

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

Yãnaí Schneider Bollick

**MOLÉCULA DE DANO RENAL-1 NA URINA E SUA ASSOCIAÇÃO
COM O CONTROLE GLICÊMICO E COM A CONCENTRAÇÃO
URINÁRIA DAS INTERLEUCINAS 1 E 6 NO DIABETES TIPO 2**

Santa Maria, RS

2018

Yãnaí Schneider Bollick

**MOLÉCULA DE DANO RENAL-1 NA URINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O
CONTROLE GLICÊMICO E COM A CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DAS
INTERLEUCINAS 1 E 6 NO DIABETES TIPO 2**

Dissertação 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-orientador: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS

2018

Bollick, Yãnaí Schneider
MOLÉCULA DE DANO RENAL-1 NA URINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
O CONTROLE GLICÊMICO E COM A CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DAS
INTERLEUCINAS 1 E 6 NO DIABETES TIPO 2 / Yãnaí Schneider
Bollick.- 2018.
49 p.; 30 cm

Orientador: Rafael Noal Moresco
Coorientador: José Antonio Mainardi de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Molécula de dano renal-1 2. Doença renal do
diabetes 3. Controle glicêmico 4. Inflamação I. Moresco,
Rafael Noal II. de Carvalho, José Antonio Mainardi III.
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Yãnaí Schneider Bollick

**MOLÉCULA DE DANO RENAL-1 NA URINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O
CONTROLE GLICÊMICO E COM A CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DAS
INTERLEUCINAS 1 E 6 NO DIABETES TIPO 2**

Dissertação 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 **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 17 de agosto de 2018:

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

Etiane Tatsch, Dra. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UFPEL)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por iluminar minhas caminhadas, me fornecer força e saúde em todos os momentos.

A minha mãe e avós, pelo amor, educação, confiança, incentivo, coragem, dedicação e carinho incondicionais. Pelos exemplos que cada um representa em minha vida, minha eterna gratidão e amor.

À meu companheiro pelo amor, carinho, preocupação, apoio e a paciência diária, obrigada por ajudar a percorrer mais esta etapa.

Ao Professor Rafael, primeiramente por me acolher de maneira atenciosa e proporcionar oportunidades, os conhecimentos ministrados que favoreceram a minha formação acadêmica. Agradeço compreensão, amizade, a paciência, orientação, confiança e tempo que sempre foram dedicados a mim.

Ao meu co-orientador José, pela sua imensa dedicação e auxílio em todos os momentos, as oportunidades, incentivo e amizade.

Aos colegas do LabiClin, pelas alegrias, amizades, carinho, ensinamentos, apoio e extrema disponibilidade de todos em ajudar.

À Universidade Federal de Santa Maria, Programa de pós-graduação e professores que promoveram meus estudos e aquisições de conhecimento durante esses anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão das bolsas de estudos;

À todos que de alguma maneira contribuíram para esta jornada da minha vida, ou seja, para que a conclusão desta dissertação fosse possível meu sincero muito obrigada.

RESUMO

MOLÉCULA DE DANO RENAL-1 NA URINA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CONTROLE GLICÊMICO E COM A CONCENTRAÇÃO URINÁRIA DAS INTERLEUCINAS 1 E 6 NO DIABETES TIPO 2

AUTORA: Yãnaí Schneider Bollick

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ORIENTADOR: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

A doença renal do diabetes (DRD) está entre as principais e mais relevantes complicações do diabetes *mellitus* (DM). A hiperglicemia e inflamação são dois dos diversos fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão de complicações do DM, incluindo a DRD. A molécula de dano renal-1 (KIM-1) é um biomarcador urinário indicativo de lesão renal tubular e vem sendo estudado juntamente com outros marcadores, na busca de um diagnóstico precoce das patologias renais, já que estudos sugerem que a lesão tubular surge antes mesmo do rim sofrer danos glomerulares. Níveis aumentados de KIM-1 na urina vêm sendo demonstrados em estados hiperglicêmicos e também em indivíduos diabéticos com inflamação renal. Ainda, com relação a inflamação, as citocinas urinárias pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1) e a interleucina-6 (IL-6) podem ser úteis para a avaliação de DRD. Considerando as consequências que o descontrole glicêmico e o processo inflamatório podem causar no desenvolvimento da DRD, o presente estudo analisou a associação dos níveis urinários de KIM-1 com os níveis de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) e inflamação renal, através de citocinas urinárias IL-1 e IL-6, em pacientes com DM tipo 2. Este estudo incluiu 122 pacientes com DM tipo 2 divididos em dois grupos de acordo com a mediana de KIM-1 urinário, representada por ≤ 87 pg/mL e > 87 pg/mL. Níveis urinários de KIM-1, IL-1 e IL-6, juntamente com outros parâmetros bioquímicos, foram avaliados nesses pacientes. Os pacientes foram divididos ainda em quartis de HbA_{1c}, onde os valores de KIM-1 urinário aumentaram cerca de 34% nos pacientes com HbA_{1c} acima de 8,7% em comparação com pacientes com valores abaixo de 6,0%. Da mesma forma, estratificando os pacientes em quartis de IL-1 e IL-6, os níveis urinários de KIM-1 também aumentaram aproximadamente 130% e 90%, respectivamente. Correlações positivas foram observadas entre KIM-1 urinário e HbA_{1c} ($r = 0,23$, $P = 0,028$), KIM-1 urinário e IL-1 urinária ($r = 0,60$, $P < 0,001$) e KIM-1 urinário e IL-6 urinária. ($r = 0,40$, $p < 0,001$). Os níveis de KIM-1 urinário foram maiores entre os pacientes com DM tipo 2 que apresentaram os maiores níveis de HbA_{1c} e as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 na urina. Com isso, o baixo controle glicêmico e a inflamação renal contribuem para a ocorrência de dano tubular no diabetes tipo 2, e o KIM-1 tem se mostrado um marcador útil na detecção de danos tubulares em pacientes com diabetes tipo 2.

Palavras-chave: Molécula de dano renal- 1. Doença renal do diabetes. Controle glicêmico. Inflamação.

ABSTRACT

KIDNEY INJURY MOLECULE-1 IN URINE AND ASSOCIATION WITH GLYCEMIC CONTROL AND WITH URINARY URINARY CONCENTRATION OF INTERLEUKINS 1 AND 6 IN TYPE 2 DIABETES

AUTHOR: Yãnaí Schneider Bollick

ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ADVISOR: Dr. Jose Antonio Mainardi de Carvalho

Diabetes kidney disease (DRD) is among the main and most relevant complications of diabetes mellitus (DM). Hyperglycemia and inflammation are two of several factors involved in the development and progression of DM complications, including DRD. The Kidney injury molecule-1 (KIM-1) is a urinary biomarker indicative of tubular renal injury and has been studied along with other markers in the search for an early diagnosis of renal pathologies, since studies suggest that the tubular lesion appears before even from the kidney undergoes glomerular damage. Increased levels of KIM-1 in urine have been demonstrated in hyperglycemic states and also in diabetic individuals with renal inflammation. Further, with regard to inflammation, the interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) proinflammatory urinary cytokines may be useful for the evaluation of DRD. Considering the consequences that the glycemic control and the inflammatory process can cause in the development of DRD, the present study analyzed the association of urinary levels of KIM-1 with levels of glycated hemoglobin (HbA1c) and renal inflammation, through urinary cytokines IL-1 and IL-6 in patients with type 2 DM. This study included 122 patients with type 2 DM divided into two groups according to the median urinary KIM-1, represented by ≤ 87 pg / mL and > 87 pg / mL . Urinary levels of KIM-1, IL-1 and IL-6 along with other biochemical parameters were evaluated in these patients. Patients were further divided into HbA1c quartiles, where urinary KIM-1 values increased by 34% in patients with HbA1c above 8.7% compared to patients with values below 6.0%. Similarly, stratifying patients in quartiles of IL-1 and IL-6, urinary levels of KIM-1 also increased approximately 130% and 90%, respectively. Positive correlations were observed between urinary KIM-1 and HbA1c ($r = 0.23$, $P = 0.028$), urinary KIM-1 and urinary IL-1 ($r = 0.60$, $P < 0.001$) and urinary KIM-1 and IL-6 urinary. ($r = 0.40$, $p < 0.001$). Urinary KIM-1 levels were higher among patients with type 2 DM who had the highest levels of HbA1c and the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6 in the urine. Thus, low glycemic control and renal inflammation contribute to the occurrence of tubular damage in type 2 diabetes, and KIM-1 has been shown to be a useful marker in detecting tubular damage in patients with type 2 diabetes.

Keywords: Kidney injury molecule-1. Diabetic kidney disease. Glycemic control. Inflammation.

LISTAS DE TABELAS

Quadro 1 – Critérios laboratoriais para o diagnóstico	12
Tabela 1 - Definição da excreção de uAlb.....	18

MANUSCRITO

Table 1 - Baseline characteristics of the study participants classified according to the median of urinary KIM-1	39
Table 2 - Multiple regression analysis of urinary KIM-1 as a dependent variable adjusted for some independent variables in different models.....	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho representando o rim, nefron, glomérulo e a organização da barreira de filtração glomerular. A barreira de filtração glomerular compreende endotélio, membrana basal glomerular (MBG) e podócitos.....	156
Figura 2 - O glomérulo saudável e com DRD	16
Figura 3 - O papel central da hiperglicemia no desenvolvimento e progressão da doença renal do diabetes.	Erro! Indicador não definido. 0
Figura 4 - Desenvolvimento de fibrose na reação inflamatória crônica.....	212
Figura 5 - Expressão do KIM-1 nas células tubulares proximais e a promoção celular apoptótico e necrótico.....	245

MANUSCRITO

Figure 1 - Urinary levels of KIM-1 stratified according to the quartiles of (A) HbA _{1c} , (B) urinary IL-1, and (C) urinary IL-6. HbA _{1c} quartiles: Q1 (4.9-6.0%), Q2 (6.1-6.9%), Q3 (7.0-8.6%) and Q4 (8.7-13.4%). Urinary IL-1 quartiles: Q1 (30-73 pg/mL), Q2 (74-89 pg/mL), Q3 (90-123 pg/mL) and Q4 (124-201 pg/mL). Urinary IL-6 quartiles: Q1 (36-93 pg/mL), Q2 (94-112 pg/mL), Q3 (113-143 pg/mL) and Q4 (144-213 pg/mL).....	42
Figure 2 - Significant positive correlations between urinary KIM-1 levels and (A) HbA _{1c} , (B) urinary IL-1, and (C) urinary IL-6	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
AGE	<i>Advanced Glycation End-Products</i> (Produtos Finais de Glicação Avançada)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
Cr	Creatinina Sérica
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM tipo 1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM tipo 2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DRC	Doença Renal Crônica
DRD	Doença Renal do Diabetes
HbA _{1c}	Hemoglobina Glicada
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i> (Molécula de dano renal-1)
MBG	Membrana Basal Glomerular
NGAL	<i>Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin</i>
NKF	<i>National Kidney Foundation</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
uAlb	Albumina Urinária

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	9
2	INTRODUÇÃO	10
3	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	12
3.1	Diabetes <i>mellitus</i>	12
3.1.1	Diabetes tipo 2	13
3.1.2	Complicações do diabetes	14
3.2	Doença renal do diabetes	14
3.2.1	Hiperglicemia e o controle glicêmico.....	18
3.2.2	Inflamação	20
3.2.2.1	Citocinas	20
3.3	Biomarcadores renais	22
3.4	Molécula de dano renal– 1	23
4	OBJETIVOS	26
4.1	Objetivo geral	26
4.2	Objetivos específicos	26
5	PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	27
5.1	Manuscrito	27
6	CONCLUSÃO	43
7	REFERENCIAS	44

1 APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no **MANUSCRITO** e representa a íntegra deste estudo. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no mesmo.

2 INTRODUÇÃO

Diabetes *Mellitus* (DM) é um crescente e importante problema de saúde pública no mundo e estima-se que com o aumento de sua prevalência o número de pessoas com diabetes poderá ser maior que 642 milhões em 2040 (OGURTSOVA et al, 2017). Acompanhado de seu aumento, existem as complicações microvasculares que podem desenvolver-se a longo prazo com o DM. A doença renal do diabetes (DRD) é uma das complicações e está entre as mais frequentes e relevantes, que pode afetar de forma progressiva esta população (FOWLER, 2008; SBD, 2017; MATHESON et al., 2010). O mecanismo exato pelo qual o DM conduz ao desenvolvimento destas complicações é complexo e ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que há determinados fatores envolvidos como: hiperglicemia, aumento da pressão arterial, anormalidades lipídicas, estresse oxidativo e processos inflamatórios (SBD, 2017; AKASH et al., 2013).

