



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

**INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA NEFROPATIA
DIABÉTICA: AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUBULARES E
DO IMPACTO DA CORREÇÃO PELA CREATININA URINÁRIA**

TESE DE DOUTORADO

José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS, Brasil
2014

**INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA NEFROPATIA
DIABÉTICA: AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUBULARES E
DO IMPACTO DA CORREÇÃO PELA CREATININA URINÁRIA**

por

José Antonio Mainardi de Carvalho

Tese de apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau
de

DOUTOR EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
COORIENTADOR: Prof. Dr. Fábio Vasconcellos Comim

Santa Maria, RS, Brasil
2014

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA NEFROPATIA
DIABÉTICA: AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUBULARES E
DO IMPACTO DA CORREÇÃO PELA CREATININA URINÁRIA**

elaborada por
José Antonio Mainardi de Carvalho

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

**Fábio Vasconcellos Comim, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)**

Angela Regina Maciel Weinmann, Dr^a. (UFSM)

Edson Luiz da Silva, Dr. (UFSC)

Maristela de Oliveira Beck, Dr^a. (UFSM)

Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 31 de outubro de 2014.

Dedico este trabalho:

*A meu filho, futuro que alimenta o presente
A meu Pai, passado que fortalece o agora.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo milagre da vida e por todas as coisas perceptíveis e imperceptíveis de minha vida, por nos fazer entender que a sabedoria do mais sábio não passa de um grão de areia, perdido no universo.

A Universidade Federal de Santa Maria, por me acolher desde o ensino médio e me fazer o profissional que sou hoje.

Ao Professor Doutor Rafael Noal Moresco, agradeço por todas as oportunidades, pela confiança, pela dedicação, pela amizade, pelo carinho, pela franqueza, pela disposição, pela paciência, pela palavra amiga, por ser muito mais que um orientador, por ser um amigo sempre presente.

A Professora Doutora Marta Duarte, pelo apoio nesse e tantos outros projetos, pela presença em tantos momentos da minha vida profissional, acadêmica e imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Fábio Comim e a Professora Doutora Melissa O. Preamor pelo apoio, dedicação, carinho e amizade.

Ao meu Chefe Farmacêutico Bioquímico Elheu Oliveira e a equipe da recepção, coleta, bioquímica e a equipe da tarde do LAC pelo apoio constante e dedicação.

A Doutora Sílvia Londero por nos apoiar neste projeto, pelo apoio no recrutamento dos pacientes, pelo compromisso e dedicação com toda a nossa equipe.

Aos meus colegas de Labclin muitas poderiam ser as palavras para agradecer, mesmo assim ainda seriam poucas, os momentos na luta do dia a dia certamente ficarão eternizados na minha memória, assim como as palavras de apoio e de carinho.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Clóvis e Miguel pela palavra amiga e por darem sentido a palavra companheirismo.

Aos meus Pais, Ledi e José, pela educação, carinho e amor, indispensáveis para chegar neste momento da minha vida e por me ensinarem a nunca desistir.

A minha esposa, Joscelaine, por estar ao meu lado, me ouvir, me apoiar nos momentos difíceis e compartilhar comigo as vitórias. Por me aguentar num Mestrado e num Doutorado recheado com uma construção.

Ao meu filho, Augusto, a obra mais importante da minha vida, obrigado pela paciência, pela compreensão e agora finalmente vamos jogar bola, montar quebra cabeça e jogar vídeo game.

A todos que em algum momento contribuirão comigo nesta minha jornada, por menor que tenha sido, certamente me ajudou a chegar até aqui, meu sincero MUITO OBRIGADO!

***“Poucos são chamados para fazer o extraordinário, mas todos
somos chamados a fazer extraordinariamente o ordinário”***

Pe. José Kentenich

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DA NEFROPATIA DIABÉTICA: AVALIAÇÃO DE MARCADORES TUBULARES E DO IMPACTO DA CORREÇÃO PELA CREATININA URINÁRIA

AUTOR: JOSÉ ANTONIO MAINARDI DE CARVALHO
ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
COORIENTADOR: PROF^a. DR. FABIO VASCONCELLOS COMIN

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 31 de outubro de 2014.

A nefropatia diabética (ND) é uma desordem multifatorial, caracterizada pelo aumento da presença da albumina na urina. A albumina urinária (uALb) é um marcador de dano glomerular mais utilizado para o diagnóstico da ND, no entanto, existem relatos na literatura que demonstraram que pacientes já apresentam sinais histológicos de ND mas com a uALb dentro da faixa de normalidade. Tem sido demonstrado uma grande capacidade dos marcadores de dano tubular em diagnosticar a ND em estágios anteriores ao aparecimento da uALb. Os marcadores urinários na maioria são corrigidos pela creatinina urinária (uCr), para compensar as taxas de excreção diária, apesar de não haver padronização a respeito. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade diagnóstica dos marcadores de dano tubular NAG (N- β -acetil-glucosaminidase), GGT (Gama-glutamiltransferase), NAP (*Protein nonalbumin*), KIM-1 (*Kidney molecule injury 1*) e NGAL (*Neutrophil gelatinase associated lipocalin*) em relação à ND e verificar a influência da correção pela uCr nas características diagnósticas dos mesmos em pacientes com DM tipo 2. Foram mensurados indicadores do controle glicêmico, perfil lipídico e hepático, marcadores urinários de dano glomerular e tubular nos pacientes com DM do tipo 2 estratificados em dois grupos, com e sem ND. Observou-se que os marcadores tubulares avaliados foram significativamente mais elevados nos pacientes com DM tipo 2 com ND em relação ao grupo sem ND, tanto para os marcadores expressos em valores absolutos ou na forma de razão com a uCr. Quando foram analisadas as áreas sob a curva (AUROC) obtidas, verificamos que todos os marcadores, com exceção de GGT expressa em valores absolutos, tiveram a capacidade de identificar a ND. NGAL e KIM-1, quando expressos em valores absolutos tiveram a melhor capacidade diagnóstica (AUROC > 0,9, sensibilidade e especificidade > 90%). NAG, GGT e NAP quando expressos na razão tiveram a melhor capacidade de diagnóstico, com AUROC igual a 0,683, 0,783 e 0,850, respectivamente. Estratificando os pacientes em grupos de acordo com a excreção urinária de albumina (EUA), verificamos que a NGAL e o KIM-1 já apresentaram níveis aumentados no intervalo EUA 10 - 30 mg/g cr. Além disso, a GGT demonstrou estar associada com a hiperfiltração glomerular em indivíduos DM tipo 2 sem nefropatia. NGAL e KIM-1 foram os marcadores tubulares urinários que demonstraram as melhores características diagnósticas, além de ser marcadores precoces da ND em pacientes DM tipo 2.

Palavras chave: marcadores tubulares, capacidade diagnóstica, nefropatia diabética e creatinina urinária.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program
Federal University of Santa Maria

LABORATORY INVESTIGATION OF DIABETIC NEPHROPATHY: EVALUATION OF TUBULAR MARKERS AND THE IMPACT OF ADJUSTMENT FOR URINARY CREATININE

AUTHOR: JOSÉ ANTONIO MAINARDI DE CARVALHO
ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO
CO-ADVISOR: PROF. DR. FABIO VASCONCELLOS COMIM

Place and Date: Santa Maria, October 31, 2014.

Diabetic nephropathy (DN) is a multifactorial pathology, characterized by the increased presence of albumin in urine. Currently, urinary albumin (uAlb) is a marker for glomerular damage mostly used for the diagnosis of DN; however, some reports in the literature showed that patients might exhibit histological signs of DN and normal uAlb. Markers of tubular damage have shown great ability to diagnose DN prior to onset of uAlb stages. Urinary markers can be adjusted by urinary creatinine (uCr), to compensate for the daily excretion rates; nevertheless, these standards are not fully established. Thus, the aim of this study was to evaluate the diagnostic ability of the markers of tubular damage NAG, GGT, NAP, KIM-1 and NGAL and the influence of the correction for uCr in DN. Glycemic control, lipid and hepatic enzyme profile as well urinary markers of glomerular and tubular damage were assessed in type 2 DM patients stratified into two groups regarding the existence of DN. The tubular markers evaluated in this study were higher in type 2 DM patients with DN compared to type 2 diabetes without DN for both markers expressed in absolute values or as a ratio to the uCr. When analyzing the areas under the curve (AUROC) obtained, we find that all markers, except for GGT expressed in absolute values, have the ability to identify the ND. NGAL and KIM-1, when expressed in absolute values had better diagnostic ability (AUROC > 0.9, sensitivity and specificity > 90%). NAG, GGT and NAP were when expressed in ratio had the best diagnostic capability, with AUROC equal to 0.683, 0.783 and 0.850, respectively. Stratifying patients into groups according to urinary albumin excretion (UEA), we found that NGAL and KIM-1 already showed increased levels in UEA range 10 - 30 mg/g cr. In addition to being, GGT showed an association with glomerular hyperfiltration Individuals in type 2 DM without nephropathy. Urinary tubular markers used in the study have potential value in diagnosis, especially NGAL and KIM-1 that showed the best diagnostic features, and are early markers of DN type 2 DM patients.

Keywords: tubular markers, diagnostic capacity, diabetic nephropathy and urinary creatinine.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Definição das anormalidades na EUA.....	18
---	----

ARTIGO CIENTIFICO I

Table 1. Baseline characteristics and biochemical variables of study participants.....	37
--	----

MANUSCRITO CIENTIFICO I

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of study participants	58
--	----

Table 2. ROC curves analysis of urinary biomarkers for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy (T2DN).....	59
---	----

Table 3. Logistic regression analyses for the association of urinary biomarkers and diabetic nephropathy.....	60
---	----

ARTIGO CIENTIFICO II

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of the study patients.....	67
---	----

ANEXO II

Tabela 2 – Comparação entre as AUROCs dos marcadores com melhor desempenho na detecção da ND expressos em valores absolutos (uNGAL e uKIM-1) e na forma de <i>ratio</i> (uNAG, uGGT e NAP).....	89
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1. Rastreamento e diagnóstico da ND. * Resultado inicial deve ser confirmada no prazo de 3 a 6 meses e 2 do 3 testes devem cair na mesma categoria para a classificação; # repetir anualmente; † TFG expresso em mililitros por minuto por 1,73 m²; ‡ considerar outras etiologias da DRC.....20

Figura 2. Vias envolvidas no desenvolvimento da ND. IL-1: Interleucina-1, IL-6: Interleucina-6, IL-18: Interleucina-18, TGF-β: Fator de crescimento β, TNF-α: Fator de necrose tumoral α, VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.....21

Figura 3. Albumina urinária. Lesão glomerular e a perda da capacidade de filtração seletiva.....24

Figura 4. Enzimas urinárias, GGT: γ-glutamil transferase e NAG: N-acetil-β-D-glucosaminidase, presentes no epitélio celular e liberadas na urina após a lesão tubular.....27

Figura 5. NGAL. Figura 5. NGAL. Esquema representativo do processo de secreção e reabsorção do NGAL.....28

Figura 6. KIM-1. Figura 6. KIM-1. Esquema representativo do processo de lesão da célula tubular renal e liberação da KIM-1 no espaço extracelular e na urina.....29

ARTIGO I

Figure 1. ROC curves of absolute uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio in the assessment of incipient DKD. Areas under the curve for uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio were 0.954 (95% CI, 0.912–0.996, $P < 0.001$) and 0.787 (95% CI, 0.677–0.897, $P < 0.001$), respectively. The difference between areas was 0.167 (Z statistic = 3.121, $P = 0.0018$).....38

MANUSCRITO CIENTIFICO I

Figure 1. Levels of urinary biomarkers (uNAG [A], uGGT [B], NAP [C], uNGAL [D] and uKIM-1 [E]) in the study patients, not corrected by uCr. ^a $P < 0.05$, T2DN compared with T2DM; ^b $P < 0.001$, T2DN compared with T2DM and ^c $P < 0.0001$, T2DN compared with T2DM.....61

Figure 2. Levels of urinary biomarkers (uNAG [A], uGGT [B], NAP [C], uNGAL [D] and uKIM-1 [E]) in the study patients, corrected by uCr, ^a $P < 0.05$, T2DN compared with T2DM; ^b $P < 0.001$, T2DN compared with T2DM; ^c $P < 0.0001$, T2DN compared with T2DM.....62

Figure 3. ROC curves of biomarkers in values absolute and ratio in the assessment of diabetic nephropathy. Difference between areas under the curve for: A) uNAG and ratio uNAG was 0.0332 (Z statistic = 0.476), $P = 0.6340$; B) uGGT and ratio uGGT was 0.203 (Z statistic = 1.964), $P = 0.0495$; C) NAP and ratio NAP was 0.112 (Z statistic = 2.628), $P = 0.0086$; D) uNGAL and ratio uNGAL was 0.175 (Z statistic = 2.902), $P = 0.0037$ and E) uKIM-1 and ratio uKIM-1 was 0.125 (Z statistic = 2.524), $P = 0.0116$63

Figure 4. Levels of tubular markers, KIM-1 and NGAL, stratified at different concentrations of UAE and express in absolute and ratio values. ^a $P \leq 0.05$, UAE ≥ 30 mg/g cr vs UAE 10-30mg/g cr; ^b $P \leq 0.05$, UAE ≥ 30 mg/g cre vs UAE < 10 mg/g cr; ^c $P \leq 0.05$, UAE 10-30mg/g cr vs UAE < 10 mg/g cr.....64

ANEXO I

Figura 7. Curvas ROC dos biomarcadores com melhor desempenho diagnóstico na detecção da ND expressos em valores absolutos (NGAL e KIM-1) e na forma de ratio (NAG, GGT e NAP).....88

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: *American Diabetes Association*

AGE: Produtos finais da glicação avançada

AUROC: *areas under the ROC curve*

DKD: *Diabetic Kidney Disease*

DM: *Diabetes mellitus*

DM tipo 1: *Diabetes mellitus* tipo 1

DM tipo 2: *Diabetes mellitus* tipo 2

DRC: Doença renal crônica

DRT: Doença renal terminal

EUA: Excreção urinária de albumina;

FAL: Fosfatase alcalina

GGT: Gama-glutamilttransferase

HbA_{1c}: Hemoglobina glicada

hsPCR: *high sensitive C-reactive protein*

IL-1: Interleucina 1

IL-6: Interleucina 6

IL-18: Interleucina 18

KIM-1: *Kidney molecule injury 1*

KDIGO: *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

LDH: Lactato Desidrogenase

LFABP: *liver fatty acid-binding proteins*

NAG: N- β -acetil-glucosaminidase

NAP: *Protein nonalbumin*

NGAL: *Neutrophil gelatinase associated lipocalin*

ND: Nefropatia diabética

NKF-KDOQI: *National Kidney Foundation and Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*

PKC: Proteína C quinase

RAAS: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

ROC: Receiver operating characteristic curve

ROS: Espécies reativas do oxigênio

TFG: Taxa de filtração glomerular

TGF- β 1: Fator de crescimento β 1

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

uAlb: Albumina urinária

uCr: Creatinina urinária

uGGT: Gama-glutamilttransferase urinária

uKIM-1: *Kidney molecule injury 1* urinária

uNAG: N- β -acetil-glucosaminidase urinária

uNGAL: *Neutrophil gelatinase associated lipocalin* urinária

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

Sumário

1	Apresentação	15
2	Introdução	16
2.1	Nefropatia Diabética: definição e diagnóstico.....	18
2.2	Nefropatia Diabética: fisiopatologia.....	20
2.3	Nefropatia Diabética: lesão renal.....	22
2.4	Marcadores de dano glomerular.....	23
2.5	Marcadores de dano tubular.....	25
2.6	Marcadores glomerulares e tubulares e a correção pela creatinina urinária.....	30
2.7	Biomarcadores de doença renal e perspectivas futuras.....	31
3.	Objetivos.....	33
4.	Publicações científicas.....	34
4.1	Artigo Científico I.....	34
4.2	Manuscrito Científico I.....	39
4.3	Artigo Científico II.....	62
5.	Discussão.....	65
6.	Conclusões.....	70
7.	Referências Bibliográficas.....	72
8.	Anexos.....	84

1. APRESENTAÇÃO

As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se nos **ARTIGOS CIENTÍFICOS (I e II)** e **MANUSCRITO I**, representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos e manuscrito 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 dos artigos e manuscrito estão mencionadas nos mesmos.

2. INTRODUÇÃO

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

O desenvolvimento das complicações crônicas do DM é responsável por uma proporção significativa do aumento das taxas de mortalidade em pacientes com DM (ADA, 2009; SCHRAMM et al., 2008). A nefropatia diabética (ND) é considerada uma das principais complicações microvasculares do diabetes (FELEHGARI et al., 2011) e tornou-se a mais comum causa de doença renal terminal (DRT) nos Estados Unidos e Europa. No Rio Grande do Sul, no ano de 1996, a doença renal primária foi atribuída ao DM em 26% dos casos admitidos em programas de diálise (GROSS et al., 2000). Além disto, a ND está associada a importante aumento de mortalidade, principalmente relacionada à doença cardiovascular (VALMADRID et al. 2000; ADA, 2010). Sendo assim, a ND tem impacto considerável na sociedade no que se refere a aspectos econômicos e de saúde pública. Neste contexto, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para investigar e elucidar a patogênese da ND, bem como seu diagnóstico precoce e sua prevenção (WADA; MAKINO, 2009).

Durante décadas, o diagnóstico da ND tem sido feito a partir da determinação da microalbuminúria (uAlb) o biomarcador utilizado rotineiramente na prática clínica, uma vez que o “padrão ouro” seria a biópsia renal, não recomendada por uma série de inconvenientes (SUAREZ et al., 2013; JHA et al., 2014). A albumina urinária (uAlb) é o primeiro sinal de insuficiência renal ou de ND incipiente (REMUZZI et al., 2002; MATHENSON et al., 2010), sendo geralmente considerado o melhor preditor não invasivo para o desenvolvimento de ND (NARITA et al., 2006). Além de ser aceita como marcador diagnóstico precoce de nefropatia, a uAlb é também considerada um importante fator de risco para ocorrência de eventos cardiovasculares em pacientes diabéticos e em indivíduos não diabéticos (LAMBERS HEERSPINK et al., 2006; RUGGENENTI; REMUZZI, 2006; BARRAT; TOPHAM, 2007; MATHESON et al., 2010). No entanto, tem sido demonstrado que muitos pacientes considerados normoalbuminúricos já apresentam alterações histopatológicas renais avançadas (WADA; MAKINO, 2009, MATHESON et al., 2010, FELEHGARI et al., 2011), indicando que a uAlb não é o marcador ideal para a detecção precoce da ND.

Assim, outros marcadores vêm sendo estudados como alternativa no diagnóstico precoce de ND. Dentre estes, os marcadores urinários indicativos de lesão tubular incluem a avaliação laboratorial de enzimas urinárias ou de proteínas de baixo peso molecular que normalmente são filtradas pelo glomérulo (MATHESON et al., 2010). Algumas das proteínas e enzimas tubulares melhores caracterizadas para a detecção da lesão tubular proximal são: α_1 e β_2 -microglobulina, cistatina C, proteína ligadora do retinol, *neutrophil gelatinase associated lipocalin* (NGAL), *kidney molecule injury-1* (KIM-1), α -glutathion-S-transferase, Gama-glutamyltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FAL), lactato desidrogenase (LDH) e N- β -acetil-glucosaminidase (NAG) (HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; BAGASHAW et al., 2007). Estes biomarcadores são considerados sensíveis e podem aumentar sua concentração, mesmo antes do aumento da excreção urinária de albumina de uAlb na fase inicial do DM. Dessa forma, fornecem informações significativas sobre a fisiopatologia da doença, além de permitir a abordagem clínica mais precoce para o diagnóstico da ND. Além disto, a perda urinária de outras proteínas exceto a albumina (*proteín nonalbumin* [NAP]) também pode indicar dano tubular em vez de dano glomerular (SAKATSUME et al., 2007).

Os biomarcadores urinários de lesão renal são normalmente normalizados pela correção com a creatinina urinária (uCr), com o objetivo de compensar as alterações na concentração na urina (WAIKAR et al., 2010), reduzindo assim a variação do biomarcador (HELMERSSON-KARLQVIST et al., 2013). No entanto, ainda não está claro se a normalização dos biomarcadores urinários através da creatinina é útil para o diagnóstico de algumas doenças renais (DELANAYE et al., 2011). Em particular, não se sabe se a normalização de biomarcadores urinários tubulares pela creatinina pode alterar sua capacidade diagnóstica na investigação da ND.

Sendo assim, considerando o crescente número de indivíduos com DM tipo 2 e a grande proporção destes que podem desenvolver a ND (20-30%), torna-se importante o diagnóstico precoce desta desordem. Neste contexto, a avaliação de novos biomarcadores, bem como de suas características diagnósticas é de extrema relevância.

2.1 Nefropatia Diabética: definição e diagnóstico

A ND, uma das principais complicações microvasculares do DM, (FELEHGARI et al., 2011) é definida como um aumento na taxa de excreção urinária de albumina (EUA), redução da função renal, com alterações da concentração da creatinina sérica e taxa de filtração glomerular (TFG) (GROSS et al., 2005) e tornou-se a mais comum causa de doença renal terminal (STEINKE et al., 2005).

A uAlb é o marcador mais tradicional e largamente utilizado no diagnóstico e monitoramento da ND. O aparecimento da uAlb nos indivíduos com DM é considerada a primeira manifestação clínica assintomática de dano microvascular (BIRN; CHRISTENSEN, 2006; ADA, 2008). A história natural da ND varia de acordo com o tipo de DM, com a presença ou não de uAlb. Aproximadamente 80% dos pacientes com DM tipo 1 e uAlb, se não tratados, irão progredir para nefropatia franca, enquanto apenas 20-40% dos indivíduos com DM tipo 2, ao longo de um período de 15 anos, terão a mesma progressão (KOVÁCS, 2009). NIELSEN et al. (1997) demonstraram há mais de uma década, que um indicador claro de progressão da doença é o aumento da pressão arterial sistólica, mesmo dentro da faixa considerada pré-hipertensão. Entre os pacientes que têm DM tipo 1 com nefropatia e hipertensão, 50% progredirão para a doença renal em estágio final dentro de uma década (RAILE et al., 2007).

