al., 2016).

A albuminúria é um marcador de dano renal, especialmente de disfunção glomerular, e é tradicionalmente considerada o padrão ouro para diagnosticar o início da DRD (MATHESON et al., 2010). Similar à TFG, a mensuração da EUA durante um período de 24 horas é dispendiosa, além de ter uma pequena precisão e baixo poder preditivo (EKNOYAN et al., 2003; LEVEY et al., 2003). Desta forma, as diretrizes atuais recomendam a determinação da uACR em amostras isoladas de urina, o que é utilizado na prática clínica (ADA, 2016). No entanto, a albuminúria não é específica para a presença de DRD, podendo se elevar por outras razões, incluindo atividade física, padrão dietético, infecções, febre, insuficiência cardíaca congestiva, hiperglicemia grave, hipertensão não controlada e menstruação (NKF-KDOQI, 2007). Deve-se considerar também que a albuminúria pode estar presente em pacientes sem DRD, bem como em indivíduos não diabéticos com DRC progressiva (LEE e CHOI, 2014).

Algumas evidências têm indicado que certos pacientes com diabetes podem apresentar lesões renais patológicas avançadas e declínio progressivo da função renal quando os níveis de EUA ainda se encontram dentro da normalidade, indicando que a albuminúria não é um marcador perfeito para a detecção precoce da DRD (MATHESON et al., 2010). Além disso, seu poder preditivo é limitado (LEE e CHOI, 2014), uma vez que nem sempre ocorre a progressão de microalbuminúria para macroalbuminúria (STEINKE et al., 2005) e que alguns pacientes podem desenvolver DRD mesmo na ausência de microalbuminúria (DWYER et al., 2012; ITO et al., 2010). Em diversos estudos, também tem sido reportada a remissão espontânea da microalbuminúria para a normoalbuminúria em uma grande proporção de pacientes com diabetes, o que leva a refletir sobre a inevitabilidade da progressão da doença renal (MacISAAC et al., 2014; PERKINS et al., 2003).

A variabilidade substancial na gravidade da DRD no DM tipo 1 e a natureza heterogênea da patologia no DM tipo 2 sugere que a microalbuminúria pode ou não refletir a patologia subjacente. Considerando que existe uma forte associação entre a duração do diabetes e o desenvolvimento de DRD, particularmente no DM tipo 1, a EUA aumentada no

DM de curta duração suscita questionamentos sobre a presença de doença renal não causada pelo diabetes (NKF-KDOQI, 2007). Outro ponto importante a ser discutido é a natureza heterogênea da lesão renal, especialmente no DM tipo 2. A albuminúria é um marcador de disfunção glomerular, o que é característico da DRD no DM tipo 1 (CARAMORI et al., 2002; MAUER et al., 1984). No entanto, a glomerulopatia é menos comum na patogênese da DRD no DM tipo 2, onde as lesões tubulointersticiais e/ou vasculares são, algumas vezes, as principais lesões histológicas (BROCCO et al., 1997; DALLA VESTRA et al., 2000; FIORETTO et al.; 1996).

No entanto, é importante salientar que, apesar dos questionamentos acerca da importância do valor do aumento da EUA como um marcador da DRD, em uma revisão de ensaios clínicos randomizados, de metanálises e de grandes estudos observacionais, o papel da microalbuminúria como fator de risco para eventos cardiovasculares e progressão da DRD foi reforçado (BAKRIS e MOLITCH, 2014). Destaca-se também que tanto a EUA como a TFG são preditores independentes de doença cardiovascular e de mortalidade nos pacientes com DM tipo 2 (DRURY et al., 2011; NINOMIYA et al., 2009).

1.1.3.2 Novas perspectivas: biomarcadores urinários emergentes na avaliação da Doença Renal do Diabetes

Devido às limitações da TFG estimada e da albuminúria no diagnóstico precoce da DRD, existe a necessidade de investigar e validar novos biomarcadores que sejam mais sensíveis e específicos na detecção da doença e na predição de sua progressão. A identificação de novos biomarcadores pode ser útil para fornecer informações a respeito da fisiopatologia da doença, além de proporcionar estratégias clínicas precoces para o diagnóstico (MORESCO et al., 2013). Alguns biomarcadores urinários têm sido estudados com este propósito, incluindo biomarcadores que refletem o dano renal glomerular ou tubular, biomarcadores de estresse oxidativo e biomarcadores de inflamação. Além destes, novos biomarcadores emergentes na avaliação da DRD incluem o estudo de microRNA e do perfil genômico, metabolômico e proteômico de pacientes acometidos por esta patologia (LEE e CHOI, 2014; LIN et al., 2016). Na Tabela 6 são apresentados alguns biomarcadores urinários que têm sido estudados na avaliação da DRD.

O dano renal na DRD é caracterizado por alterações na estrutura e na permeabilidade glomerular. Essas alterações podem ocorrer como resultado de dano a qualquer um dos componentes pertencentes ao aparato da barreira de filtração glomerular, incluindo a

membrana glomerular basal, os podócitos e os capilares glomerulares endoteliais (LEE e CHOI, 2014). O dano glomerular resulta no aparecimento urinário de um excesso de proteínas séricas que não seriam livremente filtradas através do glomérulo, incluindo macromoléculas como a albumina e a transferrina (LEWIS e XU, 2008). As anormalidades na membrana basal glomerular, que incluem acúmulo de matriz mesangial e espessamento da membrana glomerular, estão associadas com a produção aumentada de proteínas de matriz extracelular, como o colágeno tipo IV.

Tabela 6 – Biomarcadores urinários na avaliação da DKD.

<i>Biomarcadores de dano glomerular</i>	<i>Biomarcadores de dano tubular</i>	<i>Biomarcadores de inflamação</i>	<i>Biomarcadores de estresse oxidativo</i>
Albumina	α_1 -microglobulina (A1 MG)	Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)	Pentosidina
Colágeno tipo IV	β_2 -microglobulina (β_2 MG)	Interferon- γ (IFN- γ)	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG)
Nefrina	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL)	Interleucina-1 (IL-1)	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG)
Podocalixina	Molécula de injúria renal tipo 1 (KIM-1)	Interleucina-6 (IL-6)	
Transferrina	N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	Proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1)	
	Proteína ligadora do retinol (RBP)		

Neste contexto, alguns autores têm reportado que o aumento das concentrações urinárias de transferrina (KAZUMI et al., 1999; NARITA et al., 2006) e de colágeno tipo IV (CAWOOD et al., 2010; IJIMA et al., 1998; KOTAJIMA et al., 2000) podem preceder o desenvolvimento de microalbuminúria em pacientes com DM tipo 2. Além disso, dano aos podócitos, com redução tanto no número, quanto na densidade, tem sido reportada como uma característica precoce na DRD. Algumas proteínas podócito-específicas, como a nefrina (HARA et al., 2012; PÄTÄRI et al., 2003) e podocalixina (HARA et al., 2012), podem estar

aumentadas na urina de pacientes normoalbuminúricos, sendo úteis na detecção precoce da DRD.

Tem sido demonstrado que o túbulo proximal pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da albuminúria e que os biomarcadores de dano tubular são sensíveis e podem prever a microalbuminúria ou a DRD em estágios precoces (MATHESON et al., 2010), como a hiperfiltração glomerular (FU et al., 2012a). Os biomarcadores de dano tubular são essencialmente enzimas urinárias e proteínas plasmáticas de baixo peso molecular. Uma elevada excreção urinária destes biomarcadores pode ser devido à reabsorção deficiente de proteínas plasmáticas pelas células tubulares ou devido ao aumento da secreção de enzimas urinárias pelas células epiteliais tubulares, levando à proteinúria (BARRATT e TOPHAM, 2007; HONG e CHIA, 1998). Proteínas e enzimas com peso molecular menor que 70 kDa são livremente filtradas através da membrana glomerular, sendo completamente reabsorvidas pelas células epiteliais tubulares. Sendo assim, proteínas e enzimas que possuem peso molecular superior, são oriundas da secreção pelas células epiteliais tubulares (FLANDROIS et al., 1986). Algumas das enzimas e proteínas associadas com o dano tubular são: A1 MG e β 2 MG, RBP, NGAL, KIM-1 e NAG (MORESCO et al., 2013).

A NGAL é uma pequena proteína, com peso molecular de 25 kDa, pertencente à família das lipocalinas, que está associada covalentemente à gelatinase de neutrófilos humanos. É secretada em pequenas quantidades pelos pulmões, rins, traqueia, estômago, tecido do cólon, bem como pelos neutrófilos. A NGAL é altamente expressa no néfron distal, sendo liberada das células tubulares renais danificadas no sangue e na urina em resposta ao dano nefrotóxico e isquêmico (MISHRA et al., 2005). Desta forma, a elevação de seus níveis pode ser observada muito antes que um decréscimo da TFG seja observado (HIRSCH et al., 2007; WHEELER et al., 2008).

Alguns estudos têm sugerido que a excreção urinária de NGAL pode ser útil para a detecção precoce do dano renal no DM e também para o monitoramento da DRD. Foi demonstrado que a NGAL urinária estava elevada em pacientes com DM tipo 1, com ou sem microalbuminúria, indicando a presença de dano tubular em um estágio precoce (NIELSEN et al., 2010). Em pacientes com DM tipo 2, foi descrito que os níveis urinários de NGAL estavam alterados mesmo em indivíduos com EUA normal (uACR <10 mg/g creatinina) ou levemente aumentada (uACR 10-30 mg/g creatinina), o que indica que o dano tubular pode estar presente em um estágio precoce da DRD (DE CARVALHO et al., 2016).

Um estudo de Fu et al. (2012b) investigando a ocorrência de dano tubular em pacientes com DM tipo 2, reportou que os níveis urinários de NGAL estavam

significativamente elevados em pacientes diabéticos, quando comparados a um grupo controle. Neste sentido, os autores concluíram que a excreção urinária de NGAL pode ser um biomarcador mais precoce e, por isso, mais promissor que albuminúria na detecção e predição do dano renal em pacientes com DM tipo 2. Nauta et al. (2011), demonstraram em um estudo com 94 pacientes diabéticos que os níveis urinários de NGAL estavam significativamente elevados em pacientes normoalbuminúricos, quando comparados a indivíduos controles não-diabéticos. Além disso, os níveis de NGAL estavam associados positivamente com a albuminúria e o com o declínio na TFG.

Corroborando com estes achados, outros estudos têm reportado que as concentrações urinárias de NGAL aumentam com a progressão da doença e podem predizer o declínio da função renal. No mesmo estudo de Fu et al. (2012b), descrito acima, a excreção urinária de NGAL demonstrou uma correlação forte e positiva com a uACR e uma correlação negativa com a TFG. Nielsen e al. (2012) descreveram que uma excreção urinária de NGAL elevada foi capaz de predizer um rápido declínio da TFG em pacientes com DM tipo 2. Em pacientes com DM 1, também foi reportada uma correlação positiva entre a concentração urinária de NGAL e a severidade da albuminúria (NIELSEN et al., 2010).

Estes achados suportam a hipótese de que o dano tubular é relativamente comum nos estágios iniciais do DM e que a NGAL representa um dos biomarcadores promissores na avaliação da DRD. Neste contexto, a associação da NGAL com marcadores inflamatórios poderia indicar a precocidade destes na detecção do dano renal no DM. Além de ser um biomarcador precoce, a NGAL destaca-se pela capacidade de predizer a progressão da DRD, o que corrobora sua utilidade clínica na avaliação desta patologia.

O estresse oxidativo desempenha um papel crucial na patogênese da DRD. A hiperglicemia e demais componentes relacionados ao DM induzem o aumento da produção celular de superóxido e a ativação de vias associadas com a patogênese das complicações diabéticas, como a via dos poliois, bem como a ativação da PKC e o aumento da produção de AGEs (KANAUCHI et al., 2002). O 8-OHdG e 8-oxodG são produtos do dano oxidativo ao ácido desoxirribonucléico (DNA), os quais são livremente filtrados e, sendo assim, seus níveis urinários podem refletir o estresse oxidativo sistêmico (LEINONEN et al., 1997) e serem biomarcadores úteis para predizer o desenvolvimento de DRD (HINOKIO et al., 2002; NISHIKAWA et al., 2003). Já dentre os AGEs, um dos melhores quimicamente caracterizados em humanos é a pentosidina, a qual tem sido considerada um marcador de formação e de acúmulo destes produtos (PRICE et al., 2001). Níveis urinários elevados de pentosidina tem sido reportados em pacientes com DM tipo 2 e DRD (CALABRESE et al.,

2007). Também tem sido descrito que as concentrações urinárias de pentosidina se correlacionam com a gravidade da albuminúria em pacientes com DM (KERN et al., 2010).

Evidências recentes têm demonstrado que os mecanismos imunológicos e inflamatórios desempenham um importante papel no desenvolvimento e na progressão da DRD (ELMARAQBY e SULLIVAN, 2012; NAVARRO et al., 2008; TUTTLE, 2005). A inflamação tem sido reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento da DRD e, neste contexto, parece ser mais um fator causal da doença do que uma consequência da doença (KOLB e MANDRUP-POULSEN, 2005; PICKUP, 2004; RIVERO et al., 2009). Tem sido reportado que indivíduos que progridem para DRD apresentam características inflamatórias anos antes do início da doença (BLOOMGARDEN, 2003; DANDONA et al., 2004).

Além disso, tem sido demonstrado que uma elevada excreção urinária de marcadores inflamatórios está associada com a progressão da patologia. Neste sentido, alguns estudos têm encontrado associações entre o aumento da EUA e da excreção de marcadores inflamatórios (CHERNEY et al., 2012; NAVARRO et al., 2006; NAVARRO et al., 2003; WOLKOW et al., 2008; WU et al., 2013). Interleucinas (IL-1, IL-6, IL-10), TNF- α , IFN- γ , quimiocinas (MCP-1), fatores de crescimento (CTGF, TGF- β 1), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1), fatores de transcrição nuclear (NF- κ B), bem como células imunes (linfócitos e macrófagos) estão envolvidos na patogênese do DM e, conseqüentemente, desempenham um importante papel no desenvolvimento de suas complicações (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014).

Desta forma, pode-se observar que um grande número de biomarcadores tem sido estudado na avaliação da DRD e diversos estudos têm demonstrado resultados promissores. No entanto, novas investigações são necessárias para validar estes biomarcadores. Cabe salientar, que várias questões ainda devem ser respondidas antes que estes novos biomarcadores sejam implementados na prática clínica, como os efeitos de diversos fatores na interpretação dos resultados, incluindo sexo, idade e diferenças de pontos de corte de cada biomarcador em condições distintas (OSTERMAN et al., 2012).

1.1.4 Citocinas inflamatórias urinárias na avaliação da Doença Renal do Diabetes

Algumas observações clínicas têm suportado a hipótese de que o processo inflamatório renal contribui para o desenvolvimento da DRD em pacientes com DM e que o

aumento da excreção urinária de marcadores inflamatórios pode estar associado com a progressão do dano renal nestes pacientes.

Neste contexto, Tashiro et al. (2002) verificaram que os níveis urinários de MCP-1 estavam aumentados em um grupo de pacientes com DM tipo 2 e DRD, quando comparados a um grupo controle de indivíduos saudáveis. Observou-se também que estes níveis aumentavam gradualmente conforme o estágio clínico da DRD (normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria). A excreção urinária de IL-18 se apresentou elevada em pacientes com micro e macroalbuminúria.

Navarro et al. (2003) estudaram a associação de parâmetros inflamatórios com a EUA em estágios precoces do DM tipo 2. Foi observado que os níveis urinários de TNF- α estavam significativamente mais elevados em pacientes diabéticos do que em indivíduos controles saudáveis. Além disso, a excreção urinária de TNF- α aumentou significativamente com a progressão da DRD, demonstrando uma correlação significante e positiva com a EUA.

Navarro et al. (2006) analisaram a associação entre a citocina pró-inflamatória TNF- α e os marcadores clínicos de dano glomerular (uACR) e tubular (NAG) em pacientes com DM tipo 2. Os pacientes foram estratificados em diferentes quartis dos marcadores inflamatórios séricos TNF- α e proteína C reativa ultrasensível. Pacientes no mais alto quartil destes parâmetros inflamatórios apresentaram excreção mais elevada de albumina e de NAG do que pacientes no quartil mais baixo. Além disso, as concentrações urinárias de TNF- α foram positivamente e significativamente associadas com as excreções urinárias de NAG e de albumina. Estes achados mostram que a excreção urinária de TNF- α se correlaciona com a severidade da doença em renal em pacientes com DM tipo 2, tanto em relação ao dano glomerular, quanto em relação ao dano tubular, sugerindo um importante papel desta citocina na patogênese e na progressão da DRD.