A hiperglicemia tem papel importante no desenvolvimento do DM, com mais possibilidade de encontrar complicações em pacientes que apresentam glicemia mal controlada, quando comparado com indivíduos que possuem diabetes controlado. Na DRD, o comprometimento renal pode decorrer do surgimento de lesões renais induzidas pela hiperglicemia, onde várias estruturas renais são susceptíveis a este estado hiperglicêmico (SBD, 2017; SANCHEZ et al., 2009; DURAN-SALGADO et al., 2014). O processo inflamatório é outro fator envolvido na progressão da DRD. O processo inflamatório no sistema renal, pode resultar em lesões celulares que ocorrem após a secreção de citocinas pró-inflamatórias, moléculas lesivas para os rins, tendo como exemplo a interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (NAVARRO et al., 2005; DURAN-SALGADO et al., 2014; NAVARRO et al., 2006; LUÍS-RODRÍGUEZ et al., 2012). As citocinas urinárias pró-inflamatórias vêm demonstrando potencial diagnóstico em identificar a lesão renal em indivíduos com DM tipo 2. Dentre estas as interleucinas urinárias, como a IL-6 e interleucina-10 (IL-10) foram propostas para a avaliação da DRD (SANGOI et al., 2016).

De fato, a hiperglicemia e a inflamação no DM podem acarretar em prejuízos no sistema renal e uma maneira de verificar estes danos renais causados pelo DM é através de biomarcadores renais. Na DRD, há um aumento na excreção urinária de albumina e redução da função renal, com variações dos níveis de creatinina sérica (Cr) e da taxa de filtração glomerular (TFG) (GROSS et al., 2005). A albumina urinária (uAlb) é um exemplo de biomarcador de dano renal urinário muito utilizado na rotina laboratorial e pode estar associada à DRD (NARITA et al., 2006; MATHESON et al., 2010), como sendo a primeira

indicação de lesão renal ou DRD incipiente (REMUZZI et al., 2002; MATHESON et al., 2010).

No entanto, já foi evidenciado que pacientes considerados normoalbuminúricos apresentavam disfunções renais e alterações histopatológicas renais avançadas (WADA; MAKINO, 2009; AN et al., 2009; MATHESON et al., 2010). Dessa forma, outros biomarcadores vêm sendo pesquisados, dentre estes, os marcadores urinários indicativos de lesão tubular, os quais podem ser enzimas urinárias ou proteínas que comumente são filtradas pelo glomérulo (MATHESON et al., 2010). O interesse pelos marcadores de lesão tubular está aumentando, pois o dano tubular tem sido relatado em diabéticos com a função glomerular intacta (SINGH et al., 2008), sinalizando que podem ser biomarcadores mais precoces. Observou-se que a molécula de dano renal-1 (KIM-1) tem potencial para detectar lesões renais tubulares em pacientes com DM tipo 2, o que sugere uma possível associação entre o aumento dos níveis deste biomarcador com o desenvolvimento de DRD (DE CARVALHO et al., 2016).

Os níveis urinários de KIM-1 foram significativamente maiores em altas concentrações de glicose, sugerindo que este marcador pode estar envolvido no dano aos túbulos renais induzidos pela alta glicose (GOU et al., 2016). Além disso, o KIM-1 já foi associado à inflamação renal, estando elevado em pacientes diabéticos com diagnóstico de inflamação renal quando comparados com diabéticos sem inflamação (AHMED et al., 2015). Existem evidências que demonstram o potencial diagnóstico do KIM-1 na DRD. Também é possível que este marcador apresente importante papel no prognóstico dessa doença. Estudos sugerem relações de KIM-1 com os estados de hiperglicemia e inflamação associados a alterações renais (GOU RONG et al., 2016, HUMPHREYS et al., 2013, VAN TIMMEREN et al., 2007). Dessa forma, torna-se relevante investigar a relação do dano tubular renal com o controle glicêmico inadequado e a inflamação renal em pacientes com DM tipo 2, através da análise dos níveis da associação urinária de KIM-1 com o monitoramento da porcentagem de HbA_{1c} e a inflamação renal, através de citocinas urinárias pró-inflamatórias IL-1 e IL-6.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 DIABETES *MELLITUS*

O DM é um grupo de doenças metabólicas causado por defeitos na ação e/ou secreção da insulina, o que resulta no estado de hiperglicemia característico da doença (ADA, 2010). As células β -pancreáticas secretam a insulina, hormônio chave para a regulação do metabolismo da glicose, quando secretado este hormônio aumenta a captação de glicose nas células adiposas e musculares, estimulando a translocação do transportador de glicose GLUT4 dos locais intracelulares para a superfície celular na membrana plasmática. Disfunções envolvendo as células β do pâncreas, bem como a deficiência de a insulina são associadas a fisiopatologia do DM (SALTIEL et al., 2001).

O DM pode apresentar sintomas como poliúria, polidipsia, visão turva e perda de peso (RUSSEL et al., 2015). Concomitantemente com a sintomatologia e avaliação clínica, utilizam-se exames laboratoriais para auxiliar no critério diagnóstico (Quadro 1). Os critérios diagnósticos para DM tipo 1 são semelhantes aos utilizados no DM tipo 2 porém, comumente a sintomatologia já possui mais a atenção do clínico do que no segundo caso.

Quadro 1. Critérios laboratoriais para o diagnóstico

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicose 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	HbA _{1c} (%)	Observações
Normoglicemia	< 100	< 140	–	< 5,7	OMS emprega valor de corte de 110 mg/dL para normalidade da glicose em jejum. ²
Pré-diabetes ou risco aumentado para DM	≥ 100 e < 126*	≥ 140 e < 200#	–	≥ 5,7 e < 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de pré-diabetes.
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5	Positividade de qualquer dos parâmetros confirma diagnóstico de DM. Método de HbA _{1c} deve ser o padronizado. Na ausência de sintomas de hiperglicemia, é necessário confirmar o diagnóstico pela repetição de testes.

Fonte: (SBD, 2017). OMS: Organização Mundial da Saúde; HbA_{1c}: hemoglobina glicada; DM: diabetes *mellitus*.
* Categoria também conhecida como glicemia de jejum alterada. # Categoria também conhecida como intolerância oral à glicose.

A genética desempenha função importante para o desenvolvimento do DM, porém existem também fatores ambientais, que podem aumentar a resistência à insulina e consequentemente elevação da glicemia (WHO, 2009). Alguns dos fatores associados com o aumento da prevalência do diabetes são: maus hábitos alimentares, estilo de vida sedentário, excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional bem como à maior sobrevivência dos indivíduos com DM (SBD, 2017). Se a situação atual persistir, o número projetado de pessoas com DM pode superar as 642 milhões, previstas para 2040 (OGURTSOVA et al, 2017). Em 2015 o Brasil era o quarto país, dentre os dez principais países com adultos diabéticos, cerca de 14,3 milhões (IDF, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que a glicemia elevada é o terceiro principal risco para mortalidade no mundo, atrás apenas da hipertensão arterial e uso do tabaco (WHO, 2009). Nos Estados Unidos em 2015, o DM foi a sétima principal causa de morte, com 79.535 atestados de óbito que relatam como a causa básica de morte (CDC, 2017). Cerca de 75% dos casos são de países em desenvolvimento e acredita-se que 46% dos casos de DM em adultos não sejam diagnosticados (IDF, 2015; BEAGLEY et al., 2013). Com o aumento do DM, também pode ocorrer o aumento de complicações que a hiperglicemia crônica do DM pode causar à longo prazo (ADA, 2010).

Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do DM, através de alguns desses processos podemos classificar em DM tipo 1, DM tipo 2 ou demais complicações do DM.

3.1.1 Diabetes tipo 2

O DM tipo 2 é definido pela sua deficiência de insulina relativa (e não absoluta) e resistência periférica à insulina. Muitas vezes ao longo da doença, esses indivíduos não dependem de tratamento com insulina para sobreviver (ADA, 2017). A resistência à insulina em pacientes com DM tipo 2 aumenta a necessidade deste hormônio nos tecidos alvo. Além disso, o aumento da necessidade por insulina não pode ser suprido pelas células β pancreáticas devido a defeitos na função das mesmas (HALBAN et al., 2014). Dependência de insulina do DM tipo 1 é uma das principais diferenças para o tipo 2: Além desta, existem outras diferenças como a ausência de cetoacidose na maioria dos pacientes com DM tipo 2 e a não ocorrência da destruição autoimune de células β (KHARROUBI et al., 2015).

Este tipo de DM é responsável por 90-95% dos casos de diabetes e a maioria dos indivíduos acometidos são adultos (ADA, 2017). Mundialmente o DM tipo 2 afeta cerca de

18-20% de adultos com mais de 65 anos e estima-se que aproximadamente 285 milhões de pessoas têm DM, com prevalência em adultos entre 20 e 79 anos (ADA 2014).

Devido a fatores como os sintomas iniciais leves, o diagnóstico do DM pode ser atrasado por anos o que pode gerar maior incidência do desenvolvimento de suas complicações, já que a hiperglicemia não é tratada durante esse período não diagnosticado (KHARROUBI; DARWISH, 2015).

3.1.2 Complicações do diabetes

As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos (IDF, 2015). Estas complicações desenvolvidas à longo prazo no DM podem ser categorizadas em macrovasculares e microvasculares. Entre as macrovasculares incluem, doença arterial coronariana e periférica e acidente vascular cerebral, que resultam a partir de uma disfunção e inflamação do endotélio e dos músculos lisos. Já as microvasculares afetam vasos pequenos da retina, dos nervos e rins, resultante da deficiência da auto-regulação do fluxo sanguíneo, permeabilidade alterada, inflamação, hipóxia, fibrose e outros (RUSSEL et al., 2015), originando a retinopatia diabética, neuropatia diabética e DRD, também conhecida como nefropatia diabética (FOWLER, 2008).

Existem vários mecanismos propostos pelos quais o DM pode levar ao desenvolvimento de retinopatia e pode iniciar até sete anos antes do diagnóstico de DM tipo 2 (FOWLER, 2008). Já a neuropatia diabética, envolve os nervos periféricos e autonômicos, nestes casos pode aparecer de diversas maneiras dependendo do local. Essa complicação resultou em cerca de 80% de amputações após ulceração ou lesão no pé (BOULTON et al., 2005; FOWLER, 2008). Em pacientes com DM, uma das complicações microvasculares mais frequentes é a DRD, podendo afetar de forma progressiva esta população (FOWLER, 2008, MATHESON et al., 2010). A DRD é determinada por lesões renais, ocorrendo aumento na excreção urinária de albumina e redução da função renal, com variações dos níveis de creatinina sérica e da TFG (GROSS et al., 2005).

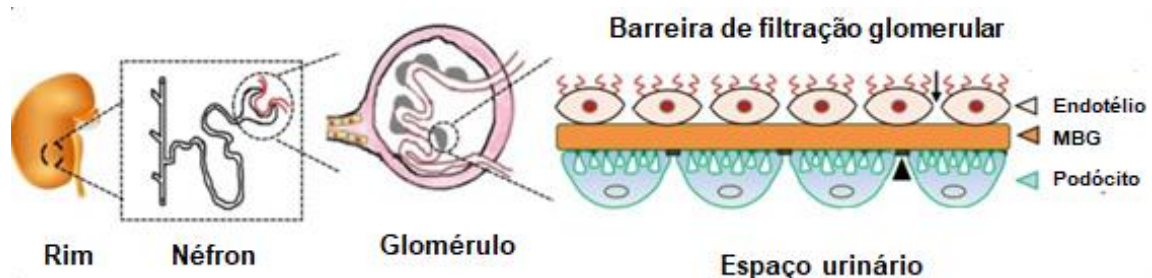
3.2 DOENÇA RENAL DO DIABETES

A DRD, tradicionalmente conhecida como nefropatia diabética, está entre as principais complicações microvasculares do DM, podendo afetar cerca de 20-40% dos pacientes com diabetes (FELEHGARI et al., 2011; ADA 2016) e tornou-se a causa comum de doença renal

em estágio final (STEINKE et al., 2005). O número de pacientes afetados pela DRD é grande, pois a incidência de DM continua crescendo (GREGGT et al., 2014), por esta razão, a DRD é uma das principais causas de doença renal crônica (DRC) em pacientes ingressando em programas de diálise (ADA, 2014). Em pacientes com DM tipo 1, aproximadamente 50% desenvolve doença renal em estágio final, sendo no DM tipo 2 uma parcela menor de indivíduos (DEFRONZO, 1995). A DRD geralmente desenvolve-se após um período de 10 anos ou, pelo menos, 5 anos no DM tipo 1, mas também esta presente no diagnóstico de DM tipo 2 (ADA, 2017). Esta complicação é caracterizada por lesões renais glomerulares, tubulares, intersticiais e vasculares (BURTIS et al., 2008).

