

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA

**Contribuições ao estudo da nefropatia diabética: estudo evolutivo da
função renal em pacientes proteinúricos; efeito da qualidade da proteína
na função renal de pacientes microalbuminúricos; atividade do sistema
de contratransporte de sódio-lítio**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica
para a obtenção do Grau de Doutor.

Autor: Rogério Friedman

Orientador: Prof. Jorge L. Gross

Co-orientador: Prof. GianCarlo Viberti (Londres)

Porto Alegre, 16 de janeiro de 1995

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado em regime de "Doutorado sanduíche", em colaboração com o Guy's Hospital, da Universidade de Londres que, na pessoa do Professor GianCarlo Viberti, nos deu acesso a recursos até hoje não disponíveis em nosso meio. Muito aprendi em termos de tecnologia, mas o mais importante foi o aprendizado filosófico, de posturas científicas e éticas numa sociedade talvez mais madura que a nossa. O bem mais valioso que trago desta experiência no exterior não são os novos métodos, mas as novas amizades.

Estas amizades vêm se juntar a uma que vem crescendo há 15 anos: Dr. Jorge L. Gross. Mais do que um orientador acadêmico, ele soube perceber, por tê-las vivido, as dificuldades que o desenvolver de um trabalho deste porte impõem ao indivíduo e teve a sensibilidade de oferecer apoio e afeto nas horas mais difíceis. Durante este período, o vínculo acadêmico se transformou em amizade sólida. Esta conquista por si só tornou este trabalho mais valioso.

Agradeço à CAPES e ao CNPq por tornarem este trabalho possível com seu apoio financeiro.

Minha família foi a origem de minhas crenças. Com eles aprendi a ser um melhor ser humano e a dar valor ao afeto, à honestidade, trabalho pessoal e criatividade. Este trabalho nos manteve fisicamente afastados por longo tempo, mas sempre estivemos próximos em espírito e pensamento. O apoio que recebi foi tão natural que passaria despercebido, não fosse tão vital para tudo o que conquistei.

Minha esposa foi a chave de tudo. Sem ela, este sonho não teria se realizado. Amor e gratidão não podem ser descritos em poucas linhas. Ela sabe...

... *That we find out the cause of this effect;
Or rather say the cause of this defect,
For this effect defective comes by cause ...*

William Shakespeare, "Hamlet", ato 2, cena 2, 1600-1608.

ÍNDICE

Resumo	I
Summary	V
Introdução geral	1
Acompanhamento a longo prazo da filtração glomerular de pacientes com diabetes melito tipo 2 e proteinúria clínica	
Introdução	5
Pacientes e métodos	10
Resultados	14
Discussão	27
Qualidade das proteínas da dieta, função renal e resistência periférica à insulina em pacientes diabéticos com microalbuminúria	
Introdução	33
Pacientes e métodos	37
Resultados	52
Discussão	66
Atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio em pacientes com diabetes melito tipo 2 normo- e microalbuminúricos	
Introdução	73
Pacientes e métodos	83
Resultados	90
Discussão	103
Referências bibliográficas	115

RESUMO

Proteinúria (micro- e macroalbuminúria) identifica pacientes diabéticos com nefropatia diabética e/ou risco de doença cardiovascular e morte.

Os três estudos que compõem este trabalho exploram aspectos de curso evolutivo, possibilidades de intervenção precoce e marcadores de predisposição para estas complicações.

ESTUDO 1: Acompanhamento a longo prazo da filtração glomerular de pacientes com diabetes melito tipo 2 e proteinúria clínica.

Estudo longitudinal, observacional, não-controlado. Sete pacientes diabete melito (DM) tipo 2 e proteinúria de 24 h persistentemente superior a 500 mg, cinco dos quais com glomerulosclerose diabética à biópsia, foram acompanhados por 83,6 meses (média), tendo sua filtração glomerular (FG, ⁵¹Cr-EDTA), parâmetros de controle metabólico, peso, pressão arterial e proteinúria medidas por diversas vezes ao longo do estudo. Houve deterioração significativa da FG em apenas 1 paciente. A proteinúria só aumentou significativamente em 1 paciente. A FG basal correlacionou-se com a pressão sistólica média durante o período de observação. O comportamento da função renal não se relacionou com ingestão protéica, controle metabólico ou idade. Conclui-se que a deterioração de função renal em pacientes com DM tipo 2 e nefropatia diabética é diferente da observada no DM tipo 1, sendo provavelmente mais lenta.