Em outro estudo, Navarro et al. (2008) avaliaram as concentrações urinárias de TNF- α e IL-6 em indivíduos controle e em pacientes com DM tipo 2 com função renal normal, em diferentes estágios de DRD (normoalbuminúria, microalbuminúria e macroalbuminúria). Foi observado que os níveis urinários de IL-6 foram similares entre os pacientes diabéticos e o grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas em relação à excreção urinária de IL-6 entre os três grupos de pacientes com DRD estudados. Já quanto às concentrações urinárias de TNF- α , foi verificado que estavam aumentadas nos pacientes diabéticos em relação ao grupo controle. Além disso, os níveis urinários de TNF- α foram significativamente mais elevados em pacientes com macroalbuminúria, quando comparados

àqueles com microalbuminúria e àqueles com EUA normal. A excreção urinária de TNF- α também foi maior em pacientes microalbuminúricos do que naqueles normoalbuminúricos.

Wolkow et al. (2008) avaliaram se o declínio da função renal em pacientes diabéticos está associado com elevada excreção de marcadores inflamatórios na urina. Neste estudo, foram mensuradas citocinas urinárias em pacientes com DM tipo 1 e microalbuminúria que apresentaram função renal estável ou em declínio durante um período de acompanhamento de aproximadamente 3 anos. O grupo controle foi composto por pacientes com DM tipo 1 e normoalbuminúria. Foi demonstrado que elevados níveis urinários de IL-6, IL-8, e MCP-1 estão associados com o declínio da função renal em pacientes microalbuminúricos.

Wu et al. (2010) avaliaram a produção e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e de citocinas produzidas por células Th1 (IFN- γ , interleucina 2 (IL-2)) e Th2 (interleucina 4 (IL-4), IL-10), bem como de quimiocinas (MCP-1 e quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais (RANTES)) no plasma e na urina de pacientes com DM tipo 2. Dois grupos foram comparados: um grupo controle composto por pacientes normoalbuminúricos e microalbuminúricos e um grupo com DRD manifesta. Os pacientes com DRD manifesta apresentaram níveis urinários de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas mais elevados. Esta ativação de citocinas e quimiocinas foi posteriormente confirmada através de análise imunohistoquímica. Foi encontrada coloração positiva para IL-1 β , IFN- γ e MCP-1 em células glomerulares, intersticiais e tubulares renais dos pacientes com DRD, indicando que diversas células renais participam na produção de citocinas e quimiocinas. Além disso, foi reportado que os níveis urinários de MCP-1 se correlacionam positivamente com a proteinúria e negativamente com a TFG.

Liu et al. (2010) avaliaram as concentrações urinárias de 27 citocinas em pacientes com DM tipo 2 normo e microalbuminúricos. Os níveis de interleucina 8 (IL-8), proteína 10 induzida pelo interferon (IP-10), MCP-1, eotaxina, RANTES e TNF- α estavam significativamente mais elevados em pacientes microalbuminúricos, em relação a pacientes normoalbuminúricos ou indivíduos controles. Os níveis de fator estimulador de colônias granulócitos-monócitos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α) e proteína inflamatória de macrófago-1 β (MIP-1 β) se apresentaram mais elevados em pacientes microalbuminúricos do que em pacientes controles.

Cherney et al. (2012) caracterizaram a excreção urinária de citocinas e quimiocinas em adolescentes com DM tipo 1 normoalbuminúricos. Os níveis urinários de IL-6 e RANTES foram mais elevados do menor para o maior tercil albumina/creatinina, sugerindo que uma uACR elevada, mas ainda dentro faixa normal, pode estar associada com a inflamação renal e

com o risco de desenvolvimento de DRD. Em outro estudo em pacientes com DM tipo 1, Ellina et al. (2012) avaliaram as concentrações séricas e urinárias de glicosaminoglicanos associados à matriz extracelular (GAGs), CTGF, VEGF, MCP-1, CD40 e IFN- γ no desenvolvimento da DKD. Foi observado que os níveis plasmáticos de GAGs, CD40 e MCP-1, bem como os níveis urinários de GAGs e CTGF estavam elevados em pacientes normoalbuminúricos. Estas observações podem sugerir que os níveis de GAGs e de CTGF, podem refletir sinais precoces de dano renal, antes mesmo do início da albuminúria.

Verhave et al. (2013) investigaram a capacidade das citocinas urinárias em prever independentemente a progressão da DRD e seu valor aditivo a fatores de risco clássicos. Os biomarcadores urinários foram mensurados em pacientes diabéticos (tipo 1 ou tipo 2) com DRD manifesta, no início do estudo e após um período de acompanhamento de aproximadamente 2 anos. A presença de níveis elevados de cada um dos marcadores avaliados (IL-6, IL-8, MCP-1, TGF- β 1) foi capaz de prever uma progressão mais rápida da doença renal, exceto para IL-1 β . No entanto, somente MCP-1 e TGF- β 1 foram capazes de fornecer informações prognósticas adicionais à proteinúria e de prever o declínio da função renal independentemente de fatores de risco clássicos.

Wu et al. (2013) avaliaram a correlação dos marcadores TNF- α e NGAL com a progressão da DRD em pacientes com DM tipo 2. Os níveis urinários de TNF- α e NGAL foram determinados em indivíduos controles e em pacientes diabéticos em diferentes faixas de EUA. Os pacientes normoalbuminúricos e microalbuminúricos foram acompanhados por aproximadamente dois anos. Os resultados deste estudo demonstraram que os níveis urinários de TNF- α e NGAL estavam elevados em pacientes com DM tipo 2 e se correlacionaram positivamente com o grau de EUA. Além disso, a elevação destes dois marcadores na urina foi capaz de prever a diminuição da TFG, sendo que o TNF- α foi um preditor independente do declínio da função renal em um estágio precoce da DRD.

Har et al. (2014) avaliaram a relação entre a hiperfiltração e citocinas/quimiocinas inflamatórias urinárias em adolescentes com DM tipo 1, com pressão arterial normal e normoalbuminúricos. Também foi avaliada a associação entre os níveis urinários e plasmáticos dos marcadores inflamatórios, para esclarecer a origem destes fatores. As análises incluíram eotaxina, GM-CSF, fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) interferon α 2 (IFN- α 2), IL-2, IL-12, proteína quimiotática de monócitos tipo 3 (MCP-3), MCP-1, quimiocina derivada dos macrófagos (MDC), MIP-1 α , fator de crescimento derivado das plaquetas-BB (PDGF-AB/BB), fator de necrose tumoral β (TNF- β) e ligante CD40 solúvel (sCD40L). Um dos achados mais interessantes deste estudo foi a associação entre a

hiperfiltração renal e níveis elevados de citocinas/quimiocinas nos adolescentes avaliados, antes mesmo do desenvolvimento de microalbuminúria. Os níveis urinários de citocinas/quimiocinas aumentaram significativamente de acordo com a faixa de filtração glomerular, sendo mais elevados nos adolescentes com hiperfiltração, e com tendências paralelas nas concentrações séricas dos marcadores avaliados.

Sendo assim, esses estudos não somente corroboram a hipótese de que o processo inflamatório está intimamente relacionado com o desenvolvimento e progressão da DKD, mas indicam que a inflamação representa um importante aspecto a ser avaliado em pacientes com DM. No entanto, as características diagnósticas das citocinas urinárias na detecção precoce do dano renal ainda necessitam ser investigadas. Além disso, pouco se sabe sobre a alteração destes marcadores mesmo em pacientes normoalbuminúricos, sendo que novos estudos são necessários para corroborar esta hipótese.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização da concentração urinária das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ na detecção da DRD, bem como a associação destas citocinas com indicadores de dano glomerular e tubular em pacientes com DM tipo 2.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analisar biomarcadores séricos/plasmáticos e urinários associados ao perfil lipídico, controle glicêmico e função renal, entre outros, nos pacientes do estudo;
- Avaliar os níveis urinários das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , bem como os níveis urinários do marcador de dano tubular NGAL nos pacientes do estudo;
- Investigar as características dos biomarcadores em estudo na identificação da DRD: ponto de corte, sensibilidade e especificidade;
- Estabelecer uma razão entre a excreção da citocina pró-inflamatória urinária IL-6 e os níveis urinários citocina anti-inflamatória IL-10, avaliando as características desta razão na investigação da DRD;
- Avaliar os níveis das citocinas inflamatórias urinárias, bem como da razão entre IL-6 e IL-10 em diferentes faixas de EUA, verificando se estes marcadores estão alterados em pacientes DM tipo 2 normoalbuminúricos;
- Estudar a associação da excreção urinária de IL-6, IL-10 e TNF- α com indicadores de dano glomerular e tubular (albuminúria e NGAL) nos pacientes do estudo.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Urinary inflammatory cytokines as indicators of kidney damage in type 2 diabetic patients

Manuela Borges Sangoi, José Antonio M. de Carvalho, Etiane Tatsch, Bruna S. Hausen, Yãnaí S. Bollick, Sílvia W. K. Londero, Thiago Duarte, Rogério Scolari, Marta M. M. F. Duarte, Melissa O. Premaor, Fabio V. Comim, Maria B. Moretto, Rafael N. Moresco

Publicado no Periódico: **Clinica Chimica Acta**

Clin Chim Acta 460 (2016) 178–183. doi: 10.1016/j.cca.2016.06.028

Urinary inflammatory cytokines as indicators of kidney damage in type 2 diabetic patients

Manuela Borges Sangoi^{a,b,c}, José Antonio M. de Carvalho^{a,d}, Etiane Tatsch^{a,c}, Bruna S. Hausen^{a,c}, Yãnaí S. Bollick^a, Sílvia W. K. Londero^d, Thiago Duarte^e, Rogério Scolari^f, Marta M. M. F. Duarte^{e,f,g}, Melissa O. Premaor^{e,h}, Fabio V. Comim^{e,h}, Maria B. Moretto^{c,e}, Rafael N. Moresco^{a,c,e,*}

^aLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Health Sciences, Integrated Regional University of High Uruguay and Missions, Santiago, RS, Brazil

^cPharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dUniversity Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^ePharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^fClinical Analysis Laboratory, Labimed, Santa Maria, RS, Brazil

^gDepartment of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

^hDepartment of Clinical Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Phone.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018; E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Postal address affiliations:

Federal University of Santa Maria : Avenida Roraima 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Franciscan University Center: Rua dos Andradas 1614, Centro, 97.010-032, Santa Maria, RS, Brazil

Lutheran University of Brazil: BR 287, Km 252, Trevo Maneco Pedroso, Boca do Monte, 97020-0001, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail addresses of authors :

Manuela Borges Sangoi : manu_sangoi@hotmail.com;

José Antonio Mainardi de Carvalho: zemainardi@yahoo.com.br;

Etiane Tatsch : etianetatsch@gmail.com;

Bruna S. Hausen : brunahausen@hotmail.com;

Yãnaí Schneider Bollick: yanaischneider@gmail.com;

Sílvia W. K. Londero: kleinert@terra.com.br;

Thiago Duarte: duartethiago89@yahoo.com.br;

Rogério Scolari: rogerio_scolari@yahoo.com.br;

Marta M. M. F. Duarte: duartmm@hotmail.com;

Melissa O. Premaor: premaor@ufsm.br;

Fabio V. Comim: fabio.comim@ufsm.br;

Maria B. Moretto: beatriz.moretto@yahoo.com.br.

Abstract

Background: The aim of this study was to investigate whether urinary levels of interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) are altered in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM), and whether these cytokines are able to identify diabetic kidney disease (DKD) among these patients.

Methods: This study included 125 T2DM patients classified into three groups according to urinary albumin/creatinine ratio (uACR): uACR <10 mg/g creatinine, uACR 10–30 mg/g creatinine and uACR >30 mg/g creatinine. Urinary inflammatory cytokines were measured.

Results: The urinary IL-6 levels increased from uACR <10 (97.2 ± 26.4 pg/mL) to uACR 10–30 (113.6 ± 28.0 pg/mL) and to uACR >30 mg/g creatinine (163.5 ± 25.6 pg/mL) ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively) patients. The urinary IL-10 levels decreased in these uACR ranges [100.0 (58.0–141.0) pg/mL vs. 62.0 (54.5– 71.5) pg/mL vs. 42.0 (32.0–48.0) pg/mL] ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). All urinary cytokines demonstrated good ability to identify DKD (areas under curves > 0.9).

Conclusions: Urinary inflammatory cytokines, especially IL-6 and IL-10, may assist in the identification of DKD in T2DM patients, even in the absence of micro- and macroalbuminuria.

Keywords: cytokines, diabetic kidney disease, inflammation, urine.

Abbreviations

DKD, diabetic kidney disease

T2DM, type 2 diabetes *mellitus*

IL-1, interleukin-1

IL-6, interleukin-6

IL-10, interleukin-10

TNF- α , tumor necrosis factor-alpha

IFN- γ , interferon-gamma

uAlb, urinary albumin excretion

uACR, urinary albumin/creatinine ratio

HbA_{1c}, glycated hemoglobin

hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein

eGFR, Estimated glomerular filtration rate

CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

BMI, Body mass index

ROC, Receiver operator characteristics

AUC, area under the curve

CI, confidence intervals

1. Introduction

Diabetic kidney disease (DKD) is defined as functional, structural and clinical alterations of the kidneys caused by diabetes [1]. This is the foremost microvascular complication of diabetes and the leading cause of end-stage renal disease. Epidemiological data have shown that type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) accounts for a great proportion of the patients on renal replacement therapy programs [2,3]. Therefore, DKD contributes considerably to morbidity and mortality in the diabetic population [4], underscoring the importance of prevention, early identification, and adequate treatment [5]. Although urinary albumin (uAlb) is a classical DKD marker, some patients with diabetes have renal pathological lesions even in the normoalbuminuric range. Moreover, the predictive power of albuminuria is limited [6,7]. In this context, it is extremely important to search for new biomarkers that can predict and identify DKD in the early stages and provide information about the pathophysiology of the disease. Toward this end, a number of new and important biomarkers present in urine have been identified according to the major pathways involved in the development and progression of DKD [8].

Besides the traditional and hemodynamic risk factors, accumulating evidence now indicates that inflammation and more specifically inflammatory cytokines play a significant role in the development and progression of kidney damage in diabetes [9]. Inflammatory response is activated by metabolic and hemodynamic derangements in the diabetic kidney. This may occur at a very early stage of diabetes [10] and result in several damaging effects involving the dysregulation of inflammatory cytokines [8,10,11]. Proinflammatory cytokines including interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interferon-gamma (IFN- γ) have been recognized as pathogenic mediators that contribute to organ damage [12]. The effects of these cytokines include modifications of the renal structure, intrarenal hemodynamic alterations, modification in the permeability of glomerular endothelium, changes in the expression of diverse molecules, cellular necrosis and apoptosis, and increment in the production of reactive oxygen species [9]. Among proinflammatory cytokines, IL-6 affects extracellular matrix dynamics at both mesangial and podocyte levels, stimulates proliferation of mesangial cells, increases fibronectin expression, and enhances endothelial permeability [9,13]. Otherwise, interleukin-10 (IL-10) exerts predominantly anti-inflammatory and immunosuppressive effects [14]. Data from humans linking IL-10 and type 2 DM are limited to a few studies evaluating the serum concentrations of this cytokine and the available contributions are not sufficient to clarify the causative or protective role of IL-10 in the renal damage secondary to DM [15,16].

Importantly, it has been demonstrated that patients with diabetes who progress to DKD display features of inflammation years prior the onset of the disease [11,17,18]. Additionally, inflammation in the kidney contributes to the worsening of the pathology [17,19,20]. These observations indicate that the inflammatory cytokines are causally linked to kidney damage in patients with diabetes and may be useful as early biomarkers for the identification of DKD. However, modifications in urinary levels of inflammatory cytokines in patients with normal or mildly increased albuminuria are uncertain and the diagnostic properties of these markers were not assessed in the aforementioned studies. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the urinary levels of the inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ are altered in T2DM patients with normal or mildly increased albuminuria, and whether urinary cytokines are able to identify DKD among patients with T2DM.