Conforme as diretrizes de 2014 da *American Diabetes Association* (ADA), a triagem dos pacientes diabéticos para detecção da ND deve ser realizada através de teste anual que avalia a EUA (valores preconizados encontram-se na tabela 1) em pacientes com DM tipo 1, com duração maior que 5 anos, e em todos os pacientes com DM tipo 2 a partir do diagnóstico.

Tabela 1. Definição das anormalidades na EUA

Categoria	Urina amostra (mg/g creatinina)
Normoalbuminúria	< 30
Microalbuminúria	30 – 299
Macroalbuminúria	≥ 300

Fonte: NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013.

O primeiro passo para a triagem diagnóstica da ND é a medida da albumina em amostra de urina, coletada como a primeira urina da manhã ou

aleatoriamente. Devido à variabilidade da EUA, duas a três amostras devem ser coletadas durante um período de 3 a 6 meses, para confirmar o aumento da EUA (ADA, 2014). Além da EUA, a creatinina sérica deve ser mensurada uma vez por ano em todos os adultos com DM, para estimar a TFG. As diretrizes mais recentes do *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013) recomendam reportar a TFG, uma vez que é útil no estabelecimento do diagnóstico de doença renal crônica (DRC) independentemente do diagnóstico de ND (GOSMANOV et al, 2014).

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

Como a ND é de natureza progressiva e a maioria dos pacientes com ND desenvolve albuminúria progressiva, seguida por redução na TFG, é incomum observar um paciente nefropata apresentar TFG reduzida e concentrações normais de uAlb (GOSMANOV et al, 2014). Para entender melhor este conceito, a *National Kidney Foundation and Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-KDOQI) desenvolveu uma nova grade de combinações de diferentes concentrações de uAlb e TFG para ajudar a estabelecer o diagnóstico da ND¹ (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013), conforme demonstrado na figura 1.

¹ **Nota:** A partir de 2007 a NKF KDOQI passaram a adotar oficialmente o termo Doença renal diabética (*Diabetic Kidney Disease: DKD*) como nomenclatura substituta ao termo Nefropatia Diabética, no entanto não existe ainda consenso a respeito da nomenclatura, assim os presentes termos podem ser utilizados como sinônimos (KDOQI, 2007).

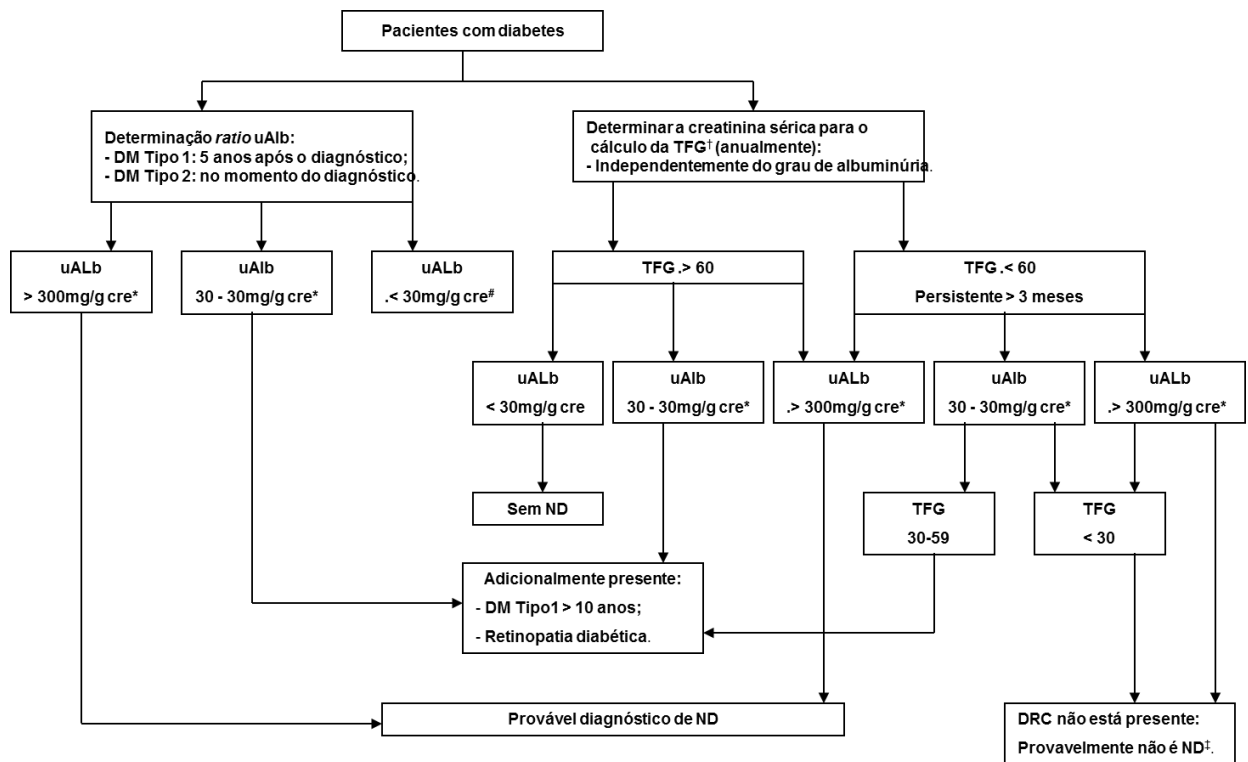


Figura 1. Rastreamento e diagnóstico da ND. * Resultado inicial deve ser confirmado durante um período de 3 a 6 meses, e 2 dos 3 testes devem se encaixar na mesma categoria para a classificação; # repetir anualmente; † TFG expresso em mililitros por minuto por 1,73 m²; ‡ considerar outras etiologias da DRC.

Fonte: Reproduzido de GOSMANOV et al, 2014.

2.2 Nefropatia Diabética: Fisiopatologia

Vários mecanismos contribuem para o desenvolvimento da ND, incluindo a interação da hiperglicemia com fatores metabólicos, alterações hemodinâmicas e predisposição genética (ZIYADEH, 2004). Os fatores hemodinâmicos e ativação de vários sistemas vasoativos, como o sistema renina-angiotensina-aldosterona, bem como a resposta à secreção de citocinas, como fator de crescimento β 1 (TGF- β 1), levam a ocorrência de mais alterações hemodinâmicas, resultando em aumento da pressão arterial sistêmica e da pressão intraglomerular. O comprometimento das vias metabólicas, entre outras características, leva à glicação não enzimática, ao aumento da atividade da proteína C quinase (PKC), e ao metabolismo anormal da via dos polióis. Além disto, tem sido descrito uma associação entre o aumento da secreção de moléculas inflamatórias (como citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases) e o desenvolvimento da ND (ICHINOSE et al., 2007, NAVARRO-GONCALEZ; MORA FERNANDEZ, 2008, ELMARAKBY; SULLIVAN, 2012). O

estresse oxidativo também parece desempenhar um papel central no desenvolvimento desta complicação (SINGH et al., 2008). Estudos que utilizaram inibidores das vias envolvidas no desenvolvimento da ND têm ajudado a esclarecer a patogênese desta condição. Porém, os mesmos não levaram à expansão da terapêutica para controlar o desenvolvimento da doença (RAPTIS; VIBERTI, 2001). Nos últimos 20 anos, três vias principais para o desenvolvimento da ND foram identificadas, conforme apresentado na figura 2.

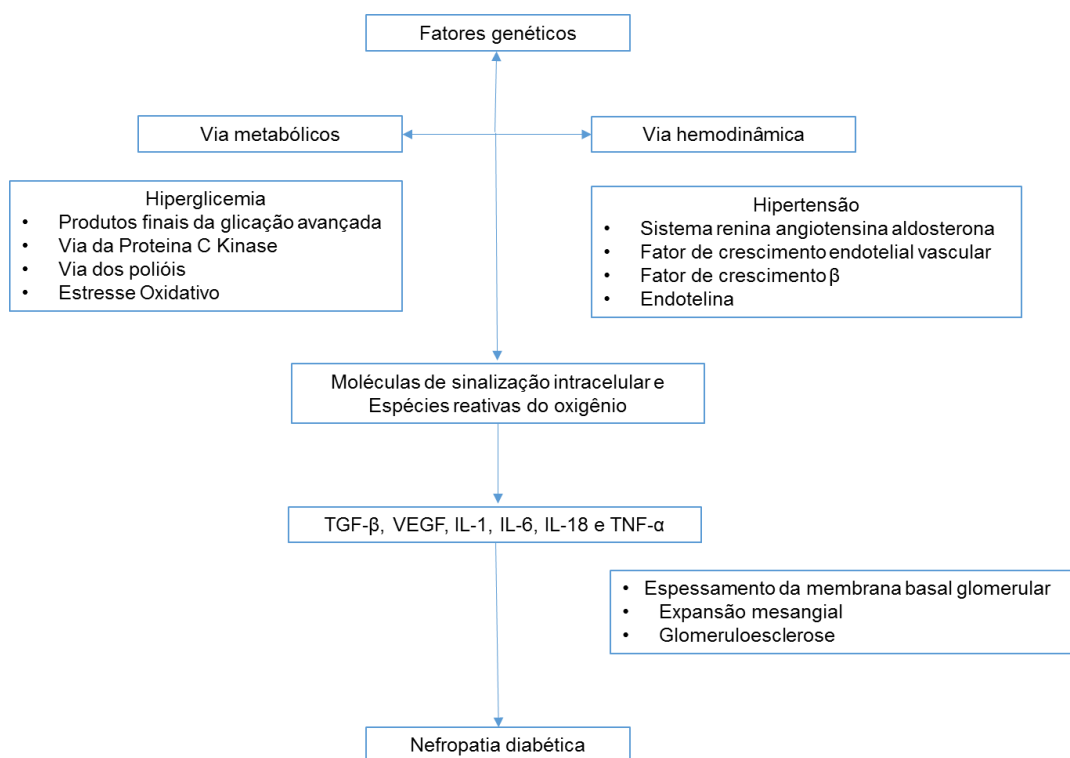


Figura 2. Vias envolvidas no desenvolvimento da ND. IL-1: Interleucina-1, IL-6: Interleucina-6, IL-18: Interleucina-18, TGF-β: Fator de crescimento β, TNF-α: Fator de necrose tumoral α, VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: Adaptado de Vinod , 2012.

Entre os mecanismos que levam ao desenvolvimento da ND destaca-se a hiperfiltração glomerular, uma alteração hemodinâmica renal inicial em indivíduos com DM, que pode ajudar a prever o risco para o desenvolvimento posterior de ND (MARTHY-HARTERT et al., 2002). A patogênese da hiperfiltração é complexa e envolve o *feedback* tubuloglomerular, assim como as alterações hemodinâmicas. As alterações hemodinâmicas renais associadas com a hiperfiltração incluem vasodilatação da arteríola aferente e constrição da arteríola eferente (CHERNEY et al., 2012). No entanto, a hiperfiltração é só parcialmente corrigida nos pacientes

diabéticos após a inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2 ou do bloqueio do sistema renina-angiotensina (SOCHETT et al., 2006; CHERNEY et al., 2008). A hiperfiltração glomerular é geralmente promovida pela hiperglicemia. Em pacientes que fazem uso de insulina observa-se que, à medida que a glicose sofre redução nas suas concentrações plasmáticas, a taxa de filtração recua para níveis próximos do normal (WISEMAN et al., 1984, BULUM et al., 2013). A hiperfiltração tem sido sugerida como um fator de risco para o desenvolvimento da albuminúria e progressiva nefropatia (MORGENSEN, 1994; CARAMORI et al., 1999). Uma meta-análise de dez estudos de coorte, com 780 pacientes normoalbuminúricos mostrou que a progressão para micro e macroalbuminúria foi significativamente maior em pacientes que apresentavam hiperfiltração glomerular no início do estudo (MAGEE et al., 2009).

2.3 Nefropatia Diabética: Lesão Renal

O desenvolvimento da ND é multifatorial, sendo que um conjunto de mecanismos leva ao desenvolvimento da lesão renal e à consequente perda de proteína na urina, bem como redução gradativa da função renal. A lesão renal se caracteriza tanto na ND, como em outras doenças renais, por estar presente em diferentes sítios do néfron, principalmente no glomérulo e nos túbulos renais (MATHESON et al., 2010; MORESCO et al., 2013).

O dano glomerular é caracterizado por alterações na permeabilidade e na estrutura glomerular. A parede glomerular possui três camadas: células endoteliais, membrana basal e células epiteliais. Na ND a barreira de permeabilidade é danificada, resultando em perda de proteínas na urina, (VARGHESE et al., 2007) tais como proteínas plasmáticas, como a albumina e a transferrina, que normalmente não são filtradas livremente através do glomérulo (MATHESON et al., 2010). As mudanças estruturais na doença renal diabética incluem o acúmulo de matriz mesangial e o espessamento da membrana basal glomerular (NAJAFIAN et al., 2009). Além disto, pode ocorrer hipertrofia tubular renal, associada a alterações da membrana basal no tubulointerstício, como a fibrose tubulointersticial (SHARMA et al., 1996).

O desenvolvimento da albuminúria na ND é bem conhecido. Foi sugerido que o declínio da função renal correlaciona-se melhor com o grau de lesão tubular e fibrose túbulo-intersticial (WHITE; BILOUS, 2000). Além disso, os resultados de estudos recentes têm um interesse renovado no papel da reabsorção proximal tubular da

albumina oriunda da filtração glomerular, o que sugere que a filtração da albumina sob condições fisiológicas é maior do que o determinado anteriormente e que danos na célula do túbulo proximal, por si só, podem provocar o desenvolvimento de albuminúria (DICKSON et al., 2014). O túbulo proximal pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da albuminúria, maior do que se pensava anteriormente. Portanto, alguns marcadores de dano tubular podem ser mais sensíveis durante a fase microalbuminúrica (primeiro estágio da ND), independente de defeitos na permeabilidade glomerular (RUSSO et al., 2009).

2.4 Marcadores de dano glomerular

Dano glomerular geralmente resulta em proteinúria glomerular, devido ao aumento da permeabilidade, tanto para proteínas plasmáticas, que normalmente não são filtradas livremente através do glomérulo (albumina e transferrina) quanto pelo aumento da excreção de proteínas da matriz extracelular (BRAHIMI et al., 2007; SHIVANANDA NAYAK et al., 2008). O colágeno tipo IV e a fibronectina são moléculas proteicas de alto peso molecular que normalmente não são filtradas através do glomérulo. No entanto, ambas são componentes da matriz mesangial glomerular e membrana basal, e dessa forma, a excreção destas proteínas na urina pode refletir a relação síntese/degradação em pacientes com lesão renal (BANU et al., 1995; KADO et al., 1996; IJIMA et al., 1998).

2.4.1 Albumina

A albumina (peso molecular de 65 KDa) é a proteína mais abundante no plasma. É uma molécula aniônica, sintetizada no fígado (RUGGENENTI; REMUZZI, 2006). A filtração da albumina é seguida por sua reabsorção tubular e, assim, a albuminúria resultante reflete a contribuição desses dois processos. A disfunção de ambos os processos pode resultar em aumento da EUA, sendo que a lesão glomerular e tubular tem sido implicada nos eventos iniciais que conduzem à proteinúria (excreção urinária de proteínas acima de 0,5 g/24h) (de JONG; GANSEVOORT, 2010). Assim, o aumento na EUA é uma das primeiras manifestações clínicas assintomáticas de dano microvascular no DM (ADA, 2008) e tem sido usada para classificar os diferentes estágios de ND. No entanto, embora a mensuração da albuminúria seja considerada

o padrão-ouro para a detecção precoce da ND (BRUNO et al., 2007) e reconhecida como fator de risco cardiovascular e renal em indivíduos diabéticos e não diabéticos (TAKIZAWA et al., 1998; ZEISBERG et al., 2001), limitações na sua utilização devem ser levadas em consideração .

Neste contexto, o significado prognóstico da albumina urinária tem sido questionado (KADO et a,1996; BANU et al., 1996). Evidências sugerem que o risco de desenvolver ND (ARAKI et al., 2010; MORITA et al., 2011; COHEN-BUCAY; VISWANATHAN, 2012) e doença cardiovascular (MCCORMICK et al., 1990; HONG; CHIA, 1998) começa quando os valores da EUA ainda estão dentro da faixa normoalbuminúrica. Sendo assim, possivelmente, valores de EUA inferiores aos atualmente utilizados para o diagnóstico da ND devem ser estabelecidos (O'DONNELL et al., 1991; DRONAVALLI et al., 2008), uma vez que mesmo indivíduos que apresentam EUA na faixa "normal" podem ter riscos significativos de nefropatia e eventos cardiovasculares (O'DONNELL et al., 1991).

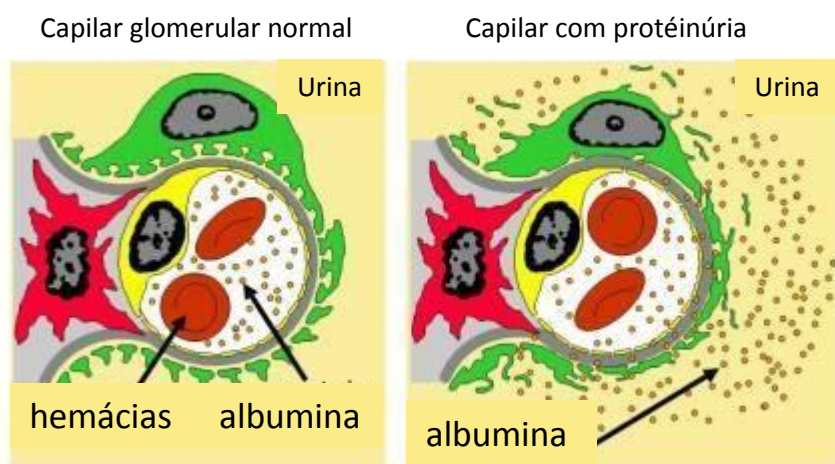


Figura 3. Albumina urinária. Lesão glomerular e a perda da capacidade de filtração seletiva. Fonte: Adaptado de SILBERNAGL; LANG, 2010.

Além disto, estudos têm descrito que alguns pacientes podem desenvolver ND mesmo na ausência de uAlb (KAZUMI et al., 1999; WORTHLEY et al., 2001; NARITA et al., 2004), uma vez que mudanças estruturais na membrana basal glomerular podem aparecer anteriormente às mudanças na EUA, sugerindo que este marcador pode ser detectado somente após danos significativos nos glomérulos (TELCl et al., 2000; NAJAFIAN et al., 2009; HELLEMONS et al., 2012).

2.4.2 Transferrina

É uma proteína com peso molecular muito semelhante à albumina (76,5 kDa). No entanto, devido ao maior ponto isoelétrico que a albumina, é menos aniônica e mais rapidamente filtrada na cápsula de Bowman. Portanto, a transferrina é excretada antes e/ou numa proporção maior do que a albumina (MCCORMICK et al., 1990). Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que o aumento da excreção de transferrina urinária pode preceder as mudanças na EUA (O'DONNELL et al., 1991; KAZUMI et al., 1999; WORTHLEY et al., 2001). Estudos de acompanhamento mostraram que o aumento da excreção da transferrina foi capaz de prever o aparecimento da uAlb em pacientes normoalbuminúricos, tanto com DM tipo 1 como com DM tipo 2 (NARITA et al., 2004; NARITA et al., 2006). Esses estudos fornecem evidências de que a transferrina urinária pode ser um indicador mais sensível de lesão glomerular e ND do que a uAlb (MEMISOGULLARI; BAKAN, 2004; TELCI et al., 2000; NARITA et al., 2004; NARITA et al., 2006).

Além disto, em uma recente revisão, Hellemons et al. (2012) avaliaram a validade de alguns biomarcadores para prever o início ou a progressão da nefropatia em pacientes com DM tipo 2. Foi demonstrado que a transferrina urinária é preditiva para o aparecimento da nefropatia (HOSOJIMA et al., 1989). Uma vez que a transferrina é uma molécula antioxidante extracelular, uma diminuição dos seus níveis pode contribuir para o desequilíbrio entre antioxidantes/oxidantes, que pode estar envolvido em complicações diabéticas tais como ND (MEMISOGULLARI; BAKAN, 2004). Neste contexto, a transferrina parece ser ferramenta útil na avaliação da lesão glomerular, uma vez que sua excreção pode estar associada a fase inicial da ND.

2.5 Marcadores de dano tubular

As enzimas e proteínas presentes no ultrafiltrado têm geralmente peso molecular inferior a 70 kDa, sendo completamente reabsorvidas pelas células epiteliais tubulares. Sendo assim, enzimas que têm peso molecular superior a 70 kDa são oriundas de danos nos túbulos renais e a sua concentração esta associada com o grau de dano. Além disto, as concentrações urinárias destas enzimas/proteínas não são influenciados pelos seus valores plasmáticos (FLANDROIS et al., 1986). Portanto, a excreção urinária de proteínas plasmáticas pelas células tubulares tem

sua origem na reabsorção deficiente, ou no aumento da secreção de enzimas pelas células epiteliais tubulares, os quais levam à proteinúria (FLYNN, 1990; HONG; CHIA, 1998; BARRAT; TOPHAM, 2007). Algumas das enzimas e proteínas associadas com ao dano tubular são: α 1 e β 2-microglobulina, proteína ligadora do retinol 4, NAG, FAL, GGT, NGAL e KIM-1 (MORESCO et al., 2013).