ESTUDO 2: Qualidade das proteínas da dieta, função renal e resistência periférica à insulina em pacientes diabéticos com microalbuminúria.

Estudo de "cross-over" no qual duas dietas isocalóricas e isoprotéicas, equiparadas em termos de macronutrientes, uma com proteínas de origem predominantemente animal (APD), a outra com proteínas de origem predominantemente vegetal (VPD) tiveram seus efeitos comparados em 19 pacientes diabéticos (5 com DM tipo 1, 14 com DM tipo 2) com microalbuminúria. Após alocação aleatória, cada dieta foi seguida por 4 semanas, com um período de 2 semanas de "wash-out". Foram medidos glicemia, HbA1c, frutossamina, insulina (RIE), lipídios e lipoproteínas séricas, filtração glomerular (FG, inulina), excreção urinária de albumina (EUA, imunoturbidimetria), peso, pressão arterial (manômetro de zero aleatório) e resistência periférica à insulina ("clamp" hiperinsulinêmico euglicêmico). Peso e pressão arterial não se alteraram. A FG e o HDL colesterol reduziram-se e a frutossamina aumentou significativamente durante a VPD. O colesterol total reduziu-se igualmente nas 2 dietas. A qualidade de proteínas tem efeitos significativos sobre a função renal. Dietas mais toleráveis pelo paciente, de eficácia semelhante à hipoproteica e, portanto, mais efetivas, poderão ser desenvolvidas se estes benefícios puderem ser confirmados a longo prazo.

ESTUDO 3: Atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio em pacientes com diabetes melito tipo 2 normo- e microalbuminúricos.

Estudo transversal no qual 38 pacientes com diabetes melito (DM) tipo 2 sem proteinúria clínica tiveram medidas a atividade do sistema de

contratransporte de sódio lítio (Na^+/Li^+ CT, método de Canessa), excreção urinária de albumina (EUA, imunoturbidimetria), perfil lipídico, insulinemia (RIE), glicemia, HbA1 e foram avaliados do ponto de vista de presença de hipertensão arterial e doença cardiovascular (questionário da OMS e codificação Minnesota do eletrocardiograma). Pacientes com $\text{EUA} < 20 \mu\text{g}/\text{min}$ foram considerados normoalbuminúricos e os com $20 < \text{EUA} \leq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ foram classificados como microalbuminúricos. Presença de doença cardiovascular (questionário e/ou Minnesota positivo) associou-se com menor glicemia, maior concentração de VLDL colesterol e LDL triglicérides. Hipertensão (pressão arterial $\geq 140/90$ mmHg ou tratamento) se associou com maior atividade do Na^+/Li^+ CT e maiores níveis de insulinemia. Microalbuminúria se associou com menor atividade do Na^+/Li^+ CT e maiores níveis de apolipoproteína B. Ao contrário do constatado no DM tipo 1, a atividade do Na^+/Li^+ CT se correlacionou negativamente com a EUA ($r_s = -0,53$, $p = 0,001$). O Na^+/Li^+ CT se correlacionou positiva e significativamente os níveis de lipoproteína (a) - Lp(a) - e se associou com hipertensão arterial. Os resultados sugerem que, diferentemente do observado no DM tipo 1, no DM tipo 2 um aumento da atividade do Na^+/Li^+ CT se associa com fatores de risco cardiovasculares e hipertensão arterial, mas não com nefropatia diabética. A relação negativa significativa com a EUA não encontra paralelo na literatura e necessita ser esclarecida.

SUMMARY

Proteinuria (micro- and macroalbuminuria) identifies diabetic patients with nephropathy and/or those at risk of cardiovascular disease and death.

The three studies that are part of this work explore aspects of the evolution of kidney function, possibilities of early intervention, and markers of predisposition for these complications.

STUDY 1: Long-term follow-up of glomerular filtration rate of type 2 diabetic patients with persistent proteinuria.