2. Materials and methods

2.1. Study population

The study was conducted between June 2013 and October 2014. Data from 196 previously diagnosed T2DM patients from the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil were screened. To avoid potential confounding factors, patients who had urinary tract diseases, prior renal disease other than DKD, malignancy, infectious and liver diseases, acute or chronic inflammatory diseases, pregnancy, renal transplantation and the use nephrotoxic drugs were excluded from the study. Thus, a total of 125 T2DM patients were eligible for the present study. The subjects were divided into two main groups: without DKD (n=101) and with DKD (n=24). The clinical diagnosis of DKD was defined based on the detection of uAlb in a random urine sample (albumin excretion of more than 30 mg/g of creatinine in two out of three random urine samples collected within a six month period) [21]. With the objective of investigating the potential of urinary cytokines for early detection of DKD, patients were stratified into the following three subgroups according to the urinary albumin/creatinine ratio (uACR) [22,23]: normal (uACR <10 mg/g creatinine, n=67), mildly increased (uACR 10–30 mg/g creatinine, n=34) and moderately/severely increased (uACR >30 mg/g creatinine, n=24). Clinical study characteristics (age, gender, weight, height, diabetes duration, hypertension, treatment) and medical history were recorded by reviewing the hospital's medical registry and clinical and epidemiological evaluation questionnaire answered by the patients. Written informed consent was obtained from all subjects, and the

study was carried out in accordance with guidelines approved by the Institutional Ethics Review Board for Human Studies (12303113.0.0000.5346).

2.2. *Sample collection and biochemical analysis*

Blood samples were collected from all patients after an overnight fast (for a minimum period of 8 h) by venous puncture technique into the Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA, with sodium fluoride plus EDTA, or no anticoagulants. Blood samples were routinely centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min. Whole blood in EDTA was used to assess glycosylated hemoglobin levels (HbA_{1c}) using the chromatographic method in a D10[®] automated analyzer (BioRad, California, USA). Plasma with fluoride plus EDTA was used for measurement of fasting glucose and serum was used to determine the levels of total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and creatinine. Measurements of these variables were performed using standard methods on a Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA). Creatinine levels were measured by a rate-blanked compensated Jaffe method [24]. Morning urine samples were collected from each patient for biochemical analysis. The urine specimens were centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min and the supernatant was utilized for analysis. uAlb and creatinine were determined using a Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA). uAlb results were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the albumin levels in accordance with the concentration of urine [25]. Urinary inflammatory cytokine quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ (R&D Systems Inc[®], Minneapolis, Minnesota, USA). The detection range of the IL-1 assay was 3.9–250.0 pg/mL and its sensitivity was 1 pg/mL. Intra-assay CV was 2.2%, and inter-assay CV was 3.4%. The detection range of the IL-6 assay was 0.2–10.0 pg/mL and its sensitivity was 0.11 pg/mL. Intra-assay and inter-assay CV were 5.5%. The detection range of IL-10 assay was 0.8–50.0 pg/mL and its sensitivity was 0.17 pg/mL. Intra-assay CV was 4.6%, and inter-assay CV was 8.5%. The detection range of TNF- α assay was 0.5–32 pg/mL and its sensitivity was 0.19 pg/mL. Intra-assay CV was 3.1%, and inter-assay CV was 7.4%. The detection range of IFN- γ assay was 15.6–1000.0 pg/mL and its sensitivity was 8.0 pg/mL. Intra-assay CV was 2.8%, and inter-assay CV was 3.7%. All assays were carried out according to the manufacturer's instructions. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation [26]. Body mass index (BMI)

was calculated as an index of the weight in kilograms divided by the square of the height in meters.

2.3. Statistical analysis

All variables were tested for normality using Kolmogorov-Smirnov test and the appropriated parametrical or non-parametrical approach was used. Continuous parametric data were expressed as mean \pm standard deviation and statistical differences between the groups were evaluated by the Student's *t* test. Nonparametric continuous variables are presented as median (interquartile range) and analyzed using the Mann-Whitney test. Categorical data were summarized as percentages and compared using χ^2 test. The comparison of urinary cytokine levels according to uAlb was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post hoc test or the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post hoc test. Moreover, receiver operator characteristic (ROC) curves were constructed to quantify the overall ability of urinary cytokines and IL-6/IL-10 ratio to discriminate patients with and without DKD. The sensitivity and specificity of such assays were assessed by areas under curves (AUCs). AUCs were compared by Z statistic. Two-tailed *p* values <0.05 were considered significant and confidence intervals (95% CI) were provided where appropriate. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) and MedCalc[®] for Windows, version 14.10.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. Results

The baseline clinical characteristics of study participants are summarized in Table 1. The studied groups had similar distributions of gender, age and duration of diabetes. Similarly, no significant differences were observed with regard to BMI, eGFR, proportion of smokers or hypertensive patients between groups. Fasting plasma glucose, HbA_{1c} and serum biochemical parameters were also not significantly different between the groups. As expected, patients with DKD showed higher uACR levels when compared to those without DKD.

Notably, higher urinary levels of IL-1 and IL-6 were observed in patients with DKD than those without DKD: 152.5 (139.5–179.5) pg/mL vs. 80.0 (65.0–99.5) pg/mL and 164.8 \pm 24.9 pg/mL vs. 102.3 \pm 27.8 pg/mL, respectively ($P < 0.001$), as shown in Figure 1. Urinary levels of TNF- α and IFN- γ were also higher in patients with DKD than in patients without: 192.7 \pm 33.1 pg/mL vs. 117.6 \pm 28.4 pg/mL and 251.5 (220.5–291.5) μ g/mL vs. 140.5 (128.0–157.0) μ g/mL, respectively ($P < 0.001$). However, regarding urinary IL-10, the

excretion of this cytokine in subjects with DKD was significantly lower than in individuals without DKD: 40.5 (30.5–47.0) pg/mL vs. 70.5 (56.0–124.0) pg/mL, respectively ($P < 0.001$). Moreover, the ratio IL-6/IL-10 was higher in the group of patients with DKD than in those without DKD: 4.3 (3.1–5.9) vs. 1.3 (0.7–1.9) ($P < 0.001$) (Figure 1). These observations indicate that the inflammatory process is part of the renal injury in diabetes.

Diabetic patients are usually classified into normoalbuminuria (uACR <30 mg/g creatinine), microalbuminuria (uACR 30–300 mg/g creatinine) and macroalbuminuria (uACR >300 mg/g creatinine). However, in this study our aim was to investigate whether urinary inflammatory cytokines are altered in patients with normal (uACR <10 mg/g creatinine) or mildly increased (uACR 10–30 mg/g creatinine) albuminuria. As shown in Figure 2, urinary IL-6 levels increased from normal (97.2 ± 26.4 pg/mL) to mildly increased (113.6 ± 28.0 pg/mL) and to moderately/severely increased (163.5 ± 25.6 pg/mL) ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively) patients. Meanwhile, the urinary levels of IL-10 decreased from uACR <10 mg/g creatinine to uACR 10–30 mg/g creatinine, and to uACR >30 mg/g creatinine patients. Results were 100.0 (58.0–141.0) pg/mL, 62.0 (54.5–71.5) pg/mL and 42.0 pg/mL (32.0–48.0), ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). Interestingly, the IL-6/IL-10 ratio was also altered according to albuminuria ranges. This ratio was increased from normal to mildly increased and to moderately/severely increased patients: 0.8 (0.7–1.6), 1.7 (1.5–2.3) and 3.8 (3.0–5.5), respectively ($P < 0.001$).

The ROC curve analysis was performed to verify the overall ability of urinary inflammatory cytokines to identify DKD and establish the diagnostic characteristics of these markers (sensitivity, specificity and cut-off). As shown in Table 2, all urinary cytokines assessed demonstrated good ability to discriminate between T2DM patients with DKD and those without (AUCs > 0.9 in all cases). The urinary IL-6/IL-10 ratio also presented a good ability in identifying kidney disease in T2DM patients in the present study (AUC > 0.9).

4. Discussion

The present study was designed to evaluate the urinary inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in the identification of DKD in T2DM patients. An important finding in this study was the alteration in the levels of urinary IL-6 and IL-10 even in T2DM patients with normal or mildly increased albuminuria. In addition, results revealed that all urinary inflammatory cytokines assessed have the ability to discriminate DKD in T2DM patients. These markers exhibited good sensitivity and specificity in the identification of renal disease in the studied patients.

Accumulated data have emphasized the critical role of inflammation in the pathogenesis of DKD [27–31]. Our results showed that the patients with DKD presented a significant increase in urinary inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α and IFN- γ) compared to patients without DKD. Some previous works have demonstrated high urinary concentrations of inflammatory cytokines in patients with DKD [32,33]. In contrast, our results revealed that the urinary levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 were decreased in patients with DKD compared to those without DKD. Consistent with these observations, the IL-6/IL-10 ratio was higher in diabetic patients with DKD than those without DKD. The IL-10 decrease can contribute to renal damage associated with T2DM since this cytokine exerts predominantly anti-inflammatory effects. In contrast, IL-6 is a proinflammatory cytokine reported as relevant for the development and progression of DKD. Therefore, the imbalance of IL-6/IL-10 may contribute to the development of DKD, and high values of the ratio IL-6/IL-10 are associated with increased activation of the inflammatory process. These results corroborate the notion that the inflammatory process plays a role in diabetic renal injury.

Clear evidence has reported renal dysfunction even in normoalbuminuric patients [7,8]. In this context, the search for new sensitive, specific and noninvasive biomarkers currently emerges. There is growing evidence to support the use of urinary tubular markers in the assessment of DKD. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a good marker of renal dysfunction and an early predictor of DKD [34,35]. In this context, Wu et al. [17] observed that baseline levels of urinary TNF- α and NGAL were elevated and correlated with the severity of albuminuria in patients with T2DM. These results reiterate the importance of inflammatory markers for assessing pathogenesis and progression of DKD at the early stage.

A highlighting finding in the current study was the alteration of the urinary IL-6 and urinary IL-10 levels even in patients with normal or mildly increased albuminuria. These results suggest that the levels of these inflammatory markers may be altered even before a diagnosis of DKD, thus allowing the early detection of kidney damage. In the ROC curve analysis, IL-6, IL-10 and TNF- α were found to be the most sensitive cytokines for the identification of renal disease in T2DM patients. Results from our data demonstrated that the all urinary cytokines assessed as well as the IL-6/IL-10 ratio have a good ability to discriminate between T2DM patients with DKD and those without it (AUCs > 0.9 in all cases). Thus, the urinary inflammatory cytokines assessed are able to assist with DKD diagnosis.

Some limitations of our study need to be acknowledged. One of the weaknesses of this study was related to its transversal design; it was impossible to address whether the

inflammatory process (identified by the biomarkers in the study) was consistent with the development of DKD or changes in glomerular function over the course of time. In addition, the number of patients with microalbuminuria and macroalbuminuria was limited, which might have underestimated the association between inflammation markers and renal indices. However, the association among the stages of DKD, including an pre-clinical phase was sufficient to suggest a strong association between these disorders. The number of patients enabled us to observe statistically significant differences between the groups. Finally, the study lacks a control group of non-diabetic individuals.

5. Conclusions

In conclusion, the current study highlights the potential role of urinary inflammatory cytokines in the identification of kidney damage in T2DM patients. Interestingly enough, urinary levels of IL-6 and IL-10 were altered even in individuals with normal or mildly increased albuminuria. All urinary cytokines assessed showed potential value in the diagnosis of DKD in patients with T2DM. Therefore, the assessment of urinary cytokines, especially IL-6 and IL-10, may provide new approaches for the assessment and monitoring of DKD even before conventional measures including eGFR, serum creatinine and traditional glomerular injury markers such as uAlb. However, further longitudinal studies in larger samples are needed. Additionally, further studies assessing urinary levels of cytokines in a healthy population are of interest for determination of a reference range to allow comparisons between healthy individuals and patients with different clinical conditions.

Acknowledgments:

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil, number 476758/2012-2). The authors thank CNPq/Brazil and Capes/Brazil for providing fellowships. The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) for providing biochemical reagents.

References

- [1] C. Mora-Fernández , V. Domínguez-Pimentel, M.M. de Fuentes, J.L.Górriz, A. Martínez-Castelao, J.F. Navarro-González, Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics, *J. Physiol.* 592 (2014) 3997–4012.
- [2] R.C. Atkins, The epidemiology of chronic kidney disease, *Kidney Int. Suppl.* 67 (2005) S14–S18.

- [3] D. Luis-Rodríguez, A. Martínez-Castelao, J.L. Górriz, F. De-Álvaro, J.F. Navarro-González, Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy, *World J. Diabetes* 3 (2012) 7–18.
- [4] M.L. Gonzalez Suarez, D.B. Thomas, L. Barisoni, A. Fornoni, Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? *World J. Diabetes* 4 (2013) 245–255.
- [5] S.Y. Lee, M.E. Choi. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria, *Pediatr. Nephrol.* 30 (2014) 1063–1075.
- [6] J.M. Steinke, A.R. Sinaiko, M.S. Kramer, S. Suissa, B.M. Chavers, M. Mauer, The early natural history of nephropathy in Type 1 diabetes: III. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients, *Diabetes* 54 (2005) 2164–2171.
- [7] A. Matheson, M.D. Willcox, J. Flanagan, B.J. Walsh, Urinary Biomarkers in Type 2 Diabetes: a review, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26 (2010) 150–171.
- [8] R.N. Moresco, M.B. Sangoi, J.A.M. de Carvalho, E. Tatsch, G.V. Bochi, Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers, *Clin. Chim. Acta* 421 (2013) 17–30.
- [9] J.F. Navarro-González, C. Mora-Fernández, The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 433–442.
- [10] A.K.H. Lim, G.H. Tesch, Inflammation in diabetic nephropathy, *Mediators inflamm.* 2012 (2012), doi: 10.1155/2012/146154.
- [11] R. Misseri, D.R. Meldrum, C.A. Dinarello, P. Dagher, K.L. Hile, R.C. Rink, et al., TNF- α mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 288 (2005) F406–F411.
- [12] P.M. García-García, M.A. Getino-Melián, V. Domínguez-Pimentel, J.F. Navarro-González, Inflammation in diabetic kidney disease, *World J. Diabetes* 15 (2014) 431–443.
- [13] M. Dalla Vestra, M. Mussap, P. Gallina, M. Bruseghin, A.M. Cernigoi, A. Saller, et al., Acute-phase markers markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes, *J. Am. Soc. Nephrol.* 16 (2005) S78–S82.
- [14] C. Herder, M. Carstensen, D.M. Ouwens, Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes, *Diabetes Obes. Metab.* 15 (2013) 39–50.
- [15] A. Zamauskaite, M.M. Yaqoob, J.A. Madrigal, S.B. Cohen, The frequency of Th2 type cells increases with time on peritoneal dialysis in patients with diabetic nephropathy, *Eur. Cytokine Netw.* 10 (1999) 219–226.
- [16] J. Mysliwska, K. Zorena, E. Semetkowska-Jurkiewicz, D. Rachon, H. Suchanek, A. Mysliwski. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. *Eur. Cytokine Netw.* 16 (2005) 117–122.