2.5.1. N-acetil- β -D-glucosaminidase

A NAG é uma enzima lisossômica encontrada na borda em escova nas células do túbulo proximal (Figura 4). Devido ao seu peso molecular relativamente alto (> 130 kDa), a NAG plasmática não é filtrada através do glomérulo e, desta forma, a NAG é liberada na urina após lesão tubular (BAZZI et al., 2002; LIANGOS et al., 2007). O aumento da excreção urinária de NAG (uNAG) foi extensivamente estudado em adultos e em crianças e demonstrou ser um indicador sensível, persistente e robusto de lesão do túbulo proximal (VAIDYA et al., 2008), sendo que a elevação de sua concentração na urina tem sido associada ao dano tubular proximal decorrente de diversas causas (BERNARD et al., 1987; WATTS, 1988; GUDER, 1992; PRICE, 1992; HONG; CHIA, 1998).

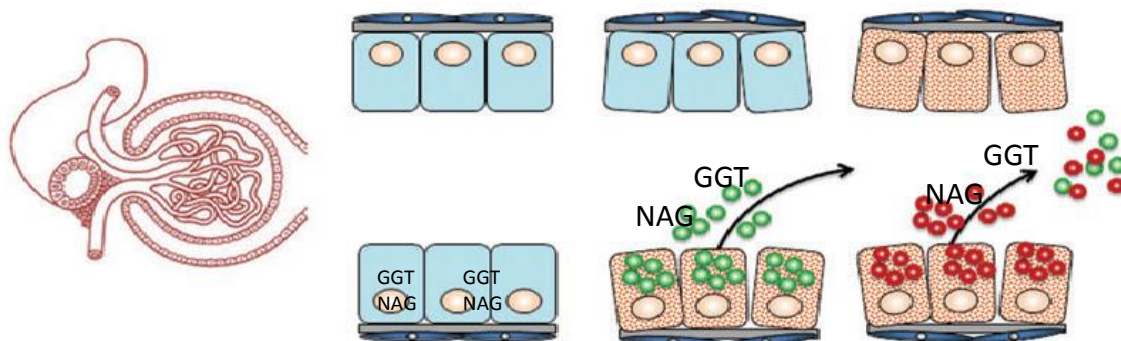


Figura 4. Enzimas urinárias, GGT: Gama-glutamilttransferase e NAG: N-acetil- β -D-glucosaminidase, presentes no epitélio celular e liberadas na urina após a lesão tubular

Fonte: Adaptado de CHARLTON et al., 2014.

Estudos têm demonstrado que a uNAG desempenha papel importante no diagnóstico precoce e monitoramento da doença renal no DM, mesmo antes do início da uAlb. Neste contexto, a excreção aumentada de uNAG foi observada mesmo em pacientes diabéticos com albuminúria normal (CHEUNG et al., 1990; LAPSLEY et al., 1993; USLU et al., 2005; PIWOWAR et al., 2006; KALANSOORIYA et al., 2007). Além disto, os níveis de uNAG aumentam com a hiperglicemia (MOCAN et al., 1994; HSIAO

et al., 1996; KORDONOURI et al., 1998) e podem diminuir após controle glicêmico adequado (YAMANOUCI et al., 1998; BASTURK et al., 2006).

2.5.2. Gama-glutamilttransferase

A GGT é uma enzima com peso molecular de aproximadamente 90 kDa, porém algumas isoenzimas podem ter peso molecular de até 200 kDa (KAPLAN et al., 2003). Ela está presente (em ordem crescente de abundância) no túbulo proximal do rim, no fígado, no pâncreas e no intestino (KAPLAN et al., 2003; ZHANG et al., 1997). A GGT é um indicador específico e sensível de dano celular (PANCHENKO et al., 1994; BASTURK et al., 2006) e o aumento da excreção urinária desta enzima reflete o dano da membrana da borda em escova e a perda das microvilosidades (LISOWSKA-MYJAK et al., 2010) (Figura 4). Além disto, esta enzima tem sido descrita em alguns estudos prospectivos como marcador sensível de lesão tubular proximal, além de ser altamente específica para o diagnóstico da ND (IKENAGA et al., 1993; KWON et al., 2003; WESTHUYZEN et al., 2003; DE CARVALHO et al., 2011). A excreção da GGT também foi associada com as concentrações de glicose e hemoglobina glicada (HbA_{1c}), conforme o grau de função renal (JUNG; BURCHARDT et al., 1987; IKENAGA et al., 1993). Assim, a GGT parece ser um marcador importante para a detecção precoce de ND uma vez que os seus valores urinários estão aumentados mesmo na ausência de uAlb.

2.5.3 *Neutrophil gelatinase associated lipocalin*

A NGAL é uma proteína com peso molecular de 25 kDa, produzida a partir da gelatinase de neutrófilos humanos e pertencer à família das lipocalinas. É secretada em pequenas quantidades nos pulmões, rins, traquéia, estômago e no tecido do cólon (BOLIGNANO et al., 2008; MISHRA et al., 2006). Marcadores tubulares, como a NGAL, recentemente ganharam muita atenção, pois são considerados biomarcadores sensíveis e específicos para a detecção da lesão renal. Neste contexto, a NGAL é considerada um excelente preditor de lesão renal aguda (MISHRA et al., 2006). Dentro de poucas horas após estímulos nocivos, tais como a isquemia-reperfusão (MISHRA et al., 2006), ocorre aumento da NGAL nos túbulos renais (Figura 5). Nielsen et al. (2010) demonstraram que a NGAL urinária (uNGAL) foi elevada em pacientes com DM tipo 1, com ou sem albuminúria, indicando lesão tubular em estágio inicial.

Também foi descrito que a uNGAL é superior à uAlb na predição do declínio da TFG em pacientes com DM tipo 2 micro ou macroalbuminúricos (NIELSEN et al., 2012). Fu et al. (2012) demonstraram que o dano tubular ocorre a curto prazo em pacientes com DM tipo 2, e que a uNGAL pode ser um marcador mais precoce do que a relação albumina/creatinina urinária na detecção da ND.

Além disto, a NGAL pode ser mensurada no soro e tem emergido como biomarcador sensível, específico e precoce, altamente preditivo de lesão renal aguda (RICCI & RONCO, 2009). Foi demonstrado que a determinação no soro/plasma da NGAL pode ser um marcador promissor de lesão tubular, tanto para a lesão renal aguda e crônica (MITSNEFES et al., 2007).

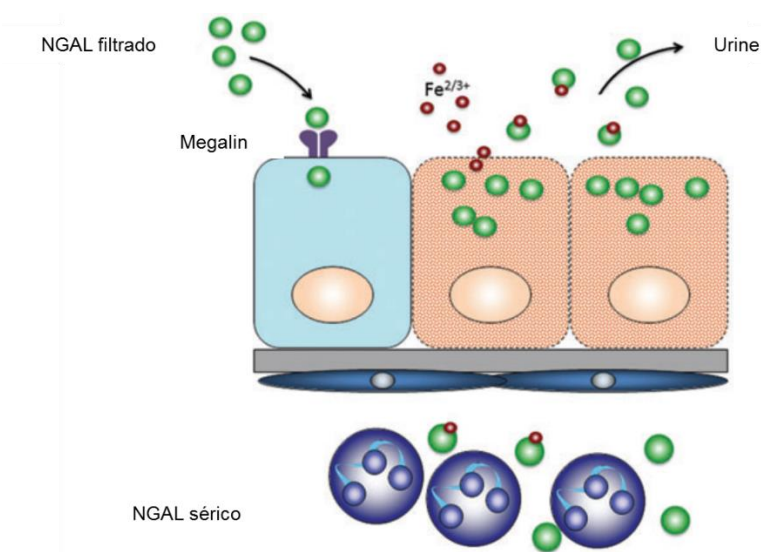


Figura 5. NGAL. Esquema representativo do processo de secreção e reabsorção do NGAL.

Fonte: Adaptado de CHARLTON et al., 2014.

2.5.4 *Kidney molecule injury -1*

A KIM-1 é uma proteína de membrana do tipo 1, expressa na membrana apical das células dos túbulos proximais. Quando clivada na membrana é liberada no lúmen dos túbulos e, finalmente, aparece na urina onde permanece estável (ICHIMURA et al., 1998; HAN; BAILLY, 2002) (Figura 6). Esta proteína não é detectada na urina de indivíduos normais, sendo considerada não só um biomarcador sensível de lesão tubular proximal (van TIMMEREN et al., 2007), mas também um biomarcador preditivo de alguns desfechos (VAIDYA et al., 2008 (A); VAIDYA et al. 2008 (B); BANGSTAD et al., 2009; VAIDYA et al., 2010). Recentemente, Vaydia et al. (2008, B) relataram que a KIM-1 foi capaz de identificar a insuficiência renal aguda em pacientes

hospitalizados. Além disto, evidências indicam que a concentração do KIM-1 na urina (uKIM-1) pode estar relacionada com a progressão ou a regressão da ND em pacientes com DM tipo 1 (NIELSEN et al., 2011). No entanto, este biomarcador só reflete o dano tubular em estágios mais avançados da doença renal. Sendo assim, outros estudos são necessários para investigar o valor diagnóstico e prognóstico deste marcador em comparação com a uAlb na ND (MORESCO et al., 2013).

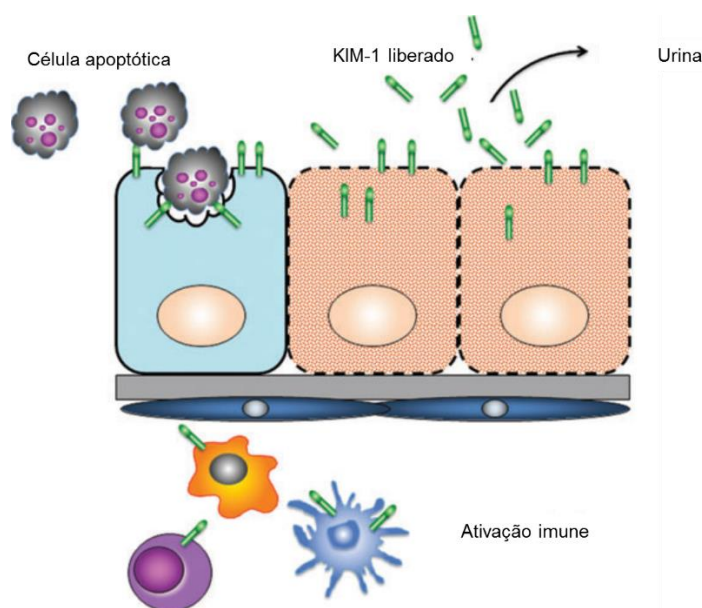


Figura 6. KIM-1. Esquema representativo do processo de lesão da célula tubular renal e liberação da KIM-1 no espaço extracelular e na urina.

Fonte: Reproduzido de CHARLTON et al., 2014.

2.5.5 Nonalbumin proteinuria

A perda urinária de proteínas na urina, exceto a albumina, é chamada de *nonalbumin proteinuria* (NAP), a qual é considerada um marcador de dano tubular e não glomerular. De fato, estudos têm associado o aumento da NAP ao dano tubular e não ao glomerular (SAKATSUME et al., 2007, KIM et al. 2014). A NAP inclui vários tipos de proteínas urinárias, algumas destas associadas à lesão renal, como: α 1 e β 2-microglobulina, IgG, cistatina C, transferrina, *nephrin*, metaloproteinase da matriz 9 e inibidor tecidual de metaloproteinases-1 (LANGHAM et al., 2002, PATARI et al., 2003, CIECIURA et al., 2005, HALIMI et al, 2007). Halimi et al (2007) verificaram em uma população de indivíduos transplantados renais que a avaliação da EUA associada a NAP pode fornecer diferentes informações a respeito do enxerto/sobrevida de pacientes submetidos a transplante renal, uma vez que são

marcadores de diferentes sítios renais (glomérulo/túbulo). O estudo desenvolvido por Kim et al. (2014), em indivíduos coreanos com DM tipo 2 demonstrou que a NAP é um biomarcador precoce de dano tubular e pode ser usado para detectar o desenvolvimento e a progressão da ND na prática clínica. Dessa forma, a NAP é um novo biomarcador urinário, relacionado ao dano tubular, e novos estudos avaliando seu potencial diagnóstico nas doenças renais, especialmente na ND, são de extrema relevância.

2.6 Marcadores glomerulares e tubulares e a correção pela creatinina urinária

Os biomarcadores urinários, tais como albumina e outros marcadores de lesão renal, são frequentemente relatados como uma relação normalizada pela uCr para controlar as variações na taxa do fluxo urinário (DYSON et al, 1992; NEWMAN et al., 2000). O pressuposto implícito é que a excreção uCr é constante inter e intra-indivíduos, de tal forma que as mudanças na relação irão refletir as mudanças na excreção do biomarcador (CHATTAWAY et al., 1969; MITCH et al., 1980). Usando simulações de computador da cinética da creatinina, verificou-se que os níveis normalizados do biomarcador de lesão tubular, pode ser influenciado por mudanças dinâmicas na taxa de excreção da uCr quando existirem alterações na taxa de filtração glomerular (WAIKAR et al., 2010). Coletas de urina cronometradas de pacientes hospitalizados com alteração da TFG e/ou doença grave demonstraram variabilidade nas taxas de excreção uCr inter e intra-indivíduos (LEVEY et al., 1989). Realizar a correção pela uCr pode resultar na subestimação ou superestimação da taxa de excreção do biomarcador dependendo do contexto clínico. Menor excreção de creatinina no cenário de lesão renal aguda ou crônica pode amplificar o sinal do biomarcador de lesão tubular, aumentando assim a sua utilidade clínica. A variabilidade da excreção da creatinina, no entanto, pode complicar a determinação do valor limite para biomarcadores normalizados de doença renal aguda ou crônica, incluindo a albumina (WAIKAR et al., 2010).

Um dos primeiros marcadores a ser relacionado com a uCr foi a uAlb, onde os valores absolutos foram comparados com a razão uAlb/uCr (PRICE et al, 2005; POLKINGHORNE, 2006). A albumina no soro normalmente não é filtrada pelo glomérulo, sendo encontrada na urina apenas quando a disfunção glomerular está presente (MERLOT et al, 2014). Assim, ajustando a uAlb pela uCr, ambos marcadores

glomerulares não são filtrados do mesmo modo tem base racional (MORGESTERN et al., 2003). Se os glomérulos estão danificados, a filtração será modificada, resultando numa menor filtração da creatinina e no aumento considerável da filtração da albumina. Essa relação pode, portanto, ser útil para avaliar a doença glomerular, os conceitos gerais utilizados para uAlb foram estendidos para a maioria dos marcadores urinários de lesão renal, sendo sistematicamente relatados utilizando a relação com a concentração da uCr (CONTI et al, 2009)

No entanto, no caso de marcadores urinários de lesão tubular, o problema é significativamente diferente. Normalmente, um marcador urinário confiável de doença tubular está fortemente relacionado à disfunção tubular, devendo ser totalmente independente de outros marcadores renais, especialmente aqueles afetados pela função glomerular e outras funções não renais fisiopatológicas (HERGET-ROSENTHAL et al, 2004; MATHESON et al., 2010). Por conseguinte, a correção do marcador urinário tubular específico pela uCr, que é função da filtração glomerular e de secreção tubular, não é apropriado. Esta correção requer que glomérulos estejam totalmente íntegros, se não for levada em conta a questão da secreção tubular, a correção poderá ter efeitos adversos, gerando valores falsos negativos assim como falsos positivos (CONTI et al., 2009).

Assim, ao se utilizar marcadores urinários específicos para o dano tubular renal, em relação a um segundo marcador urinário, o qual é fortemente dependente da função glomerular, como a creatinina, que pode ainda estar relacionada com outras condições fisiopatológicas, prejudica a relevância clínica do marcador tubular e pode levar a falsas interpretações (CONTI et al., 2009; WAIKAR et al., 2010). A correção pela uCr deve ser realizada apenas em pacientes com glomerulopatia evidente quando apenas marcadores glomerulares específicos são medidos, ou seja a uAlb. Em todos os outros casos de doenças renais, a correção utilizando a uCr pode ser inadequada e deve ser evitada (CONTI et al., 2009; HELMERSSON-KARLQVIS et al., 2013).

2.7 Biomarcadores de doença renal e perspectivas futuras

Descrito pela primeira vez em 1989, o termo biomarcador (acrônimo de marcador biológico) significa indicador mensurável de uma condição biológica específica e para um processo de doença específica. Em 2001, a definição de

biomarcador foi padronizada como sendo uma característica que pode ser mensurada e avaliada em um processo biológico normal, processo patológico, farmacológico ou resposta à intervenção terapêutica. Além disto, a *Food Drug and Administration* usa o termo biomarcador para descrever qualquer indicador diagnóstico que pode ser medido e utilizado para avaliar qualquer risco ou doença (MOORE et al., 2010). Durante a última década, uma enorme expansão na descoberta e validação de biomarcadores para o diagnóstico da doença renal tem sido observada.

O biomarcador ideal é aquele que pode prever e diagnosticar a doença renal, identificar a localização, o tipo e etiologia da lesão, prever resultados, permitir o monitoramento e proporcionar a determinação do início de intervenções terapêuticas (ENDRE et al., 2010). Os biomarcadores podem ser classificados em biomarcadores de função (filtração glomerular), biomarcadores de função tubular (reabsorção de moléculas filtradas) ou biomarcadores de lesão. Infelizmente, os biomarcadores tradicionais, incluindo proteínas ou moléculas que podem ser encontradas na urina, estão longe de satisfazer os requisitos acima (MURRAY et al., 2010). Vários obstáculos ainda devem ser transpostos antes que novos biomarcadores de lesão renal possam ser implementados na prática clínica, como os efeitos de diferentes fatores na interpretação dos resultados, incluindo sexo, idade e diferenças de pontos de corte de cada biomarcador em diferentes condições (doença renal crônica, circulação extracorpórea e sepse) (OSTERMAN et al., 2012). Tecnologias inovadoras, tais como a genômica e a proteômica, permitiram a descoberta de biomarcadores que antecedem a doença renal, incluindo o NGAL, cistatina C, KIM-1, IL-18) e *liver fatty acid-binding proteins* (L-FABP) (TSIGOU et al., 2013). Por fim, ainda não há consenso no que diz respeito à normalização dos biomarcadores pela uCr (WAIKAR et al., 2010), como é feito em pacientes com doença renal crônica. No entanto, é incorreto considerar excreção da creatinina como sendo estável, uma vez que mudanças dinâmicas na excreção de uCr podem ocorrer durante as fases aguda e de recuperação da TFG durante a doença renal (RALIB et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar as características diagnósticas dos biomarcadores tubulares urinários, NAG, GGT, NAP, NGAL e KIM-1, bem como o impacto da correção pela creatinina urinária nestes indicadores na identificação da nefropatia em pacientes com DM tipo 2.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial diagnóstico de novos biomarcadores urinários para a detecção da ND;
- Estabelecer as características diagnósticas dos biomarcadores em estudo na detecção da ND: ponto de corte, sensibilidade e especificidade;
- Investigar o impacto da correção pelos valores urinários de creatinina nas características diagnósticas dos biomarcadores urinários em estudo;
- Avaliar os níveis/atividade dos biomarcadores urinários utilizados no estudo em diferentes faixas de EUA, verificando assim o potencial na detecção precoce do dano renal nos pacientes do estudo;
- Investigar a associação entre a hiperfiltração glomerular e a atividade urinária da GGT, estabelecendo correlações entre estas variáveis. Além disso, estabelecer o potencial da GGT para a detecção da hiperfiltração glomerular em pacientes DM tipo 2;
- Determinar, entre os marcadores avaliados no estudo, aquele que apresentou melhores características diagnósticas na identificação da ND em pacientes com DM tipo 2, bem como determinar se este marcador deve ser reportado corrigido ou não pelas concentrações da creatinina urinária.

4. PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO I

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

José Antonio M. De Carvalho, Etiane Tatsch, Bruna S. Hausen, Yãnaí S. Bollick, Vanessa D. Torbitz^a, Naiara S. Guarda, Luízi P. De Campos, Thiago Duarte, Marta M. M. F. Duarte, Sílvia W. K. Londero, Fabio V. Comim, Rafael N. Moresco

DOI 10.1515/cclm-2014-0655

Aceito para publicação no periódico: ***Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.***

Letter to the Editor

José Antonio M. De Carvalho, Etiane Tatsch, Bruna S. Hausen, Yãnaí S. Bollick, Vanessa D. Torbitz, Naiara S. Guarda, Luízi P. De Campos, Thiago Duarte, Marta M.M.F. Duarte, Sílvia W.K. Londero, Fabio V. Comim and Rafael N. Moresco*

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

DOI 10.1515/cclm-2014-0655

Received June 23, 2014; accepted July 24, 2014

Keywords: creatinine; incipient diabetic kidney disease; urinary kidney injury molecule 1.