A patogênese do DM pode conduzir à alterações renais que podem justificar a presença de uAlb e outras proteínas na urina de pacientes diabéticos. O glomérulo e o túbulo renal são duas estruturas fundamentais que constituem a unidade funcional dos rins, o néfron. O glomérulo filtra o plasma para evitar a perda de proteínas no filtrado glomerular. O túbulo renal reabsorve água e eletrólitos, além de contribuir com sais e proteínas para o filtrado glomerular. A barreira de filtração glomerular é seletivamente permeável e para a realização desta função, sua estrutura é constituída por três camadas: o endotélio, membrana basal glomerular (MBG) e podócitos (Figura 1), que de forma geral facilitam o fluxo de água e pequenas moléculas, ao mesmo tempo em que restringem o fluxo de proteínas plasmáticas grandes (PASUPULATI et al., 2014; KUMAR et al., 2011; MUKHI et al., 2017). Desta maneira, a barreira de filtração glomerular funciona como uma peneira molecular seletiva e dependente de tamanho que facilita a filtração de água, eletrólitos e pequenos solutos, enquanto restringe a passagem de macromoléculas negativamente carregadas incluindo proteínas e polipeptídeos. Proteínas com um peso molecular de até 20 kDa são filtradas facilmente através da barreira. No entanto, as proteínas menores são reabsorvidas pelos túbulos contorcidos proximais, e apenas pequenas quantidades de proteínas são excretadas.

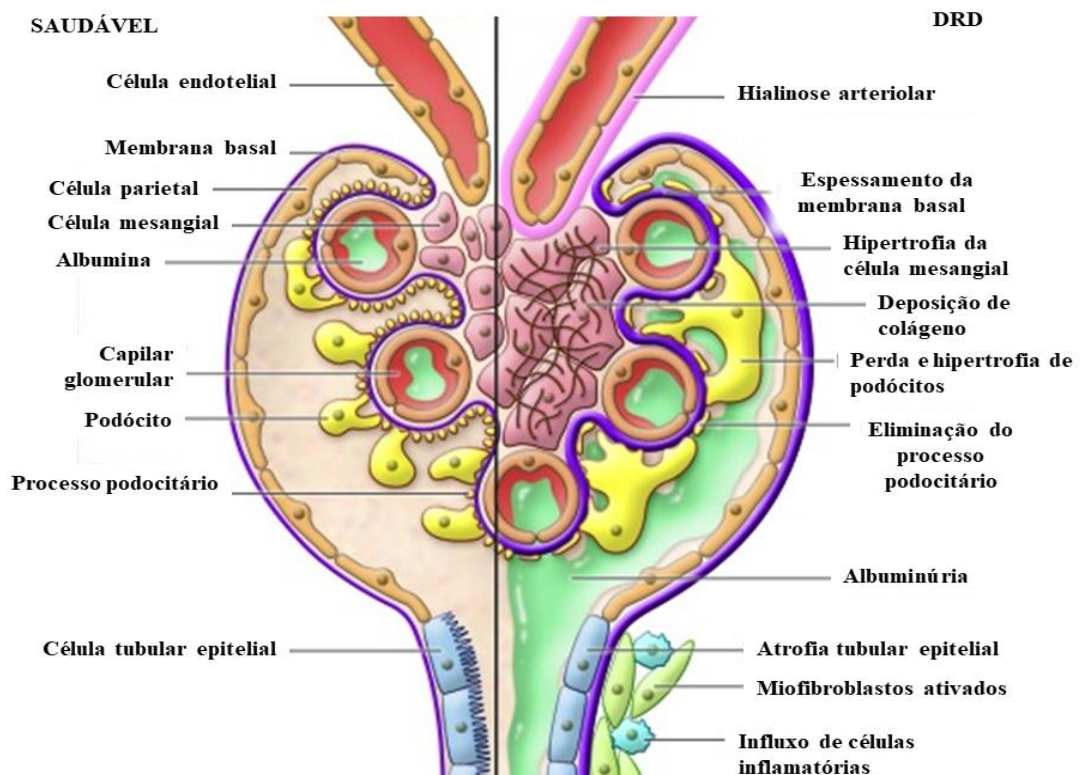
Figura 1 - Desenho representando o rim, néfron, glomérulo e a organização da barreira de filtração glomerular.



Fonte: (Adaptado MUKHI et al., 2017). MBG: Membrana basal glomerular

O curso da DRD pode conduzir à hipertrofia e perda de podócitos, espessamento da MBG, expansão mesangial, hialinose arterial, deposição de colágeno, atrofia epitelial tubular, acúmulo de miofibroblastos, influxo de células inflamatórias e glomeruloesclerose. Com isso, quando a função do néfron é prejudicada, ocorrem alterações glomerulares e quantidades variáveis de proteínas são excretados na urina, como a uAlb (Figura 2) (MUKHI et al., 2017; CAO e COOPER, 2011).

Figura 2 - Glomérulo saudável e com DRD.



Fonte: (Adaptado de REIDY et al., 2014)

A uAlb é o marcador mais tradicional e largamente utilizado no diagnóstico e monitoramento da DRD e quando alterada em indivíduos com DM é considerada a primeira manifestação clínica assintomática de dano microvascular renal (BIRN; CHRISTENSEN, 2006; ADA, 2008). Conforme a ADA (2016), a triagem para detecção da DRD deve ser realizada através de um teste anual que avalia a excreção da uAlb, em pacientes com DM tipo 1 com tempo de doença maior que 5 anos e para pacientes com DM tipo 2 deve ser a partir do

momento do diagnóstico. Além da excreção da uAlb, a creatinina sérica (Cr) deve ser mensurada para estimar a TFG (ADA, 2016).

A excreção da uAlb normal é geralmente definida como < 30 mg/g Cr e o aumento da excreção de uAlb é definido como ≥ 30 mg / g Cr (Tabela 1). Além disso, devido à variabilidade biológica na excreção de uAlb, duas das três amostras de uAlb coletadas dentro de um período de 3 a 6 meses devem ser anormais antes de considerar um paciente com albuminúria. A TFG é calculada a partir da Cr usando uma fórmula validada. A equação da *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) é geralmente preferida. Uma TFG ≤ 60 mL / min / $1,73$ m² é geralmente considerada anormal (ADA, 2017).

Tabela 1. Definição da excreção de uAlb

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

Fonte: (KDIGO, 2013).

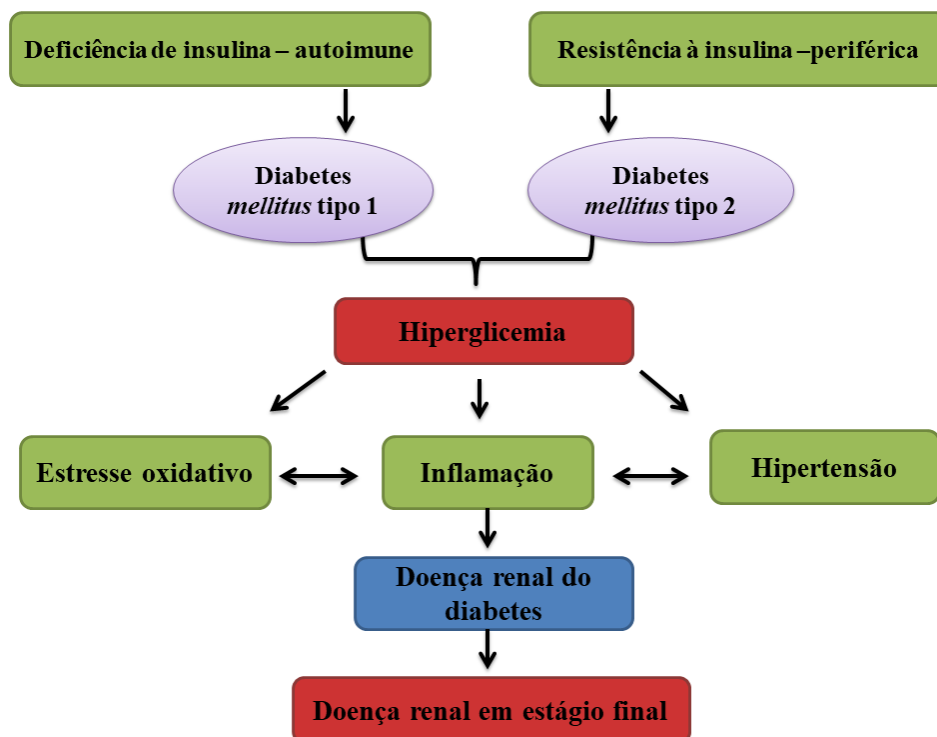
Como a DRD tem natureza progressiva e a maioria dos pacientes com DRD desenvolve aumento progressivo de uAlb, seguida por uma redução na TFG, é incomum observar um paciente com DRD apresentando uma TFG reduzida e níveis normais de uAlb (GOSMANOV et al., 2014). Contudo, evidências sugerem que o risco de desenvolver DRD (ARAKI et al., 2010; MORITA et al., 2011; COHEN-BUCAY; VISWANATHAN, 2012) e doença cardiovascular (MCCORMICK et al., 1990; HONG; CHIA, 1998) começam quando os valores da excreção uAlb ainda estão na faixa normoalbuminúrica. Assim, os indivíduos que apresentam excreção da uAlb na faixa normal também podem possuir riscos significativos de nefropatia e eventos cardiovasculares (O'DONNELL et al., 1991). Outros estudos também têm descrito que mudanças estruturais na MBG podem aparecer anteriormente às mudanças na excreção urinária de albumina, sugerindo que este marcador pode ser detectado somente após danos significativos nos glomérulos (TELICI et al., 2000; NAJAFIAN et al., 2009; HELLEMONS et al., 2012). Com isso, apesar da mensuração da

uAlb ser considerada o marcador tradicional para a detecção precoce para DRD (BRUNO et al., 2007), limitações na sua utilização devem ser consideradas.

3.2.1 Hiperglicemia e o controle glicêmico

Indivíduos com DM não tratado ou mal controlado têm maior possibilidade de desenvolver as complicações crônicas do DM. Ainda não está claro o quanto as complicações crônicas do diabetes são resultantes da própria hiperglicemia ou de condições associadas, como deficiência de insulina, mudanças da osmolaridade, glicação de proteínas e alterações lipídicas ou da pressão arterial (SBD, 2017). Contudo, sabe-se que a hiperglicemia está entre os fatores de risco para desenvolvimento da DRD, assim como outros fatores que incluem duração do DM, consumo de tabaco, dislipidemia e hipertensão (Figura 3) (CADE, 2008).

Figura 3 - O papel central da hiperglicemia no desenvolvimento e progressão da doença renal do diabetes



Fonte: (Adaptado de MAGEE et al., 2017).

Várias estruturas renais são susceptíveis a hiperglicemia, desta maneira a DRD é caracterizada por hipertrofia glomerular, espessura de membranas basais e acúmulo de matriz extracelular nessas membranas que causam fibrose e esclerose tubulointersticial e glomerular (EL MESALLAMY, 2012; KOLSET, 2012 SANCHEZ et al., 2009). O comprometimento renal induzido pela hiperglicemia é importante no desenvolvimento e progressão da DRD e, portanto, o surgimento de lesões renais. A hiperglicemia induz o estresse oxidativo e ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs desempenham papel relevante através da apoptose de células mesangiais, o que contribui em parte para a hiperfiltração glomerular, uma disfunção renal precoce no diabetes, já que estas células fornecem suporte estrutural e auxílio na filtração glomerular (MAGEE et al., 2017; YAMAGISHI et al., 2010). Além do estresse oxidativo, a hipertensão sistêmica contribui para a patogênese da DRD através do aumento da pressão intraglomerular (BEAGLEY et al., 2014).