- [17] J. Wu, Y. Ding, C. Zhu, X. Shao, X. Xie, K. Lu, et al., Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes, *Exp. Ther. Med.* 6 (2013) 1482–1488.
- [18] J.F. Navarro, C. Mora-Fernández, The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications, *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (2006) 441–450.
- [19] P.P. Wolkow, M.A. Niewczas, B. Perkins, L.H. Ficociello, B. Lipinski, J.H. Warram, et al., Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric Type 1 Diabetics, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 789–797.
- [20] D.Z. Cherney, J.W. Scholey, D. Daneman, D.B. Dunger, R.N. Dalton, R. Moineddin R, et al., Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria, *Diabet. Med.* 29 (2012) 1297–1302.
- [21] American Diabetes Association, Standards of medical care in diabetes – 2014, *Diabetes Care* 37 (2014) S14–S80.
- [22] K. Matsushita, M. van der Velde, B.C. Astor, M. Woodward, A.S. Levey, P.E. de Jong, et al., Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis, *Lancet.* 375 (2010) 2073–2081.
- [23] D.C. Wheeler, G.J Becker, Summary of KDIGO guideline. What do we really know about management of blood pressure in patients with chronic kidney disease? *Kidney Int.* 83 (2013) 377–383.
- [24] K. Larsen, Creatinine assay by a reaction-kinetic principle, *Clin. Chim. Acta* 41 (1972) 209–217.
- [25] D.J. Newman, M.J. Pugia, J.A. Lott, J.F. Wallace, A.M. Hiar, Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity, *Clin. Chim. Acta* 294 (2000) 139–155.
- [26] A.S. Levey, L.A Stevens, C.H. Schmid, Y.L. Zhang, A.F. Castro, H.I. Feldman, et al., A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Ann. Intern. Med.* 150 (2009) 604–612.
- [27] M.B. Duran-Salgado, A.F. Rubio-Guerra, Diabetic nephropathy and inflammation, *World J. Diabetes* 5 (2014) 393–398.
- [28] J.F. Navarro, C. Mora, Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy, *ScientificWorldJournal* 6 (2006) 908–17.
- [29] M. Shikano, H. Sobajima, H. Yoshikawa, T. Toba, H. Kushimoto, H. Katsumata, et al., Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy, *Nephron* 85 (2000) 81–85.

- [30] J.F. Navarro, C. Mora, M. Muros, J. García, Urinary tumour necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients, *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 3428–3434.
- [31] Y. Moriwaki, T. Yamamoto, Y. Shibutani, E. Aoki, Z. Tsutsumi, S. Takahashi, et al., Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor- α in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy, *Metabolism* 52 (2003) 605–608.
- [32] H.O. El Mesallamy, H.H. Ahmed, A.A. Bassyouni, A.S. Ahmed, Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 646–650.
- [33] C.C. Wu, J.S. Chen, K.C. Lu, C.C. Chen, S.H. Lin, P. Chu, et al., Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 700–704.
- [34] F.L. Nauta, W.E. Boertien, S.J.L. Bakker, H. Van Goor, W. Van Oeveren, P.E. de Jong, et al., Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes, *Diabetes Care* 34 (2011) 975–981.
- [35] J.A.M. De Carvalho, E. Tatsch, B.S. Hausen, Y.S. Bollick, M.B. Moretto, T. Duarte, et al., Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 232–236.

Table 1. Baseline clinical characteristics of study participants.

	Without DKD	With DKD	<i>P</i> value
Age (years)	60.0 ± 12.3	57.1 ± 12.5	0.302
Male (%)	35	29	0.609
BMI (kg/m ²)	29.6 (26.6–35.5)	32.3 (26.7–43.4)	0.115
Hypertension (%)	73	86	0.186
Smokers (%)	9	12	0.556
Diabetes duration (years)	12.0 (6.0–20.0)	10.0 (7.0–20.0)	0.900
Hypoglycemic agents (%)	94	87	0.277
Antihypertensive agents (%)	78	75	0.752
Statins use (%)	83	70	0.198
Fasting glucose (mmol/L)	6.5 (5.7–8.5)	6.9 (5.6–13.4)	0.318
HbA _{1c} (%)	6.9 (5.9–8.2)	7.1 (5.9–9.7)	0.408
HbA _{1c} (mmol/mol)	52.0 (41.0–66.0)	54.0 (41.0–82.0)	0.408
Total cholesterol (mmol/L)	4.6 (4.0–4.9)	4.5 (4.0–5.4)	0.987
LDL cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 0.7	2.7 ± 1.0	0.398
HDL cholesterol (mmol/L)	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.4	0.582
Triglycerides (mmol/L)	1.4 (1.0–2.1)	1.6 (1.0–2.3)	0.389
hsCRP (mg/dL)	0.3 (0.2–0.5)	0.5 (0.2–0.6)	0.179
Serum creatinine (µmol/L)	79.6 (70.7–97.2)	79.6 (70.7–97.2)	0.613
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	76.3 ± 21.1	77.5 ± 24.4	0.798
uACR (mg/g creatinine)	7.3 (4.7–11.5)	104.8 (94.2–299.3)	<0.001

Data are expressed as percentages, mean ± standard deviation or median and interquartile range. T2DM, type 2 diabetes *mellitus*; DKD, diabetic kidney disease; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; hsCRP, high-sensitivity C-reactive protein; uACR, urinary albumin/creatinine ratio.

Table 2. Characteristics of urinary inflammatory cytokines in the assessment of diabetic kidney disease (DKD).

	AUC	95% CI	P value	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)
IL-1	0.957	0.905–0.986	<0.001	128.0	87	95
IL-6	0.954	0.905–0.986	<0.001	139.0	92	91
IL-10	0.924	0.901–0.984	<0.001	50.0	92	83
TNF- α	0.958	0.862–0.964	<0.001	165.0	92	99
IFN- γ	0.943	0.886–0.977	<0.001	182.0	87	95
IL-6/IL-10	0.974	0.928–0.994	<0.001	2.5	96	93
(IL-6+TNF- α)/IL-10	0.978	0.954–1.000	<0.001	5.8	94	96

AUC, area under curve; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10; TNF- α , tumor necrosis factor-alpha; IFN- γ , interferon-gamma.

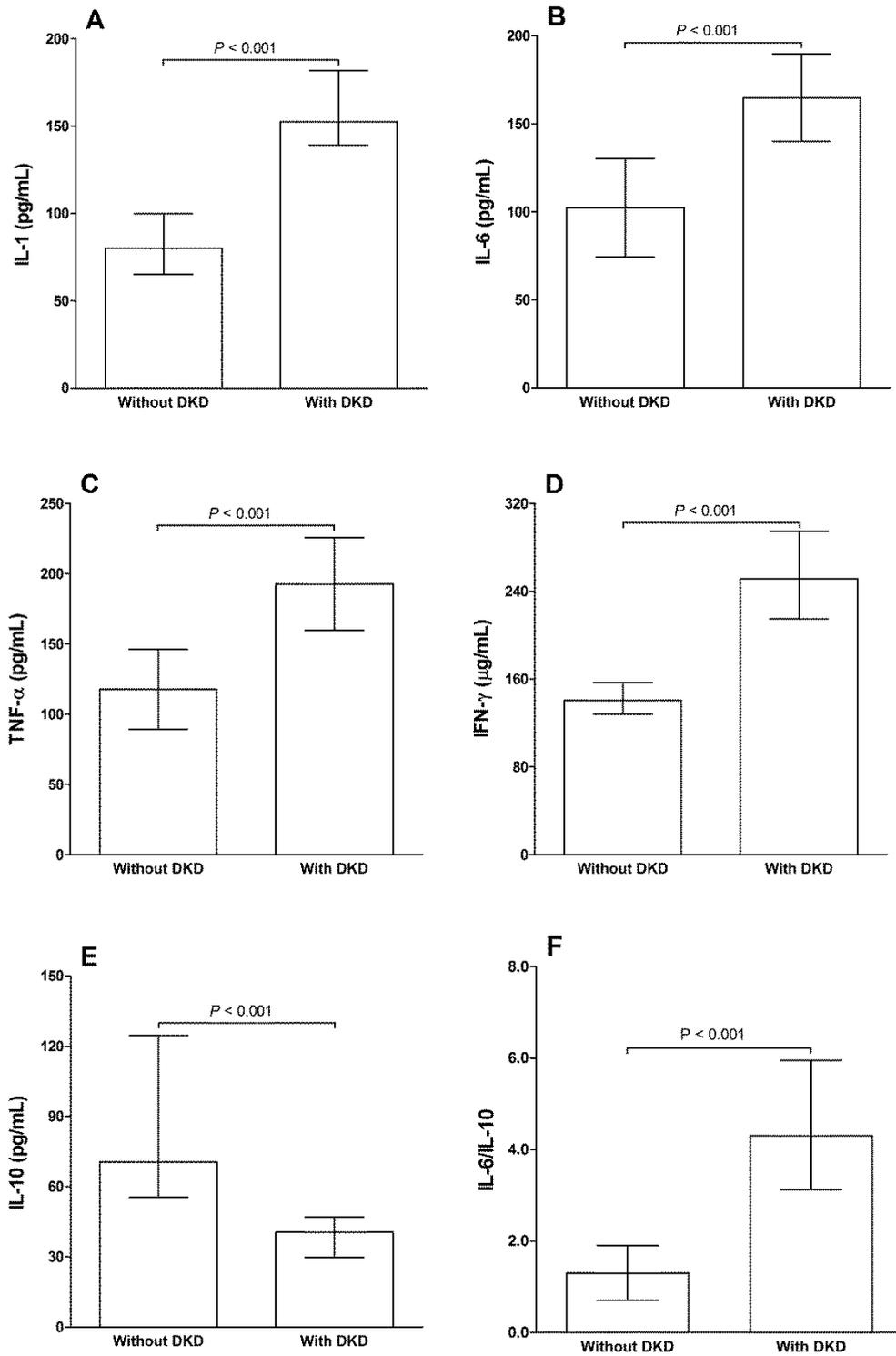


Figure 1. Urinary levels of inflammatory cytokines, (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IFN- γ , (E) IL-10 and (F) IL-6/IL-10 ratio of study participants. Data are expressed as mean \pm standard deviation or median and interquartile range.

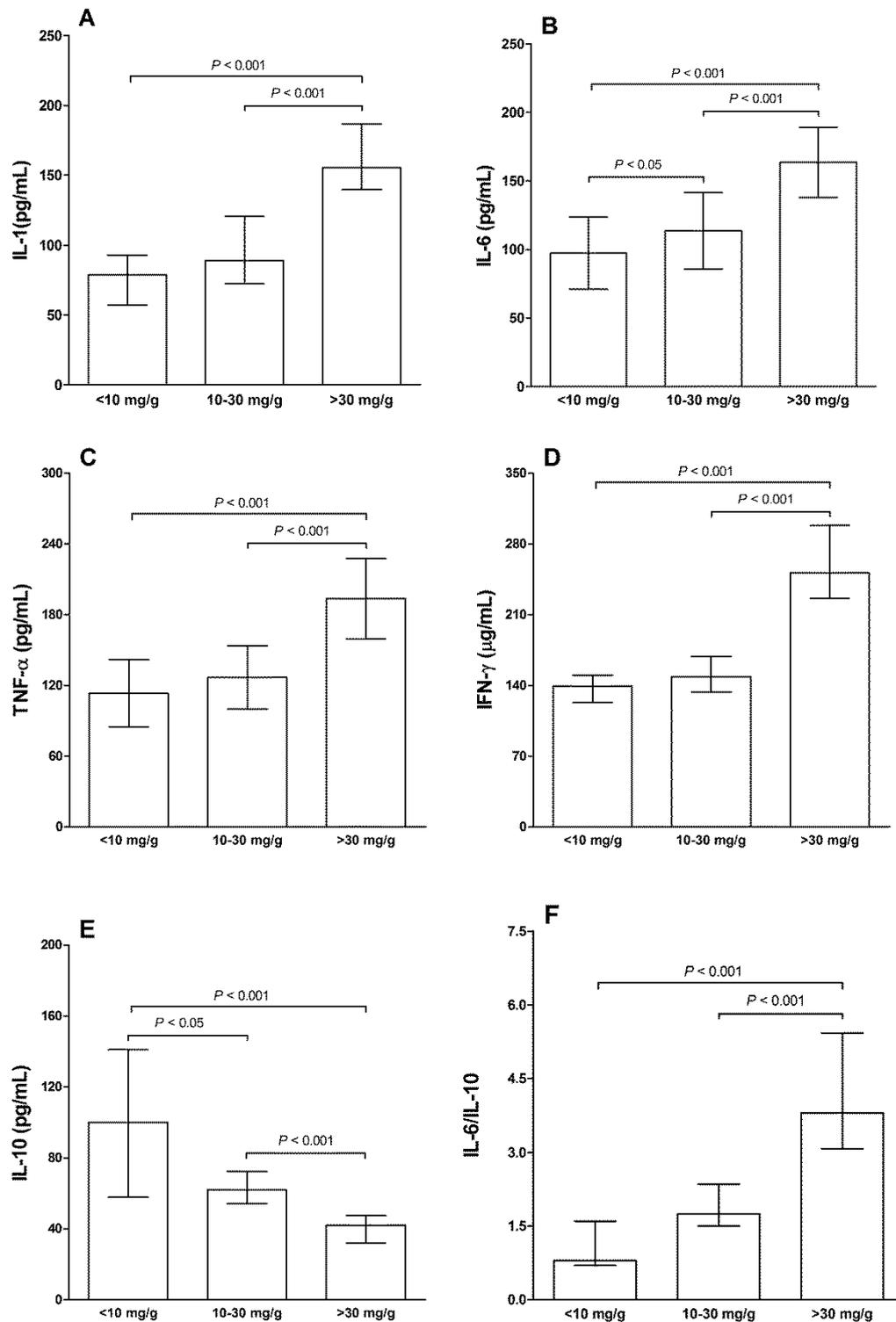


Figure 2. Urinary levels of inflammatory cytokines, (A) IL-1, (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IFN- γ , (E) IL-10 and (F) IL-6/IL-10 ratio of study participants stratified at different concentrations of urinary albumin/creatinine ratio (uACR): uACR <10 mg/g creatinine, uACR 10–30 mg/g creatinine and uACR >30 mg/g creatinine. Data are expressed as mean \pm standard deviation or median and interquartile range.

3 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Association between urinary levels of interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha with glomerular and tubular damage indicators in type 2 diabetic patients

Manuela Borges Sangoi^{a,b,c}, José Antonio M. de Carvalho^{a,d}, Etiane Tatsch^{a,c}, Bruna S. Hausen^{a,c}, Naiara dos Santos Guarda^{a,c}, Thiago Duarte^e, Marta M. M. F. Duarte^{e,f}, Melissa O. Premaor^{e,g}, Fabio V. Comim^{e,g}, Maria B. Moretto^{c,e}, Rafael N. Moresco^{a,c,e,*}

A ser submetido para Periódico Internacional no formato de *Short Communication* ou *Letter to the Editor*

Association between urinary levels of interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha with glomerular and tubular damage indicators in type 2 diabetic patients

Manuela Borges Sangoi^{a,b,c}, José Antonio M. de Carvalho^{a,d}, Etiane Tatsch^{a,c}, Bruna S. Hausen^{a,c}, Naiara dos Santos Guarda^{a,c}, Thiago Duarte^e, Marta M. M. F. Duarte^{e,f}, Melissa O. Premaor^{e,g}, Fabio V. Comim^{e,g}, Maria B. Moretto^{c,e}, Rafael N. Moresco^{a,c,e,*}

^aLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Health Sciences, Integrated Regional University of High Uruguay and Missions, Santiago, RS, Brazil

^cPharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^dUniversity Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^ePharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^fDepartment of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil

^gDepartment of Clinical Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding Author: Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Phone.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018; E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Postal address affiliations:

Federal University of Santa Maria : Avenida Roraima, 1000, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Lutheran University of Brazil: BR 287, Km 252, Trevo Maneco Pedroso, Boca do Monte, 97020-001, Santa Maria, RS, Brazil.

Clinical Analysis Laboratory, Labimed: Rua Pinheiro Machado, 2350, Edifício Central de Clínicas, Centro, 97050-600, Santa Maria, RS, Brazil.

Integrated Regional University of High Uruguay and Missions: Avenida Batista Bonoto Sobrinho, 733, São Vicente, 97700-000, Santiago, RS, Brazil.

E-mail addresses of authors :

Manuela Borges Sangoi : manuelasangoi@gmail.com;

José Antonio Mainardi de Carvalho: zemainardi@yahoo.com.br;

Etiane Tatsch : etianetatsch@gmail.com

Bruna S. Hausen : brunahausen@hotmail.com

Naiara dos Santos Guarda: naiarasguarda@hotmail.com

Thiago Duarte: duartethiago89@yahoo.com.br

Marta M. M. F. Duarte: duartmm@hotmail.com

Melissa Orlandin Premaor: premaor@ufsm.br

Fabio Vasconcelos Comim: fabio.comim@ufsm.br

Maria B. Moretto: beatriz.moretto@yahoo.com.br

Abstract

Objectives: The aim of this study was to investigate the urinary concentrations of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) according to quartiles of estimated glomerular filtration rate (eGFR), urinary albumin/creatinine ratio (uACR) and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) in type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) patients.