To the Editor,

Kidney molecule injury 1 (KIM-1) is a type 1 membrane protein expressed on the apical membrane of proximal

***Corresponding author: Rafael Noal Moresco**, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, 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; Laboratory of Clinical Biochemistry, Center of Health Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil; and Center of Health Sciences, Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

José Antonio M. De Carvalho: Laboratory of Clinical Biochemistry, Center of Health Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil; and University Hospital, Santa Maria-RS, Brazil

Etiane Tatsch, Bruna S. Hausen, Yãnaí S. Bollick, Vanessa D. Torbitz, Naiara S. Guarda and Luízi P. De Campos: Laboratory of Clinical Biochemistry, Center of Health Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

Thiago Duarte: Center of Health Sciences, Pharmacology Postgraduate Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

Marta M.M.F. Duarte: Department of Health Sciences, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria-RS, Brazil

Sílvia W.K. Londero: University Hospital, Santa Maria-RS, Brazil

Fabio V. Comim: Center of Health Sciences, Department of Clinical Medicine, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

tubule cells, which is undetectable in urine from healthy individuals, and is a sensitive and specific biomarker for proximal tubule injury [1]. Therefore, it may be involved in the pathophysiology of chronic kidney disease (CKD). Diabetic kidney disease (DKD) refers to CKD presumed to be caused by diabetes, detected clinically by persistent abnormal urine albumin excretion and screening for a decreased glomerular filtration rate (GFR) [2]. Incipient DKD, referring to microalbuminuria in patients with diabetes, has been defined as uAlb-to-creatinine ratio of 30–300 mg albumin per gram of creatinine [3]. Urinary albumin (uAlb) has been recognized as a useful biomarker for diagnosing DKD, however, there is some evidence of glomerular changes in normoalbuminuric individuals [4]. Therefore, urinary tubular markers have been highlighted, including KIM-1. Urinary biomarkers of kidney injury are usually reported as normalized to the ratio to urinary creatinine (uCr), in order to compensate for variations in urine concentrations [5]. However, it remains unclear whether the requirement of correction of specific urinary biomarkers to creatinine is helpful for the diagnosis of some renal disorders. In particular, it is not known whether the correction of uKIM-1 to creatinine may affect its diagnostic ability in the investigation of incipient DKD. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of uKIM-1 in the diagnosis of incipient DKD, analyzing whether the diagnostic accuracy of this biomarker may be affected by correction of uKIM-1 to uCr.

This study included 79 patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into two groups by urinary albumin concentrations: T2DM without incipient DKD (n=59) and T2DM with incipient DKD (n=20). The clinical diagnosis of incipient DKD was defined based on the detection of uAlb in a random urine sample [6].

Exclusion criteria consisted of urinary tract diseases, prior renal disease other than incipient DKD, neoplastic disorders, uncontrolled thyroid disorders, infectious and liver diseases, active or chronic persistent infection or inflammatory disorders, pregnancy, renal transplantation, and the use of nephrotoxic drugs. All eligible patients signed an informed written consent, and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the Institutional Ethics Review Board for Human Studies (number 12303113.0.0000.5346).

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 and tubes with EDTA. All patients also collected a urine sample. Plasma was used to measure the concentrations of fasting glucose, thyroid-stimulating hormone (TSH) and creatinine, while the total blood was used to assess the concentrations of glycated hemoglobin (HbA_{1c}). Urine specimens were used to measure the concentrations of creatinine, albumin and KIM-1. Measurements of glucose, urinary creatinine and uAlb were performed using standard methods on a Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. HbA_{1c} was measured using chromatographic methods in D10 automated analyzer (BioRad, CA, USA); TSH was performed by chemiluminescence in Immulite 2000® (Siemens, Los Angeles, CA, USA) and, uKIM-1 was analyzed by commercial sandwich ELISA kits (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). GFR was estimated by

the Modification of Diet in Renal Disease formula. Continuous data were summarized as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile ranges (IQR). Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with the χ^2 -test. Distribution of variables was tested by using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical differences between groups were evaluated by Student's t- or Mann-Whitney-tests. Receiver operating characteristics (ROC) curve was performed to quantify the overall ability of KIM-1 to discriminate incipient DKD in T2DM patients. The Z statistic was used to compare the areas under the ROC curve. Multiple regression analysis was employed to investigate whether BMI has an effect. Statistical significance was assumed at $p < 0.05$. Data were analyzed using MedCalc version 13.0.6.0 (Ostend, Belgium).

The baseline characteristics and biochemical variables of study participants are described in Table 1. Plasma glucose, uAlb, uKIM-1, ratio uAlb/uCr and the uKIM-1/uCr ratio were significantly higher in T2DM patients with incipient DKD. In addition, no statistically significant differences for HbA_{1c}, creatinine, GFR and uCr were observed between groups. The ROC curve was employed to quantify the overall ability of uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio to discriminate between those T2DM patients with incipient DKD and those without. uKIM-1 had a greater ability to discriminate incipient DKD than the ratio of uKIM-1/uCr, as shown in Figure 1. At a cut-off value of 137 pg/mL, uKIM-1 showed a sensitivity of 88.5% (95% CI 77.8%–95.3%) and

Table 1 Baseline characteristics and biochemical variables of study participants.

	T2DM without incipient DKD	T2DM with incipient DKD	p-Value
Age, years	60.5±1.6	56.9±2.8	0.273
BMI, kg/m ²	30.8±6.3	36.3±11.4	0.011
Male, %	37.3	40.0	0.829
Hypertension, %	69.5	80.0	0.365
ACE-inhibitors, %	34.2	59.0	0.057
Duration of diabetes, years	13.3±0.9	14.4±2.5	0.612
Glucose, mmol/L	7.1±2.1	9.5±4.9	0.003
HbA _{1c} , %	7.2±1.8	8.2±2.5	0.059
TSH, mIU/L	1.9±1.0	1.8±1.1	0.754
Creatinine, μ mol/L	87.5±27.4	92.8±45.9	0.564
GFR, mL/min/1.73 m ²	70.1±17.1	67.7±20.2	0.600
uCr, mg/dL	93.1±51.3	94.3±66.2	0.933
uAlb, g/L	0.63 (0.38–1.00)	7.41 (3.69–14.20)	<0.001
uKIM-1, pg/mL	79.0 (58.0–98.0)	173.0 (152.5–192.5)	<0.001
Ratio uAlb/uCr, mg/g cr	8.5 (4.8–14.4)	98.3 (49.1–181.8)	<0.001
Ratio uKIM-1/uCr, ng/g cr	101.1 (62.7–196.0)	230.3 (124.6–413.0)	<0.001

Data are expressed as percentages, mean and SD or median and interquartile range (IQR). BMI, body mass index; GFR, glomerular filtration rate; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; TSH, thyroid-stimulating hormone; uAlb, urinary albumin; uCr, urinary creatinine; uKIM-1, urinary kidney injury molecule 1.

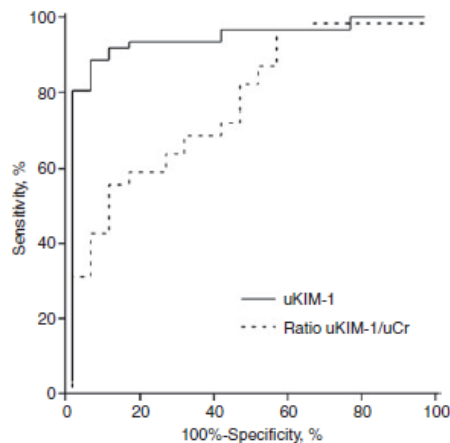


Figure 1 ROC curves of absolute uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio in the assessment of incipient DKD.

Areas under the curve for uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio were 0.954 (95% CI 0.912–0.996, $p < 0.001$) and 0.787 (95% CI 0.677–0.897, $p < 0.001$), respectively. The difference between areas was 0.167 (Z statistic=3.121, $p = 0.0018$).

a specificity of 95.0% (95% CI 75.1%–99.9%). At a cut-off value of 109 ng/g creatinine, uKIM-1/uCr showed a sensitivity of 55.7% (95% CI 42.5%–68.5%) and a specificity of 90.0% (95% CI 68.3%–98.8%). Multiple regression analysis showed that the associations between incipient DKD, uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio were independent of BMI ($p = 0.229$ and $p = 0.637$, respectively).

The major findings of the present study are that both uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio have ability to discriminate incipient DKD; however, uKIM-1 has a higher ability to discriminate incipient DKD than the uKIM-1/uCr ratio. Furthermore, we established the best cut-off points for uKIM-1 and uKIM-1/uCr. To the best of our knowledge, this study is the first attempt to examine whether the correction of uKIM-1 to creatinine affects the diagnostic characteristics of this biomarker in the assessment of incipient DKD. Urinary biomarkers, such as albumin and other markers of kidney injury, are frequently reported to have a normalized ratio to uCr concentration [5]. The theoretical basis for uCr adjustment is to compensate for variations in urine concentrations (assuming a steady uCr excretion rate), thus reducing variation in the biomarker [7]. KIM-1 is usually measured on urine random samples, and the results are reported in the literature as absolute values or as a ratio of uKIM-1/uCr. However, there is no specific standardization for the expression of uKIM-1 results as an absolute value or uKIM-1/uCr ratio.

Although the absolute values of uKIM-1 were different between T2DM patients with incipient DKD compared to

T2DM patients without incipient DKD, there were no significant differences for uCr. Thus, uCr is largely directly related to the GFR. However, 10%–40% of uCr is a consequence of active tubular secretion, with substantial variation among demographic groups [8]. uCr excretion becomes highly variable as renal failure progresses, and this variation influences both timed and spot-urine protein-creatinine ratios [9]. Thus, adjusting the values of any tubular markers to uCr, especially in patients with acute or even moderate chronic renal failure, may be inappropriate [10]. In summary, in the present study, uKIM-1 and the uKIM-1/uCr ratio were effective for identifying incipient DKD but the correction of uKIM-1 to uCr decreased the diagnostic power of this biomarker. However, further studies are required to confirm our results in a larger population.

Acknowledgments: This study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil, number 476758/2012-2). R.N. Moresco is recipient of CNPq Research Productivity Fellowship. The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) for providing biochemical reagents.

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), (Grant/Award Number: ‘476758/2012-2’).

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

- Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:463–93.
- Reutens AT. Epidemiology of diabetic kidney disease. *Med Clin North Am* 2013;97:1–18.
- Gosmanov AR, Wall BM, Gosmanova EO. Diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. *Am J Med Sci* 2014;347:406–13.
- Dwyer JP, Parving HH, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB. Renal dysfunction in the presence of normoalbuminuria in type 2 diabetes: results from the DEMAND study. *Cardiorenal Med* 2012;2:1–10.
- Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2010;78:486–94.

6. Website: National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF KDOQI) Guidelines. Guideline 1: screening and diagnosis of diabetic kidney disease. Available from: http://www.kidney.org/professionals/KDOQI/guideline_diabetes/guide1.htm. Accessed 22 July, 2014.
7. Helmersson-Karlqvist J, Årnlöv J, Larsson A. Day-to-day variation of urinary NGAL and rationale for creatinine correction. *Clin Biochem* 2013;46:70–2.
8. Boeniger MF, Lowry LK, Rosenberg J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am Ind Hyg Assoc J* 1993;54:615–27.
9. Morgenstern BZ, Butani L, Wollan P, Wilson DM, Larson TS. Validity of protein-osmolality versus protein-creatinine ratios in the estimation of quantitative proteinuria from random samples of urine in children. *Am J Kidney Dis* 2003;41:760–6.
10. Marc Conti M, Moutereau S, Esmilaire L, Desbene C, Lallali K, Devanlay M, et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1553–6.

4.2 MANUSCRITO I

Assessment of urinary tubular biomarkers as a strategy for the early detection of nephropathy in type 2 diabetic patients

José Antonio M. De Carvalho, Etiane Tatsch, Bruna S. Hausen, Manuela B. Sangoi, Guilherme V. Bochi, Yãnaí S. Bollick, Maria B. Moretto, Lariane O. Cargneluti, Thiago Duarte, Marta M. M. F. Duarte, Sílvia W. K. Londero, Melissa O. Preamor, Fabio V. Comim, Joris R. Delanghe, Rafael N. Moresco.

Manuscrito até o momento não submetido a periódico científico.

Assessment of urinary tubular biomarkers as a strategy for the early detection of nephropathy in type 2 diabetic patients

José Antonio M. De Carvalho^{a,b,c}, Etiane Tatsch^{a,c}, Bruna S. Hausen^{a,c}, Manuela B. Sangoi^{a,c}, Guilherme V. Bochi^{a,d}, Yãnaí S. Bollick^a, Maria B. Moretto^{c,d}, Lariane O. Cargneluti^c, Thiago Duarte^d, Marta M. M. F. Duarte^{d,e}, Sílvia W. K. Londero^b, Melissa O. Preamor^{d,f}, Fabio V. Comim^f, Joris R. Delanghe^g, Rafael N. Moresco^{a,c,d,g,*}

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

^bUniversity Hospital, Santa Maria-RS, Brazil

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

^dPharmacology Postgraduate Program, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

^eDepartment of Health Sciences, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria-RS, Brazil

^fDepartment of Clinical Medicine, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

^gDepartment of Clinical Chemistry, Ghent University Hospital, Gent, Belgium

*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, Brasil. Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

Email: rnmoresco@ufsm.br

Abstract

Background: Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of chronic renal disease worldwide, and its diagnosis is currently determined by urinary albumin. However, renal dysfunction have been reported in normoalbuminuric patients. Therefore, the aim of this study was to assess the diagnostic capacity of tubular biomarkers as neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule-1 (KIM-1), non-albumin protein (NAP), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and gamma-glutamyltransferase (GGT) in the early detection of DN.

Methods: In this study 117 Type 2 DM patients were enrolled. Fasting glucose, HbA_{1c}, serum creatinine, glomerular filtration rate (GFR), serum uric acid, serum albumin, lipid profile and liver tests were performed. Urinary albumin, creatinine, NAG, GGT, NAP, NGAL and KIM-1 were assessed, and both biomarkers were analyzed with and without a correction for urinary creatinine.

Results: Type 2 DM patients with nephropathy (T2DN) presented increased levels of tubular markers. The best diagnostic ability to identify DN was observed with uNGAL (sensitivity of 91% and specificity of 96%) and uKIM-1 (sensitivity of 91% and specificity of 93%). uKIM-1 and uNGAL (absolute values and uCr ratios) were increased in the normoalbuminuric group (uAlb 10-30 mg/g cr range), indicating tubular kidney injury even in the normal range of urinary albumin excretion.

Conclusions: uKIM-1 and uNGAL showed the best diagnostic characteristics in the detection of DN, and these biomarkers were elevated in normoalbuminuric patients, indicating the early detection of tubular injury. The adjustment by uCr in relation to urinary markers such as NGAL and KIM-1 decreased the diagnostic power of these biomarkers.

Keywords: Diabetic nephropathy, tubular damage, urinary biomarkers, diagnostic ability.

1. Introduction

Diabetic nephropathy (DN), the most common microvascular complication of diabetes mellitus (DM), is the leading cause of mortality and morbidity in DM patients [1,2]. DN is a clinical syndrome defined by persistent albuminuria (micro or macroalbuminuria) on at least two occasions separated by 3 or 6 months [3,4]. The renal injury in DN is due to a complex series of pathophysiological changes initiated by disturbed glucose homeostasis and is similar in both type 1 and type 2 DM patients [5]. Urinary albumin is generally considered the earliest non-invasive marker for the development of DN [6] and a well-established independent risk factor of cardiovascular disease [7]. However, urinary albumin (uAlb) is only able to detect DN once significant glomerular damage has occurred [8]. Conversely, renal dysfunction and nephropathy have been reported in normoalbuminuric patients [9,10].

Whilst most attention has focused on glomerular changes, it is now increasingly recognized that tubules play an important role in the pathogenesis of DN [11,12]. Urinary markers which may reflect tubular damage are mainly urinary enzymes or plasma low molecular weight proteins normally freely filtered by the glomerulus [13]. Some of the proteins and tubular enzymes associated with proximal tubular injury are N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), gamma-glutamyltransferase (GGT), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and kidney injury molecule-1 (KIM-1) [12]. These are sensitive biomarkers that can predict microalbuminuria or DN in the early stage of diabetes and might provide not only meaningful information regarding early pathophysiology but also an earlier clinical approach to the diagnosis. In addition, urinary leakage of proteins other than albumin, i.e. nonalbumin protein (NAP), can also indicate tubular damage rather than glomerular damage [14].

Urinary biomarkers of kidney injury are usually reported as a ratio normalized to urinary creatinine (uCr), in order to compensate for variations in urine concentrations [15], thus reducing the variation of the biomarker [16]. It remains unclear, however, if the requirement for the normalization of specific urinary biomarkers to creatinine is helpful to the diagnosis of some renal disorders, in particular DN.

Therefore, considering that tubular markers seem to be an emerging alternative for the early diagnosis of DN, the aim of this study was to assess the diagnostic capacity of tubular biomarkers (GGT, NAG, NAP, NGAL and KIM-1) and determine the potential of these markers in the early detection of DN in DM type 2 patients. In addition, it was verified the impact of correction through uCr in the diagnostic ability of tubular markers in DN patients.

2. Materials and methods

2.1. Study population

Participants were recruited from the University Hospital of Santa Maria located in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The study involved 117 patients divided into two groups: Type 2 DM patients without nephropathy (T2DM) and Type 2 DM patients with nephropathy (T2DN). The clinical diagnosis of DN was defined based on the detection of uAlb in a random urine sample (uAlb excretion of more than 30 mg/g of creatinine in two out of three random urine samples collected in within a six month period) [17]. Moreover, patients were also stratified according to urinary albumin excretion (UAE) into three groups: UAE < 10 mg/g cr, UAE 10-30 mg/g cr and UAE > 30 mg/g cr. Exclusion criteria consisted of urinary tract diseases, prior renal disease other than DN, neoplastic disorders, uncontrolled thyroid disorders, infectious and liver diseases, active or chronic persistent infection or inflammatory disorders, pregnancy, renal transplantation, and the use of nephrotoxic drugs. All eligible patients provided informed written consent, and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the Institutional Ethics Review Board for human studies (CAAE number 12303113.0.0000.5346).

2.2. Laboratory analysis

Blood samples were collected from all patients after an overnight fast by venous puncture into Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with sodium fluoride plus EDTA, with EDTA and no anticoagulants. Each patient also provided a urine sample for biochemical analysis. Blood samples were routinely centrifuged at 2500 × g for 15 minutes, and urine specimens were centrifuged at 1000 × g for 5 minutes. The urine aliquots were stored at -80°C until analysis. Plasma with sodium fluoride plus EDTA was used to measure the levels of fasting glucose, and whole blood in EDTA was used to measure the levels of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) and hemoglobin. The serum was used to assess the levels of insulin, uric acid, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, high sensitive C-reactive protein (hsPCR), creatinine (cr) and GGT. Levels of uCr, uAlb, proteinuria, urinary NGAL (uNGAL), urinary KIM-1 (uKIM-1), urinary NAG (uNAG) and urinary GGT (uGGT) were assessed. The urinary markers were corrected by uCr. The results of uAlb were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [18]. Measurements of the glucose, uric acid, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, hsPCR, uCr, and uGGT were performed using standard methods on a Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. HbA_{1c} was measured using chromatographic methods with a D10® automated analyzer (BioRad, California, USA). Insulin was

determined using a Cobas 6000[®] automated analyzer (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Hemoglobin was measured using a Sysmex XE-5000[®] automated hematology system (Sysmex, Kobe, Japan). Proteinuria method is an adaptation of pyrogallol red-molybdate method by Fujita [19], creatinine method employs a modification of the kinetic Jaffe reaction reported by Larsen [20] and uAlb method is based on a particle-enhanced turbidimetric inhibition immunoassay, were determined using Dimension RXL MAX[®] (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). uNGAL and uKIM-1 were measured using ELISA kits designed to analyze random spot urine samples (KIM-1, R&D systems, Minneapolis, MN, USA and NGAL, HYB211-05, AntibodyShop, Gentofte, Denmark). All assays were conducted according to the manufacturer's instructions. The inter-assay and intra-assay precision for the uKIM-1 were 6.0-7.8% and 3.9-4.4%, and 5.6-7.9% and 3.1-4.4% for NGAL. The detection limits of the assays were 0.009 ng/mL for KIM-1 and 0.012 ng/mL for NGAL. Values under the detectable cutoff range (<5% of the total number) were approximated using the mean value between zero and the lower limit of the detectable cutoff value. NAG was determined using a method developed by Horak et al. (1981). Proteinuria and uAlb values were used to estimate the amount of NAP: NAP = proteinuria-uAlb. Patients whose NAP value was equal to zero were defined as having no NAP [21]. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation [22].

2.3 Statistical analysis

The distributions of continuous variables were examined for skewness and kurtosis by the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) for parametric variables and median and interquartile range (IQR) for nonparametric variables. Categorical data are summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with the χ^2 test. Statistical differences between groups were evaluated by the Mann-Whitney test or Student's *t* test. Comparison of more than two variables 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. Logistic regression analysis was performed to investigate whether some factors interfere with urinary tubular biomarkers. Receiver operator characteristic (ROC) curves were constructed to quantify the overall ability of urinary biomarkers (NAG, GGT, NAP, NGAL and KIM-1) to discriminate between type 2 diabetic patients with nephropathy and those without nephropathy. The sensitivity and specificity of such assays were assessed by the areas under the ROC curve (AUROC), and AUROCs were compared using Z-statistics. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism[®] version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), Statistical

Package for Social Sciences[®], version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and MedCalc[®] version 13.2.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

3. Results

The baseline characteristics and biochemical parameters of all participants in the study are provided in Table 1. Overall, 117 type 2 diabetic patients were evaluated. The age of both groups was similar. No differences in BMI, gender, proportion of smokers or hypertension were detected between the groups, except for the use of ACE inhibitors in T2DN compared to T2DM ($P = 0.033$). Similarly, no significant changes in the values of GFR, insulin, uric acid, HbA_{1c}, serum GGT, lipids and hemoglobin were observed in the studied groups (Table 1).