Para auxiliar no controle glicêmico, principalmente de pacientes com DM, a rotina laboratorial conta com a utilização da HbA_{1c}, um parâmetro que oferece vantagens ao refletir níveis glicêmicos dos últimos 3 a 4 meses, além de sofrer menor variabilidade dia a dia (causadas por estresse ou doença) e maior conveniência aos pacientes por independe do estado de jejum para sua determinação (SBD, 2017). Em 2010, a *American Diabetes Association* (ADA) atualizou o uso da HbA_{1c} no diagnóstico do diabetes em pacientes com valores de HbA_{1c} ≥ 6,5%, com algumas vantagens frente à glicemia de jejum e a glicemia pós-prandial. Em 2017, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), informou que para poder ser utilizada no diagnóstico de DM, a determinação da HbA_{1c} deve ocorrer pelo método padronizado no *Diabetes Control and Complications Triale* certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (ADA, 2010; SBD 2017). Existem interferentes como algumas doenças que alteram o tempo de sobrevivência das hemácias, como anemia hemolítica e hemorragia, podem resultar valores falsamente baixos de HbA_{1c} (PIMAZONI NETTO, A. et al., 2009)

Para reduzir a incidência de complicações, como insuficiência renal ou retinopatia são necessários anos de controle glicêmico. Para prevenir ou retardar as complicações microvasculares, tanto no DM tipo 1 quanto no DM tipo2 recomenda-se o monitoramento com uma meta de aproximadamente 7% de HbA_{1c} (DCCT, 1995; NKF, 2012).

3.2.2 Inflamação

Existe uma combinação de mecanismos imunológicos e inflamatórios que desempenham função fundamental no desenvolvimento e progressão do DM tipo 2 (DURAN-SALGADO; RUBIO-GUERRA, 2014). A inflamação é definida como uma cascata de fenômenos induzida em resposta a lesão tecidual e a diferentes estímulos patológicos. As evidências confirmam que a inflamação tem um papel importante no desenvolvimento da maioria das doenças renais crônicas (TROSTEL; GARCIA, 2015). No DM tipo 2 o processo inflamatório parece desempenhar um papel tanto na patogênese da doença como também nas suas complicações microvasculares (ZOZULINSKA; WIERUSZ-WYSOCKA, 2006). Quando o epitélio do túbulo renal proximal é lesado, é promovida uma resposta inflamatória (CDC, 2017).

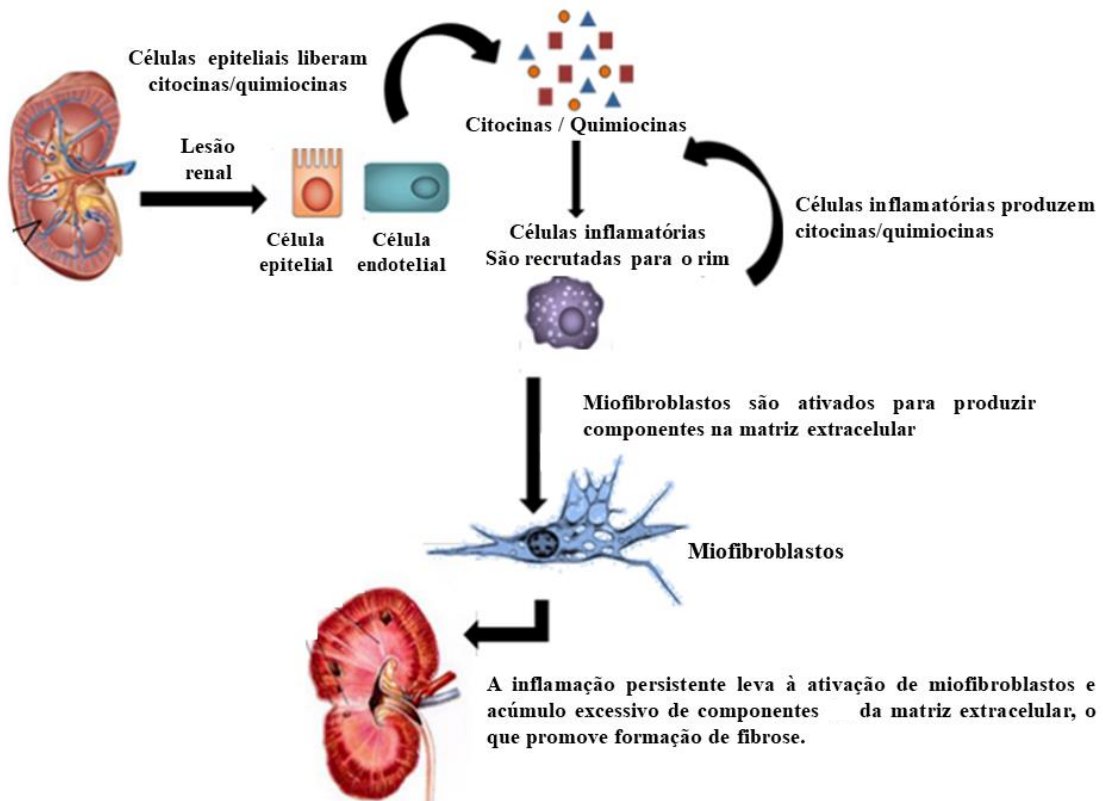
A resposta inflamatória pode ser induzida por múltiplos mecanismos, incluindo a morte celular induzida pela hiperglicemia, que ativa o influxo de macrófagos e outras células imunes. Além da hiperglicemia, alguns outros componentes como o sistema renina-angiotensina e o estresse oxidativo, podem ativar o processo inflamatório nos rins, o que resulta na infiltração de monócitos e linfócitos. Estes, por sua vez, secretam moléculas lesivas, como citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROS). Estas atividades promovem lesão celular e o desenvolvimento de fibrose (DURAN-SALGADO; RUBIO-GUERRA, 2014, VESTRA et al., 2005) o que pode causar inflamação de baixo grau no sistema renal, associada a nefropatia e espessamento de MBG no DM tipo 2.

3.2.2.1 Citocinas

A participação da inflamação na patogênese do DM envolve aumento da produção de quimiocinas, infiltração de células inflamatórias ao rim, produção de citocinas pró-inflamatórias e dano tecidual (DURAN-SALGADO; RUBIO-GUERRA, 2014; NAVARRO-GONZÁLEZ; MORA-FERNÁNDEZ, 2008; NAVARRO-GONZÁLEZ et al., 2009). As citocinas inflamatórias são moléculas-chave envolvidas no processo inflamatório, desempenhando um papel significativo como reguladores, bem como efetores finais, devido a esta importância têm sido estudadas em várias doenças, incluindo DRD (LUÍS-RODRÍGUEZ et al., 2012). As células renais (endoteliais, mesangiais, glomerulares e epiteliais tubulares) são capazes de sintetizar citocinas inflamatórias (HASEGAWA et al., 1995; LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012). Após a lesão tecidual, as células epiteliais/endoteliais liberam

citocinas para recrutar e ativar células inflamatórias. Células inflamatórias ativadas secretam citocinas profibróticas e citocinas para atrair mais células inflamatórias e amplificar a reação inflamatória. As células mesangiais e os fibroblastos são ativados e a deposição excessiva da matriz extracelular é observada (Figura4) (TROSTEL; GARCIA, 2015).

Figura 4 - Desenvolvimento de fibrose na reação inflamatória crônica



Fonte: (Adaptado TROSTEL e GARCIA, 2015)

Em um estudo experimental, verificou-se que macrófagos incubados com MBG de animais diabéticos apresentavam maiores valores de IL-1 do que os incubados com de animais normais, sugerindo o potencial papel das citocinas inflamatórias como fatores patogênicos na DRD (HASEGAWA et al., 1991). Nos rins de diabéticos a IL-1 e a IL-6 são reguladas positivamente (NAVARRO et al., 2006; LUÍS-RODRÍGUEZ et al., 2015). A IL-1 foi relacionada ao aumento da permeabilidade endotelial, proliferação de células mesangiais e anormalidades hemodinâmicas intraglomerulares (ROYALL et al., 1989). A IL-6 estimula a proliferação de células mesangiais e aumenta a permeabilidade endotelial (VESTRA et al., 2005; HIRANO et al., 1990). Concentrações elevadas de IL-6 foram relatadas em pacientes

com DM tipo 2 e doença renal evidente, demonstrando uma associação direta entre o espessamento da membrana e a IL-6. Além disso, a IL-6 tem sido relacionada à progressão da doença renal (BURACZYNSKA, 2007).

O papel da IL-6 no DM tipo 2 é considerado complexo, vários estudos experimentais relataram que a IL-6 induz resistência à insulina nos tecidos periféricos (FÈVE e BASTARD, 2009; AKASH et al., 2012), apoptose em ilhotas pancreáticas, juntamente com outras citocinas inflamatórias (AKASH et al., 2012; PRADHAN et al., 2001). Devido a esses efeitos, a IL-6 é considerada um fator de risco e atua como marcador preditivo e patogênico para resistência à insulina e progressão do DM tipo 2 (TILG; MOSCHEN, 2008).

Os níveis urinários da citocina anti-inflamatórias IL-10 foram menores em pacientes com DM tipo 2 e DRD em comparação com os pacientes DM tipo 2 sem DRD. Também os níveis de IL-10 urinária diminuíram em pacientes diabéticos com níveis de uAlb entre 10-30 mg/g creatinina em comparação com pacientes com uAlb<10mg/g creatinina (SANGOI et al., 2016).

A IL-6 é relevante na DRD, pois afeta a dinâmica da matriz extracelular nos níveis mesangial e podocitário, estimula a proliferação de células mesangiais, aumenta a expressão de fibronectina e aumenta a permeabilidade endotelial (NAVARRO-GONZÁLEZ; MORA-FERNÁNDEZ, 2008; VESTRA et al., 2005).

O conhecimento e melhor compreensão do papel dos processos inflamatórios na DRD pode representar uma importante oportunidade terapêutica para o desenvolvimento de novas estratégias para evitar a progressão desta complicação (LUIS-RODRÍGUEZ et al., 2012).

3.3 BIOMARCADORES RENAIIS

O diagnóstico e prognóstico de doenças renais é limitado. A biópsia do tecido é considerada padrão ouro para o diagnóstico, e algumas vezes se torna necessário apesar da complexidade e dificuldade, já que pode promover riscos por ser um método invasivo (MANNO, et al., 2004).

Nos últimos anos, ocorreu um crescimento na busca de biomarcadores para diagnosticar doença renal, pois há necessidade de um melhor diagnóstico precoce. Os biomarcadores mais promissores aparentam ser encontrados em estudos comandados em pesquisas por questões específicas (KONVALINKA et al., 2012). Diversas dificuldades devem ser superadas antes que novos biomarcadores de lesão renal sejam inseridos na prática clínica. Alguns obstáculos são os efeitos de diferentes fatores na interpretação dos resultados,

incluindo sexo, idade e diferenças de pontos de corte de cada marcador em determinadas condições (OSTERMANN et al., 2012). O biomarcador ideal é o que pode diagnosticar precocemente ou até mesmo prever a doença renal, constatar o local, a etiologia da lesão, auxiliar o acompanhamento e favorecer a determinação de intervenções terapêuticas (ENDRE et al., 2010).

Os biomarcadores tubulares compreendem especialmente moléculas pequenas que estão situadas no túbulo renal, sendo geralmente proteínas ou enzimas que são liberadas para a circulação sistêmica ou urina como consequência de variações na TFG, lesão nas células tubulares ou infiltração de células inflamatórias (OSTERMANN et al., 2012). O interesse pelos marcadores de dano tubular está aumentando, pois a lesão tubular tem sido relatada em pacientes com DM e a função glomerular intacta (SINGH et al., 2008), sinalizando que podem ser biomarcadores mais precoces. Algumas enzimas e proteínas relacionadas ao dano tubular são: α 1 e β 2-microglobulina, proteína ligadora do retinol, lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL), KIM-1, N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), gama-glutamyltransferase urinária (uGGT) e demais marcadores (MORESCO et al., 2013).