Design and Methods: This study included 121 T2DM patients stratified into quartiles of eGFR, uACR, and uNGAL. Urinary inflammatory cytokines were measured.

Results: The urinary levels of IL-6 and TNF- α increased 45.5% and 49.4% in the patients from the highest uACR quartile compared to those in the lowest quartile. In contrast, urinary IL-10 levels decreased 59.1% in patients in the highest uACR quartile compared to those in the lowest quartile. Urinary IL-6 and TNF- α were 75.3% and 81.6%, respectively, higher in the highest uNGAL quartile compared to the lowest quartile. Additionally, the urinary IL-10 concentration was 30.2% lower in patients from the highest uNGAL quartile compared to those from the lowest quartile.

Conclusion: Urinary inflammatory markers such as IL-6, IL-10, and TNF- α constitute a useful and noninvasive approach for monitoring the development and progression of glomerular and tubular injuries in T2DM patients.

Keywords: diabetes, kidney damage, urine, cytokines, albumin, neutrophil gelatinase-associated lipocalin.

Abbreviations

CKD-EPI, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; DKD, Diabetic Kidney Disease; eGFR, Estimated Glomerular Filtration Rate; HbA_{1c}, Glycated Hemoglobin; hsCRP, High-sensitivity C-reactive Protein; IFN- γ , Interferon-gamma; IL-1, Interleukin-1; IL-10, Interleukin-10; IL-6, Interleukin-6; NAG, N-acetyl- β -glucosaminidase; T2DM, Type 2 Diabetes *mellitus*; TNF- α , Tumor Necrosis Factor-alpha; uACR, Urinary Albumin/Creatinine Ratio; uNGAL, Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin.

1. Introduction

Diabetic kidney disease (DKD) is a frequent and severe long-term microvascular complication of diabetes, and it has become the leading cause of end-stage renal disease in most countries, accounting for an increased morbidity and mortality among diabetic patients [1,2]. Thus, the prevention and early identification of DKD is imperative for adequate management of this disease [3].

Urinary albumin is a classical marker of DKD. However, there are attendant shortcomings of albuminuria as a diagnostic tool for DKD because it lacks sensitivity and specificity for identification of renal disease in diabetes [3,4]. In this context, growing evidence indicates that the tubular damage markers are sensitive and specific biomarkers for detecting kidney damage [5]. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL), a member of the lipocalin protein family, is a promising marker because it increases in diabetic patients with or without albuminuria, indicating tubular damage at an early stage [6,7]. Additionally, inflammatory markers may be used to monitor the development or progression of DKD since inflammation is a relevant pathway linked to this disease [4]. Recently, we have demonstrated that measurement of urinary interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) may assist in the identification of DKD in type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) patients, even in the absence of micro- and macroalbuminuria [8].

Since some urinary cytokines have potential in the identification of DKD, the present study was designed to further improving knowledge about the relationship between urinary cytokines and biomarkers associated with the physiopathology of DKD. Therefore, we investigated the urinary levels of IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) according to quartiles of estimated glomerular filtration rate (eGFR), urinary albumin/creatinine ratio (uACR) and uNGAL in T2DM patients.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Data from 196 previously diagnosed T2DM patients recruited from the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil were screened. Exclusion criteria were any of the following conditions: urinary tract diseases, prior diseases other than DKD, malignancy, infections, liver diseases, acute or chronic inflammatory diseases, pregnancy, renal transplantation and the use of nephrotoxic drugs. Thus, a total of 121 T2DM patients

were studied. The eligible patients were stratified into quartiles of eGFR, uACR, and uNGAL. Relevant clinical study characteristics and medical history were recorded by reviewing the hospital's medical registry and based on the information provided by patients in a clinical and epidemiological evaluation questionnaire. This study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (12303113.0.0000.5346).

2.2. *Sample collection and biochemical analysis*

Blood samples were obtained from participants in a fasting state by venous puncture technique into the Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes. Whole blood in EDTA was used to assess glycated hemoglobin levels (HbA_{1c}) using the chromatographic method in a D10[®] automated analyzer (BioRad, California, USA). For estimation of fasting glucose, the plasma collected with tubes containing fluoride plus EDTA was used. The serum was used to quantify the concentrations of total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and creatinine. Morning urine samples were also collected for each patient and used to measure the concentrations of albumin and creatinine. All these parameters were performed using standard methods on a Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA). Urinary albumin results were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine [9]. Moreover, uNGAL and inflammatory cytokines (IL-6, IL-10, and TNF- α) were determined in the urine samples. uNGAL was measured using ELISA kit designed to analyze random spot urine samples (HYB211-05, Antibody Shop, Gentofte, Denmark). Urinary cytokine concentrations were detected by ELISA using commercial kits for human IL-6, IL-10, and TNF- α (R&D Systems Inc[®], Minneapolis, Minnesota, USA). The eGFR was calculated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation [10].

2.3. *Statistical analysis*

Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) for parametric continuous variables, or median (interquartile range) for nonparametric continuous variables. Categorical variables were expressed as percentages. The comparisons of urinary inflammatory cytokine levels among the different categories (quartiles) of eGFR, uACR, and uNGAL were performed by a one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. All the analyses were performed using GraphPad Prism[®] (version 4.0).

3. Results

Baseline clinical characteristics of study participants are summarized in Table 1. Patients were categorized into quartiles of eGFR, uACR, and uNGAL. The eGFR thresholds were: <61.0 mL/min/1.73 m², 61.0–76.0 mL/min/1.73 m², 77.0–92.0 mL/min/1.73 m² and >92.0 mL/min/1.73 m² for quartiles 1–4, respectively. However, urinary levels of IL-6, IL-10, and TNF- α did not show any significant difference across the eGFR quartiles (data not shown).

Figure 1 shows urinary concentrations of IL-6, IL-10, and TNF- α according to quartiles of uACR and uNGAL. The uACR quartiles were: <5.4 mg/g creatinine, 5.4–9.0 mg/g creatinine, 9.1–17.6 mg/g creatinine and >17.6 mg/g creatinine. The urinary levels of IL-6 and TNF- α increased 45.5% and 49.4%, respectively, in the patients from the highest uACR quartile compared to those in the lowest quartile ($p < 0.001$ for both). In contrast, urinary IL-10 levels decreased 59.1% in patients in the highest uACR quartile compared to those in the lowest quartile ($p < 0.001$).

Moreover, the thresholds for uNGAL quartiles were: <30.0 ng/mL, 30.0–39.0 ng/mL, 40.0–61.4 ng/mL and >61.4 ng/mL for quartiles 1–4, respectively. Notably, higher urinary concentrations of IL-6 and TNF- α were observed in uNGAL quartiles 3 and 4. Urinary IL-6 and TNF- α were 75.3% and 81.6%, respectively, higher in highest uNGAL quartile compared to the lowest quartile ($p < 0.001$ for both). Additionally, the urinary IL-10 concentration was 30.2% lower in patients from the highest uNGAL quartile compared to those from the lowest quartile ($p < 0.001$).

4. Discussion

Accumulating data have supported the critical role of inflammation in the development and progression of DKD. Therefore, the use of inflammatory markers has emerged as a new approach for assessment of renal disease in diabetic patients. The pathogenesis of DKD includes a chronic inflammation with the influx of inflammatory cells and following generation of proinflammatory cytokines which contributes to the kidney damage [11]. The present study has demonstrated an association between the urinary inflammatory cytokines IL-6, IL-10 and TNF- α and the biomarkers associated with the pathogenesis and progression of DKD regarding both glomerular and tubular damage.

Patients who developed DKD have low-grade of inflammation years before the onset of the disease [3,12]. Interestingly enough, results of our previous study showed the alteration of the urinary proinflammatory cytokine IL-6 and urinary anti-inflammatory cytokine IL-10 even in T2DM patients with normal or mildly increased albuminuria, suggesting that these markers may be altered even before a diagnosis of DKD [8]. Moreover, convincing data have reported the rise of urinary inflammatory cytokines excretion according to the DKD progress [13,14]. Preliminary clinical reports have shown a significant relationship between the urinary excretion of inflammatory cytokines and uACR in T2DM patients [12,15]. Consistent with these findings, in the present study, an increase of urinary IL-6 and TNF- α levels, and a decrease in urinary IL-10 levels were observed in higher uACR quartiles. These observations support the notion that the inflammation contributes to the development and the progression of renal damage in patients with diabetes. Thus, inflammatory markers may be useful for the early assessment of patients with DKD, especially because these parameters can contribute to a better prognosis.

Additionally, higher urinary levels of IL-6 and TNF- α and lower urinary concentrations of IL-10 were found across quartiles of uNGAL. In this context, Navarro et al. [15] demonstrated that T2DM patients in the upper quartile of serum inflammatory parameters (TNF- α and hs-CRP) had more albuminuria and urinary excretion of the tubular marker N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG) than patients in the lower quartile. Moreover, TNF- α excretion was significantly and positively associated to uNAG. Taken together with our results, these findings reiterate that the inflammation is associated with glomerular and tubular damage in the setting of diabetes.

In conclusion, urinary inflammatory markers such as IL-6, IL-10, and TNF- α constitute a useful and noninvasive approach for monitoring the development and progression of glomerular and tubular injuries in T2DM patients. However, further longitudinal studies are required to understand better the role of inflammatory cytokines as biomarkers for prognosis of renal injury in diabetic patients.

Disclosure of conflict of interest

The authors declare there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by the National Council for Scientific and Technological Development [CNPq/Brazil, number 476758/2012-2]. The authors thank CNPq/Brazil and Capes/Brazil for providing fellowships. The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) for providing biochemical reagents.

References

- [1] A.K.H. Lim, Diabetic nephropathy – complications and treatment, *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* 7 (2014) 361–381.
- [2] C. Mora-Fernández, V. Domínguez-Pimentel, M.M. de Fuentes, J.L. Górriz, A. Martínez-Castelao, J.F. Navarro-González, Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics, *J. Physiol.* 592 (2014) 3997–4012.
- [3] S.Y. Lee, M.E. Choi, Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria, *Pediatr. Nephrol.* 30 (2014) 1063–1075.
- [4] A. Matheson, M.D. Willcox, J. Flanagan, B.J. Walsh, Urinary biomarkers in type 2 diabetes: a review, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26 (2010) 150–171.
- [5] R.N. Moresco, M.B. Sangoi, J.A.M. de Carvalho, E. Tatsch, G.V. Bochi, Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers, *Clin. Chim. Acta* 421 (2013) 17–30.
- [6] S.E. Nielsen, K.J. Schjoedt, A.S. Astrup, L. Tarnow, M. Lajer, P.R. Hansen, H.H. Parving, P. Rossing, Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril, *Diab. Med.* 27 (2010) 1144–1150.
- [7] J.A.M. De Carvalho, E. Tatsch, B.S. Hausen, Y.S. Bollick, M.B. Moretto, T. Duarte, M.M.M.F. Duarte, S.W.K. Londero, M.O. Premaor, F.V. Comim, J.R. Delanghe, R.N. Moresco, Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as

indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 232–236.

[8] M.B. Sangoi, J.A.M. De Carvalho, E. Tatsch, B.S. Hausen, Y.S. Bollick, S.W.K. Londero, T. Duarte, R. Scolari, M.M.M.F. Duarte, M.O. Premaor, F.V. Comim, M.B. Moretto, R.N. Moresco, Urinary inflammatory cytokines as indicators of kidney damage in type 2 diabetic patients, *Clin. Chim. Acta* 460 (2016) 178–183.

[9] D.J. Newman, M.J. Pugia, J.A. Lott, J.F. Wallace, A.M. Hiar, Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity, *Clin. Chim. Acta* 294 (2000) 139–155.

[10] A.S. Levey, L.A. Stevens, C.H. Schmid, Y.L. Zhang, A.F. Castro, H.I. Feldman, J.W. Kusek, P. Eggers, F. Van Lente, T. Greene, J. Coresh, A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Ann. Intern. Med.* 150 (2009) 604–612.

[11] M.B. Duran-Salgado, A.F. Rubio-Guerra, Diabetic nephropathy and inflammation, *World J. Diabetes* 5 (2014) 393–398.

[12] J. Wu, Y. Ding, C. Zhu, X. Shao, X. Xie, K. Lu, R. Wang, Urinary TNF- α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes, *Exp. Ther. Med.* 6 (2013) 1482–1488.

[13] P.P. Wolkow, M.A. Niewczas, B. Perkins, L.H. Ficociello, L.H. Lipinski, J.H. Warram, A.S. Krolewski, Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric type 1 diabetics, *J. Am. Soc. Nephrol.* 19 (2008) 789–797.

[14] J.F. Navarro, C. Mora, M. Macia, J. Garcia, Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus, *Am. J. Kidney Dis.* 42 (2003) 53–61.

[15] J.F. Navarro, C. Mora, M. Muros, J. García, Urinary tumour necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients, *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 3428–3434.

Table 1.

Baseline characteristics and biochemical parameters of the study population.

Characteristics and biochemical parameters	
Age (years)	59.5 ± 12.4
Male (%)	34.0
BMI (kg/m ²)	29.7 (26.7–35.4)
Hypertension (%)	75.4
Smokers (%)	8.8
Diabetes duration (years)	12.0 (6.0–20.0)
Hypoglycemic agents (%)	92.4
Antihypertensive agents (%)	76.7
Fasting glucose (mmol/L)	6.6 (5.7–8.8)
HbA _{1c} (%)	6.8 (5.9–8.5)
HbA _{1c} (mmol/mol)	51.5 (41.0–69.0)
Total cholesterol (mmol/L)	4.5 (4.0–5.0)
LDL cholesterol (mmol/L)	2.5 ± 0.7
HDL cholesterol (mmol/L)	1.2 ± 0.5
Triglycerides (mmol/L)	1.5 (1.0–2.2)
hsCRP (mg/dL)	0.3 (0.2–0.5)
Serum creatinine (μmol/L)	79.6 (70.7–97.2)
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	76.1 ± 21.5
uACR (mg/g creatinine)	9.1 (5.4–17.8)

Data are expressed as percentages, mean ± standard deviation or median and interquartile range. BMI: body mass index; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein; eGFR: estimated glomerular filtration rate; uACR, urinary albumin/creatinine ratio.

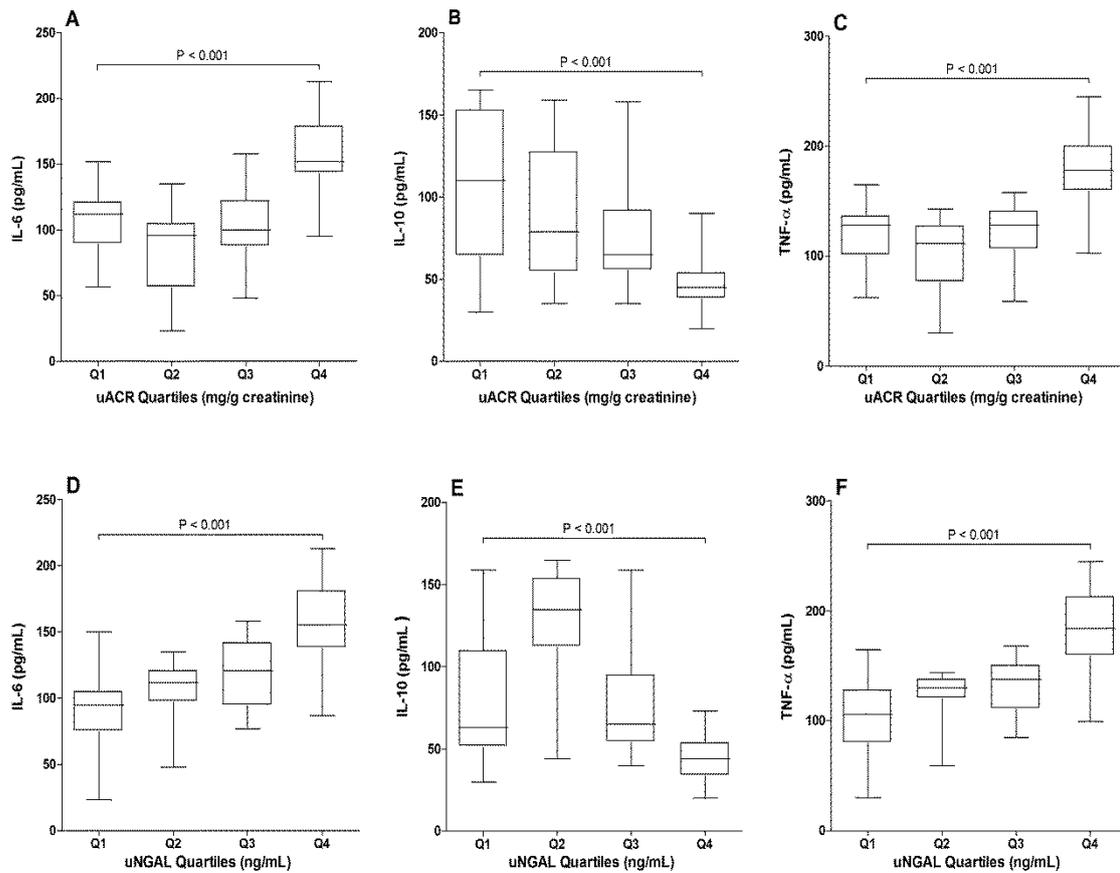


Fig. 1. Box and whisker plots of urinary levels of IL-6, IL-10 and TNF- α according to urinary albumin/creatinine ratio (uACR) and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (uNGAL) quartiles.