The main results of this study focused on the modification of urinary parameters. As shown in Figure 1, T2DN patients presented increased levels of markers of tubular damage in comparison to T2DM. The results were: activity of uNAG 3.9 U/l (1.9-6.0) vs. 2.3 U/l (1.5-3.9), $P = 0.0276$; activity of uGGT 52.7 U/l (25.4-85.2) vs. 32.9 U/l (25.8-52.6), $P = 0.113$; NAP 12.3 mg/dl (4.8-26.7) vs. 4.7 mg/dl (2.5-7.9), $P = 0.0005$; uNGAL 70.5 ng/ml (66.5-78.3) vs. 36.0 ng/ml (26.0-46.0), $P < 0.0001$ and uKIM-1 165.6 pg/ml (146.8-189.8) vs. 77.0 pg/ml (53.0-97.0), $P < 0.0001$, indicating considerable changes in the nephropathy group. Even when adjusted by uCr, these markers remained abnormal, as can be seen in Figure 2. The comparison between the T2DN vs. T2DM groups was: uUNAG ratio 4.9 U/g cr (3.1-7.8) vs. 3.0 U/g cr (1.6-6.5), $P = 0.0083$; uGGT ratio 61.5 U/g cr (47.2-118.5) vs. 45.0 U/g cr (36.0-56.4), $P = 0.0003$; NAP ratio 152.9 mg/g cr (11.7-299.2) vs. 58.4 mg/g cr (38.9-85.8), $P < 0.0001$; uNGAL ratio 101.6 ng/g cr (58.5-193.1) vs. 39.2 ng/g cr (24.7-73.6), $P < 0.0001$ and uKIM-1 ratio 230.3 ng/g cr (127.4-418.8) vs. 91.7 ng/g cr (51.0-165.8), $P < 0.0001$.

In order to define the diagnostic ability of tubular markers in identifying patients with nephropathy among subjects with T2DM, ROC curve analysis were performed. Table 2 shows the results of the ROC curve analysis for the absolute values and ratios with uCr of all urinary tubular markers assessed in this study. The AUROCs of urinary markers, expressed in absolute values and uCr ratios, were compared for each marker (Figure 3). The best accuracy for DN was observed with uNGAL (sensitivity of 91% and specificity of 96%) and uKIM-1 (sensitivity of 91% and specificity of 93%).

Logistic regression analysis showed that all urinary tubular markers, expressed as absolute values and uCr ratios, except for the uNAG ratio were associated with DN. After adjustment for confounding variables, i.e. use of ACE inhibitors, all biomarkers except uNAG remained independently associated with ND, as shown in Table 3.

According to UAE, the diabetic patients were divided into three groups, as follows: uAlb < 10 mg/g cr (n=64), uAlb 10-30 mg/g cr (n=31) and uAlb > 30 mg/g cr (n=22), as shown in Figure 4. Usually, patients are classified into normoalbuminuria (uAlb < 30 mg/g cr), microalbuminuria (uAlb 30-300 mg/g cr) and macroalbuminuria (uAlb > 300 mg/g cr). However, our objective was to verify the potential of these markers in the early detection of DN since renal dysfunction and nephropathy have been reported in normoalbuminuric patients. Thus, the normoalbuminuric group was divided into two distinct ranges (uAlb <10 mg/g cr and uAlb 10-30 mg/g cr) to assess the urinary biomarkers in this normal range. For this analysis, we selected the urinary biomarkers that presented the best diagnostic performance, NGAL and KIM-1. As shown in Figure 4, both uKIM-1 and uNGAL (absolute values and uCr ratios) were increased in the uAlb 10-30 mg/g cr range, indicating tubular kidney injury even in the normal range of UAE.

4. Discussion

The main outcome of this study was to finding an early disruption of tubular damage markers prior to the consolidation of microalbuminuria, suggesting their potential utility for the diagnosis of renal dysfunction before the development of major glomerular lesions. Even in the normoalbuminuric range (uAlb <30 mg/g cr), it was possible to detect a consistent modification of uNGAL and uKIM-1. Our results corroborate previous studies showing an increase in tubular damage markers levels in T2DN patients [20,25-30]. Moreover, this study also demonstrated that adjustment by uCr did not contribute to improving the diagnostic capacity of tubular markers NGAL and KIM-1 to identify DN. In this context, uNGAL and uKIM-1 had the best diagnostic characteristics when expressed as absolute values.

As expected, T2DN patients presented a significant elevation in urinary tubular markers compared with T2DM patients. The markers were expressed in absolute values or as a ratio with uCr; the adjustment by uCr was not affected by the urinary tubular marker levels, exception for uGGT. The uGGT ratio was significantly elevated in T2DN patients, while uGGT expressed as absolute values did not differ between the groups. Thus, our results corroborate previous studies that showed an increase in tubular damage marker levels in T2DN patients [20,26,27,30-32]. In this context, recent evidence has focused on the importance of detection of tubular damage to correlate with kidney damage in patients with DN [30,32-37]. The increased activity of enzymes in urine (uNAG and uGGT) is mainly associated with two factors, i.e. hyperglycemia and the consequent damage to the brush border cells of renal tubules, as well as the high molecular weight of these molecules, making free glomerular filtration difficult [38-41]. On the other hand, the increased levels of the uNGAL and uKIM-1 may be explained by different mechanisms, including reduced clearance, increased production by injured tubular cells, or both [41,42].

In this study, we also demonstrated that NAP, which is a new marker of tubular damage, was increased in T2DN patients. The NAP level includes numerous urinary proteins, and some are associated with renal damage including alpha-1microglobulin, beta-2 macroglobulin, IgG, cystatin C, transferrin, nephrin, metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1[23,44-47]. Although there are few studies related to NAP, an increase in NAP levels has already been demonstrated in T2DM patients and T2DN patients[47]. It is important to note that NAP seems to be a promising marker for tubular kidney damage, due to easy implementation and the low cost of the test.

The ROC curve analysis was performed in order to verify the ability of tubular markers to identify DN and establish the diagnostic characteristics, such as sensitivity, specificity and the cutoff for the urinary markers. In our study, it was demonstrated that all tubular markers, with the exception of uGGT expressed in absolute values, have the ability to identify DN. The impact of uCr adjustment on AUROC was also assessed, and we observed two different situations. First, we evaluated the diagnostic characteristics of tubular markers expressed in absolute values, and found that uNGAL and uKIM-1 had the best performance in the identification of DN (AUROC > 0.9). Similarly, a study by Lacquaniti et al. [48], in type 1 diabetic patients, showed that the AUROC for uNGAL expressed in absolute values was 0.956. In addition, a recent meta-analysis study on the diagnostic characteristics of uKIM-1 for acute kidney injury demonstrated that the AUROC obtained was 0.860 [49]. In our study, we also evaluated the diagnostic characteristics for uNGAL and uKIM-1, and found a sensitivity and specificity > 90% for the followed cut-off points for uNGAL and uKIM-1, i.e. 62 ng/ml and 137 pg/ml, respectively.

Second, we evaluated the diagnostic characteristics of tubular markers expressed as a ratio with uCr, and found that the uNAG ratio, uGGT ratio and NAP ratio had the best characteristics for DN identification; the AUROC values were 0.683, 0.783 and 0.850, respectively. Interestingly, we have previously shown that the AUROC of uGGT in absolute values is 0.796, which is very close of the present results [40]. Moreover, the AUROC of uNAG was similar to that obtained by Assal et al. [50], with AUROC = 0.722. Our results also demonstrate a sensitivity and specificity > 90% for the followed cut-off points for the uGGT and NAP ratios, i.e. 45 U/g cr and 79 mg/g cr, respectively. The correction of NAP by uCr increased the diagnostic value, as demonstrated by the addition of 0.119 on the AUROC. Accordingly, the sensitivity and specificity were improved after the uCr adjustment. On the other hand, in relation to uNGAL and uKIM-1, the correction by uCr promoted a decrease in the AUROCs.

Urinary markers are usually corrected by uCr and expressed as a ratio [51]. The theoretical basis for uCr adjustment is to compensate for variations in urine concentrations (assuming a steady uCr excretion rate), thus reducing the variation of the biomarker [16]. However, it remains

unclear as to whether the requirement for the normalization of specific urinary biomarkers to creatinine is helpful in the diagnosis of some renal disorders [15]. In particular, it is not known whether the normalization of urinary tubular biomarkers to creatinine may affect its diagnostic ability in the investigation of DN. In this context, some authors such as Conti et al. [52] believe that the adjustment of the values of any tubular marker with uCr, especially in patients with acute or even moderate chronic renal failure, may be inappropriate.

The tubular damage markers, uKIM-1 and uNGAL, were selected according to the diagnostic characteristics (AUROC, sensitivity and specificity) in order to verify the potential of early detection of kidney damage in DN. Accordingly, the patients were stratified into three groups, considering the UAE; two of these groups had a UAE in the normoalbuminuric range (UAE < 10 mg/g cr and UAE 10-30 mg/g cr). Our findings demonstrate that uKIM-1 and uNGAL, expressed as absolute values and as a ratio with uCr, were increased in patients with UAE > 30mg/g cr and with UAE between 10 and 30 mg/g cr. These results suggest that the levels of these markers may be increased even before a diagnosis of nephropathy, thus allowing for the early detection of kidney damage. Previous studies have described an increase in tubular marker levels in patients with UAE < 30 mg/g cr, without an elevation of glomerular injury markers [28,31,50,53,54]. Currently, we may speculate that the urinary biomarkers assessed in this study have great potential value in the early diagnosis of nephropathy in T2DM patients.

One of the weaknesses of this study was related to its transversal design; it was impossible to address whether tubular disease (identified by the biomarkers in the study) was consistent with the development of DN or changes in glomerular function over time. In addition, the number of patients with microalbuminuria and macroalbuminuria was limited, which might have underestimated the association between tubular markers and renal indices. Nevertheless, the association among stages of DN, including an arbitrary pre-clinical phase (UAE between 10-30mg/g cr) was sufficient to suggest a strong association between these disorders. The number of patients enabled us to observe statistically significant differences between these two groups.

In conclusion, our observations suggest that the urinary biomarkers assessed in this study have potential value in the diagnosis of nephropathy in T2DM patients, highlighting KIM-1 and NGAL as having the best diagnostic characteristics. The urinary excretion of tubular enzymes (NAG and GGT), tubular proteins (KIM-1) and proteins related to tubular reabsorption (NGAL and NAP) represent different renal processes that may be involved in kidney physiopathology. In addition, the measurement of these tubular damage markers may indicate changes in kidney physiology before conventional measures, including GFR, serum creatinine and the traditional markers of glomerular injury such as uAlb. Interestingly, NAP showed a good diagnostic ability to identify nephropathy in T2DM patients, and seems to be a promising marker for the diagnosis

of DN. Moreover, NAP evaluation is easy to implement, using standardized methodologies at a low cost. Finally, we verified that uNGAL and uKIM-1 are elevated in individuals considered to be normoalbuminuric, i.e. in the uAlb range between 10 and 30 mg/g cr, indicating the early detection of tubular injury. This allows us to speculate that these biomarkers may be important tools in clinical practice for the diagnosis and monitoring of nephropathy in T2DM patients. We also demonstrated that the adjustment by uCr in relation to urinary markers such as NGAL and KIM-1 decreases the diagnostic power, although the opposite effect was observed for NAG, GGT and NAP. The correction of urinary markers of tubular origin remains quite controversial and needs to be better evaluated in future studies.

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) and Laborsys Roche (Porto Alegre, Brazil) for providing biochemical reagents. We also thank Dr. Elehu Moura de Oliveira and the team of the Laboratory of Clinical Analysis (LAC) of the University Hospital of Santa Maria for the support provided.

6. References

- [1] M B, Arnqvist H, Hermansson G, Karlberg B, Ludvigsson J. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994;330:15–8.
- [2] Krolewski M, Eggers P, Warram J. Magnitude of endstage renal disease in IDDM: a 35 year follow-up study. *Kidney Int* 1996;50:2041–6.
- [3] Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005;28:164–76. doi:10.2337/diacare.28.1.164.
- [4] Phillips AO. Diabetic nephropathy. *Medicine (Baltimore)* 2011;39:470–4. doi:10.1016/j.mpmed.2011.05.007.
- [5] Remuzzi G, Ruggenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int* 1997;51:2–15.
- [6] Narita T, Hosoba M, Kakei M, Ito S. Increased urinary excretions of immunoglobulin G, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:142–4.
- [7] Garg J, Bakris G. Microalbuminuria: marker of vascular dysfunction, risk factor for cardiovascular disease. *Vasc Med* 2002;7:35–43.
- [8] Barratt J, Topham P. Urine proteomics: the present and future of measuring urinary protein components in disease. *Can Med Assoc J* 2007;177:361–8.
- [9] Cohen M, Lautenslager G, Shearman C. Increased collagen IV excretion in diabetes. A marker of compromised filtration function. *Diabetes Care* 2001;24:914–8.
- [10] Retnakaran R, Cull C, Thorne K, Adler A, Holman R. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes* 2006;55:1832–9.
- [11] Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *Eur J Intern Med* 2009;20:551–5. doi:10.1016/j.ejim.2008.12.012.
- [12] Moresco RN, Sangoi MB, De Carvalho J a M, Tatsch E, Bochi G V. Diabetic nephropathy: Traditional to proteomic markers. *Clin Chim Acta* 2013;421:17–30. doi:10.1016/j.cca.2013.02.019.
- [13] Matheson A, Willcox MDP, Flanagan J, Walsh BJ. Urinary biomarkers involved in type 2 diabetes: A review. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:150–71. doi:10.1002/dmrr.
- [14] Sakatsume M, Kubota R, Ogawa A, Narita I, Matsuda T, Shiba K, et al. Rapid and sensitive electrophoresis of urinary protein clearly reveals the

- pathophysiological feature of renal diseases. *Nephrology* 2007;12:191–6. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00739.x.
- [15] Waikar S, Sabbiseti V, Bonventre J. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int* 2010;78:486–94.
- [16] Helmersson-Karlqvist J, Ärnlöv J, Larsson A. Day-to-day variation of urinary NGAL and rational for creatinine correction. *Clin Biochem* 2013;46:70–2. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.022.
- [17] Association American Diabetes. Standards of medical care in diabetes - 2014. *Diabetes Care* 2014;37:S14–80.
- [18] Newman DJ, Pugia M, Lott J, Wallace J, Hiar A. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 2000;294:139–55.
- [19] Fujita Y, Mori I, Kitano S. Color reaction between Pyrogallol red - Molybdenum (VI) complex and protein. *Bunseki Kagaku* 1983;32:379–86.
- [20] Larsen K. Creatinine assay by a reaction-kinetic principle. *Clin Chim Acta* 1972;41:209–17. doi:10.1016/0009-8981(72)90513-X.
- [21] Halimi JM, Matthias B, Al-Najjar A, Laouad I, Chatelet V, Marlière JF, et al. Respective predictive role of urinary albumin excretion and nonalbumin proteinuria on graft loss and death in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007;7:2775–81. doi:10.1111/j.1600-6143.2007.02010.x.
- [22] Levey S, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang Y, Hendriksen S. “Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate.” *Ann Intern Med* 2008;145:247–54.
- [23] Jung K, Grützmänn KD. Quality control material for activity determinations of urinary enzymes. *Clin Biochem* 1988;21:53–7.
- [24] Navarro JF, Mora C, Muros M, García J. Urinary tumour necrosis factor- α excretion independently correlates with clinical markers of glomerular and tubulointerstitial injury in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:3428–34. doi:10.1093/ndt/gfl469.
- [25] Mohammadi-Karakani A, Asgharzadeh-haghighi S, Ghazi-khansari M, Hosseini R. Determination of Urinary Enzymes as a Marker of Early Renal Damage in Diabetic Patients. *J Clin Lab Anal* 2007;417:413–7. doi:10.1002/jcla.
- [26] De Carvalho J a M, Bochi G V, Sangoi MB, Moresco RN. Assessment of urinary γ -glutamyltransferase in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration. *Clin Chim Acta* 2012;413:817–8. doi:10.1016/j.cca.2011.12.016.

- [27] Fu WJ, Li BL, Wang SB, Chen ML, Deng RT, Ye CQ, et al. Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;95:105–9. doi:10.1016/j.diabres.2011.09.031.
- [28] Kim SS, Song SH, Kim IJ, Yang JY, Lee JG, Kwak IS, et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;97:251–7. doi:10.1016/j.diabres.2012.02.019.
- [29] Kim SS, Song SH, Kim IJ, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS, et al. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2013;36:656–61.
- [30] Jung K, Pergande M, Schimice E, Ratzmann K, Illus A. Urinary enzymes and lowmolecular-mass proteins as indicators of diabetic nephropathy. *Clin Chem* 1988;34:544–7.
- [31] Fu W, Xiong S, Fang Y, Wen S, Chen ML, Deng RT, et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. *Endocrine* 2012;41:82–8.
- [32] Nielsen SE, Schjoedt K, Astrup A, Tarnow L, Lajer M, Hansen P, 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. *Diabet Med* 2010;27:1144–50.
- [33] Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving H-H, Rossing P. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2010;33:1320–4.
- [34] Nauta FL, Boertien WE, Bakker SJL, van Goor H, van Oeveren W, de Jong PE, et al. Glomerular and tubular damage markers are elevated in patients with diabetes. *Diabetes Care* 2011;34:975–81. doi:10.2337/dc10-1545.
- [35] Vaidya V, Niewczas M, Ficociello L, Johnson A, Collings F, Warram JH, 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-D-glucosaminidase. *Kidney Int* 2011;79:464–70.
- [36] Kim SS, Song SH, Kim IJ, Yang JY, Lee JG, Kwak IS, et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;97:251–7. doi:10.1016/j.diabres.2012.02.019.
- [37] Flandrois C, Gravagna B, Maire I, Mathieu M. Enzymuria. *Ann Biol Clin (Paris)* 1986;44:486–90.
- [38] Morita E, Kaizu K, Uriu K, Hashimoto O, Komine N, Eto S. Clinical significance of urinary enzymes in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 1991;5:158–9.

- [39] Yaqoob M, McClelland P, Patrick A, Stevenson A, Mason H, Bell G. Tubular damage in microalbuminuric patients with primary glomerulonephritis and diabetic nephropathy. *Ren Fail* 1995;17:43–9.
- [40] De Carvalho JAM, Piva SJ, Hausen BS, Bochi G V., Kaefer M, Coelho AC, et al. Assessment of urinary γ -glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2011;412:1407–11. doi:10.1016/j.cca.2011.04.015.
- [41] Ichimura T, Bonventre J V, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, 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* 1998;273:4135–42. doi:10.1074/jbc.273.7.4135.
- [42] Devarajan P. Emerging urinary biomarkers in the diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2:387–98. doi:10.1517/17530059.2.4.387.
- [43] Bernard A, Amor A, Goemaere-Vanneste J, Antoine J, Lauwerys R, Lambert A, et al. Microtransferrinuria is a more sensitive indicator of early glomerular damage in diabetes than microalbuminuria. *Clin Chem* 1988;34:1920–1.
- [44] Langham R, Kelly D, Cox A, Thomson N, Holthöfer H, Zaoui P, et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: Effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002;45:1572–6. doi:10.1007/s00125-002-0946-y.
- [45] Pätäri A, Forsblom C, Havana M, Taipale H, Groop P-H, Holthöfer H. Nephrinuria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52:2969–74.
- [46] Cieciora T, Urbanowicz A, Perkowska-Ptasinska A, Nowacka-Cieciora E, Tronina O, Majchrzak J, et al. Tubular and glomerular proteinuria in diagnosing chronic allograft nephropathy with relevance to the degree of urinary albumin excretion. *Transplant. Proc.*, vol. 37, 2005, p. 987–90. doi:10.1016/j.transproceed.2005.01.046.
- [47] Penno G, Solini A, Bonora E, Fondelli C, Orsi E, Zerbini G, et al. Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes. *J Hypertens* 2011;29:1802–9. doi:10.1097/HJH.0b013e3283495cd6.
- [48] Lacquaniti A, Donato V, Pintaudi B, Di Vieste G, Chirico V, Buemi A, et al. “Normoalbuminuric” diabetic nephropathy: Tubular damage and NGAL. *Acta Diabetol* 2013;50:935–42. doi:10.1007/s00592-013-0485-7.
- [49] Shao X, Tian L, Xu W, Zhang Z, Wang C, Qi C, et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: A meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e84131. doi:10.1371/journal.pone.0084131.
- [50] Assal HS, Tawfeek S, Rasheed E a, El-Lebedy D, Thabet EH. Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2013;6:7–13. doi:10.4137/CMED.S12633.

- [51] Dyson EH, Will EJ, Davison AM, O'Malley AH, Shepherd HT, Jones RG. Use of the urinary protein creatinine index to assess proteinuria in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:450–2.
- [52] Conti M, Moutereau S, Esmilaire L, Desbene C, Lallali K, Devanlay M, et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:1553–6. doi:10.1515/CCLM.2009.341.
- [53] Lacquaniti A, Donato V, Pintaudi B, Di Vieste G, Chirico V, Buemi A, et al. “Normoalbuminuric” diabetic nephropathy: Tubular damage and NGAL. *Acta Diabetol* 2013;50:935–42. doi:10.1007/s00592-013-0485-7.
- [54] Kim SS, Song SH, Kim IJ, Kim WJ, Jeon YK, Kim BH, et al. Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 2014. doi:10.1002/dmrr.2546.

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of study participants.