Longitudinal, observational, non-controlled study in which seven type 2 diabetic patients with persistent 24-hour proteinuria (> 500 mg), five of which had diabetic glomerulosclerosis, were followed for a mean 83.6 months. Patients had their glomerular filtration rate (GFR, $^{51}\text{Cr-EDTA}$), metabolic control parameters, weight, blood pressure, and proteinuria assessed repeatedly during the study. GFR deteriorated significantly in 1 subject only. Proteinuria increased significantly in only 1 patient. Baseline GFR correlated with average systolic blood pressure during the follow-up. The behaviour of kidney function did not correlate with protein intake, metabolic control or age. In conclusion, the deterioration of kidney function in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy is different from what is seen in type 1 diabetic patients. It is probably much slower.

STUDY 2: Quality of dietary protein, kidney function and peripheral insulin resistance in diabetic patients with microalbuminuria.

In this cross-over study, two diets, carefully matched for macronutrients, one with proteins of predominantly animal origin (APD), the other mainly from vegetable sources (VPD), had their effects compared in 19 diabetic (5 type 1, 14 type 2) patients with microalbuminuria. Each diet was followed for 4 weeks after random allocation, with a two-week wash-out period. Glycaemia, HbA1, fructosamine, insulin (RIA), lipids and lipoprotein subfractions, glomerular filtration rate (GFR, inulin), albumin excretion rate (AER, immunoturbidimetry), body weight, blood pressure (random zero), and peripheral insulin resistance (hyperinsulinaemic euglycaemic clamp) were measured. Body weight and blood pressure did not change. GFR and HDL cholesterol fell, and fructosamine raised, during the VPD. Total cholesterol was equally reduced at the end of both diets. The quality of dietary proteins has a significant effect on kidney function. Diets that are potentially more acceptable to the patients, with a similar efficacy to the low protein diet, and therefore more effective, can be developed if these benefits are confirmed in longer-term studies.

STUDY 3: Activity of the sodium-lithium countertransport system in type 2 diabetic patients with normo- and microalbuminuria.

In this cross-sectional study, 38 patients with type 2 diabetes and no clinical proteinuria (dipstick negative) had the activity of the sodium-lithium countertransport system (Na^+/Li^+ CT, Canessa's method), albumin excretion

rate (AER, immunoturbidimetry), lipid profile, plasma insulin (RIA), blood glucose, and HbA1c measured. Patients were evaluated for the presence of arterial hypertension and cardiovascular disease (WHO questionnaire and ECG Minnesota coding). Patients with $AER < 20 \mu\text{g}/\text{min}$ were considered normoalbuminuric. Patients with $20 < AER \leq 200 \mu\text{g}/\text{min}$ were classified as microalbuminuric. The presence of cardiovascular disease (questionnaire and/or Minnesota code) was associated with lower glycaemia, higher levels of VLDL cholesterol and LDL triglycerides. Hypertension (BP $\geq 140/90$ mmHg or treatment) was associated with increased Na^+/Li^+ CT activity and higher levels of insulin. Microalbuminuria was associated with lower Na^+/Li^+ CT activity and higher levels of apolipoprotein B. Contrary to what is seen in type 1 diabetic patients, the activity of Na^+/Li^+ CT held a negative, correlation with AER ($r_s = -0,53$, $p = 0,001$). Na^+/Li^+ CT correlated positively and significantly with lipoprotein (a) - Lp(a) -, and was associated with hypertension. These results suggest that, in contrast with what is observed in type 1 diabetes, in type 2 diabetes an increase in the activity of Na^+/Li^+ CT is associated with cardiovascular risk factors and high blood pressure, but not with diabetic nephropathy. The negative correlation between Na^+/Li^+ CT and AER had not yet been described, and needs to be clarified in further studies.

INTRODUÇÃO GERAL

"Heterogeneidade" ¹ é o termo que melhor define a característica fundamental das complicações crônicas do diabetes mérito (DM), particularmente a nefropatia diabética. Por trás do termo encontra-se, ao apagar das luzes do século XX, a ainda incompleta capacidade da ciência médica em estabelecer com clareza que mecanismos levam às complicações do DM.