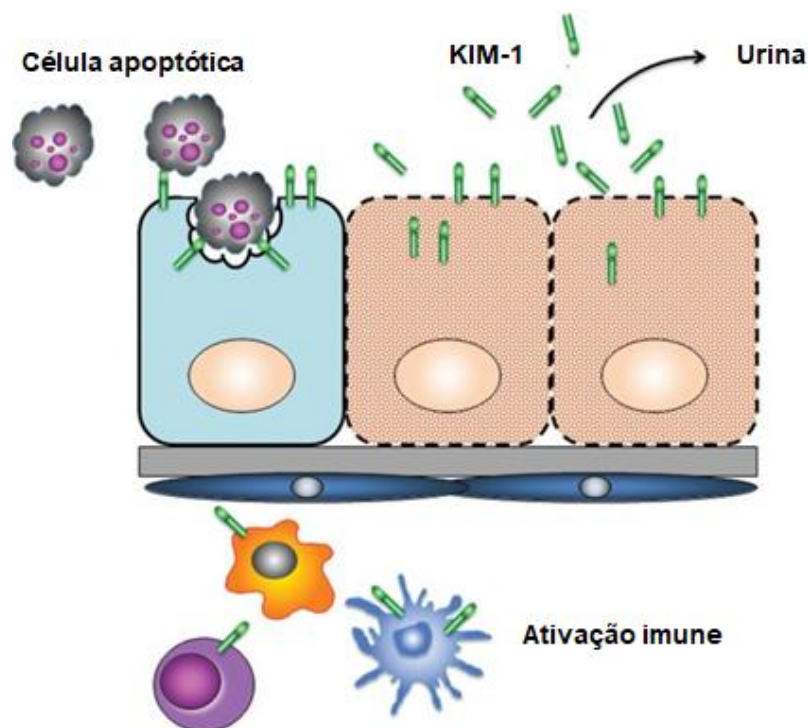
3.4 MOLÉCULA DE DANO RENAL-1

A molécula de dano renal 1 (KIM-1) é uma proteína expressa na membrana apical das células epiteliais do túbulo proximal, especialmente no segmento S3 do túbulo proximal, região altamente susceptível a lesão, como danos causados devido a isquemia ou por toxinas. KIM-1 é uma glicoproteína de membrana do tipo I que contém domínio semelhante à imunoglobulina e um domínio de mucina em sua porção extracelular (ICHIMURA et al., 1998). Existem duas variantes, KIM-1a, que é a principal forma expressa no fígado e KIM-1b, que é a forma predominante nos rins. Ambas as isoformas têm domínios extracelulares iguais, mas diferem em seus domínios citoplasmáticos (BAILLY et al., 2002).

Há indícios que a expressão de KIM-1 surge devido sua função de mediar o reconhecimento e fagocitose de células mortas. Assim, o KIM-1 na célula epitelial renal funciona como um auxiliador fagocítico, envolvido na depuração de células mortas, ou seja, sugere ser capaz de facilitar o remodelamento dos epitélios lesados (Figura 5) (ICHIMURA et al., 2008; BONVENTRE, 2009). Visto que o aumento na regulação de KIM-1 ocorre de forma rápida após a lesão tubular e o KIM-1 é transferido para a urina, é possível que a detecção deste marcador urinário possa ser utilizada para avaliação precoce da integridade tubular, já que a expressão de KIM-1 é ausente em rins considerados normais (HAN et al.,

2002; BONVENTRE, 2009). Na lesão renal, esta molécula está aumentada mais precocemente do que os biomarcadores convencionais, como creatinina e ureia, além da proteinúria, podendo ser um indicador sensível e sua presença na urina altamente específica para lesão renal. Nenhum outro órgão demonstrou expressar KIM-1 a um grau que influenciasse a excreção renal. (VAIDYA et al., 2006; BONVENTRE, 2009). Após a lesão tubular renal, os níveis de mRNA de KIM-1 aumentaram outros genes, e o ectodomínio de KIM-1 foi eliminado das células *in vitro*, bem como *in vivo* na urina, de animais de modelo experimental (BAILLY et al., 2002). Em outro estudo experimental, indicou que o KIM-1 expresso cronicamente por células epiteliais pode, conseqüentemente, estabelecer uma cascata pró-inflamatória, promovendo inflamação crônica e fibrose renal em DRC, o que pode levar a danos e perda da função renal (HUMPHREYS et al., 2013). Além disso em um estudo onde analisou amostras de biopsias renais demonstrou que KIM-1 se correlacionou de maneira positiva com fibrose túbulo intersticial e inflamação (VAN TIMMEREN et al., 2007).

Figura 3 - Expressão do KIM-1 nas células tubulares proximais e a promoção celular apoptótico e necrótico. Com a lesão, o KIM-1 é regulado positivamente e lançado na urina e no espaço extracelular. Ativação das células imunes na resposta imune induzida por lesões.



Fonte: (Adaptado de CHARLTON et al., 2014)

O KIM-1 foi aprovado pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos como um biomarcador de lesões renais agudas para o desenvolvimento de medicamentos pré-clínicos (DIETERLE et al., 2010).

Além de ser capaz de identificar a insuficiência renal aguda em pacientes hospitalizados, há indicativos que os níveis de KIM-1 na urina podem estar relacionados com a progressão ou a regressão da DRD (HAN; BAILLY, 2002; VAIDYA et al. 2008). Considerando a DRD, DE CARVALHO e colaboradores (2015), evidenciaram que o KIM-1 tem a capacidade de distinguir a DRD incipiente, estabelecendo como melhores ponto de corte 137 pg/mL para KIM-1 e um valor de 109 ng/g de creatinina para KIM-1/uCr.

Evidências recentes em pacientes com DM tipo 2 demonstraram uma correlação de KIM-1 urinário e uAlb. Os níveis de KIM-1 foram maiores nos pacientes com elevação normal ou leve da uAlb e aumentaram conforme a uAlb se elevou, o que pode indicar alterações renais antes que a lesão renal mais grave ocorra. Além disso, foi maior em pacientes diabéticos quando comparados com controles e especialmente maior em pacientes com DRD (DE CARVALHO et al., 2016; TEKCE et al., 2015; EL-ASHMAWY et al., 2015). Em pacientes com DM tipo 2, KIM-1 apresentou diferença entre os que apresentavam macroalbuminúria e microalbuminúria (NIELSEN et al., 2012). No DM tipo 1, o KIM-1 foi associado com a progressão da DRD para doença renal em estágio final nesses pacientes (NIELSEN et al., 2011). Em vista da elevação de glicose no DM, um estudo *in vitro* sugeriu que o KIM-1 poderia mediar a autofagia e apoptose por uma indução através de glicose elevada. Através dos resultados obtidos, esse poderia ser um mecanismo de KIM-1 nos túbulos renais na DRD (GOU RONG et al., 2016).

Quando relacionado o KIM-1 com a TFG, Nielsen e colaboradores (2012) verificaram que níveis elevados dos biomarcadores KIM-1 e NGAL foram associados com o declínio rápido da TFG em pacientes com DM tipo 2, já em estágio de micro e macroalbuminúria. Em pacientes com DRC houve uma associação dos níveis elevados de KIM-1 com menor TFG, porém não foi verificado se KIM-1 estava presente nos pacientes sem a DRC ou com hiperfiltração. Além disso, nas cinco coortes de um estudo, uAlb foi associada com os valores mais elevados de KIM-1 na urina e uma correlação negativa com a TFG (WAIKAR et al., 2016).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência da associação entre as concentrações urinárias de KIM-1, o controle glicêmico e os níveis urinários das citocinas pró-inflamatórias em pacientes com DM tipo 2.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se as concentrações urinárias de KIM-1 são mais elevadas nos pacientes com DM tipo 2 que apresentarem um pior controle glicêmico avaliado pelas concentrações de HbA_{1c};
- Investigar se as concentrações urinárias de KIM-1 apresentarão associação com as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 na urina de pacientes com DM tipo 2;
- Averiguar se os níveis urinários de KIM-1 são influenciados por outras variáveis clínico-laboratoriais independentes.

Revista a ser submetida: Clinica Chimica Acta

5 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

5.1 MANUSCRITO

Urinary KIM-1 is associated with glycemic control and with urinary pro-inflammatory cytokines in patients with type 2 diabetes mellitus

Yãnaí Schneider Bollick^{a,b}, José Antonio M. de Carvalho^{a,c}, Naiara dos Santos Guarda^b, Fabio Vasconcelos Comim^{d,e}, Melissa Orlandin Premaor^{d,e}, Rafael Noal Moresco^{a,b,*}

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

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

^cUniversity Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

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

^eDepartment 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.

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Phone.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

Abstract

Background: This study investigated the associations among the urinary kidney injury molecule 1 (KIM-1), glycemic control and urinary pro-inflammatory cytokines interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6) in patients with type 2 diabetes mellitus (DM).

Methods: Overall, 122 patients with type 2 diabetes grouped into 2 groups based on the median urinary KIM-1 levels were examined in this study. Urinary levels of KIM-1, IL-1, IL-6, along with other biochemical and clinics parameters, were assessed in these patients.

Results: Urinary KIM-1 values were about 34% increased in patients with HbA_{1c} above 8.7% compared to patients with HbA_{1c} values below 6.0%. Urinary levels of KIM-1 were also increased approximately 130% and 90 among patients who presented the highest increase of urinary IL-1 and IL-6, respectively. Significant positive correlations were observed between urinary KIM-1 and HbA_{1c} ($r = 0.23$, $P = 0.028$), urinary KIM-1 and urinary IL-1 ($r = 0.60$, $P < 0.001$) and urinary KIM-1 and urinary IL-6 ($r = 0.40$, $P < 0.001$)

Conclusions: Urinary levels of KIM-1 were higher among patients with type 2 DM who presented the highest levels of HbA_{1c} and the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6 in urine

Keywords: Glycemic control, inflammation, kidney injury molecule-1, tubular damage, type 2 diabetes.

1. Introduction

Kidney injury molecule-1 (KIM-1) is a type 1 membrane protein expressed mainly on proximal tubule cells after injury. In healthy kidneys, KIM-1 is expressed at low levels [1 – 2]. After tubular damage, the injured kidney cells have deranged expression and secretion of KIM-1. For this reason, urinary KIM-1 has been suggested as a biomarker for detecting and monitoring tubular injury in different clinical conditions, including diabetes kidney disease (DKD) [3 – 6]. Additionally, it has been indicated that KIM-1 may mediate high glucose-induced autophagy and apoptosis in renal tubular epithelial cells [7]. The long-standing hyperglycemia in patients with poorly controlled diabetes may contribute to the development of microvascular and macrovascular complications related to diabetes [8 – 9].

Inflammatory cytokines are key molecules involved in the pathogenesis of several diseases, including DKD. Therefore, inflammatory cytokine-related effects are potentially involved in the development and progression of renal injury in diabetes [10 –11]. The inflammatory response is stimulated by injury in the proximal renal tubule epithelium [12]. Changes in renal tubules have been studied and associated with some pathologies such as DKD [13 – 14]. Thus, there has been increasing interest in the discovery of urinary biomarkers that are able of identifying damage and other changes occurring in the renal tubules. Recently, our research team carried-out a study [15] to investigate whether urinary inflammatory cytokines were altered in type 2 diabetes mellitus (DM) patients with normal or mildly increased albuminuria and whether urinary cytokines were able to identify DKD. Interestingly, urinary IL-6 was able to assist in the identification of DKD, even in the absence of micro- and macroalbuminuria [15].

Although the inadequate glycemic control and renal inflammation are some of the mechanisms involved in the pathophysiology of DKD, it is important to investigate whether these factors are associated with urinary levels of KIM-1, a new and sensitive biomarker of renal tubular damage. Therefore, this study aimed to investigate the associations among the urinary KIM-1, glycemic control and urinary pro-inflammatory cytokines in patients with type 2 DM.

2. Materials and Methods

2.1. Study population

A total of 122 patients with T2DM recruited in the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil was enrolled in the present study. Patients who had urinary tract diseases, malignancy, infectious and liver diseases, acute or chronic inflammatory diseases, pregnancy, renal transplantation and the use of nephrotoxic drugs were excluded from the study. Patients were stratified into two groups according to the median of urinary KIM-1 to assess the association between urinary KIM-1 and other variables. The clinical data were recorded through a questionnaire with clinical and epidemiological variables and by the review of the medical registry of the hospital. Written informed consent was obtained from all the patients, and the study was conducted following guidelines approved by the Institutional Ethics Committee for human studies (number 12303113.0.0000.5346).