4 DISCUSSÃO

A DRD é considerada a complicação microvascular mais notável associada ao DM, uma vez que tem se tornado uma importante causa de mortalidade e morbidade em aproximadamente 30% dos pacientes diabéticos (SUN e KANWAR, 2015). Até o presente momento, a albuminúria é um dos marcadores mais utilizados na prática clínica para avaliação do dano renal (LIN et al., 2016), além de ser reconhecida como um preditor da progressão para doença renal em estágio final em pacientes com DM (IMPERATORE et al., 2012; STANTON, 2014b). No entanto, embora este teste seja facilmente executado, apresenta algumas limitações em relação às suas aplicações clínicas, no que se refere à sensibilidade, especificidade e poder preditivo (LEE e CHOI, 2014; LIN et al., 2016). Neste sentido, novos biomarcadores associados às vias envolvidas no desenvolvimento e na progressão da DRD têm sido identificados com a finalidade de serem utilizados como ferramentas no diagnóstico e prognóstico, além de fornecerem informações sobre a fisiopatologia da doença (MORESCO et al., 2013). Especial atenção tem sido dada ao papel crítico da inflamação no desenvolvimento e na progressão do dano renal associado ao DM (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014).

Desta forma, as limitações relacionadas à utilização da albuminúria na prática clínica e o importante papel da inflamação na patogênese da DRD motivaram a realização deste estudo. Aliado a estas questões, o fato de ainda existirem poucos estudos avaliando as concentrações urinárias das citocinas inflamatórias em pacientes diabéticos normoalbuminúricos motivou o estudo destes marcadores em relação a suas características na identificação da DRD e suas associações com o dano renal, a nível glomerular e tubular. Foi desenvolvido um artigo científico, publicado no periódico *Clinica Chimica Acta* e um manuscrito, a ser submetido para um periódico internacional no formato de *Short Communication* ou *Letter to the Editor*.

No artigo científico, avaliamos os níveis urinários das citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ em pacientes com DM tipo 2. Foi observado que as concentrações urinárias de IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ estavam notavelmente mais elevadas nos pacientes com DRD em relação àqueles sem a doença. O mesmo ocorreu para a razão entre a citocina pró-inflamatória IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10. Quanto às concentrações urinárias de IL-10, observou-se redução nos pacientes com doença renal, comparados àqueles sem esta patologia. Estes resultados corroboram os achados de estudo anteriores, nos quais foi demonstrado que pacientes com DRD apresentam excreção urinária aumentada de citocinas

inflamatórias (EL MESALLAMY et al., 2012; WU et al., 2010). Além disso, evidenciam o envolvimento da inflamação na DRD.

As citocinas inflamatórias são produzidas por células infiltradas nos rins ou por células intrínsecas renais. Estas moléculas induzem alterações hemodinâmicas intra-renais, modificações na estrutura da matriz extracelular e na membrana basal dos rins, além de contribuírem para anormalidades na expressão de diversas moléculas, necrose e apoptose celular, alterações na permeabilidade do endotélio glomerular e incremento na produção de EROs. Estes eventos contribuem para o desenvolvimento e para a progressão do dano neste órgão (DURAN-SALGADO e RUBIO-GUERRA, 2014). De fato, já foi demonstrado que pacientes com DM que desenvolvem doença renal, apresentam características inflamatórias anos antes do desenvolvimento da doença (MISSERI et al., 2005; NAVARRO e MORA-FERNÁNDEZ, 2008; WU et al., 2013). Também já foi reportado que o processo inflamatório renal contribui para o agravamento da DRD (CHERNEY et al., 2012; WOLKOW et al., 2008; WU et al., 2013). Então, as citocinas inflamatórias urinárias parecem ser biomarcadores úteis na avaliação da DRD.

Neste sentido, ainda no artigo científico, foi demonstrado que as citocinas inflamatórias avaliadas apresentaram boa capacidade na identificação da DRD entre os pacientes com DM tipo 2. Os resultados da análise da *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC) mostraram uma área sob a curva (AUC) superior a 0,9 para todos os marcadores estudados e também para a razão IL-6/IL-10. No entanto, um resultado que merece destaque é a alteração da IL-6, da IL-10 e da razão entre estas duas citocinas, mesmo em pacientes normoalbuminúricos. Os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com a uACR, sendo: uACR <10 mg/g creatinina (normal), uACR 10–30 mg/g creatinina (levemente elevada) e uACR >30 mg/g creatinina (moderadamente/severamente elevada). Cabe ressaltar, que os dois primeiros grupos estão dentro da faixa de EUA normal, se considerarmos os critérios diagnósticos atuais da DRD. Os níveis urinários de IL-6 se elevaram através das diferentes faixas de albuminúria. O mesmo ocorreu para a razão IL-6/IL-10. Já as concentrações urinárias de IL-10 se apresentaram diminuídas da menor faixa de uACR para a maior.

Especificamente, a IL-6 afeta a dinâmica da matriz extracelular, estimula a proliferação de células mesangiais, induz a expressão de fibronectina e aumenta a permeabilidade do endotélio glomerular (DALLA VESTRA et al., 2005; NAVARRO-GONZÁLEZ e MORA-FERNÁNDEZ, 2008). Já a IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Os estudos na literatura relacionando esta citocina ao DM

tipo 2 são escassos e limitados à avaliação das concentrações séricas da mesma. Os dados existentes não são suficientes para esclarecer se a IL-10 apresenta um papel causal ou protetor no dano renal associado ao DM (HERDER et al., 2013; MYSLIWSKA et al., 2005; ZAMAUSKAITE et al., 1999). No entanto, nós acreditamos que o desequilíbrio nas concentrações destas duas citocinas pode ser relevante no contexto da DRD e que valores elevados da razão entre estas duas interleucinas (IL-6/IL-10) podem estar associados com a ativação do processo inflamatório.

Estes resultados sugerem que as citocinas inflamatórias urinárias, especialmente a IL-6 e a IL-10, podem estar alteradas mesmo antes do diagnóstico de DRD. Neste sentido, a avaliação destes marcadores pode representar uma nova estratégia na avaliação e no monitoramento da doença renal, antes mesmo que ocorra a alteração de marcadores tradicionais, incluindo a estimativa da TFG, a mensuração da creatinina sérica e a determinação da albuminúria.

Considerando que as citocinas inflamatórias urinárias apresentaram relevância na identificação da DRD entre os pacientes com DM tipo 2, no manuscrito científico, nós objetivamos investigar a associação entre citocinas inflamatórias urinárias e marcadores de função renal, de dano glomerular e de dano tubular. Para responder a este objetivo, os pacientes foram estratificados em diferentes quartis de TFG estimada, uACR e NGAL urinária (uNGAL) e avaliadas a excreção urinária de IL-6, IL-10 e TNF- α .

Verificamos que os níveis urinários de IL-6 e de TNF- α não foram significativamente diferentes entre os quartis de TFG estimada. Com relação às concentrações urinárias de IL-10, estas também não diferiram significativamente entre os quartis de TFG estimada. Entretanto, foi observada uma tendência de aumento desta citocina no quartil mais alto, em relação ao quartil mais baixo de TFG estimada. Observou-se aumento dos níveis urinários de IL-6 e TNF- α nos indivíduos no mais alto quartil de uACR ou de uNGAL quando comparados com aqueles no baixo quartil. Já as concentrações urinárias de IL-10 diminuíram significativamente quando comparados os indivíduos no mais alto quartil de uACR ou de uNGAL, com aqueles no quartil mais baixo.

Os resultados deste estudo demonstram uma importante associação das citocinas inflamatórias avaliadas com os biomarcadores relacionados à patogênese do dano renal, tanto a nível glomerular, quanto tubular. Estes achados reiteram alguns estudos prévios que têm demonstrado associações das citocinas inflamatórias urinárias com a uACR (NAVARRO et al., 2003a; WU et al., 2010). Além disso, embora mais escassos, há alguns estudos que demonstram a associação do TNF- α com marcadores urinários de dano tubular, como a NAG

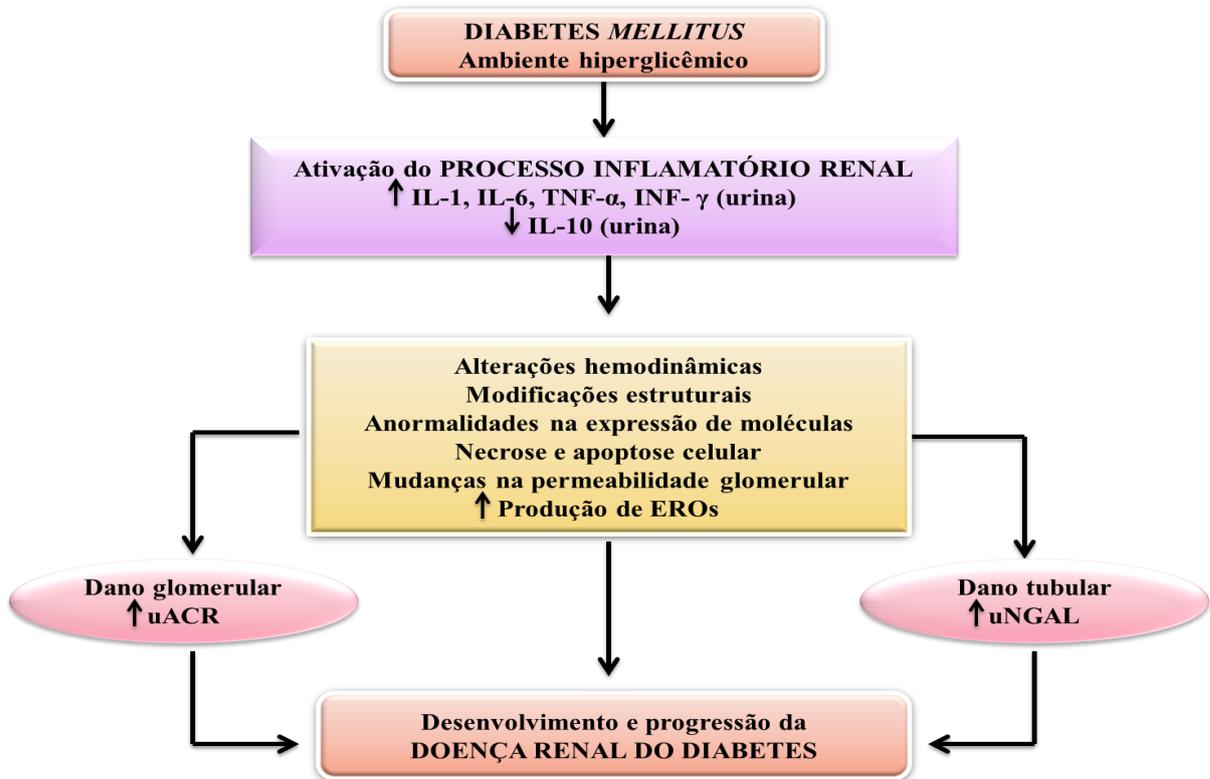
(NAVARRO et al., 2006b) e a NGAL (WU et al., 2013). No entanto, para o nosso conhecimento, não há estudos avaliando a associação das citocinas inflamatórias urinárias IL-6 e IL-10 com marcadores de dano tubular.

Diferentes mecanismos podem contribuir para a patogênese do dano renal no DM. Diversas alterações patológicas e estruturais podem ocorrer simultaneamente e progredir em diferentes taxas nos rins de pacientes diabéticos, levando a heterogeneidade da doença (WU et al., 2013). Evidências recentes têm focado na importância da detecção do dano tubular e sua associação com a injúria renal em pacientes com DRD (DE CARVALHO et al., 2016; NAUTA et al., 2011; VAIDYA et al., 2011). O dano tubular ocorre precocemente no curso da DRD e não é meramente secundário ao dano glomerular (GILBERT e COOPER, 1999; PHILLIPS, 1999). Tem sido sugerido que um aumento na excreção urinária de marcadores tubulares pode ser devido a diversas condições que são potencialmente prejudiciais aos rins, incluindo a isquemia, toxicidade, sepse e hiperglicemia (PERALTA et al., 2012).

As citocinas inflamatórias exercem efeitos relevantes a nível renal, promovendo a inflamação, a apoptose e o estresse oxidativo e, conseqüentemente, alterações renais estruturais e funcionais que contribuem para o desenvolvimento e a progressão da doença renal em pacientes diabéticos (MISSERI et al., 2005; NAVARRO e MORA-FERNÁNDEZ, 2006). Neste contexto, nós acreditamos que estes efeitos podem explicar a associação encontrada entre os marcadores de dano glomerular e de dano tubular e as citocinas inflamatórias urinárias avaliadas. Uma vez que a associação foi encontrada tanto para a uACR quanto para a uNGAL, podemos sugerir que os processos de dano tubular e glomerular podem estar ocorrendo simultaneamente, pelo menos nos pacientes avaliados, e que a inflamação está associada com os mesmos. Tomados em conjunto com os resultados do artigo científico, estes achados reforçam a utilidade das citocinas inflamatórias urinárias no contexto do dano renal associado ao DM.

Na Figura 5 estão representadas, de forma esquemática, algumas considerações que integram o artigo e o manuscrito desenvolvidos neste trabalho, enfatizando o papel das citocinas inflamatórias na avaliação do dano renal associado ao DM.

Figura 5 – Resumo esquemático demonstrando o papel das citocinas inflamatórias no desenvolvimento e na progressão do dano renal associado ao diabetes *mellitus*.



Desta forma, nós acreditamos que as citocinas inflamatórias, mensuradas na urina, são biomarcadores úteis na avaliação da DRD e que podem ser implantados na prática clínica. Uma das razões para esta afirmação se baseia no fato de que as citocinas inflamatórias urinárias apresentaram boa capacidade diagnóstica, com sensibilidade e especificidade na identificação da doença renal entre os pacientes diabéticos estudados. Outra importância da avaliação das citocinas na urina baseia-se no fato de que estas podem ser detectadas antes mesmo da alteração na EUA, demonstrando que os marcadores inflamatórios são importantes na avaliação da DRD em um estágio precoce. Finalmente, a associação das citocinas urinárias com o dano tubular e glomerular, ou seja, com a patogênese da doença, reforça a relevância destes marcadores no contexto da DRD. Baseados nos resultados de nosso estudo e nos dados da literatura, sugerimos que as citocinas urinárias mais relevantes são a IL-6, a IL-10 e o TNF- α .

Além do desempenho técnico e diagnóstico de um exame clínico, é importante realizar uma avaliação econômica do teste na rotina laboratorial. Cabe ressaltar que a economia em saúde está relacionada não só com o custo, mas também com as consequências sobre o

cuidado dos pacientes (BURTIS et al., 2008). Neste sentido, embora a implantação da determinação das citocinas urinárias na rotina do laboratório possa aumentar o custo para o mesmo, nós acreditamos que estes marcadores podem aumentar o benefício para os pacientes. Ou seja, as informações que as citocinas podem adicionar na avaliação da DRD em relação ao desenvolvimento e progressão desta patologia, podem favorecer o diagnóstico precoce e a utilização de intervenções e, conseqüentemente, evitar a ocorrência de desfechos desfavoráveis, como a doença renal em estágio final.