Há várias décadas, sabemos que apenas uma parcela dos pacientes diabéticos desenvolve nefropatia clínica, mas que seu destino tende a ser trágico. Há trinta anos temos a capacidade de identificar a nefropatia em estágios precoces, através da microalbuminúria; há pouco mais de uma década, aprendemos que podemos oferecer, aos pacientes assim afetados, formas de retardar a progressão inexorável, por meio de manobras nem sempre bem toleradas (dieta hipoproteica) e nem sempre acessíveis (drogas anti-hipertensivas). Há 1 ano, aprendemos que o controle metabólico intensivo do DM pode reduzir a incidência de complicações crônicas, mas o custo social da generalização deste tipo de tratamento o inviabiliza em nosso meio. As opções de tratamento intensivo ou a utilização de anti-hipertensivos e dietas selecionadas poderiam ser reservadas para pacientes em risco, desde que estes pudessem ser claramente identificados. Promessas como o sistema de contratransporte de sódio-lítio, indicador de predisposição para hipertensão arterial na população em geral, estão sendo avaliadas, com resultados contraditórios. Até que se definam

¹ Heterogeneidade. S. f. Qualidade ou caráter de heterogêneo. Heterogêneo. [Do grego *heterogenés*, 'de outro gênero', + -eo] Adj. 1. De diferente natureza. 2. Composto de partes de diferente natureza. Ferreira, Aurélio Buarque de Holanda. Novo Dicionário da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro, Nova Fronteira.

marcadores de risco altamente confiáveis, dietas alternativas mais aceitáveis pelos pacientes podem desempenhar um papel importante no manejo de pacientes microalbuminúricos.

A questão da heterogeneidade é mais marcante no DM tipo 2. Este tipo de DM, embora 10 vezes mais prevalente que o DM tipo 1, foi por muito tempo relegado a um segundo plano no interesse dos pesquisadores. Mesmo que a incidência de nefropatia diabética pareça ser menor neste pacientes, a grande prevalência de DM tipo 2 implica um enorme contingente de indivíduos afetados por nefropatia diabética, a maioria dos quais morre devido a complicações cardiovasculares, onerando sobremaneira os sistemas de saúde.

Precisamos conhecer melhor o curso de evolução da função renal dos pacientes com DM tipo 2 e nefropatia diabética, que ainda está mal caracterizado. Precisamos também melhorar nossa capacidade de identificar precocemente pacientes em risco, já que a microalbuminúria mais provavelmente indica pacientes que já estão doentes. O presente trabalho pretende trazer contribuições para o entendimento do comportamento das complicações crônicas e de alguns fatores de risco no DM tipo 2 e para o manejo precoce de indivíduos com DM tipo 2 e tipo 1 com microalbuminúria.

**ACOMPANHAMENTO A LONGO PRAZO DA FILTRAÇÃO GLOMERULAR DE
PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 2 E PROTEINÚRIA CLÍNICA**

INTRODUÇÃO

A freqüência e evolução da nefropatia diabética nos pacientes não dependentes de insulina são pouco conhecidas. A maioria dos estudos envolvem pacientes diabéticos dependentes de insulina. O diabetes melito (DM) não dependente de insulina (diabetes melito tipo 2 - DM tipo 2) é uma doença heterogênea; seu início habitualmente não é claro e a associação com outras doenças sistêmicas é freqüente.

A nefropatia diabética ocorre, sem dúvida, no DM tipo 2. Os pacientes estudados por Kimmelstiel e Wilson ¹ eram todos diabéticos do tipo 2. A histopatologia dos rins é semelhante à dos pacientes com diabetes melito dependente de insulina (diabetes melito tipo 1 - DM tipo 1) ². No entanto, a prevalência de doenças renais não-diabéticas é maior do que entre pacientes com DM tipo 1. A freqüência de glomerulopatias não-diabéticas em pacientes proteinúricos com DM tipo 2 varia de 23% a 30% ^{3 4 5 6}.

Embora a mortalidade diretamente atribuível à nefropatia diabética seja responsável por não mais do que 5% do total ^{7 8}, esta complicação está associada a uma mortalidade e morbidade significativamente elevadas. Entre os pacientes proteinúricos, os problemas cardiovasculares respondem pela maioria das mortes ^{9 10 11}.