2.2. Laboratory analysis

Blood samples were collected from all patients after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, with EDTA and no anticoagulants. Blood samples were routinely centrifuged at $2500 \times g$ for 15 minutes. Besides, samples of the first-morning urine were collected from all patients. The urine specimens were centrifuged at $1000 \times g$ for 5 minutes, and the supernatant was utilized for the analysis. Plasma with sodium fluoride plus EDTA was used for measurement of fasting glucose levels, while the serum was employed for the assessment of total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), insulin and creatinine by use of standard methods on Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA) or Cobas 6000[®] (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) automated analyzers. The whole blood in EDTA was used to determine the levels of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) using a chromatographic method in D10[®] automated analyzer (BioRad, California, USA). The first-morning urine samples were obtained from the patients to determine the levels of albumin, creatinine, KIM-1, urinary interleukin-1 (IL-1), and IL-6. Urinary albumin and creatinine were quantified by use of standard methods on Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, USA), and the results of urinary albumin were expressed as albumin/creatinine ratio (ACR) as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [16]. Urinary KIM-1, IL-1, and IL-6 were measured by ELISA using commercial kits (R&D Systems Inc[®],

Minneapolis, Minnesota, USA). All assays were conducted according to the manufacturer's instructions. Body mass index (BMI) was calculated by of the weight in kilograms divided by the square of the height in meters. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was assessed using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation [17].

2.3. Statistical analysis

All variables were tested for normality using D'Agostino & Pearson test, and the appropriated parametric or non-parametric approach was used. Categorical data were summarized as percentages and compared using Chi-square test. Continuous variables are presented as the mean \pm standard deviation (SD) or median and interquartile range (IQR). Statistical differences between groups were analyzed using Student's t-test or Mann-Whitney test. The comparison of urinary KIM-1 levels, according to quartiles of HbA_{1c}, urinary IL-1, and urinary IL-6 were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Spearman or Pearson correlation was used to evaluate the correlations between urinary KIM-1, HbA_{1c}, urinary IL-1 and urinary IL-6. Additionally, multiple regression analysis of urinary KIM-1 as a dependent variable adjusted for some independent variables was assessed through different models. Two-tailed P values < 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] version 6.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) or Statistica 6.0[®] (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

The baseline characteristics of the study participants are reported in Table 1. Patients were stratified into two groups according to the median of urinary KIM-1: ≤ 87 pg/mL and > 87 pg/mL. The groups had similar distributions for age, gender, BMI, the proportion of smokers, duration of type 2 DM, insulin use, oral hypoglycemic agents, ACE inhibitors, HbA_{1c}, serum insulin, HDL-cholesterol, triglycerides, and eGFR. In contrast, statistically significant differences were observed for the proportion of hypertension, fasting glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, urinary ACR, urinary IL-1 and IL-6. Patients stratified into the urinary KIM-1 group > 87 pg/mL were mostly hypertensive and had higher levels of fasting glucose, total cholesterol, LDL-cholesterol, urinary ACR, urinary IL-1 and IL-6 compared to patients with urinary KIM-1 ≤ 87 pg/mL.

Besides, urinary KIM-1 levels were evaluated according to the quartiles of HbA_{1c}, urinary IL-1, and IL-6 to investigate the impact of the glycemic control and urinary pro-inflammatory cytokines on tubular damage assessed by urinary KIM-1 in type 2 DM patients, as shown in Figure 1. The HbA_{1c} quartiles included the following values: Q1 (4.9-6.0%), Q2 (6.1-6.9%), Q3 (7.0-8.6%) and Q4 (8.7-13.4%). Among these quartiles, mean urinary KIM-1 values were about 34% higher in Q4 compared to Q1 ($P=0.003$). The quartiles of urinary IL-1 were: Q1 (30-73 pg/mL), Q2 (74-89 pg/mL), Q3 (90-123 pg/mL) and Q4 (124-201 pg/mL). In addition, the quartiles of urinary IL-6 were: Q1 (36-93 pg/mL), Q2 (94-112 pg/mL), Q3 (113-143 pg/mL) and Q4 (144-213 pg/mL). Urinary KIM-1 values were most notably higher, especially in Q4 of both IL-1 and IL-6. Interestingly, the urinary levels of KIM-1 increased approximately 130% and 90%, respectively, in patients from Q4 compared to Q1 ($P < 0.001$ for both).

Statistically significant positive correlations were also observed between urinary KIM-1 and HbA_{1c} ($r = 0.23$, $P = 0.028$), urinary KIM-1 and urinary IL-1 ($r = 0.60$, $P < 0.001$) and urinary KIM-1 and urinary IL-6 ($r = 0.40$, $P < 0.001$), as shown in Figure 2. Multiple regression analysis of urinary KIM-1 as a dependent variable adjusted for some independent variables was assessed through different models. The statistical models indicated that urinary KIM-1 was dependent of some variables such as fasting glucose, urinary ACR, urinary IL-1 and IL-6, and independent of other factors as hypertension and total cholesterol (Table 2). These results indicated that urinary KIM-1 levels are influenced by the glycemic profile of patients, as well as by renal inflammation and glomerular damage in patients with type 2 DM.

4. Discussion

The association among the urinary KIM-1, glycemic control, and urinary pro-inflammatory cytokines IL-1 and IL-6 in patients with type 2 DM were investigated in the present study. Urinary KIM-1 was significantly higher in patients who had higher HbA_{1c}, especially in those whose HbA_{1c} was higher than 8.7%. In fact, the chronic hyperglycemia of diabetes has been associated with long-term damage, dysfunction and chronic failure of different organs, including kidneys. Thus, the present study demonstrated higher tubular damage in patients who showed a poor glycemic control. The mechanism by which diabetes leads to these complications is complex, and not yet fully understood; however, it involves the direct toxic effects of high glucose levels and the enhancement of reactive oxygen species (ROS) which lead to an increase of vascular endothelial growth factor, cytokines, and other

inflammatory mediators [18–21]. An important consequence of oxidative stress related to metabolic abnormalities of diabetes is the mitochondrial superoxide overproduction, and this increased superoxide production causes the activation of pathways involved in the pathogenesis of complications, such as polyol pathway flux and the increased formation of advanced glycation end products (AGEs) [22–23]. Thus, the persistent hyperglycemia characterized by elevated HbA_{1c} is a key process for the development of tubular injury and progression to renal disease [24–26]. Interestingly, the early tubular injury has been reported in patients with diabetes mellitus whose glomerular function is intact [24].

The proximal tubule is susceptible to a variety of metabolic, hemodynamic and inflammatory factors associated with hyperglycemia [27]. For this reason, it is of interest to investigate the occurrence of tubular damage in patients with diabetes, as well as the influence of some processes such as inflammation on the status of the renal tubules. In the present study, it was observed that levels of urinary KIM-1 were higher in situations where the concentrations of the cytokines IL-1 and IL-6 were higher in the urine. Thus, our study supports the evidence that inflammation is associated with tubular damage in type 2 diabetes and demonstrates that urinary KIM-1 was able to detect tubular changes. In fact, inflammation has been demonstrated as a process that plays an important role in the pathogenesis of several chronic complications associated with diabetes, including DKD [28–31]. A recent study conducted by our research group observed higher urinary concentrations of IL-1 and IL-6 in patients with DKD than those without DKD, and these cytokines demonstrated good ability to identify DKD among patients with type 2 diabetes [15].

Proinflammatory cytokines including IL-1 and IL-6 have been recognized as pathogenic mediators that contribute to kidney damage [32]. 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 ROS [29]. Among proinflammatory cytokines, IL-6 affects extracellular matrix dynamics at both mesangial and podocyte concentrations, stimulates proliferation of mesangial cells, increases fibronectin expression, and enhances endothelial permeability [11, 29]. In conclusion, the current study reported the association between the urinary KIM-1, glycemic control, and urinary pro-inflammatory cytokines IL-1 and IL-6 in patients with type 2 DM. Urinary levels of KIM-1 were markedly higher in situations where HbA_{1c} and proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6 in urine were increased. Thus, poor glycemic control and the renal inflammation contribute to the occurrence of tubular damage in type 2 diabetes, and KIM-1

has been shown to be a useful marker for detecting tubular damage in patients with type 2 diabetes.

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 and financial support. The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) for providing biochemical reagents.

References

- [1] T. Ichimura, J.V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C.A. Hession, R.L. Cate, M. Sanicola, Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury, *J Biol Chem.* 273 (1998) 4135–4142.
- [2] S.A. Ahmed, M.A. Hamed, Kidney injury molecule-1 as a predicting factor for inflamed kidney, diabetic and diabetic nephropathy Egyptian patients, *J Diabetes MetabDisord.* 14:6 (2015) 1-6.
- [3] J.V. Bonventre, Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more, *Nephrol Dial Transplant.* 24 (2009) 3265–3268.
- [4] B.K. Tekce, H. Tekce, G. Aktas, M. Sit, Evaluation of the urinary kidney injury molecule-1 levels in patients with diabetic nephropathy, *Clin Invest Med.* 37 (2014) E377-E388.
- [5] N.E. El-Ashmawy, E.A. El-Zamarany, N. F. Khedr, A.I.A. El-Fattah, S.A. Eltoukhy, Kidney injury molecule-1 (Kim-1): an early biomarker for nephropathy in type II diabetic patients, *Int J Diabetes Dev Ctries.* 35 (2015) S431–S438.
- [6] J.A.M. De Carvalho, E. Tatsch, B. Hausen, Y.S. Bollick, M.B. Moretto, T. Duarte, M.M.F. 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.
- [7] R. Gou, J. Chen, S. Sheng, R. Wang, Y. Fang, Z. Yang, et al., KIM-1 mediates high glucose-induced autophagy and apoptosis in renal tubular epithelial cells, *Cell Physiol Biochem.* 38 (2016) 2479-2488.
- [8] Z. Ilyas, J.T. Chaiban, A. Krikorian, Novel insights into the pathophysiology and clinical aspects of diabetic nephropathy, *Rev Endocr Metab Disord.* 18(1) (2017) 21-28.
- [9] W.T. Cade, Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting, *Physical Therapy.* 88 (2008) 1322-1335.
- [10] 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(1) (2012) 7-18.
- [11] M.D. Vestra, M. Mussap, P. Gallina, M.Bruseghin, A.M.Cernigoi, A. Saller, M. Plebani, P. Fioretto, Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes, *J Am Soc Nephro.* 16 (2005) S78-S82.

- [12] I. Grgic, G. Campanholle, V. Bijol, C. Wang, V.S. Sabbisetti, T. Ichimura, B.D. Humphreys, J.V. Bonventre, Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis, *Kidney Int.* 82(2) (2012) 172–183.
- [13] S.C. Tang, K.N. Lai, The pathogenic role of the renal proximal tubular cell in diabetic nephropathy, *Nephrol Dial Transplant.* 27 (2012) 3049–3056.
- [14] T. Fiseha, Z. Tamir, Urinary markers of tubular injury in early diabetic nephropathy, 2016 (2016) 1-10.
- [15] M.B. Sangoi, M. B.; De Carvalho, J. A.; Tatsch, E.; Hausen, B. S.; Bollick Y. S.; S.W. Londero, et al., Urinary inflammatory cytokines as indicators of kidney damage in type 2 diabetic patients, *Clin Chim Acta.* 460 (2016) 178-183.
- [16] D.J. Newman, M.J. Pugia, J.A. Lott, J.F. Wallace, A.M, Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity, *Clin. Chim. Acta.* 294 (2000) 139–155.
- [17] A.S. Levey, L.A. Stevens, C.H. Schmid, Y.L. Zhang, A.F. Castro, H.I. Feldman., A new equation to estimate glomerular filtration rate, *Ann. Intern. Med.* 150 (2009) 604–612.
- [18] D. Lebeche, A.J. Davidoff, R.J. Hajjar, Interplay between impaired calcium regulation and insulin signaling abnormalities in diabetic cardiomyopathy, *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 5 (2008) 715–724.
- [19] L.J. Pu, L. Lu, X.W. Xu, R.Y. Zhang, Q. Zhang, J.S. Zhang, J. Hu, Z.K. Yang, F.H. Ding, Q.J. Chen, S. Lou, J. Shen, D.H. Fang, W.F. Shen, Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C-reactive protein levels in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes, *Cardiovasc. Diabetol.* 20 (2006) 5–27.
- [20] R. Marfella, M. D’Amico, C. Di Filippo, E. Piegari, F. Nappo, K. Esposito, L. Berrino, F. Rossi, D. Giugliano, Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1, *Diabetologia* 45 (2002) 1172–1181.
- [21] S.C. Satchell, J.E. Tooke, What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia* 2008;51:714–25.
- [22] M.K. Shigenaga, B.N. Ames, Assays for 8-hydroxy-2-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 211–216.
- [23] M. Arif, M.R. Islam, T.M.Z. Waise, F. Hassan, S.I. Mondal, Y. Kabir, DNA damage and plasma antioxidant indices in Bangladeshi type 2 diabetic patients, *Diabetes Metab.* 36 (2010) 51–57.
- [24] D.K. Singh, P. Winocour, Farrington K, Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2008;4:216–26.