5 CONCLUSÕES

- Os níveis urinários das citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ) foram mais elevados nos pacientes com DRD, enquanto que as concentrações urinárias da citocina anti-inflamatória IL-10 foram menores neste grupo, em comparação com os pacientes sem DRD. Estes resultados evidenciam o envolvimento do processo inflamatório na fisiopatologia da doença renal associada ao DM;
- Não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros de controle glicêmico e perfil lipídico, assim como para a creatinina sérica e TFG, entre os grupos do estudo;
- As determinações urinárias de IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ , assim como a razão IL-6/IL-10 foram capazes de detectar a DRD entre os pacientes do estudo;
- As concentrações urinárias de IL-6 e IL-10 apresentaram-se alteradas dentre os pacientes normoalbuminúricos (uACR 10–30 mg/g de creatinina), o que evidencia a participação precoce da inflamação na fisiopatologia da DRD;
- A razão entre a citocina pró-inflamatória urinária IL-6 e a citocina anti-inflamatória urinária IL-10 também apresentou-se alterada no grupo com uACR 10–30 mg/g de creatinina, sugerindo que a avaliação da relação entre o estado pró-inflamatório e anti-inflamatório pode estar alterada em um estágio precoce da DRD;
- Os níveis urinários de IL-6, IL-10 e TNF- α estiveram mais alterados nos pacientes que apresentam maiores níveis de uACR e uNGAL, o que demonstra que a inflamação parece contribuir para o agravamento do dano glomerular/tubular na DRD;
- Em suma, as citocinas inflamatórias mensuradas na urina podem ser biomarcadores úteis na avaliação da DRD, uma vez que algumas delas já estão alteradas mesmo em pacientes normoalbuminúricos. Esta observação sugere que os marcadores inflamatórios podem indicar a presença de alterações renais em estágio inicial, antes mesmo destas serem identificadas por medidas convencionais como modificações na TFG e na creatinina sérica, e anteriormente a detecção do marcador tradicional albuminúria. Além disso, estes marcadores apresentam uma boa capacidade de identificar a DRD em pacientes com DM tipo 2 e estão associados com o desenvolvimento de dano renal glomerular e tubular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, E.M. et al. Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: standard and emerging approaches. **Journal of general internal medicine**, v. 27, p. 458-468, 2011.
- ADA, American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, v. 37, p. S14-S80, 2014.
- American Diabetes Association. 9. Microvascular Complications and Foot Care. **Diabetes Care**, v.39, p. S72-S80, 2016.
- BAKRIS, G.L.; MOLITCH, M. Microalbuminuria as risk predictor in diabetes: the continuing saga. **Diabetes Care**, v. 37, p. 867-875, 2014.
- BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, p.1163-1170, 2012.
- BARRATT, J.; TOPHAM, P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. **Canadian Medical Association journal**, v. 177, p. 361-368, 2007.
- BAUD, L. et al. Tumor necrosis factor stimulates prostaglandin production and cyclic AMP levels in rat cultured mesangial cells. **FEBS Letters**, v. 239, p. 50-54, 1998.
- BAXMANN, A.C. et al. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v.3, p.348-354, 2008.
- BIANCHI, M.; DIB, B.; PANERAI, A.E. Interleukin-1 and nociception in the rat. **Journal of Neuroscience Research**, v.53, p.645-650, 1998.
- BLOOMGARDEN, Z.T. Inflammation and insulin resistance. **Diabetes Care**, v.26, p.1922-1926, 2003.
- BOLICK, D.T. et al. Lisofylline, a novel antiinflammatory compound, protects mesangial cells from hyperglycemia and angiotensin II mediated extracellular matrix deposition. **Endocrinology**, v. 144, p. 5227-5231, 2003.
- BOLIGNANO, D. et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 4, p. 337-344, 2009.
- BOOYA, F. et al. Potential risk factors for diabetic neuropathy: a case control study. **BMC neurology**, v. 5, p. 24, 2005.
- BORDER, W.A.; YAMAMOTO, T.; NOBLE, N.A. Transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. **Diabetes/metabolism reviews**, v. 12, p. 309-339, 1996.
- BRADY, H.R. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. **Kidney International**, v. 45, p. 1285-1300, 1994.

BROCCO, E. et al. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. **Kidney International Supplements**, v.63, p. S40-S44, 1997.

BRUNO, G. et al. Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes: the Casale Monferrato Study. **Diabetes Care**, v. 26, p.2150–2155, 2003.

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

BUSCH, M. et al. Advanced glycation end-products and the kidney. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 40, p. 742-755, 2010.

CALABRESE, V. et al. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. **Cell Stress and Chaperones**, v.12, p.299-306, 2007.

CARAMORI, M.L. et al. Cellular basis of diabetic nephropathy: Study design and renal structural-functional relationships in patients with long-standing type 1 diabetes. **Diabetes**, v.51, p.506-513, 2002.

CAWOOD, T.J. et al. Urinary collagen IV and π GST: potential biomarkers for detecting localized kidney injury in diabetes—a pilot study. **American Journal of Nephrology**, v.32, p.219–225, 2010.

CHERNEY, D.Z. et al. Urinary markers of renal inflammation in adolescents with Type 1 diabetes mellitus and normoalbuminuria, **Diabetic Medicine**, v.29, p.1297–1302, 2012.

CHIARELLI, F. et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, p. 1829-1834, 2002.

CHUANG, L.Y.; GUH, J.Y. Extracellular signals and intracellular pathways in diabetic nephropathy. **Nephrology**, v. 6, p. 165-172, 2001.

CLAUSEN, P. et al. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. **Diabetic Medicine**, v. 17, p. 644-649, 2000.

COLEMAN, D.L.; RUEF, C. Interleukin 6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. **Kidney International**, v. 41, p. 604-606, 1992.

CRAIG, M.J.; LOBERG, R.D. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) in cancer bone metastases. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 25, p. 611-619, 2006.

DALLA VESTRA, M. et al. Acute-phase markers markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, p. S78-S82, 2005.

DALLA VESTRA, M. et al. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. **Diabetes & Metabolism**, v.26, p.8-14, 2000.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunology**, v.25, p.4–7, 2004.

D'ANDREA, A. et al. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1041-1048, 1993.

DÁVILA-ESQUEDA, M.E.; VERTIZ-HERNÁNDEZ, A.A.; MARTÍNEZ-MORALES, F. Comparative analysis of the renoprotective effects of pentoxifylline and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus. **Renal Failure**, v. 27, p. 115-122, 2005.

DE BOER, I.H. et al.; Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Research Group. Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort. **Archives of Internal Medicine**, v.171, p.412–420, 2011a.

DE BOER, I.H. et al.; DCCT/ EDIC Research Group. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p.2366–2376, 2011b.

DE CARVALHO, J.A.M. et al. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. **Clinical Biochemistry**, v.49, p.232–236, 2016.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, p.2095–2147, 1996.

DIPETRILLO, K.; COUTERMARSH, B.; GESEK, F.A. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 284, p. F113-F121, 2003.

DIPETRILLO, K.; GESEK, F.A. Pentoxifylline ameliorates renal tumor necrosis factor expression, sodium retention, and renal hypertrophy in diabetic rats. **American Journal of Nephrology**, v. 24, p. 352-359, 2004.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

DONG, X. et al. Resident dendritic cells are the predominant TNF secreting cell in early renal ischemia reperfusion injury. **Kidney International**, v. 71, p. 619-628, 2007.

DRUMMOND, K.; MAUER, M. The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes. **Diabetes**, v.51, p.1580–1587, 2002.

DRURY, P.L. et al. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria are independent predictors of cardiovascular events and death in type 2 diabetes mellitus: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. **Diabetologia**, v. 54, p. 32-43, 2011.

- DURAN-SALGADO, M.B.; RUBIO-GUERRA, A.F. Diabetic nephropathy and inflammation. **World Journal of Diabetes**, v. 5, p. 393-398, 2014.
- DWYER, J. P. et al. Renal dysfunction in the presence of normoalbuminuria in type 2 diabetes: results from the DEMAND study. **Cardiorenal Medicine**, v. 2, p. 1-10, 2012.
- EL MESALLAMY, H.O. et al. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. **Clinical Biochemistry**, v. 45, p. 646-650, 2012.
- EL-HASHEMITE, N. et al. Perturbed IFN- γ -JAK-STAT signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models. **Cancer Research**, v. 64, p. 3361-3375, 2004.
- ELLINA, O. et al. Extracellular matrix-associated (GAGs, CTGF), angiogenic (VEGF) and inflammatory factors (MCP-1, CD40, IFN- γ) in type 1 diabetes mellitus nephropathy. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, p. 167-174, 2012.
- ELMARAKBY, A.A.; SULLIVAN, J.C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovascular Therapeutics**, v.30, p.49–59, 2012.
- ESPINEL, E.; AGRAZ, I.; IBERNON, M. Renal Biopsy in Type 2 Diabetic Patients. **Journal of Clinical Medicine**, v.4, p.998-1009, 2015.
- FARRAR, M.A.; SCHREIBER, R.D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 571-611, 1993.
- FIORETTO, P. et al. Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria. **Diabetologia**, v.39, p.1569-1576, 1996.
- FLANDROIS, C.; GRAVAGNA, B.; MAIRE, I., et al. Enzymuria. **Annales de Biologie Clinique**, v. 44, p. 486-490, 1986.
- FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, p.137-188, 2013.
- FU, W.J. et al. Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.95, p.105-109, 2012a.
- FU, W.J. et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. **Endocrine**, v. 41, p. 82-88, 2012b.
- GARCÍA-GARCÍA, P.M. et al. Inflammation in diabetic kidney disease. **World Journal of Diabetes**, v. 15, p. 431-443, 2014.
- GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v. 107, p. 1058-1070, 2010.

GILBERT, R.E.; COOPER, M.E. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? **Kidney International**, v.56 p.1627–1637, 1999.

GONZALEZ SUAREZ, M.L. et al. Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? **World Journal of Diabetes**, v. 4, p. 245-255, 2013.

GOSMANOV, A. R.; BARRY, M. W.; GOSMANOVA, E. O. Diagnosis and Treatment of Diabetic Kidney Disease. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 347, p. 406-13, 2014.

GU, L.; TSENG, S.C.; ROLLINS, B.J. Monocyte chemoattractant protein-1. **Chemical Immunology**, v. 72, p. 7-29, 1999.

GUIJARRO, C.; EGIDO, J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. **Kidney International**, v. 59, p. 415-424, 2001.

HAR, R.L.H. et al. The urinary cytokine/chemokine signature of renal hyperfiltration in adolescents with type 1 diabetes. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, 2014.

HARA, M. et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. **Diabetologia**, v.55, p.2913–2919, 2012.

HASEGAWA, G. et al. Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 40, p. 1007-1012, 1991.

HAYDEN, M.R.; SOWERS, J.R.; TYAGI, S.C. The central role of vascular extracellular matrix and basement membrane remodeling in metabolic syndrome and type 2 diabetes: the matrix preloaded. **Cardiovascular Diabetology**, v.4, p. 9-29, 2005.

HELAL, I.; FICK-BROSNAHAN, G.M.; REED-GITOMER, B. Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. **Nature Reviews: Nephrology**, v. 8, p. 293-300, 2012.

HERDER, C.; CARSTENSEN, M.; OUWENS, D.M. Anti-inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.15, p.39–50, 2013.

HINOKIO, Y. et al. Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v.45, p.877–882, 2002.

HIRATA, K. et al. Increased expression of selectins in kidneys of patients with diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v. 41, p. 185-192, 1998.

HIRSCH, R. et al. NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. **Pediatric Nephrology**, v.22, p.2089–2095, 2007.

HONG, C.Y.; CHIA, K.S. Markers of diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 12, p. 43-60, 1998.

- HUANG, X.R. et al. Interleukin-10 inhibits macrophage-induced glomerular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 262-269, 2000.
- HUEBSCHMANN, A.G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, p. 1420-1432, 2006.
- IJIMA, T. et al. Follow-up study on urinary type IV collagen in patients with early stage diabetic nephropathy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 12, p.378–382, 1998.
- IMPERATORE, G. et al. SEARCH for diabetes in youth study group. Projections of type 1 and type 2 diabetes burden in the U.S. Population aged <20 years through 2050: dynamic modeling of incidence, mortality, and population growth. **Diabetes Care**, v.35, p.2515–2520, 2012.
- INOUI, A. Cytokines and sickness behavior: implications from knockout animal models. **Trends Immunology**, v. 22, p.469–473, 2008.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF **Diabetes Atlas**, 7th Edition revision 2015. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas>>. Acesso: 25 de julho de 2016.
- ISMAIL, N. et al. Renal disease and hypertension in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Kidney International**, v. 55, p. 1-28, 1999.
- ITO, H. et al. High frequencies of diabetic micro- and macroangiopathies in patients with type 2 diabetes mellitus with decreased estimated glomerular filtration rate and normoalbuminuria. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 25, p. 1161-1167, 2010.
- JENKINS, A.J. et al. Increased serum pigment epithelium-derived factor is associated with microvascular complications, vascular stiffness and inflammation in Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 24, p. 1345-1351, 2007.
- KALANTARINIA, K.; AWAD, A.S.; SIRAGY, H.M. Urinary and renal interstitial concentrations of TNF-alpha increase prior to the rise in albuminuria in diabetic rats. **Kidney International**, v.64, p. 1208-1213, 2003.
- KANWAR, Y.S. A glimpse of various pathogenic mechanisms of diabetic nephropathy. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 395-423, 2011.
- KAZUMI, T. et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.22, p.1176–1180, 1999.
- KANAUCHI, M. NISHIOKA, H. HASHIMOTO, T. Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. **Nephron**, v. 91, p. 327-329, 2002.
- KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, p. 1–150, 2013.
- 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). **American Journal of Kidney Diseases**, v.55, p.824-834, 2010.

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

KIMMELSTIEL, P. WILSON, C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. **American Journal of Pathology**, v.12, p. 83-98, 1936.

KITADA, M.; KANASAKI, K. KOYA, D. Clinical therapeutic strategies for early stage of diabetic kidney disease. **World Journal of Diabetes**, v. 5, p. 342-356, 2014.

KITCHING, A.R. et al. Interleukin-10 inhibits experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, p. 36-43, 2002.

KOLB, H.; MANDRUP-POULSEN, T. An immune origin of type 2 diabetes? **Diabetologia**, v.48, p.1038-1050, 2005.

KOTAJIMA, N. et al. Type IV collagen as an early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 14, p.13-17, 2000.

LAMPROPOULOU, I.T. et al. TNF- α and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Research**, 2014. doi: 10.1155/2014/394206

LEE, S.Y; CHOI, M.E. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. **Pediatric Nephrology**, v. 30, p. 1063-1075, 2014.

LEINONEN, J. et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **FEBS Letters**, v.417, p.150-152, 1997.

LEVEY, A.S. et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. **Annals of internal medicine**, v. 150, p. 604-612, 2009.

LEVEY, A.S.; Coresh, J. Chronic kidney disease. **Lancet**, v.379, p.165-180, 2012.

LEVEY, A.S. et al. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. **Annals of Internal Medicine**, v.145, p.247-254, 2006.

LEVEY, A.S. et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, p. 137-147, 2003.

LEYVA-JIMÉNEZ, R. et al. Effect of pentoxifylline on the evolution of diabetic nephropathy. **Medicina Clínica**, v. 132, p. 772-778, 2009.

LEWIS, E.J. XU, X. Abnormal glomerular permeability characteristics in diabetic nephropathy: implications for the therapeutic use of low-molecular weight heparin. **Diabetes Care**, v. 31 (Suppl 2), p. S202-S207, 2008.

LI, M.O.; FLAVELL, R.A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- β and interleukin-10. **Immunity**, v. 28, p. 468-476, 2008.

LIM, A.K.; TESCH, G.H. Inflammation in diabetic nephropathy. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

LIM, A.K.H. Diabetic nephropathy – complications and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 361-381, 2014.