A nefropatia diabética clínica caracteriza um contingente importante de pacientes. Nos Estados Unidos, a maioria dos pacientes diabéticos com insuficiência renal tem DM tipo 2, sendo que mais de 80% dos pacientes diabéticos em hemodiálise pertencem a este grupo ^{12 13}.

A prevalência de proteinúria clínica, no entanto, ainda não está completamente estabelecida. Num estudo clássico de 1982, Fabre e colaboradores ⁷ avaliaram 510 pacientes diabéticos do tipo 2, observando que 244 (48%) apresentavam proteinúria de 24h superior

a 0,15g; destes, 100 pacientes tinham proteinúria superior a 0,5g em 24h. Seshiah e colaboradores ¹⁴ relatam uma prevalência de 44,1% de proteinúria superior a 0,15g/24h. Em nosso meio, Gross e colaboradores ¹⁵ observaram proteinúria superior a 0,15g/24h em 60,7% de 245 pacientes com DM do tipo "Maturidade" e Stein ¹¹, estudando 91 pacientes com DM tipo 2, constatou que 43 (47,2%) deles apresentavam proteinúria superior a 1,0g/24h. Estes dados podem refletir vieses de seleção: em estudo populacional de 1267 pacientes diabéticos do tipo 2 recém-diagnosticados, Olivarius e colaboradores ¹⁶ encontraram uma prevalência de proteinúria de apenas 4,6% em mulheres e 6,6% em homens.

Os estágios da nefropatia no DM tipo 2 estão incompletamente estudados. Em nossa experiência, 21% dos pacientes com DM tipo 2 que não apresentam proteinúria clínica são hiperfiltrantes ¹⁷. O significado prognóstico da hiperfiltração glomerular nestes pacientes não está estabelecido. A hiperfiltração glomerular, no entanto, está associada com glicemias mais elevadas. O achado de hiperfiltração glomerular no DM tipo 2 ainda é controverso, havendo autores que não encontram aumento de filtração glomerular ou hipertrofia renal no DM tipo 2 ¹⁸. No entanto, em estudo transversal, com expressivo número de pacientes com DM tipo 2 de diagnóstico recente, Vora e colaboradores ¹⁹ confirmaram a existência de hiperfiltração glomerular, embora esta não estivesse associada aos níveis glicêmicos.

A microalbuminúria ocorre no DM tipo 2. Como no DM tipo 1, é preditiva do desenvolvimento de macroproteinúria e de maior mortalidade ^{20 21}, predominantemente cardiovascular ^{22 23}. A permeabilidade glomerular à albumina mostra-se aumentada em repouso e após exercício ²⁴. A excreção urinária basal de albumina é mais elevada em pacientes com DM tipo 2 recém diagnosticado do que entre indivíduos normais ²⁵. O exercício físico faz aumentar de forma patológica a excreção urinária de albumina destes

pacientes ²⁵. O controle do DM com dieta tem se mostrado capaz de reduzir a excreção urinária de albumina (EUA), tanto em pacientes normoalbuminúricos ²⁶ como em microalbuminúricos ^{25 26}. Sugere-se, ainda, que o controle glicêmico adequado seria capaz de reverter a resposta anormal da EUA ao exercício físico ²⁵. O valor preditivo destes achados não está bem definido ²⁷.

Alguns pacientes parecem ser macroproteinúricos já por ocasião do diagnóstico do DM ⁷. Nos pacientes diabéticos do tipo 2 que apresentam proteinúria clínica, observam-se glicemias mais elevadas ²⁸. Estes indivíduos são mais velhos, com duração conhecida do DM mais longa, creatinina mais alta e apresentam complicações crônicas do DM e hipertensão com maior frequência que pacientes normoalbuminúricos ²⁸. Existe uma forte associação entre nefropatia clínica e retinopatia proliferativa ²⁹. O grau de controle metabólico parece correlacionar-se com a incidência de proteinúria ³⁰, bem como com o desenvolvimento de retinopatia proliferativa ^{31 32}. A duração do DM parece estar correlacionada com a frequência de retinopatia proliferativa ^{32 29} e de nefropatia clínica ^{33 34 35}. Elevação de cifras tensionais e proteinúria estão associadas com maior mortalidade em pacientes diabéticos do tipo 2 ³⁶.