- [25] D. Magee, D.J Grieve , C.J Watson , D.P Brazil ,Diabetic Nephropathy: a Tangled Web to Unweave, *Cardiovasc Drugs Ther*, 31(5): (2016) 579–592.
- [26] A.A. Rossini, J.P. Mordes, E.S. Handler, Speculations on etiology of diabetes mellitus. Tumbler hypothesis, *Diabetes*. 37:3. (1988) 257-261.
- [27] J.A. De Carvalho, S.J. Piva, B.S. Hausen, G.V. Bochi, M. Kaefer, A.C. Coelho, M.M. Duarte, R.N. Moresco, Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2011;412:1407-11.
- [28] M.B. Duran-Salgado, A.F. Rubio-Guerra, Diabetic nephropathy and inflammation, *World J. Diabetes* 5 (2014) 393–398.
- [29] J.F. Navarro-Gonzalez, C. Mora-Fernandez, The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy, *J. Am. Soc. Nephrol*. 19, (2008) 433-442.
- [30] J.F. Navarro, F.J. Milena, C. Mora, C. Leon, J. Garcia, Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration, *Am. J. Nephrol*. 26 (2006) 562-570.
- [31] D. Zozulinska, B. Wierusz-wysocka, Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease, *Diabetes Res Clin Pract*. 74 (2006) 12-16.
- [32] 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.

Table 1. Baseline characteristics of the study participants classified according to the median of urinary KIM-1.

	Urinary KIM-1 \leq 87 pg/mL	Urinary KIM-1 $>$ 87 pg/mL	P-value
Age (years)	59.7 \pm 12.4	59.7 \pm 12.8	0.987
Gender (male,%)	32.6	29.8	0.762
BMI (kg/m ²)	29.7 (26.3-35.5)	29.9 (26.6-38.5)	0.666
Hypertension (%)	63.3	87.2	0.007
Smokers (%)	14.3	21.3	0.370
Duration of type 2 DM (years)	12 (8.0-18.0)	12 (7.0-20.0)	0.584
Insulin use (%)	32.6	46.8	0.156
Oral hypoglycemic agents (%)	93.9	87.2	0.264
ACE inhibitors (%)	32.6	51.1	0.067
Fasting glucose (mmol/L)	6.5 (5.6-8.5)	7.7 (6.1-11.3)	0.023
HbA _{1c} (%)	6.7 (5.7-8.5)	7.7 (6.3-9.5)	0.054
HbA _{1c} (mmol/mol)	48.0 (39.0-69.0)	59.5 (44.3-79.5)	0.062
Serum insulin (pmol/L)	68.1 (45.8-130.6)	100.4 (63.4-134.6)	0.092
Total cholesterol (mmol/L)	4.3 (3.9-4.8)	4.6 (4.3-5.3)	0.045
LDL cholesterol (mmol/L)	2.4 \pm 0.7	2.7 \pm 0.7	0.040
HDL cholesterol (mmol/L)	1.2 (0.9-1.4)	1.0 (0.9-1.3)	0.498
Triglycerides (mmol/L)	1.3 (0.8-1.8)	1.5 (0.7-2.2)	0.510
hs-CRP (mg/dL)	0.3 (0.2-0.6)	0.4 (0.2-0.7)	0.299
eGFR (mL/min/1.73m ²)	78.1 \pm 19.4	75.4 \pm 22.1	0.557
Urinary ACR (mg/g creatinine)	5.9 (4.4-9.4)	19.5 (10.7-82.7)	<0.001
Urinary IL-1 (pg/mL)	83.8 \pm 22.8	124.2 \pm 43.6	<0.001
Urinary IL-6 (pg/mL)	104.9 \pm 22.3	134.7 \pm 38.9	<0.001

Data are expressed as percentages, mean \pm standard deviation or median and interquartile range. ACE inhibitors, angiotensin-converting-enzyme inhibitors; ACR, albumin/creatinine ratio; BMI, body mass index; DM, diabetes *mellitus*; eGFR, estimated glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; IL-1, interleukin-1; IL-6, interleukin-6; KIM-1, kidney injury molecule 1.

Table 2. Multiple regression analysis of urinary KIM-1 as a dependent variable adjusted for some independent variables in different models.

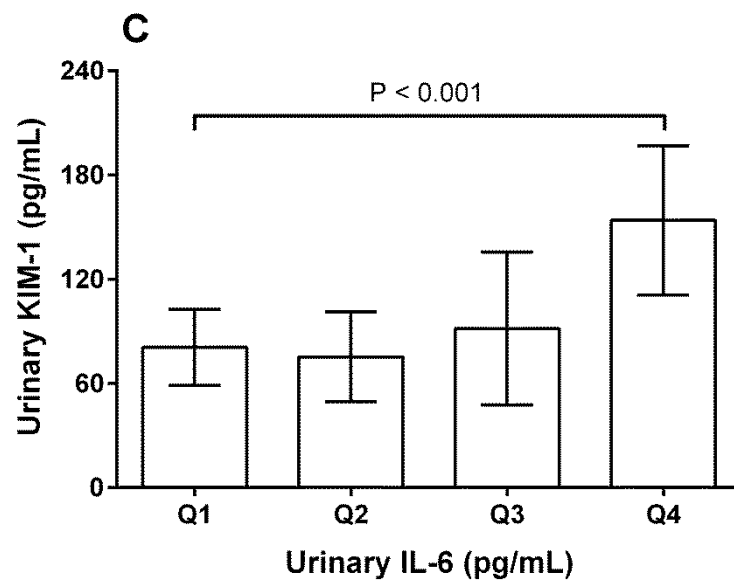
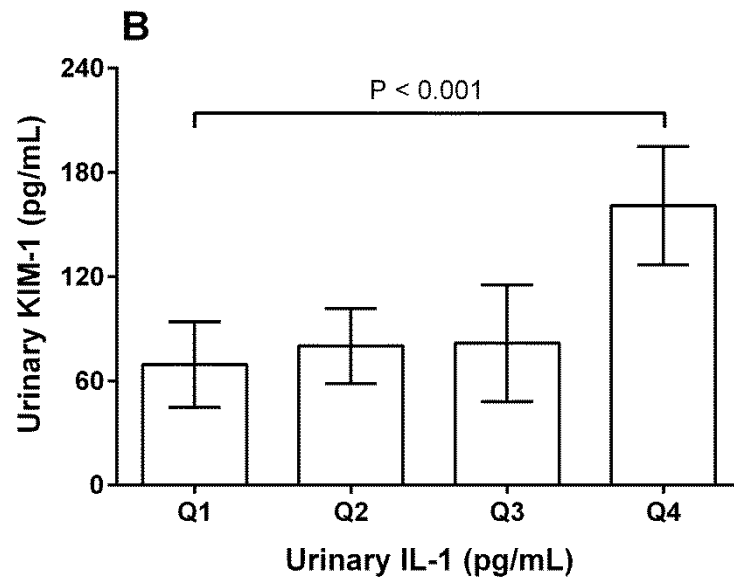
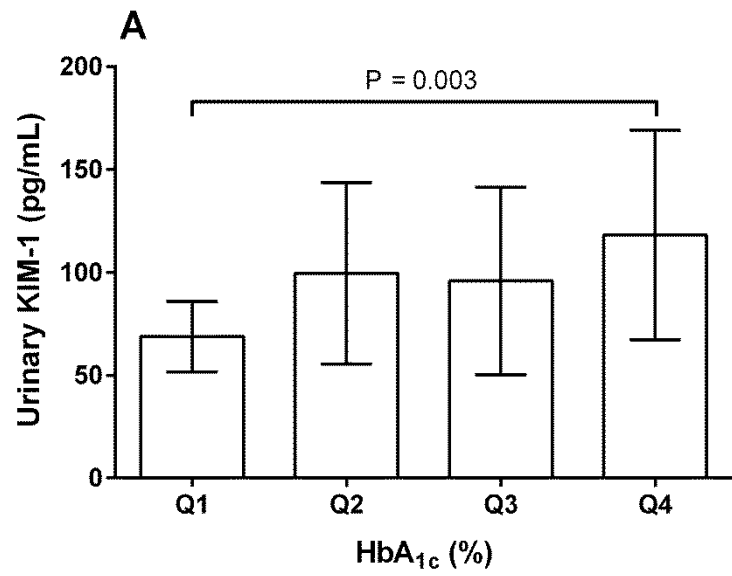
	B	SE_B	t	P-value
Model 1				
Hypertension	18.90	11.22	1.68	0.096
Fasting glucose	3.69	1.47	2.50	0.014
Total cholesterol	2.80	5.27	0.53	0.596
Model 2				
Hypertension	2.14	8.88	0.24	0.811
Fasting glucose	1.21	1.20	1.00	0.319
Total cholesterol	5.67	4.07	1.39	0.168
Urinary albumin/creatinine ratio	0.16	0.06	2.78	0.007
Urinary IL-1	0.75	0.12	6.44	<0.001
Model 3				
Hypertension	3.82	9.43	0.40	0.687
Fasting glucose	1.65	1.27	1.30	0.198
Total cholesterol	8.20	4.34	1.89	0.063
Urinary albumin/creatinine ratio	0.20	0.06	3.30	0.002
Urinary IL-6	0.77	0.14	5.37	<0.001

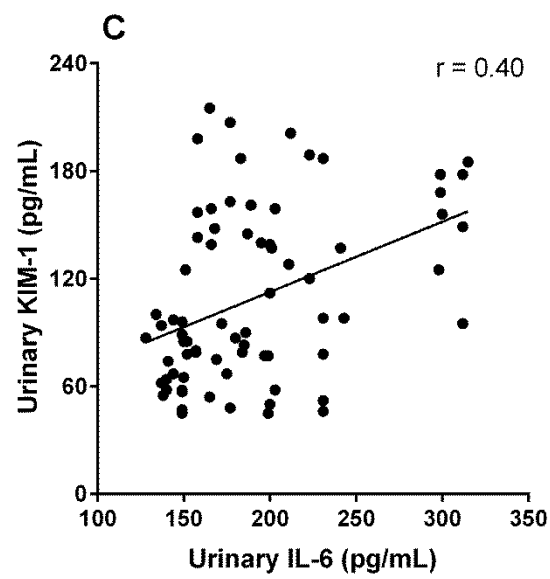
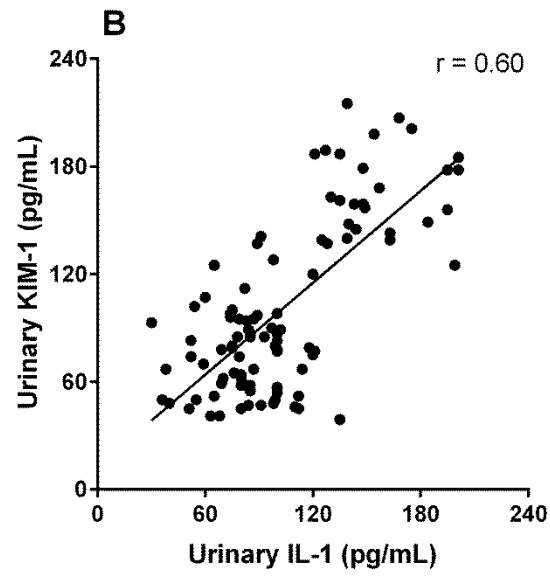
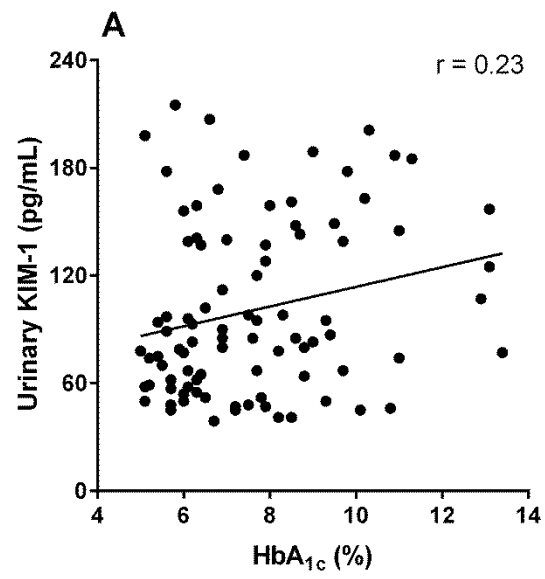
Regression coefficients (B), standard error of B (SE_B), and t statistic with corresponding P-value.