	T2DM	T2DN	P-value
Age (years)	59.6 ± 13.0	57.3 ± 12.5	0.442
Gender (M/F)	32/63	7/15	1.000
BMI (Kg/m ²)	29.7 (26.6–35.4)	31.1 (26.6–43.3)	0.302
Hypertension (%)	68.4	72.7	0.801
Smokers (%)	9.1	7.4	0.676
Duration of T2DM (years)	12.0 (6.0–18.5)	10.0 (7.0–19.0)	0.997
Diabetic retinopathy (%)	12.6	18.2	0.498
Insulin (%)	29.5	13.6	0.181
Insulin + oral hypoglycemic agents (%)	27.4	22.7	0.791
Oral hypoglycemic agents (%)	35.8	31.8	0.807
ACE inhibitors (%)	37.9	63.6	0.033
Fasting glucose (mg/dl)	122.5 (104.5–159.3)	125.5 (103.3–272.5)	0.428
HbA _{1c} (mmol/mol)	54.5 (42.0–70.8)	53.7 (41.3–85.1)	0.563
Insulin (μU/ml)	13.7 (7.4–23.7)	14.6 (8.7–23.6)	0.595
Uric acid (mg/dl)	5.1 ± 1.4	5.7 ± 1.9	0.105
Total cholesterol (mg/dl)	176.0 (153.0–190.0)	173.5 (151.0–213.8)	0.764
LDL cholesterol (mg/dl)	98.0 (79.8–108.5)	96.0 (76.0–123.0)	0.689
HDL cholesterol (mg/dl)	47.0 (38.0–57.0)	41.0 (36.0–59.5)	0.427
Triglyceride (mg/dl)	127.0 (87.0–177.0)	137.5 (86.0–198.8)	0.334
hsCRP (mg/dl)	0.3 (0.2–0.7)	0.4 (0.2–0.9)	0.512
Serum GGT (U/l)	34.0 (26.0–45.0)	36.5 (26.5–58.5)	0.422
Hemoglobin (g/dl)	13.7 (12.7–14.6)	13.5 (13.0–14.5)	0.701
Serum creatinine (mg/dl)	0.91 (0.82–1.15)	0.93 (0.81–1.17)	0.725
GFR (ml/min/1.73m ²)	74.6 ± 20.5	74.9 ± 23.2	0.943
Proteinuria (mg/dl)	5.5 (3.1–9.2)	23.6 (9.9–41.7)	<0.001
Urinary albumin (mg/dl)	0.5 (0.4–0.9)	8.00 (3.8–16.1)	<0.001
Ratio proteinuria (mg/g cr)	58.8 (39.0–85.8)	178.7 (96.2–288.2)	<0.001
Ratio urinary albumin (mg/g cr)	7.2 (4.6–11.7)	104.8 (52.8–291.9)	<0.001

BMI, body mass index; ACE inhibitors, angiotensin-converting-enzyme inhibitors; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; hsCRP, high sensitive C reactive protein; GGT, γ-glutamyltransferase; GFR, glomerular filtration rate, T2DM, Type 2 DM patients without nephropathy; T2DN, Type 2 DM patients with nephropathy.

Table 2. ROC curves analysis of urinary biomarkers for the diagnosis of type 2 diabetic nephropathy (T2DN).

	AUROC	Cut-off	Specificity (%)	Sensitivity (%)	P-value
uNAG (U/l)	0.653	3	62	71	0.019
Ratio uNAG (U/g cr)	0.683	3	49	86	0.002
uGGT (U/l)	0.590	56	77	48	0.257
Ratio uGGT (U/g cr)	0.783	45	48	95	<0.001
NAP (mg/dl)	0.738	9	79	67	<0.001
Ratio NAP (mg/g cr)	0.850	79	40	97	<0.001
uNGAL (ng/ml)	0.973	62	96	91	<0.001
Ratio uNGAL (ng/g cr)	0.799	51	65	82	<0.001
uKIM-1 (pg/ml)	0.947	137	93	91	<0.001
Ratio uKIM-1 (ng/g cr)	0.822	109	62	91	<0.001

uNAG, urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase; uGGT, urinary gama-glutamyltransferase; NAP, non-albumin protein; uNGAL, urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin; uKIM-1, urinary kidney injure molecule-1.

Table 3. Logistic regression analyses for the association of urinary biomarkers and diabetic nephropathy.

	OR (IC 95%)*	P-value	OR (IC 95%)**	P-value
uNAG (U/l)	1.140 (1.030–1.270)	0.013	1.120 (0.950–1.550)	0.070
Ratio NAG (U/g cr)	1.190 (0.990–1.430)	0.060	1.170 (0.950–1.550)	0.150
uGGT (U/l)	1.020 (1.004–1.030)	0.009	1.014 (1.004–1.023)	0.005
Ratio uGGT (U/g cr)	1.013 (1.003–1.023)	0.008	1.011 (1.002–1.021)	0.002
NAP (mg/dl)	1.100 (1.037–1.168)	0.002	1.117 (1.038–1.202)	0.003
Ratio NAP (mg/g cr)	1.010 (1.007–1.020)	<0.001	1.010 (1.006–1.020)	0.001
uNGAL (ng/ml)	1.243 (1.118–1.383)	< 0.001	1.259 (1.118–1.417)	<0.001
Ratio uNGAL (ng/g cr)	1.020 (1.010–1.030)	<0.001	1.020 (1.010–1.030)	<0.001
uKIM-1 (pg/ml)	1.058 (1.034–1.082)	< 0.001	1.057 (1.031–1.084)	<0.001
Ratio uKIM-1 (ng/g cr)	1.010 (1.005–1.014)	<0.001	1.010 (1.004–1.014)	0.001

*Without adjustment for ACE inhibitors. ** With adjustment for ACE inhibitors.

uNAG, urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase; uGGT, urinary gama-glutamyltransferase; NAP, non-albumin protein; uNGAL, urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin; uKIM-1, urinary kidney injure molecule-1.

FIGURES

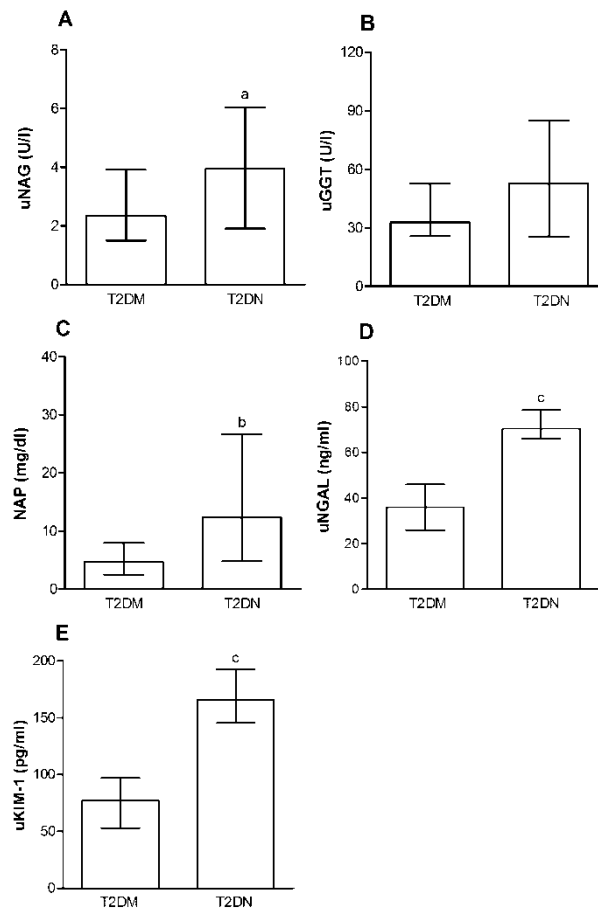


Figure 1. Levels of urinary biomarkers (uNAG [A], uGGT [B], NAP [C], uNGAL [D] and uKIM-1 [E]) in the study patients, not corrected by uCr. ^a $P < 0.05$, T2DN compared with T2DM; ^b $P < 0.001$, T2DN compared with T2DM and ^c $P < 0.0001$, T2DN compared with T2DM.

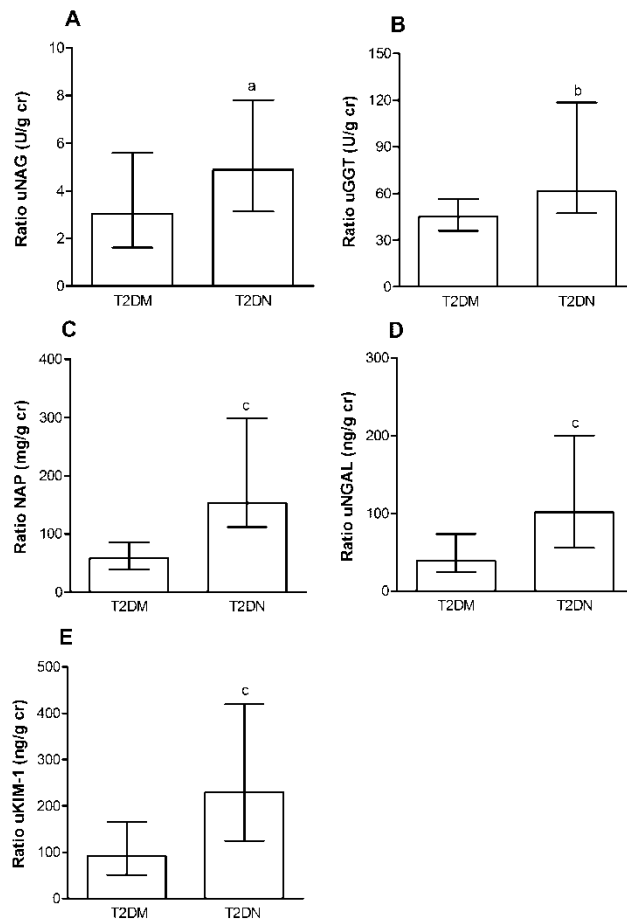


Figure 2. Levels of urinary biomarkers (uNAG [A], uGGT [B], NAP [C], uNGAL [D] and uKIM-1 [E]) in the study patients, corrected by uCr, ^a $P < 0.05$, T2DN compared with T2DM; ^b $P < 0.001$, T2DN compared with T2DM; ^c $P < 0.0001$, T2DN compared with T2DM.

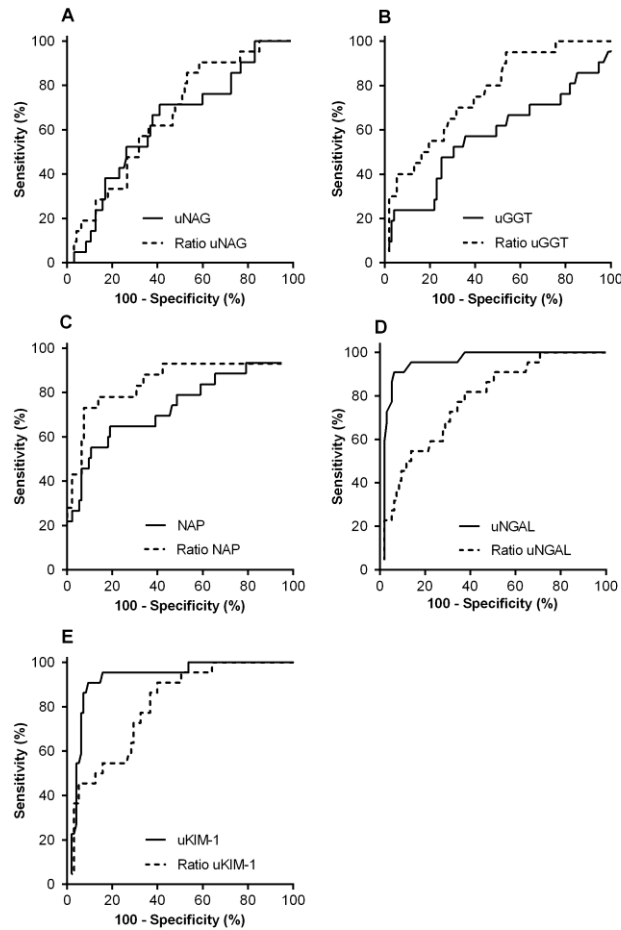


Figure 3. ROC curves of biomarkers in values absolute and ratio in the assessment of diabetic nephropathy. Difference between areas under the curve for: **A)** uNAG and ratio uNAG was 0.0332 (Z statistic = 0.476), $P = 0.6340$; **B)** uGGT and ratio uGGT was 0.203 (Z statistic = 1.964), $P = 0.0495$; **C)** NAP and ratio NAP was 0.112 (Z statistic = 2.628), $P = 0.0086$; **D)** uNGAL and ratio uNGAL was 0.175 (Z statistic = 2.902), $P = 0.0037$ and **E)** uKIM-1 and ratio uKIM-1 was 0.125 (Z statistic = 2.524), $P = 0.0116$.

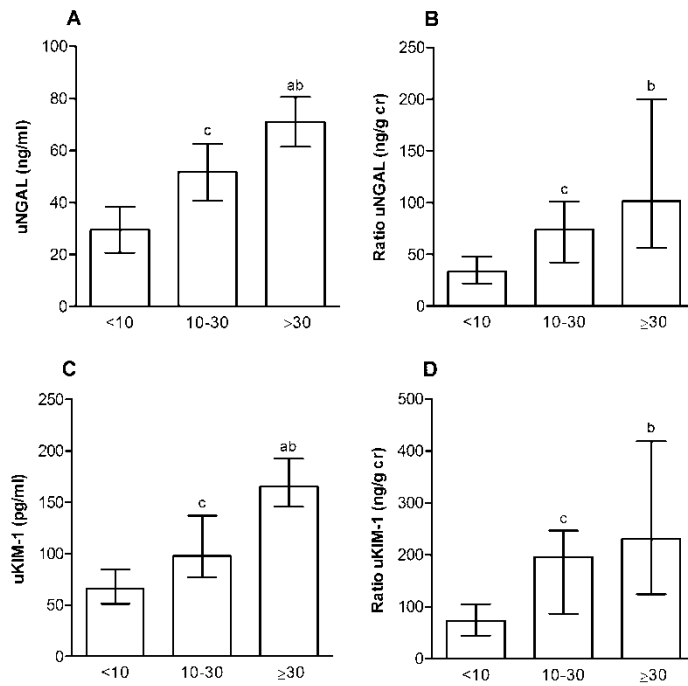


Figure 4. Levels of tubular markers, KIM-1 and NGAL, stratified at different concentrations of UAE and express in absolute and ratio values. ^a $P \leq 0.05$, UAE ≥ 30 mg/g cr vs UAE 10-30mg/g cr; ^b $P \leq 0.05$, UAE ≥ 30 mg/g cre vs UAE < 10 mg/g cr; ^c $P \leq 0.05$, UAE 10-30 mg/g cr vs UAE < 10 mg/g cr.

4.3 ARTIGO CIENTÍFICO II

Assessment of urinary γ -glutamyltransferase in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration

José Antonio M. De Carvalho, Guilherme V. Bochi, Manuela B. Sangoi, Rafael N. Moresco

DOI:10.1016/j.cca.2011.12.016

Publicado no Periódico: ***Clinica Chimica Acta***



Letter to the Editor

Assessment of urinary γ -glutamyltransferase in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration

Dear editor,

Glomerular hyperfiltration is defined as a glomerular filtration rate (GFR) >140 ml/min per 1.73 m² body surface area, and it is found in early diabetes and is associated with a poor prognosis with respect to the development of diabetic kidney disease [1]. Hyperfiltration is also present in uncontrolled diabetes, and has been shown to disappear when insulin treatment is followed strictly, but it may persist in insulin-treated patients [2]. Enzymes in urine are highly sensitive markers of renal tubular damage, and previous studies have demonstrated that determination of enzymuria could facilitate early detection of diabetic nephropathy [3,4]. Recently our team showed that urinary γ -glutamyltransferase (GGT) was higher in type 2 diabetic patients with nephropathy than those patients without nephropathy, and the urinary excretion of this enzyme may show renal changes before they are identified using conventional measurements, such as changes in GFR and serum creatinine [5]. Thus, the aim of this study was to assess the activity of urinary GGT in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration but without evidence of nephropathy.

This study included 74 volunteers enrolled in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The subjects were divided into two groups: type 2 diabetic patients without glomerular hyperfiltration ($n=67$) and type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration ($n=7$). Exclusion criteria consisted in nephropathy, chronic renal failure, renal surgery, renal transplantation, urinary tract diseases, the use of nephrotoxic drugs, malignant disease, infectious disease and liver disease. All eligible subjects provided informed written consent, and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the local research ethics committee (registration number: 23081-018849/2007-67). 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 and tubes with no anticoagulants. All patients also collected an early morning urine sample. The results of urinary albumin were expressed as milligrams of albumin per gram of creatinine as a tool to match the levels of albumin in accordance with the concentration of urine [6]. Specimens were routinely centrifuged at $2500\times g$ for 15 min. Plasma was used to measure the levels of fasting glucose, while the serum was used to assess the levels of fructosamine, creatinine, albumin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and GGT. Urine was used to measure the levels of creatinine, albumin and GGT. All measurements were performed using standard methods on a Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) automated analyzer. Glomerular filtration rate was estimated by the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) equation [7]. The continuous data were summarized as mean and standard deviation (SD), and comparisons between groups were performed with Student's *t* test. The categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups

were performed with Chi-square test. $P<0.05$ was considered statistically significant.

Baseline characteristics and biochemical parameters of the study participants are summarized in Table 1. Urinary GGT levels were significantly higher in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration than those patients without glomerular hyperfiltration, although a similar urinary albumin was observed in the groups. No significant differences were observed for fasting glucose, fructosamine, AST, ALT, GGT, and serum albumin. Thyroid hormones influence glomerular hyperfiltration, and both hypothyroidism and hyperthyroidism were associated with clinically important alterations in kidney function [8]. In this study none of the patients presented hyperthyroidism, but some patients presented hypothyroidism. However, no significant differences were observed between type 2 diabetes patients without glomerular hyperfiltration and with glomerular hyperfiltration (19.4% versus 14.3%, $P=0.742$).

Although observed in a small sample, these data show an increase of urinary GGT levels in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration, which could contribute for early detection of diabetic kidney disease. Diabetic nephropathy (DN) is characterized by a series of ultra structural changes in all renal compartments. The changes include basement membrane thickening, glomerular and tubular hypertrophy, mesangial expansion, glomerulosclerosis and tubule interstitial fibrosis. Whilst most attention has focused on glomerular changes, it is now increasingly recognized that tubules play an important role in the pathogenesis of DN [3]. Previous studies have demonstrated that enzymuria can detect tubular injury [4,9,10], which is believed to be an early event in the pathophysiologic process of clinical DN. To our knowledge there are no reports available about the association between urinary GGT and glomerular hyperfiltration, and neither if aggressive treatment is associated with kinetic changes in urinary GGT. In our study, due to similarity of therapeutic profile among the groups, it was not possible to assess the impact of treatment on the glomerular hyperfiltration, as well as on urinary activity of GGT.

Glomerular hyperfiltration is associated with a poor prognosis with respect to the development of diabetic kidney disease [1]. In addition, some studies support the evidence that diabetic hyperfiltration results from a fall in proximal tubular hydrostatic pressure due to increased proximal tubular fluid reabsorption [2,11]. Although the glomerular hyperfiltration is generally present in uncontrolled diabetes, and has been shown to disappear when insulin treatment is followed strictly, it is known that it may also persist in insulin-treated patients [2]. In this study, urinary GGT activity was higher in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration in comparison with those diabetics without glomerular hyperfiltration. Thus, we speculate that urinary GGT may show proximal tubular hydrostatic pressure changes before they are identified using other measurements. Besides, an increased excretion of GGT implies injury to the brush border membrane with loss of microvillous structure [12,13]. Enzymes in urine are highly sensitive markers of renal tubular damage because of their high molecular weight, they are not filtered through the glomerulus but originate in the renal tubular cells, and are excreted in urine [9,14]. Although little is known about the correlation of hyperfiltration and the renal damage

Table 1
Baseline characteristics and biochemical parameters of the study patients.

	Type 2 diabetes without glomerular hyperfiltration	Type 2 diabetes with glomerular hyperfiltration
Age (years)	61.0 ± 11.0	64.0 ± 6.6
Male (%)	26.9	57.1
BMI (kg/m ²)	29.4 ± 4.8	28.8 ± 5.6
Hypertension (%)	94.0	85.7
Diabetes duration (years)	11.6 ± 9.2	9.1 ± 4.7
Insulin (%)	22.4	28.6
Oral hypoglycemic agents (%)	47.8	57.1
Insulin + oral hypoglycemic agents (%)	14.9	14.3
Fasting glucose (mmol/l)	7.9 ± 3.4	6.5 ± 2.8
Fructosamine (μmol/l)	323.3 ± 112.6	282.8 ± 61.8
GFR (ml/min/1.73 m ²)	103.4 ± 22.2	193.0 ± 60.8**
Creatinine (μmol/l)	74.1 ± 21.8	45.7 ± 8.6**
AST (U/l)	25.7 ± 12.0	22.5 ± 3.5
ALT (U/l)	28.4 ± 11.9	21.0 ± 7.1
GGT (U/l)	28.2 ± 19.6	32.0 ± 18.4
Serum albumin (g/l)	36.3 ± 2.2	38.8 ± 1.6
Urinary albumin (mg/g creatinine)	4.9 ± 6.9	3.3 ± 6.1
Urinary GGT (U/g creatinine)	34.5 ± 15.7	48.7 ± 15.1*

Data are presented as mean ± SD or percentages. **P*<0.05 and ***P*<0.01.

biomarkers as well as if glomerular hyperfiltration itself results in functional and structural impairment of the kidney, we speculate that glomerular hyperfiltration is associated with tubular injury, and the increase of urinary GGT levels in type 2 diabetic patients with glomerular hyperfiltration may be an indicator of tubular damage.

There are some limitations in the current study. First, the number of patients with glomerular hyperfiltration was small, which might bring uncertainty for the association of the tubular markers and glomerular hyperfiltration. Second, the significance of the present one cross sectional study should be confirmed with a longitudinal research. Despite the limitations of this study, we suggest that urinary GGT is associated with proximal tubular hydrostatic pressure changes during glomerular hyperfiltration, and the detection of this enzyme in random urine samples may be useful to identify patients with poor prognosis with respect to the development of diabetic kidney disease. However, further studies are required to confirm this hypothesis.