Ballard e colaboradores ³⁰ relatam uma incidência cumulativa de nefropatia clínica de 24,6% em 20 anos. A evolução da nefropatia diabética clínica, avaliada através da filtração glomerular, parece ser diferente da observada no DM tipo 1. A filtração glomerular tende a se manter conservada num número significativo de pacientes ^{7 37}. Acompanhando 20 pacientes diabéticos do tipo 2 e nefróticos durante 3 anos, Stein ¹¹ observou que a proteinúria e a depuração da creatinina endógena (DCE) não se alteraram significativamente. A valorização destes achados, porém, pode ter sido prejudicada pela

duração do período de observação e pelo método utilizado para avaliar a filtração glomerular (FG).

Nenhum dos estudos longitudinais disponíveis tem duração superior a 10 anos. Assim mesmo, seria necessária a utilização de um método de medida suficientemente sensível para detectar pequenas modificações na FG. Os métodos de rotina carecem desta característica.

A creatinina e a depuração da creatinina endógena são métodos limitados quando se pretende avaliar a FG de pacientes glomerulopáticos ^{38 39} e de pacientes diabéticos com e sem nefropatia clínica ^{40 41 42}. Os valores obtidos com estes métodos não guardam boa correlação com o método-padrão, depuração da inulina ^{43 44}. O erro da estimativa da filtração glomerular chega a 55%, mesmo quando se coleta a urina através de sondagem vesical ⁴⁵. Em pacientes proteinúricos, a DCE superestima a FG em até 100% ⁴⁶. Uma DCE "normal" pode mascarar uma queda real de 42% na FG ⁴⁷.

Nossa experiência no acompanhamento de uma coorte de pacientes diabéticos do tipo 2 macroalbuminúricos por um período médio de 17,7 meses sugere que, de fato, a filtração glomerular destes indivíduos se mantenha estável por períodos de tempo mais longos ^{48 49}. Outros autores observaram um declínio médio da FG de 5,7 ml/min/ano em um grupo de pacientes diabéticos do tipo 2 com nefropatia clínica, comprovada histologicamente, embora a evolução da função renal tenha sido extremamente variável de indivíduo para indivíduo ⁵⁰. Embora o método utilizado para a medida da FG em nosso estudo tenha sido adequado (⁵¹Cr-EDTA) ⁵¹, o tempo de acompanhamento de nossos pacientes pode não ter sido suficiente para detectar pequenas mudanças, de magnitude inferior à variabilidade da técnica.

Uma vez que as evidências atuais apontam para uma magnitude de deterioração de função renal que é significativamente diferente da observada no DM tipo 1, onde os pacientes proteinúricos perdem, em média, 1 ml/min/mês^{52 53}, decidimos estender o período de acompanhamento de nossa coorte original para até 8 anos, procurando observar a evolução da função renal nestes pacientes.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram recrutados pacientes ambulatoriais com DM tipo 2 (critérios da OMS) e proteinúria clínica definida, sem outras nefropatias ou insuficiência cardíaca, a partir da população atendida no ambulatório de Endocrinologia do HCPA entre os anos de 1985 e 1988.

Os critérios de inclusão foram: 1) diagnóstico do DM após a idade de 30 anos; 2) ausência de cetonúria; 3) uso de insulina somente após 5 anos de DM, para melhorar o controle metabólico;

Proteinúria clínica foi definida como excreção urinária de proteínas igual ou superior a 500 mg/24 h, em duas amostras de urina estéril colhidas com intervalo mínimo de 2 semanas.

Inicialmente, foram excluídos pacientes com evidências de insuficiência cardíaca esquerda e/ou de outras nefropatias. A ausência de insuficiência cardíaca esquerda foi caracterizada por: exame clínico; exame radiológico de tórax; medida da fração de ejeção por ventriculografia radioisotópica de repouso, usando hemácias marcadas com Tc99m. Uma fração de ejeção superior a 0,56, na ausência de sinais clínicos e radiológicos de insuficiência ventricular esquerda foi considerada como excludente de insuficiência cardíaca esquerda⁵⁴. As seguintes evidências foram consideradas como indicativas de outras glomerulopatias: hemoglobinúria; cilindros hemáticos no sedimento urinário; história de nefropatias antecedendo o DM; hipertensão arterial sistêmica grave, de início muito precoce (anterior à quarta década de vida), principalmente se anterior ao diagnóstico do DM.