Figure Captions

Figure 1. Urinary levels of KIM-1 stratified according to the quartiles of (A) HbA_{1c}, (B) urinary IL-1, and (C) urinary IL-6. HbA_{1c} quartiles: Q1 (4.9-6.0%), Q2 (6.1-6.9%), Q3 (7.0-8.6%) and Q4 (8.7-13.4%). Urinary IL-1 quartiles: Q1 (30-73 pg/mL), Q2 (74-89 pg/mL), Q3 (90-123 pg/mL) and Q4 (124-201 pg/mL). Urinary IL-6 quartiles: Q1 (36-93 pg/mL), Q2 (94-112 pg/mL), Q3 (113-143 pg/mL) and Q4 (144-213 pg/mL).

Figure 2. Significant positive correlations between urinary KIM-1 levels and (A) HbA_{1c}, (B) urinary IL-1, and (C) urinary IL-6.





6 CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstrou que as concentrações urinárias de KIM-1 estiveram associadas a indicadores de controle glicêmico e de inflamação renal em pacientes com DM tipo 2.
- Os pacientes que apresentaram valores mais elevados de HbA_{1c}, especialmente aqueles com HbA_{1c} iguais ou acima de 8,7%, demonstraram concentrações mais elevadas de KIM-1 na urina, indicando um maior dano tubular.
- As concentrações urinárias de KIM-1 estiveram mais elevadas naqueles pacientes que apresentaram níveis urinários mais elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6.
- A inflamação renal e o controle glicêmico inadequado parecem estar associados ao desenvolvimento de lesão tubular com a consequente elevação dos níveis urinários de KIM-1 em pacientes com DM tipo 2.
- A elevação do KIM-1 urinário também ocorreu de forma dependente de outros indicadores como a razão albumina/creatinina na urina, e de forma independente de outras variáveis clínico-laboratoriais como hipertensão arterial, glicemia de jejum e colesterol total.

7 REFERENCIAS

- AHMED, S. A.; HAMED, M. A. Kidney injury molecule-1 as a predicting factor for inflamed kidney, diabetic and diabetic nephropathy Egyptian patients. **J Diabetes Metab Disord.**, v.14:6, p. 1-6,2015.
- AKASH, M. H. REHMAN, K.; CHEN, S. Role of Inflammatory Mechanisms in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **J Cell Biochem.**, v.114(3), p. 525-31, 2013.
- AKASH, M. H. et al. Interleukin-1 receptor antagonist: A new therapy for type 2 diabetes mellitus. **J Pharm Sci.**, v. 101, p. 1647–1658, 2012.
- AKASH, M. S. H.; REHMAN, K.; CHEN, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **J Cell Biochem.**, v. 114, p. 525-531, 2013.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.**, v. 33, p. S62–S69, 2010.
- AN, J. H. et al. The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean type 2 diabetic patients: a possible early stage renal complication. **J Korean Med Sci.**, v. 24, p. S75–S81, 2009.
- BAILLY, V. et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 39739–39748, 2002.
- BEAGLEY, J. et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.103(2), p. 150-60, 2013.
- BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): an urinary biomarker and much more. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 24, p. 3265-3268, 2009.
- BOULTON, A. J. et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care.**, v. 28, p. 956 -962, 2005.
- BURACZYNSKA, M. et al. Interleukin-6 gene polymorphism and faster progression to end-stage renal failure in chronic glomerulonephritis. **Transl Res.**, v.150, p. 101–105, 2007.
- CADE, W. T. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. **Phys Ther.**, v.88(11), p. 1322-35, 2008.
- CAO, Z.; COOPER, M. E.; Pathogenesis of diabetic nephropathy. **J Diabetes Investig.**, v. 2(4), p. 243–247, 2011.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **National Diabetes Statistics Report.** Atlanta, GA, U.S. Dept of Health and Human Services, 2017.
- DE CARVALHO, J. A. M. et al. Evaluation of the diagnostic characteristics of urinary kidney injury molecule 1 (uKIM-1) and uKIM-1/creatinine ratio in the assessment of incipient diabetic kidney disease. **Clin Chem Lab Med.**, v. 53(2), p. 51-4, 2015.

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. **Clin Biochem.**, v. 49, p. 232-236, 2016.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH. Type 1 diabetes: recent developments. **Br Med J.**, v. 328(7442), p. 750–754, 2004.

DIETERLE, F. et al. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. **Nat Biotechnol.**, v. 28, p. 455–462, 2010.

DURAN-SALGADO, M. B.; RUBIO-GUERRA, A. F. Diabetic nephropathy and inflammation. **World J Diabetes.**, v. 5(3), p. 393–398, 2014

EL-ASHMAWY, N. E. et al. Kidney injury molecule-1 (Kim-1): an early biomarker for nephropathy in type II diabetic patients. **Int J Diabetes Dev Ctries.**, v. 35, p. 431–438, 2015.

EL MESALLAMY, H. O. et al. Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy. **Clin Biochem.**, v. 45(9), p. 646-50, 2012.

ENDRE, Z. H. et al. Early intervention with erythropoietin does not affect the outcome of acute kidney injury (the earlyarf trial). **Kidney Int.**, v. 77, p. 1020–1030, 2010.

FÈVE, B.; BASTARD, J. P. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol.**, v. 5, p. 305–311, 2009.

FOWLER, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. **Clin Diabetes.**, v. 26(2), p. 77-82, 2008.

GOU, R. et al. KIM-1 Mediates High Glucose-Induced Autophagy and Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells. **Cell Physiol Biochem.**, v. 38, p. 2479-2488, 2016.

GREGGT, E. W. et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. **N Engl J Med**, v. 17, n. 370, p. 1514-23, 2014.

GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 176-188, 2005.

HALBAN, P. A. et al. β -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Postulated Mechanisms and Prospects for Prevention and Treatment. **Diabetes Care**, v. 37(6), p. 1751-1758, 2014.

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

HASEGAWA, G.; NAKANO, K.; KONDO, M. Role of TNF and IL-1 in the development of diabetic nephropathy. **Nefrologia.**, v. 15, p. 1–4, 1995.

HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunol Today.**, v. 11, p. 443–449, 1990.

HUMPHREYS, B. D. et al. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. **J Clin Invest.** v.123(9), p. 4023-35, 2013.

ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 4135–4142, 1998.

ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule–1 is a Phosphatidylserine receptor that confers A phagocytic phenotype on epithelial cells. **J Clin Invest.**, v.118 , p. 1657-68, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas.** 6th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **Diabetes Atlas.** 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M.; Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World J Diabetes.**, v. 6(6), p. 850–867, 2015.

KOLSET, S. O.; REINHOLT, F. P.; JENSSEN, T. Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix. **J Histochem Cytochem.**, v. 60(12), p. 976–986, 2012.

KONVALINKA, A.; SCHOLEY, W. J.; DIAMANDIS, P. E. Searching for New Biomarkers of Renal Diseases through Proteomics. **Clin Chem.**, v. 58, p. 353-65, 2012.

KUMAR, P. A.; BROSIUS, F. C.; MENON, R. K. The glomerular podocyte as a target of growth hormone action: implications for the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Curr Diabetes Rev.**, v. 7, p. 50–5, 2011.

KUMAR, P. A. et al. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus. **Front Endocrinol.**, v.5, p.151, 2014.

LUIS-RODRÍGUEZ, D. et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. **World J Diabetes.**, v. 3(1), p. 7-18, 2012.

MAGEE, D. et al. Diabetic Nephropathy: a Tangled Web to Unweave. **Cardiovasc Drugs Ther.**, v. 31(5), p. 579–592, 2017.

MANNO, C. et al. Predictors of bleeding complications in percutaneous ultrasound-guided renal biopsy. **Kidney Int.**, v. 66, p. 1570 –7, 2004.

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

MUKHI, D. et al. Novel Actions of Growth Hormone in Podocytes: Implications for Diabetic Nephropathy. **Front Med.**, v. 4, p. 102, 2017.

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

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION (KDOQI). Clinical Practice Guideline for Diabetes and CKD: 2012. **Am J Kidney Dis.**, v. 60(5), p. 850-886, 2012.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F. et al. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. **Am J Nephrol.**, v. 26, p. 562–570, 2006.

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F.; MORA, C. Role of inflammation in diabetic complications. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 5, p. 2601-2604, 2005.

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

NAVARRO-GONZÁLEZ, J. F.; MORA-FERNÁNDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol.**, v. 19, p. 433–442, 2008.

NIELSEN, S. E. et al. Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 97, p. 71–76, 2012.

NIELSEN, S. E. et al. Tubular markers do not predict the decline in glomerular filtration rate in type 1 diabetic patients with overt nephropathy. **Kidney Int.**, v. 79, p. 1113–1118, 2011.

OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 128, p. 40-50, 2017.

OSTERMANN, M.; PHILIPS, B. J.; FORNI, L. G. Clinical review: biomarkers of acute kidney injury: where are we now? **Crit Care.**, v. 16, p. 233, 2012.

PIMAZONI NETTO, A. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA_{1C}) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **J Bras Patol.**, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.

PRADHAN, A. D. et al. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA.**, v. 286, p.327–334, 2001.

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

ROYALL, J. A. et al. Tumor necrosis factor and interleukin 1 α increase vascular endothelial permeability. **Am J Physiol.**, v. 257, p. 399–L410, 1989.

RUSSEL, N. D. F.; COOPER, M. E. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. **Diabetologia**, v. 58, p. 1708–1714, 2015.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SANCHEZ, A. P.; SHARMA, K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Expert Rev Mol Med.**, v. 11, p. 13, 2009.

SANGOI, M. B. et al. Urinary inflammatory cytokines as indicators of kidney damage in type 2 diabetic patients. **Clin Chim Acta.**, v. 460, p. 178-83, 2016.

SINGH, D. K; WINOCOUR, P; FARRINGTON, K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubula hypothesis of diabetic nephropathy. **Nat Ver Nephrol.** v. 4, p. 216–26, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018** - São Paulo: Editora Clannad. Vários autores. Vários coordenadores, 2017.

TEKCE, B. K. et al. Does the kidney injury molecule-1 predict cisplatin-induced kidney injury in early stage? **Ann Clin Biochem.** v. 52, p. 88-94, 2015.

THE DCCT RESEARCH GROUP. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. **Kidney Int.**, v.47(6), p. 1703-1720, 1995.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Mol Med.**, v. 14, p. 222–231, 2008.

TROSTEL, J.; GARCIA, G. E. Endogenous Inhibitors of Kidney Inflammation. **J Nephrol Res.**, v. 1(2), p.61-68, 2015.

VAIDYA, V. S. et al. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 290, p. F517–F529, 2006.

VAIDYA, V. S., FERGUSON, M. A., BONVENTRE, J. V. Biomarkers of acute kidney injury. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 48, p. 463–493, 2008.

VAN TIMMEREN, M. M. et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. **J Pathol.**, v. 212(2), p. 209-17, 2007.

VESTRA, M. D. et al. Acute-phase markers markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v.16, p. S78–S82, 2005.

WADA, J.; MAKINO, H. Historical chronology of basic and clinical research in diabetic nephropathy and contributions of Japanese scientists. **Clin Exp Nephrol.**, v. 13, p. 405–414, 2009.

WAIKAR, S. S. et al. Relationship of proximal tubular injury to chronic kidney disease as assessed by urinary kidney injury molecule-1 in five cohort studies. **Nephrol Dial Transplant.**, v. 31, p.1460-1470, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.** Geneva, Switzerland, 2009.

YAMAGISHI, S; MATSUI, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 3(2), p 101-108, 2010.

ZOZULINSKA, D.; WIERUSZ-WYSOCKA, B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 74, p. 12-16, 2006.