References

- [1] Mogensen CE. Twelve shifting paradigms in diabetic renal disease and hypertension. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;82(Suppl 1):S2–9.
- [2] Frische S. Glomerular filtration rate in early diabetes: ongoing discussions of causes and mechanisms. *J Nephrol* 2011;24:537–40.
- [3] Magri CJ, Fava S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy. *Eur J Int Med* 2009;20:551–5.
- [4] Yaqoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, Bell GM. Tubular damage in microalbuminuric patients with primary glomerulonephritis and diabetic nephropathy. *Ren Fail* 1995;17:43–9.
- [5] De Carvalho JAM, Piva SJ, Hausen BS, et al. Assessment of urinary γ-glutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2011;412:1407–11.
- [6] Newman DJ, Pugia MJ, Lott JA, Wallace JF, Hiar A. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. *Clin Chim Acta* 2000;294:139–55.
- [7] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
- [8] Mariani LH, Berns JS. The renal manifestations of thyroid disease. *J Am Soc Nephrol* 2012;23:22–6.
- [9] Herget-Rosenthal S, Poppen D, Hüsing J, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* 2004;50:552–8.
- [10] Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:543–51.
- [11] Persson P, Hansell P, Palm F. Tubular reabsorption and diabetes-induced glomerular hyperfiltration. *Acta Physiol (Oxf)* 2010;200:3–10.
- [12] Singh DK, Winocour P, Farrington K. Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2008;4:216–26.
- [13] Scherberich JE. Urinary proteins of tubular origin: basic immunological and clinical aspects. *Am J Nephrol* 1990;10(Suppl 1):43–51.
- [14] Bagshaw SM, Langenberg C, Haase M, Wan L, May CN, Bellomo R. Urinary biomarkers in septic acute kidney injury. *Intensive Care Med* 2007;33:1285–96.

José A.M. De Carvalho
Guilherme V. Bochi
Manuela B. Sangoi
Rafael N. Moresco*

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

*Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 32208941; fax: +55 55 32208018. E-mail address: nmoresco@yahoo.com.br (Moresco).

28 November 2011

5. DISCUSSÃO

Presentemente o diagnóstico da ND é estabelecido através da determinação da uAlb. Os marcadores de lesão tubular vêm surgindo como excelente alternativa para identificação da nefropatia em pacientes com DM tipo 2 (MATHESON et al., 2010, TONOLO; CHERCI, 2014). Diversos estudos apontam que estes, podem ser ferramentas úteis no diagnóstico de uma série de doenças renais, como a insuficiência renal aguda, insuficiência renal crônica, azotemia pré-renal, pré-eclâmpsia e, especialmente, ND (MISHRA et al., 2005; BENETT et al., 2008; NICKOLAS et al., 2008; D'ANNA et al., 2008). No entanto alguns destes marcadores de lesão tubular ainda não foram totalmente avaliados em relação às suas características diagnósticas na ND, incluindo a NGAL, a KIM-1 e a NAP, bem como as enzimas urinárias, que já vêm demonstrando potencial diagnóstico, porém ainda não foram inseridas na rotina diagnóstica.

Nesta tese, avaliamos os biomarcadores urinários tubulares uNAG, uGGT, NAP, uNGAL e uKIM-1 em pacientes com DM tipo 2. Entre os principais resultados, pode-se destacar a associação dos biomarcadores urinários avaliados com a ND, tanto quando os resultados foram expressos em valores absolutos ou quando foram expressos na forma de razão com a uCr. Pela primeira vez, foi avaliada a capacidade diagnóstica, os pontos de corte, a sensibilidade e a especificidade dos marcadores NAP, uKIM-1 e uNGAL no diagnóstico da nefropatia em pacientes com DM tipo 2. Foram observadas diferenças na capacidade diagnóstica destes marcadores, quando comparados os valores corrigidos e não corrigidos pela uCr, uma vez que não existe consenso estabelecido de qual é a melhor forma de expressar estes marcadores (DELANAYE et al., 2011). Além disto, foi demonstrado que a estratificação dos pacientes de acordo com os níveis de EUA, mesmo na faixa considerada como normoalbuminúria pelos critérios atuais, os biomarcadores já apresentaram níveis aumentados, demonstrando a presença de lesão tubular antes mesmo do desenvolvimento da lesão glomerular. O conjunto desses resultados corrobora outros estudos que vêm demonstrando a precocidade dos marcadores tubulares em uma série de doenças renais, dentre elas a ND (NIELSEN et al., 2010; NAUTA et al., 2011; VAIDYA et al., 2011; KIM et al., 2012; FU et al., 2012).

Primeiramente, avaliamos o potencial diagnóstico do biomarcador uKIM-1 e suas características diagnósticas, bem como o efeito da correção pela uCr sobre estas características, conforme descrito na seção ARTIGO I. Os pacientes com DM tipo 2

foram divididos em dois grupos: com e sem nefropatia. Verificamos que os níveis de uAlb e uKIM-1, com e sem correção pela creatinina urinária foram significativamente maiores nos pacientes nefropatas. A análise da *receiver operating characteristic curve* (ROC) foi utilizada para determinar a capacidade diagnóstica da uKIM-1, com e sem correção pela creatinina urinária, em identificar a nefropatia em pacientes com DM tipo 2. A uKIM-1, expresso em valores absolutos, teve maior capacidade diagnóstica em identificar a ND do que a uKIM-1 corrigida pelos valores urinários de creatinina.

Sendo assim, verificamos que tanto a uKIM-1 expresso em valores absolutos, como a uKIM corrigida pela creatinina urinária possuem capacidade de identificar a ND. No entanto, uKIM-1 expresso em valores absolutos apresentou maior capacidade de discriminar a ND do que a razão uKIM-1 creatinina. Além disto, nós estabelecemos os melhores pontos de corte para uKIM-1, com e sem correção pelos níveis urinários de creatinina, conforme descrito na tabela 1 (ARTIGO I). Para o nosso conhecimento, este estudo é a primeira tentativa de analisar se a correção do uKIM-1 pela uCr afeta as características diagnósticas deste biomarcador na identificação da ND. Os biomarcadores urinários, tais como albumina e outros marcadores de lesão renal, são frequentemente reportados corrigidos pela concentração da uCr na forma de razão (WAIKAR et al., 2010). No entanto, não há padronização específica para a expressão dos resultados de uKIM-1 como valor absoluto ou como razão uKIM-1/uCr. Embora os valores absolutos de uKIM-1 foram diferentes entre os pacientes DM tipo 2 com nefropatia e pacientes com DM tipo 2 sem nefropatia, não houve diferenças significativas para a uCr. Assim, a uCr está em grande parte diretamente relacionada com a TFG. No entanto, 10% - 40% da uCr é consequência da secreção tubular ativa, com variação substancial entre os grupos demográficos (BOENIGER et al., 1993).

Também avaliamos os marcadores uNAP, uNAG, uGGT, uKIM-1 e uNGAL, conforme descrito na seção MANUSCRITO I. Os marcadores tubulares avaliados nesta etapa foram mais elevados nos pacientes com DM tipo 2 e nefropatia, tanto os marcadores expressos em valores absolutos ou como razão com a uCr. Apenas a uGGT quando expressa em valores absolutos não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Estes resultados corroboram diversos estudos que demonstraram que os marcadores de dano tubular estão elevados na urina de pacientes com DM tipo 2 e nefropatia (JUNG et al., 1988; NAVARRO et al., 2006; AMBADE et al., 2006; KARAKARANI-MOHAMMADI et al., 2007; DE CARVALHO et al., 2011; FU et al., 2011; KIM et al 2012; KIM et al., 2013). De fato, evidências recentes têm demonstrado a importância da detecção do dano tubular no diagnóstico

precoce da lesão renal, especialmente em pacientes DM com suspeita de ND (NIELSEN et al 2010, NAUTA et al, 2011, KIM et al, 2012, FU et al, 2012, VAIDYA et al, 2011, NIELSEN et al, 2010).

Quando analisamos as áreas sob as curvas ROC (AUROC), verificamos que todos os marcadores, com exceção da uGGT expressa em valores absolutos, têm a capacidade de identificar a ND. Quando avaliamos o fato de correção dos marcadores tubulares pela uCr, duas situações diferentes foram observadas:

- Primeiramente, verificando as características dos marcadores expressos em valores absolutos, uNGAL e uKIM-1 apresentaram melhor capacidade diagnóstica na identificação dos pacientes com ND, sendo as áreas obtidas > 0,9. Estes resultados corroboram estudos prévios, que verificaram AUROC semelhantes para os marcadores uNGAL e uKIM-1 (LACQUANITI et al., 2013; SHAO et al., 2014).

- Posteriormente, analisando os resultados dos marcadores expressos como razão pela uCr, a uNAG, a uGGT e a NAP tiveram melhor desempenho para identificar a ND, apresentando AUROCs de 0,683, 0,783 e 0,850, respectivamente. Os resultados obtidos para AUROC na identificação da ND, são semelhantes aos obtidos em observações anteriores (DE CARVALHO et al., 2011; ASSAL et al., 2013).

De maneira interessante, a correção da NAP pela uCr melhora suas características diagnósticas, o que é demonstrado por aumento da AUROC e, conseqüentemente sensibilidade e especificidade superiores. Contrariamente, os marcadores uNGAL e uKIM-1, quando corrigidos pela uCr apresentaram diminuição de suas AUROCs. A base teórica para o ajuste uCr é para compensar as variações nas concentrações de urina (assumindo uma taxa de excreção uCr constante), reduzindo assim a variação do biomarcador (HELMERSSON-KARLQVIST et al., 2013). No entanto, ainda não está claro se a correção dos biomarcadores urinários pela a creatinina é útil para o diagnóstico de algumas doenças renais (WAIKAR et al., 2010). Em particular, não se sabe se a normalização de biomarcadores urinários tubulares pela creatinina pode afetar a sua capacidade de diagnóstico na investigação da ND. Além disto, CONTI et al. (2009) propuseram que o ajuste dos valores de quaisquer marcadores tubulares pela uCr, especialmente em pacientes com insuficiência renal crônica ou aguda, mesmo moderada, pode ser inapropriado.

Para a avaliação do potencial de detecção precoce de lesão renal, foram selecionados os marcadores que apresentaram as melhores características diagnósticas (AUROC, sensibilidade e especificidade), uKIM-1 e uNGAL. Os pacientes foram estratificados em três grupos de acordo com EUA: uAlb < 10 mg/g

creatinina, uAlb 10 - 30 mg/g creatinina e uAlb > 30 mg/g creatinina. Cabe ressaltar que dois destes grupos estão dentro da faixa normoalbuminúrica, conforme os critérios atuais de classificação da ND. Analisando os dados obtidos para as determinações de uKIM-1 e uNGAL, tanto quando expressa em valores absolutos ou como *ratio*, verificou-se que os valores destes marcadores estavam elevados não somente no grupo com EUA > 30 mg/g creatinina, mas também no grupo de indivíduos com EUA de 10 - 30 mg/g creatinina. Estas observações comprovam o potencial destes biomarcadores na detecção precoce de dano renal, uma vez que seus valores estão aumentados mesmo antes da instalação da nefropatia. De fato, estes resultados estão de acordo com outros estudos que demonstraram elevação de marcadores tubulares em pacientes com EUA < 30 mg/g cr (uAlb normal), identificando a presença de dano tubular renal, sem elevação aparente de marcadores de lesão glomerular (FU et al., 2012; LACQUANITI et al., 2013, ASSAL et al., 2013; KIM et al., 2012; KIM et al., 2014).

Ainda em relação à atividade da uGGT, avaliamos o comportamento desta enzima nos pacientes com DM tipo 2 e hiperfiltração glomerular, mas sem sinais de ND. Para o nosso conhecimento, não há relatos disponíveis sobre a associação entre uGGT e hiperfiltração glomerular. A hiperfiltração glomerular está associada a prognóstico desfavorável quanto ao desenvolvimento de doença renal diabética (MORGENSEN, 2008). Neste estudo, a atividade da uGGT foi maior em pacientes com DM tipo 2 e hiperfiltração glomerular em comparação com os pacientes com DM tipo 2 sem hiperfiltração glomerular. Assim, especula-se que a atividade da uGGT pode estar relacionada a alterações de pressão hidrostática nos túbulos proximais, antes mesmo que estas possam ser identificadas por outros métodos. Embora a associação entre a hiperfiltração e os biomarcadores de dano renal seja pouco conhecida, haja vista que a própria hiperfiltração glomerular resulta em comprometimento estrutural e funcional do rim (PERSSON et al., 2010; FRISCHE et al., 2011), nós acreditamos que a hiperfiltração glomerular está associada com a lesão tubular e o aumento da atividade urinária da GGT em pacientes com DM tipo 2 e hiperfiltração glomerular pode ser um indicador de lesão tubular.

Finalmente, verificamos dentre os marcadores qual deles possui a melhor capacidade diagnóstica quando expressos em valores absolutos (uNGAL e uKIM-1) ou expressos na forma de razão com a uCr (NAP, uNAG e uGGT). Para isso, realizamos a comparação das curvas ROC (ENG, 2005), com posterior análise através da estatística Z (BEWIJK et al., 2004). Os resultados obtidos podem ser

observados na figura 7 (Anexo 2). Verificamos que uNGAL e uKIM-1 tiveram capacidade diagnóstica estatisticamente superior em relação aos outros biomarcadores, exceto para a comparação de NAP corrigida pela uCr e uKIM-1, conforme demonstrado na tabela 2 (Anexo 1). Além disto, cabe ressaltar que não houve diferença entre os marcadores uNGAL e uKIM-1 quando comparados entre si, o que demonstra haver equivalência na capacidade diagnóstica entre os marcadores.

6. CONCLUSÕES

- O marcador urinário tubular KIM-1, expresso tanto em valores absolutos quanto na forma de razão com a uCr, foi eficaz para a identificação da ND. No entanto, o ajuste de KIM-1 pela uCr reduziu a capacidade diagnóstica deste biomarcador;
- Os biomarcadores urinários avaliados apresentaram potencial no diagnóstico da nefropatia em pacientes com DM tipo 2, destacando a uKIM-1 e a uNGAL, que tiveram a melhor capacidade diagnóstica. Além disto, verificou-se que os marcadores uNGAL e uKIM-1 estavam elevados mesmo em indivíduos considerados normoalbuminúricos (EUA 10 - 30 mg/g Cr), demonstrando a detecção de lesão tubular precoce. Sendo assim, a avaliação destes marcadores pode representar importante ferramenta na prática clínica para o diagnóstico precoce e monitoramento da nefropatia em pacientes com DM tipo 2.
- A excreção urinária de enzimas tubulares (NAG e GGT), proteínas tubulares (KIM-1) ou proteínas relacionadas com a reabsorção tubular (NGAL) e NAP pode indicar a presença da lesão renal em estágio inicial, antes mesmo desta ser identificada por medidas convencionais, tais como alterações na TFG, creatinina sérica e anteriormente ao aparecimento de marcadores tradicionais de lesão glomerular, tais como uAlb;
- NAP mostrou boa capacidade diagnóstica na identificação de nefropatia em pacientes com DM tipo 2, demonstrando ser um marcador promissor na detecção precoce da ND. Além disso, cabe ressaltar sua facilidade de implantação na rotina clínica, devido às metodologias bem estabelecidas e padronizadas, aliadas ao baixo custo;
- Foi demonstrado que a correção pela uCr para os marcadores uNGAL e uKIM-1, diminui a sua capacidade diagnóstica. O oposto foi observado para a uNAG, a uGGT e a NAP, que apresentaram melhor desempenho quando expressos na forma de razão pela uCr. Desta forma, a correção dos marcadores urinários de origem tubular pela uCr precisa ser melhor avaliada, pois continua a ser bastante controversa. É necessário estabelecer quais marcadores e em que situações estes devem ser corrigidos pela uCr.

- Foi verificada associação entre a hiperfiltração glomerular e a lesão tubular, caracterizada pelo aumento da atividade da uGGT nos pacientes com DM tipo 2. Assim, a determinação da atividade da uGGT pode contribuir para o diagnóstico da ND em associação com outros marcadores, além de auxiliar na identificação do desenvolvimento do processo de lesão tubular em um estágio anterior ao desenvolvimento da ND.
- A comparação entre os marcadores utilizados no estudo, demonstrou que uKIM-1 e uNGAL (expressos em valores absolutos) possuem a melhor capacidade diagnóstica em relação aos demais marcadores. Além disto, quando comparados entre si, uKIM-1 e uNGAL, demonstraram ter a capacidade diagnóstica equivalente.
- Finalmente, verificamos que a NAP corrigida pela uCr apresentou capacidade diagnóstica equivalente ao uKIM-1 (expresso em valores absolutos). Assim, a NAP pode ser uma nova ferramenta promissora na investigação da ND.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADA, American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2008. **Diabetes Care**, v. 31, S. 1, p. S12–S54, 2008.

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

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

ADA, American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, v. 37, p. S14-S80, 2014.

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

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

ARAKI, S., HANEDA, M., KOYA, D. et al. Association between urinary type IV collagen level and deterioration of renal function in type 2 diabetic patients without overt proteinuria. **Diabetes Care**, v.33, p. 1805–1810, 2010.

ASSAL, H. S., TAWFEEK, S., RASHEED, E. A. et al. Serum cystatin C and tubular urinary enzymes as biomarkers of renal dysfunction in type 2 diabetes mellitus. **Clin Med Insights Endocrinol Diabetes**, v. 6, p. 7-13, 2013.

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

BANGSTAD, H. J., SELJEFLOT, I., BERG, T.J. et al. Renal tubulointerstitial expansion is associated with endothelial dysfunction and inflammation in type 1 diabetes. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 69, p. 138–144, 2009.

BANU, N., HARA, H., OKAMURA, M. et al. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage. **Diabetes Res Clin Pract**, v.29, p. 57–67, 1995.

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

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

- BAZZI, C., PETRINI, C., RIZZA, V. et al. Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, p. 1890–1896, 2002.
- BENNETT, M., DENT, C. L., MA, Q. et al. Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.3, p. 665–573, 2008.
- BERNARD, A. M., VYSKOCIL, A. A., MAHIEU, P. et al. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. **Clin Chem**, v. 33, p. 775–779, 1987.
- BIRN, H., CHRISTENSEN, E. I. Renal albumin absorption in physiology and pathology. **Kidney Int**, v. 69(3), p. 440-449, 2006.
- BOENIGER, M. F., LOWRY, L. K., ROSENBERG, J. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. **Am Ind Hyg Assoc J**, v. 54, p. 615 – 627, 1993.
- BRAHIMI, M., LE CLESIAU, H., OUAZEN, Z. et al. Microalbuminuria, a marker of artery rigidity and cardiac dysfunction. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 100(8), p. 673–676, 2007.
- BOLIGNANO, D., DONATO, V., COPPOLINO, G. et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of kidney damage. **Am J Kidney Dis**, v. 52, p. 595–605, 2008.
- BRUNO, G., MERLETTI, F., BARGERRO, G. et al. Estimated glomerular filtration rate, albuminuria and mortality in type 2 diabetes: the Casale Monferrato study. **Diabetologia**, v.50, p. 941–948, 2007.
- BULUM, T., KOLARI, B., PRKA, I. et al. Hyperfiltration in Normoalbuminuric Type 1 Diabetic Patients: Relationship with Urinary Albumin Excretion Rate. **Coll. Antropol.**, v. 37 (2) p. 471–476, 2013.
- CARAMORI, M. L., GROSS, J. L., PECIS, M., et al. Glomerular filtration rate, urinary albumin excretion rate, and blood pressure changes in normoalbuminuric normotensive type 1 diabetic patients: an 8-year follow-up study. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1512–1516, 1999.
- CHARLTON, J. R., PORTILLA, D., OKUSA, M.D. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. **Nephrol Dial Transplant**, v. 29(7), p. 1301-1311, 2014.
- CHATTAWAY, F.W., HULLIN, R.P., ODDS, F.C. The variability of creatinine excretion in normal subjects, mental patients and pregnant women. **Clin Chim Acta**, v. 26, p. 567–576, 1969.
- CHERNEY, D. Z., MILLER, J. A., SCHOLEY, J. W. et al. The effect of cyclooxygenase-2 inhibition on renal hemodynamic function in humans with type 1 diabetes. **Diabetes**, v.57, p. 688–695, 2008.

- CHERNEY, D. Z., REICH, H. N., JIANG, S. et al. Hyperfiltration and effect of nitric oxide inhibition on renal and endothelial function in humans with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 1; 303(7), p. R710-R718, 2012.
- CHEUNG, C. K. et al. Urinary excretion of albumin and enzymes in non-insulin-dependent Chinese diabetics. **Clin Nephrol**, v. 34, n. 3, p. 125-130, 1990.
- CIECIURA, T., URBANOWICZ, A., PERKOWSKA-PTASINSKA, A. et al. Tubular and glomerular proteinuria in diagnosing chronic allograft nephropathy with relevance to the degree of urinary albumin excretion. **Transplant Proc**, v. 37(2), p. 987–990, 2005.
- COHEN-BUCAY, A., VISWANATHAN, G. Urinary markers of glomerular injury in diabetic nephropathy. **Int J Nephrol**, 2012, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/146987>.
- CONTI, M., MOUTEREAU, S., ESMILAIRE, L., et al. Should kidney tubular markers be adjusted for urine creatinine? The example of urinary cystatin C. *Clin Chem Lab Med*, v. 47, n. 12, p. 1553-1556, 2009.
- D'ANNA, R., BAVIERA, G., GIORDANO, D. et al. Second trimester neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a potential prediagnostic marker of preeclampsia. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.87, p. 1370–1373, 2008.
- DE CARVALHO, J. A. M., PIVA, S. J., HAUSEN, B. S. et al. Assessment of urinary gammaglutamyltransferase and alkaline phosphatase for diagnosis of diabetic nephropathy. **Clin Chim Acta**, v. 412, p.1407–1411, 2011.
- de JONG, P. E., GANSEVOORT, R.T. Albuminuria in non-primary renal disease: risk marker rather than risk factor. **Nephrol Dial Transplant**, v. 25, p. 656–658, 2010.
- DELANAYE, P., ROZET, E., KRZESINKI, J. M. et al. Urinary NGAL measurement: biological variation and ratio to creatinine. **Clin Chim Acta**, v. 412(3-4), p. 390, 2011.
- DICKSON, L. E., WAGNER, M. C., SANDOVAL, R. M. et al. The proximal tubule and albuminuria: really! **JAmSocNephrol**, v. 25, p. 443–453, 2014.
- DRONAVALLI, S., DUKA, I., BAKRIS, G. L. The pathogenesis of diabetic nephropathy. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, v.4, p. 444–452, 2008.
- DYSON, E.H., WILL, E.J., DAVISON, A.M., et al. Use of the urinary protein creatinine index to assess proteinuria in renal transplant patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 7, p. 450–452, 1992.
- ELMARAKBY, A. A., SULLIVAN, J. C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **Cardiovasc Ther**, v. 30, p. 49–59, 2012.
- ENDRE, Z. H., WALKER, R. J., PICKERING, J. W. 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.