LIN, C.H.; CHANG, Y.C.; CHUANG, L.M. Early detection of diabetic kidney disease: Present limitations and future perspectives. **World Journal of Diabetes**, v.7, p.290-301, 2016.

LIU, J. et al. Multiplex bead analysis of urinary cytokines of type 2 diabetic patients with normo- and microalbuminuria. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 31, p.279–289, 2010.

LUIS-RODRÍGUEZ, D. et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. **World Journal of Diabetes**, v. 3, p. 7-18, 2012.

MACIA-HERAS, M.; DEL CASTILLO-RODRIGUEZ, N.; NAVARRO-GONZÁLEZ, J. The renin-angiotensin-aldosterone system in renal and cardiovascular disease and effects of its pharmacological blockade. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 3, p. 1-24, 2012.

MACISAAC, R.J.; EKINCI, E.I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **American Journal of Kidney Diseases**, v.63, S39–S62, 2014.

MARTINI, S. et al. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 9, p. 267-274, 2008.

MATHESON, A. et al. Urinary Biomarkers in Type 2 Diabetes. **Diabetes/metabolism Research and Reviews**, v.26, n.3, p.150-171, 2010.

MAUER, S.M. et al. Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v.74, p.1143-1155, 1984.

MCCARTHY, E. et al. TNF- α increases albumin permeability of isolated rat glomeruli through the generation of superoxide. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 9, p. 433-438, 1998.

MICHELS, W.M. et al. Performance of the Cockcroft-Gault, MDRD, and new CKD-EPI formulas in relation to GFR, age, and body size. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 5, p.1003-1009, 2010.

MISHRA, J. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. **Lancet**, v. 365, p. 1231- 1238, 2005.

MISSERI, R. et al., TNF alpha mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling, **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, v.288, p.F406–F411, 2005.

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

MOLITCH, M.E. et al.; Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study Group. Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial and the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study. **Diabetes Care**, v.33, p.1536–1543, 2010.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 683-765, 2001.

MORA-FERNÁNDEZ, C. et al. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. **The Journal of Physiology**, v. 592, p. 3997-4012, 2014.

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

MORII, T. et al. Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v.17, p. 11-15, 2003.

MORIWAKI, Y. et al. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. **Metabolism**, v. 52, p. 605-608, 2003.

MURAKAMI, H. et al. Plasma levels of soluble vascular adhesion molecule-1 and cholesterol oxidation product in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 8, p. 21-24, 2001.

MYŚLIWSKA, J. et al. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. **European Cytokine Network**, v. 16, p. 117-122, 2005.

NAKAMURA, T. et al. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. **Diabetes**, v. 42, p.450–456, 1993.

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, p.142–144, 2006.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. **American Journal of Kidney Disease**, v. 49, p. S12–S154, 2007.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease: 2012 update. **American Journal of Kidney Disease**, v. 60, p. 850–886, 2012.

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

NAVARRO J.F. et al. Tumor necrosis factor-alpha gene expression in diabetic nephropathy: relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition. **Kidney International Supplements**, v. 99, p. S98-S102, 2005.

NAVARRO, J.F. et al. Effects of pentoxifylline administration on urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion in type 2 diabetic patients: a short term, prospective, randomized study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, p. 264-270, 2003b.

NAVARRO, J.F. et al. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, p. 53-61, 2003a.

NAVARRO, J.F. et al. Influence of renal involvement on peripheral blood mononuclear cell expression behavior of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in type 2 diabetic patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.23, p.919–926, 2008.

NAVARRO, J.F. et al. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. **American Journal of Nephrology**, v. 26, p. 562-570, 2006a.

NAVARRO, J.F. et al. Urinary tumor necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.21, p.3428–3434, 2006b.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J.F. et al. Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 165-173, 2009.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J.F.; MORA-FERNÁNDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, p. 433-442, 2008.

NELSON, R.G. et al. Determinants of end-stage renal disease in Pima Indians with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and proteinuria. **Diabetologia**, v. 36, p. 1087-1093, 1993.

NIELSEN, S.E. et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Kidney Injury Molecule 1 (KIM1) in patients with diabetic nephropathy: a cross-sectional study and the effects of lisinopril. **Diabetic Medicine**, v.27, p. 1144-1150, 2010.

NIELSEN, S.E. et al. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 97, p. 71-76, 2012.

- NINOMIYA, T. et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. **Journal of American Society of Nephrol**, v. 20, p. 1813-1821, 2009.
- NISHIKAWA T. et al. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.26, p.1507–1512, 2003.
- NIU, J; KOLATTUKUDY, P.E. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: Molecular mechanisms and clinical implications. **Clinical Science**, v. 117, p. 95-109, 2009.
- NOSADINI, R. et al. Course of renal function in type 2 diabetic patients with abnormalities of albumin excretion rate. **Diabetes**, v. 49, p. 476-484, 2000.
- OSTERMANN, M., PHILIPS, B. J., FORNI, L. G. Clinical review: biomarkers of acute kidney injury: where are we now? **Critical Care**, v. 16, p. 233-246, 2012.
- PACKHAM, D.K. et al. Proteinuria in type 2 diabetic patients with renal impairment: the changing face of diabetic nephropathy. **Nephron Clinical Practice**, v. 118, p. c331-c338, 2011.
- PAPALE M. Urine proteome analysis may allow noninvasive differential diagnosis of diabetic nephropathy. **Diabetes Care**, v. 33, p. 2409-2415, 2010.
- PARK, C.W. et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NFkappa B-dependent. **Diabetologia**, v.43, p. 1544-1553, 2000.
- PÄTÄRI, A. et al. Nephriuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. **Diabetes**, v.52, p.2969–2974, 2003.
- PERALTA, C.A.et al., Associations of urinary levels of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) with kidney function decline in the multiethnic study of atherosclerosis (MESA). **Circulation**, v.60, p.904–911, 2012.
- PERBAL, B. CCN proteins: Multifunctional signalling regulators. **Lancet**, v. 363, p. 62-64, 2004.
- PERKINS, B.A. et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v.348, p.2285–2293, 2003.
- PERRONE, R.D.; MADIAS, N.E.; LEVEY, A.S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. **Clinical Chemistry**, v.38, p. 933-1953, 1992.
- PFEILSCHIFTER, J. et al. Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 159, p. 385-394, 1989.
- PFEILSCHIFTER, J.; MUHL, H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor potentiate angiotensin II- and calcium ionophore-stimulated prostaglandin E2 synthesis in rat renal

mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.169, p. 585-595, 1990.

PHILLIPS, A.; JANSSEN, U.; FLOEGE, J. Progression of diabetic nephropathy. Insights from cell culture studies and animal models. **Kidney Blood Pressure Research**, v. 22, p.81-97, 1999.

PICKUP, J.C. et al. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. **Life Sciences**, v. 67, p. 291-300, 2000.

PICKUP, J.C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p.813-823, 2004.

PIEPER, G.M. Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 30, p. 528-532, 1997.

PRICE, D.L. et al. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.48967-48972, 2001.

RABKIN, R. Diabetic nephropathy. **Clinical Cornerstone**, v.5, p. 1-11, 2003.

RADEKE, H.H. et al. Interleukin 1-alpha and tumor necrosis factor alpha induce oxygen radical production in mesangial cells. **Kidney International**, v. 37, p. 767-775, 1990.

REMUZZI, G. et al. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 1145-1151, 2002.

RISER, B.L. et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 11, p. 25-38, 2000.

RIVERO, A. et al. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. **Clinical Science**, v. 116, p. 479-492, 2009.

RODRIGUEZ-MORÁN, M. et al. Effects of pentoxifylline on the urinary protein excretion profile of type 2 diabetic patients with microproteinuria: a double-blind, placebo-controlled randomized trial. **Clinical Nephrology**, v. 66, p. 3-10, 2006.

ROYALL, J.A. Tumor necrosis factor and interleukin 1 increase vascular endothelial permeability. **The American Journal of Physiology**, v. 257, p. L339-L410, 1989.

RUBIO-GUERRA, A. F. et al. Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in Type-2 diabetic hypertensive patients. **Kidney & Blood Pressure Research**, v. 32, p. 106-109, 2009.

RUDBERG, S.; OSTERBY, R. Decreasing glomerular filtration rate - an indicator of more advanced diabetic glomerulopathy in the early course of microalbuminuria in IDDM adolescents? **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 12, p. 1149-1154, 1997.

- RULE, A.D. et al. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 141, p.929-937, 2004.
- SASSY-PRIGENT, C. et al. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 49, p. 466-475, 2000.
- SCARPELLI, D. et al. Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. **Diabetes**, v. 55, p. 1529-1533, 2006.
- SCHMIDT-OTT, K.M. Unraveling the role of connective tissue growth factor in diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 73, p. 375-376, 2008.
- SCHREINER, G.F.; KOHAN, D.E. Regulation of renal transport processes and hemodynamics by macrophages and lymphocytes. **American Journal of Nephrology**, v. 258, p. F761-F767, 1990.
- SEKIZUKA, K. et al. Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. **Nephron**, v. 68, p. 284-285, 1994.
- SERON, D.; CAMERON, J.S.; HASKARD, D.O. Expression of VCAM-1 in the normal and diseased kidney. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 6, p. 917-922, 1991.
- SHIKANO, M. et al. Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. **Nephron**, v. 85, p. 81-85, 2000.
- SHIMOIKE, T. et al. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. **Metabolism**, v. 49, p. 1030-1035, 2000.
- SRIVASTAVA, S.K.; RAMANA, K.V.; BHATNAGAR, A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. **Endocrine reviews**, v. 26, p. 380-392, 2005.
- STANTON, R.C. Clinical challenges in diagnosis and management of diabetic kidney disease. **American Journal of Kidney Disease**, v. 63, p. S3–S21, 2014a.
- STANTON, R.C. Frontiers in diabetic kidney disease: introduction. **American Journal of Kidney Diseases**, v.63, p.S1–S2, 2014b.
- STEINKE, J.M. et al. The early natural history of nephropathy in Type 1 diabetes: III. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients. **Diabetes**, v. 54, 2164-2171, 2005.
- SUGIMOTO, H. et al. Advanced glycation end products- cytokine-nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: Aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor-alpha and inducible oxide synthase in diabetic rat glomeruli. **Diabetologia**, v. 42, p.878-886, 1999.

SUN, L. KANWAR, Y.S. Relevance of TNF- α in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 88, p. 662-665, 2015.

SUZUKI, D. et al. In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 44, p. 1233-1238, 1995.

TAKEBAYASHI, K. et al. Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 20, p. 98-104, 2006.

TAN, A.L.; FORBES, J.M.; COOPER, M.E. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 27, p. 130-143, 2007.

TASHIRO, K. et al. Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 16, p. 1-4, 2002.

THOMSON, S.C. et al. Ornithine decarboxylase, kidney size, and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. **The Journal of clinical investigation**, v.107, p. 217-224, 2001.

TOYODA, M. et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration in human type 1 diabetic nephropathy. **Diabetes**, v.56, p.2155–2160, 2007.

TUTTLE, K.R. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. **Journal of American Society of Nephrology**, v.16, p.1537–1538, 2005.

VAIDYA, V. et al. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes is associated with lower levels of urinary tubular injury biomarkers, kidney injury molecule-1, and N-acetyl-b-Dglucosaminidase. **Kidney International**, v.79, p.464–470, 2011.

VASAVADA, N.; AGARWAL, R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, p. 146-154, 2005.

VERHAVE, J.C. et al. Clinical value of inflammatory urinary biomarkers in overt diabetic nephropathy: A prospective study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 101, p. 333-340, 2013.

WADA, J., MAKINO, H. Historical chronology of basic and clinical research in diabetic nephropathy and contributions of Japanese scientists. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 13, p. 405-414, 2009.

WADA, J.; MAKINO, H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Clinical Science**, v. 124, p. 139-152, 2013.

WATKINS, L.R.; MAIER, S. Cytokines and Pain. **P.O.Box**, v.133, CH-4010 Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1999.

- WEIL, E.J. et al. Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy. **Kidney International**, v.82, p.1010–1017, 2012.
- WHEELER, D.S. et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. **Critical Care Medicine**, v.36, p.1297–1303, 2008.
- WILLIAMSON, J.R.; CHANG, K.; FRANGOS, M. et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. **Diabetes**, v. 42, p. 801-813, 1993.
- WÓJCIAK-STOTHARD, B. et al. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, p. 150-165, 1998.
- WOLF, G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 34, p. 785-796, 2004.
- WOLKOW, P.P. et al. Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric Type 1 Diabetics. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, p. 789-797, 2008.
- WONG, C.K. et al. Aberrant activation profile of cytokines and mitogen-activated protein kinases in type 2 diabetic patients with nephropathy. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, p. 123-131, 2007.
- WU, C. et al. Aberrant cytokines/chemokines production correlate with proteinuria in patients with overt diabetic nephropathy. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, p. 700-704, 2010.
- WU, J. et al. Urinary TNF α and NGAL are correlated with the progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 6, p. 1482-1488, 2013.
- YANG, Y.F. et al. Mycophenolate mofetil prevents lethal acute liver failure in mice induced by bacille Calmette-Guérin and lipopolysaccharide. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, p. 611-618, 2008.
- YERNENI, K.K. et al. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. **Diabetes**, v. 48, p. 855-864, 1999.
- ZAMAUSKAITE, A. et al. The frequency of Th2 type cells increases with time on peritoneal dialysis in patients with diabetic nephropathy. **European Cytokine Network**, v. 10, p. 219-226, 1999.
- ZHANG, B. et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. **Kidney International**, v.72, p. 37-44, 2007.

ZHANG, C. et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: Relationship with diabetic nephropathy. **Human Immunology**, v. 75, p. 289-296, 2014.

ZIYADEH, F.N.; HAN, D.C. Involvement of transforming growth factor-beta and its receptors in the pathogenesis of diabetic nephrology. **Kidney International**, v. 60, p. S7-S11, 1997.

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOMARCADORES ASSOCIADOS A PROCESSOS METABÓLICOS, INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E GENOTÓXICOS EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS

Pesquisador: RAFAEL NOAL MORESCO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12303113.0.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 236.696

Data da Relatoria: 11/03/2013

Apresentação do Projeto:

A prevalência do diabetes mellitus (DM) vem aumentando significativamente nas últimas décadas, sendo que as complicações crônicas representam a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes com esta patologia a longo prazo. Como o exato mecanismo pelo qual o DM leva ao desenvolvimento destas complicações é complexo, e não está ainda totalmente elucidado, o objetivo deste projeto será avaliar o perfil de biomarcadores associados a processos metabólicos, inflamatórios, oxidativos e genotóxicos em pacientes com DM e em pré-diabéticos, bem como sua associação com o desenvolvimento de complicações crônicas. Para isto, será realizado um estudo transversal prospectivo envolvendo 300 pacientes adultos, de ambos os sexos, com o diagnóstico de DM tipo 1 e 2. Também serão recrutados para o estudo cerca de 100 indivíduos pré-diabéticos e 100 indivíduos saudáveis. Serão avaliados os seguintes parâmetros: níveis de insulina, creatinina, uréia, colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, PCR-us, IL-6, IL-10, albumina, proteínas totais, IMA, NOx, ácido úrico, TNF- α , AST, ALT, ferro total, ferritina,

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar

Bairro: Cidade Universitária - Camobi

CEP: 97.105-900

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-0382

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



transferrina, sTfR, NTBI, TIBC, xantina, hipoxantina, xantina oxidase, xantina desidrogenase, NAG, AOPP, glutatona redutase, HbA1c, FRAP, TOS,

Índices hematimétricos, dano no DNA, albumina urinária, creatinina, GGT, FAL, KIM-1, NGAL, NAG.

Também será avaliada o potencial prognóstico

em relação ao desenvolvimento das complicações crônicas do DM e mortalidade durante um período de 24 meses dos biomarcadores envolvidos

neste estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil de biomarcadores associados a processos metabólicos, inflamatórios, oxidativos e genotóxicos em pacientes com diabetes mellitus, bem como em pré-diabéticos, a fim de investigar o potencial diagnóstico e prognóstico destes biomarcadores para o desenvolvimento de complicações crônicas do diabetes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

adequados para o tipo de pesquisa realizada

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa com tema relevante, bem estruturada, com justificativa, objetivos e metodologia coerentes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados em sua nova versão

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovar o projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9382

E-mail: cep.ufsm@gmail.com