- ENG, J. Receiver operating characteristic analysis: a primer. **J. Acad Radiol.** v. 12(7), p. 909-916, 2005.
- .FELEHGARI, V., RAHIMI, Z., MOZAFARI, H. et al. ACE gene polymorphism and serum ACE activity in Iranians type II diabetic patients with macroalbuminuria. **Mol Cell Biochem**, v. 346, p. 23–30, 2011.
- FLANDROIS, C., GRAVAGNA, B., MAIRE, I. et al. Enzymuria. **Ann Biol Clin**, v. 44, p. 486–490, 1986.
- FLYNN, F. V. Assessment of renal function: selected developments. **Clin. Biochem.** v. 23, p. 49-54, 1990.
- FRISCHE, S. Glomerular filtration rate in early diabetes: ongoing discussions of causes and mechanisms. **J Nephrol.** v. 24, p. 537-540, 2011.
- FU, W. J., XIONG, S. L., FANG, Y. G. et al. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study. **Endocrine**, v. 41, p. 82–88, 2012.
- FU, W., BAO-LIANG, L., SHAO-BO, W. et al. Changes of the tubular markers in type 2 diabetes mellitus with glomerular hyperfiltration. **Diabetes resarch and clinical pratic**, v. 95, p. 105-109, 2012 (B).
- GOSMANOV, A. R., BARRY, M. W., GOSMANOVA, E. O. Diagnosis ant Treatment of Diabetic Kidney Disease. **The American Journal of the medical Sciences**, v. 347, p.v406-13, 2014.
- GROSS, J. L. et al. Diagnóstico e classificação do diabetes mellito e tratamento do diabetes melito tipo 2: recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Arq. bras. endocrinol. metab**, v. 44, s.4, p. S8-S35, 2000.
- GROSS, J. L., DE AZEVEDO, M. J., SILVEIRO, S.P. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v.28, p.176-188, 2005.
- GUDER, W. G.; HOFMAN, W. Markers for the diagnosis and monitoring of renal tubular lesions. **Clin Nephrol**, v.38, s1, p. S3-S7, 1992.
- HALIMI, J. M., MATTHIAS, B., AL-NAJJAR, A. et al. Respective predictive role of urinary albumin excretion and nonalbumin proteinuria on graft loss and death in renal transplant recipients. **Am J Transplant**, v. 7(12), p. 2775–2781, 2007.
- HAN, W. K., BAILLY, V., ABICHANDANI, R. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney Int**,v.62 ,p. 237–244, 2002.
- HELLEMONS, M. E., KERSCHBAUM, J., BAKKER, S. J., et al. Validity of biomarkers predicting onset or progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes: a systematic review. **Diabet Med**, v. 29, p. 567–577, 2012.

HELMERSSON-KARLQVIST, J., ARNLOV, J., LARSSON, A. Day-to-day variation of urinary NGAL and ational for creatinine correction. **Clin Biochem**, v. 46, p. 70 – 72, 2013.

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

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

HOSOJIMA, H., MIYAUCHI, E., MORIMOTO, S. Urinary excretion of angiotensin-converting enzyme in NIDDM patients with nephropathy. **Diabetes Care**, v. 12, p. 580–582, 1989.

HSIAO, P. H., TSAI, W. S., TSAI, W. Y. et al. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Nephrol**, v. 16, p. 300–303, 1996.

ICHIMURA, T., BONVENTRE, J. V., BAILLY, V. 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.

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

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

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

JUNG, K., BURCHARDT, U. Urinary enzymes in research and in clinical medicine. Report on a symposium of the Humboldt-Universitat Berlin and the Bezirkskrankenhaus Frankfurt/Oder in Frankfurt/Oder, 22–25 April 1987. **J Clin Chem Clin Biochem**, v. 7 (25), p. 823–288, 1987.

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

KADO, S., AOKI, A., WADA, S. et al. Urinary type IV collagen as amarker for early diabetic nephropathy. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 31, p. 103–108, 1996.

KAEFER, M., PIVA, S. J., DE CARVALHO, J. A. M. et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Clin Biochem**, v. 43, p. 450-54, 2010.

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

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

KAZUMI, T., HOZUMI, T., ISHIDA, Y., et al. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, p. 1176–1180, 1999.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney Int Suppl**, v. 3, p. 1 – 150, 2013.

KIM, S. S., SONG, S. H., KIM, I. J. et al. Clinical implication of urinary tubular markers in the early stage of nephropathy with type 2 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 97, p. 251–257, 2012.

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

KIM, S. S., SONG, S. H., KIM, I. J., et al. Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab Res Rev**. 2014

KORDONOURI, O., HARTMANN, R., MULLER, C. et al. Predictive value of tubular markers for the development of microalbuminuria in adolescents with diabetes. **Horm Res**, v. 50 (S1), p. 23–27, 1998.

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

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

LACQUANITI, A., DONATO, V., PINTAUDI, B. et al. "Normoalbuminuric" diabetic nephropathy: tubular damage and NGAL. **Acta Diabetol**, v. 50, n. 6, p. 935-942, 2013.

LAMBERS HEERSPINK, H. J., BRINKMAN, J. W., BAKKER, S. J., et al. Update on microalbuminuria as a biomarker in renal and cardiovascular disease. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. V.15(6), p. 631-636, 2006.

LANGHAM, R. G., KELLY, D. J., COX, A. J. et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. **Diabetologia**, v. 45(11), p. 1572–1576, 2002.

LAPSLEY, M., FLYNN, F. V., SANSOM, P. A. Beta 2-glycoprotein-1 (apolipoprotein H) excretion and renal tubular malfunction in diabetic patients without clinical proteinuria. **J Clin Pathol**, v.46, p. 465–469, 1993.

LEVEY, A.S., BERG, R.L., GASSMAN, J.J., et al. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study Group. **Kidney Int Suppl**, v. 27, p. S73–S80, 1989.

LIANGOS, O., PERIANAYAGAM, M. C., VAIDYA, V. S. et al. Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 904–912, 2007.

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

MAGEE, G. M., BILOUS, R. W., CARDWELL, C. R. et al. Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. **Diabetologia**, 52 (4), p. 691-697, 2009.

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

MCCORMICK, C. P., KONEN, J. C., SHIHABI, Z. K. Microtransferrinuria and microalbuminuria. I. In the diabetic human. In: Zacharieva S, Wippermann M, Muchá I, Andonova K, Jankova G, editors. **Clin Physiol Biochem**, v.8, p. 53–58, 1990.

MEMISOGULLARI, R., BAKAN, E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v. 18, p. 193–197, 2004.

MERLOT, A.M., KALINOWSKI, D.S., RICHARDSON, D.R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. **Front Physiol**, v. 5, p. 299, 2014.

MITCH, W.E., COLLIER, V.U., WALSER, M. Creatinine metabolism in chronic renal failure. **Clin Sci (Lond)**, v. 58, p. 327–335, 1980.

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

MISHRA, J., MA, Q., KELLY, C. et al. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. **Pediatr Nephrol**, v. 21, p. 856–863, 2006.

MITSNEFES, M. M., KATHMAN, T. S., MISHRA, J. et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. **Pediatr Nephrol**, v. 22, p. 101–108, 2007.

MOCAN, Z., EREM, C., YILDIRIM, M. et al. Urinary beta 2-microglobulin levels and urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase enzyme activities in early diagnosis of non-insulin-dependent diabetes mellitus nephropathy. **Diabetes Res**, v. 26, p. 101–107, 1994.

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

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

MOORE, E., BELLOMO, R., NICHOL, A. "Biomarkers of acute kidney injury in anesthesia, intensive care and major surgery: from the bench to clinical research to clinical practice," **Minerva Anestesiologica**, vol. 76, n. 6, p. 425–440, 2010.

MORGENSEN, C. E. Glomerular Hyperfiltration in Human Diabetes. **Diabetes Care**, 17 (7), p. 770-775, 1994.

MORGENSEN, C. E. Twelve shifting paradigms in diabetic renal disease and hypertension. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 82(Suppl 1), p. S2–59, 2008.

MORGENSTERN, B.Z., BUTANI, L., WOLLAN, P., et al. Validity of protein-osmolality versus protein-creatinine ratios in the estimation of quantitative proteinuria from random samples of urine in children. **Am J Kidney Dis**, v. 41, p. 760–766, 2003.

MORESCO, R. N., SANGOI, M. B., CARVALHO, J. A. M. , TATSCH, E. , BOCHI, G. V. Diabetic nephropathy: traditional to proteomic markers. **Clinica Chimica Acta**, v. 421, p. 17-30, 2013.

MORITA, M., UCHIGATA, Y., HANAI, K. et al. Association of urinary type IV collagen with GFR decline in young patients with type 1 diabetes. **Am J Kidney Dis**, v. 58, p. 915–920, 2011.

MURRAY PT, MEHTA RL, SHAW A et al. Current use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney Int*, v 85 , n. 3, p. 513-521, 2014..

NAJAFIAN, B., MAUER, M. Progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 83, p. 1–8, 2009.

NARITA, T., SASAKI, H., HOSOBATA, M. et al. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.27, p. 1176–1181, 2004.

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

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

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

NEWMAN, D.J., PUGIA, M.J., LOTT, J.A., et al. Urinary protein and albumin excretion corrected by creatinine and specific gravity. **Clin Chim Acta**, v. 294, p. 139–155, 2000.

NICKOLAS, T. L., O'ROURKE, M. J., YANG, J. et al. Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. **Ann Intern Med.**, v. 148 (11), p. 810-819, 2008.

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

NIELSEN, S. E., SCHJOEDT, K. J., ASTRUP, A. S. 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. **Diabet Med**, v. 27, p. 1144–1150, 2010.

NIELSEN, S. E., ANDERSEN, S., ZDUNEK, D. 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.

NIELSEN, S. E., REINHARD, H., ZDUNEK, D. 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.

O'DONNELL, M. J., MARTIN, P., FLORKOWSKI, C. M. et al. Urinary transferrin excretion in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabet Med**, v. 8, p. 657–661, 1991.

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.

PANCHENKO, E.L. et al. The differential diagnostic value of urinary enzyme and amino acid excretion in children with nephrotic syndrome. **Pediatr Nephro**, v. 82, n. 2, p. 142-147, 1994.

PATARI, A., FORSBLOM, C., HAVANA, M. et al. Nephrouria in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 52(12), p. 2969–2974, 2003.

PERSSON, P., HANSELL, P., PALM, F. Tubular reabsorption and diabetes- induced glomerular hyperfiltration. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 200, p. 3-10, 2010.

PIWOWAR, A. et al. Urinary activities of cathepsin B, N-acetyl- β -D-glucosaminidase, and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus. **Med Sci Monit**, v. 12, n.5, p. CR210–CR214, 2006.

POLKINGHORNE, K.R. Detection and measurement of urinary protein. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 15, p. 625–630, 2006.

PRICE, R. G. The role of NAG (N-acetyl- β -D-glucosaminidase) in the diagnosis of kidney disease including the monitoring of nephrotoxicity. **Clin Nephrol**, v.38, S1, p. S14-S19, 1992.

PRICE, C.P., NEWALL, R.G., BOYD, J.C. Use of protein: creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. **Clin Chem**, v. 51, p. 1577–1586, 2005.

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

RALIB, A. M., PICKERING, J. W., SHAW, G. M. et al. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 23, p. 322–333, 2012.

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

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

RICCI, Z., RONCO, C. Today's approach to the critically ill patient with acute kidney injury. **Blood Purif**, v. 27, p. 127–134, 2009.

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

RUSSO, L. M., SANDOVAL, R. M., CAMPOS, S. B. et al. Impaired tubular uptake explains albuminuria in early diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 489–494, 2009.

SAKATSUME, M., KUBOTA, R., OGAWA, A. et al. Rapid and sensitive electrophoresis of urinary protein clearly reveals the pathophysiological feature of renal diseases. **Nephrology (Carlton)**, v. 12(2), p. 191–196, 2007.

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

SEKIZUKA, K., TOMINO, Y., SEI, C. et al. Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. **Nephron**, v. 68, p. 284–285, 1994.

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

SILBERNAGL, S., LANG, F. Color Atlas of Pathophysiology. Stuttgart; New York: Thieme, 2010.

SHAO, X., TIAN, L., XU, W. et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e84131, 2014.

SHARMA, K., JIN, Y., GUO, J. et al. Neutralization of TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 45, p. 522–530, 1996.

SHIVANANDA NAYAK, B., DUNCAN, H., LALLOO, S. et al. Correlation of microalbumin and sialic acid with anthropometric variables in type 2 diabetic patients with and without nephropathy. **Vasc Health Risk Manag**, v. 4(1), p. 243–247, 2008.

SOCHETT, E. B., CHERNEY, D. Z., CURTIS, J. R. et al. Impact of renin angiotensin system modulation on the hyperfiltration state in type 1 diabetes. **J Am Soc Nephrol**, v.17, p. 1703–1709, 2006.

STEINKE, J. M., SINAIKO, A. R., KRAMER, M. S. 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, p. 2164–2171, 2005.

STEPHENSON, J. M., FULLER, J. H. Microalbuminuria is not rare before 5 years of IDDM. EURODIAB IDDM Complications Study Group and the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes Study Group. **J Diabetes Complications**, v. 8(3), p. 166-173, 1994.

SUAREZ, M. L. G., THOMAS, D. B., BARISONI, L. et al. Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy? **World J Diabetes**, v. 4(6), p. 245-255, 2013.

TAKIZAWA, H., SATOH, T., KURUSU, A. et al. Increase of urinary type IV collagen in normoalbuminuric patients with impaired glucose tolerance. **Nephron**, v. 79, p. 474–475, 1998.

TELCI, A., CAKATAY, U., KAYALI, R. et al. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. **Horm Metab Res**, v. 32, p. 40–43, 2000.

TONOLO, G., CHERCHI, S. Tubulointerstitial disease in diabetic nephropathy. **Int J Nephrol Renovasc Dis**. v. 21(7), p. 107-115, 2014.

TSIGOU, E., PSALIDA, V. DEMPONERAS, C. et al. Role of new biomarkers: functional and structural damage. **Crit Care Res Pract.**, v. 36. p. 1078. 2013.

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

VAIDYA, V. S., WAIKAR, S. S., FERGUSON, M. A. et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. **Clin Transl Sci**, v. 1, p. 200–208, 2008. **(A)**

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

VAIDYA, V. S., OZER, J. S., DIETERLE, F. et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nat Biotechnol**, v. 28, p. 478–85, 2010.

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

van TIMMEREN, M. M., van DEN HEUVEL, M. C., BAILLY, V. et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. **J Pathol**, v. 212, p. 209–217 2007.

- VARGHESE, S. A., POWELL T. B., BUDISAVLJEVIC, M. N. et al. Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, p. 913–922, 2007.
- VINOD, P.B. Pathophysiology of diabetic nephropathy. **Clinical Queries: Nephrology**, v. 102, p. 121–126, 2012.
- 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., SABBISSETTI, V. S., BONVENTRE, J. V. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. **Kidney Int**, v.78, p. 486 – 494, 2010.
- WATTS, G. F., VLITOS, M. A., MORRIS, R. W. et al. Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase excretion in insulin-dependent diabetes mellitus: relation to microalbuminuria, retinopathy and glycaemic control. **Diabete Metab**, v.14, p. 653–658, 1988.
- WHITE, K. E., BILOUS, R. W. Type 2 diabetic patients with nephropathy show structural-functional relationships that are similar to type 1 disease. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, p. 1667–1673, 2000.
- WESTHUYZEN, J. et al. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. **Nephrol Dial Transplant**, v. 18, p. 543-551, 2003.
- WISEMAN, M. J., VIBERTI, G. C., KEEN, H. Threshold effect of plasma glucose in the glomerular hyperfiltration of diabetes. **Nephron.**, v. 38(4), p. 257–260, 1984.
- WORTHLEY, D. L., HARVEY, N. T., HILL, N. L. et al. Urinary transferrin and albumin concentrations in patients with type 1 diabetes and normal controls: the search for the first protein lost. **Clin Biochem**, v.34:83–5, 2001.
- YAMANOUCHI, T., KAWASAKI, T., YOSHIMURA, T. et al. Relationship between serum 1,5-anhydroglucitol and urinary excretion of N-acetylglucosaminidase and albumin determined at onset of NIDDM with 3-year follow-up. **Diabetes Care**, v. 21, p. 619–624, 1998.
- ZEISBERG, M., BONNER, G., MAESHIMA, Y. et al. Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial–mesenchymal transdifferentiation. **Am J Pathol**, v. 159, p. 1313–1321, 2001.
- ZHANG, H. F., ONG, W. Y., LEONG, S. K. et al. Species differences in the localization of gamma-glutamyl transpeptidase immunopositive cells at the blood-brain interface. **J. Hirnforsch.** v. 38, p. 323-330, 1997.
- ZIYADEH, F. N. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β 1 as the major mediator. **J Am Soc Nephrol**, v. 5, s. 1, p. S55-S57, 2004.

8. ANEXOS

ANEXO I

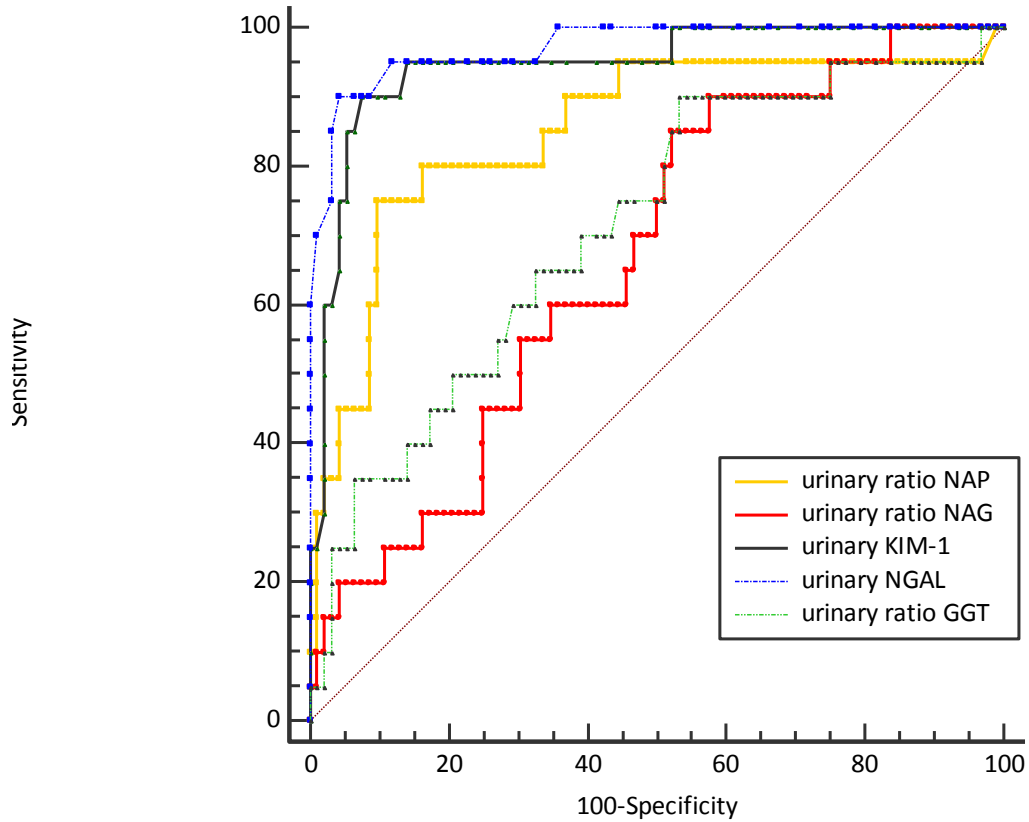


Figura 7 – Curvas ROC dos biomarcadores com melhor desempenho diagnóstico na detecção da ND expressos em valores absolutos (NGAL e KIM-1) e na forma de ratio (NAG, GGT e NAP).

ANEXO II

Tabela 2 – Comparação entre as AUROCs dos marcadores com melhor desempenho na detedção da ND expressos em valores absolutos (uNGAL e uKIM-1) e na forma de ratio (uNAG, uGGT e NAP).

	Diferença entre as AUROCS	Estatística Z	<i>P</i> < 0,05
Ratio uNAG vs ratio uGGT	0,100	0,610	0,5422
Ratio uNAG vs uNGAL	0,290	4,914	< 0,0001
Ratio uNAG vs uKIM-1	0,264	4,250	< 0,0001
Ratio NAP vs uNAG	0,167	2,558	0,0105
Ratio NAP vs uNGAL	0,123	1,980	0,0478
Ratio NAP vs uGGT	0,067	2,157	0,0310
Ratio NAP vs uKIM-1	0,097	1,432	0,1522
uNGAL vs ratio uGGT	0,190	3,940	0,0001
uKIM-1 vs ratio uGGT	0,164	3,334	0,0009
uNGAL vs uKIM-1	0,026	1,489	0,1365

Ratio uNAG: N-β-acetil-glucosaminidase (U/mg Cr); ratio uGGT: gama-glutamyltransferase (U/mg Cr); ratio NAP: *Nonalbumin proteinuria* (mg/g Cr); NGAL: *neutrophil gelatinase associated lipocalin* (ng/mL) e uKIM-1: *kidney molecule injury -1* (pg/ml).