Uma vez satisfeitos os critérios de inclusão, os pacientes foram submetidos a uma avaliação clínica inicial, que incluiu: anamnese e exame físico completos;

eletrocardiograma de repouso; fundoscopia; avaliação da sensibilidade vibratória; exame neurológico; avaliação funcional do sistema nervoso autônomo.

O índice de massa corporal foi calculado pela razão entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros ⁵⁵.

A pressão arterial foi medida com o paciente em repouso, sentado, utilizando-se um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio, com manguito de 12,5 cm. As fases I e V dos sons de Korotkoff foram empregadas para identificar as pressões sistólica e diastólica, respectivamente. Considerou-se hipertenso todo aquele paciente cuja tensão arterial em repouso fosse igual ou superior a 160/95 mmHg ⁵⁶, ou qualquer outro valor com história de hipertensão em vigência de drogas anti-hipertensivas.

O exame fundoscópico foi realizado pelo clínico e por oftalmologista, sob midríase. De acordo com a fundoscopia direta, os pacientes foram classificados como livres de retinopatia diabética, portadores de retinopatia não proliferativa ou portadores de retinopatia proliferativa ⁵⁷.

A sensibilidade vibratória foi avaliada por meio de um diapasão de 128 Hz, sendo pesquisada no 1º artelho. Foram examinados os reflexos profundos, força e coordenação. Foi considerada como diagnóstica de neuropatia periférica a presença de pelo menos uma das seguintes alterações, na ausência de outras causas, como hipotireoidismo não tratado (exame clínico, dosagens séricas de T4 e TSH) e deficiência de vitamina B12 (exame clínico, hemograma, dosagens séricas de B12): diminuição da sensibilidade vibratória; diminuição do reflexo aquileu; quadros clínicos de polineuropatia sensitiva simétrica (parestésias, dor urente nas extremidades ao contato com lençóis, sensação de hipoestesia em "luva" ou em "bota"); quadros clínicos de amiotrofia; presença de úlceras neuropáticas atuais ou no passado.

A avaliação funcional do sistema nervoso autônomo incluiu 5 testes autonômicos cardiovasculares previamente padronizados no Serviço de Endocrinologia do HCPA ⁵⁸. A ocorrência de 2 ou mais testes alterados foi considerada como diagnóstica de neuropatia autônoma ^{58 59}.

O diagnóstico de macroangiopatia foi considerado face a evidências de doença vascular periférica, cardiopatia isquêmica ou doença cerebrovascular.

Após a avaliação inicial e a intervalos periódicos, os pacientes foram submetidos à seguinte avaliação: medida da filtração glomerular; hemograma; exame comum de urina e urocultura com teste; dosagens plasmáticas de glicose, colesterol, triglicerídeos, uréia e creatinina; dosagens de glicose, proteínas e creatinina na urina de 24h; dosagem de hemoglobina glicosilada A1c no plasma; exame clínico completo (incluindo peso e pressão arterial).

A filtração glomerular foi medida pelo método da injeção única de ⁵¹Cr-EDTA ⁵¹. Hemograma, exame comum de urina e urocultura com teste seguiram métodos de rotina do laboratório do HCPA.

A glicose foi medida em auto-analisador pelo método da hexose-hexoquinase ^{60 61}. O colesterol total e os triglicerídeos foram medidos por métodos enzimáticos ⁶². A uréia foi determinada pelo método cinético UV ⁶³. A creatinina foi quantificada pelo método de Jaffé (cinético, picrato alcalino), em auto-analisador ^{64 65}. As proteínas urinárias foram avaliadas pelo método turbidimétrico de Denis e Ayer ⁶⁶. A hemoglobina glicosilada A1c (HbA_{1c}) foi quantificada por microcromatografia ⁶⁷.

A ingestão protéica foi calculada como 6,25 vezes a excreção urinária total de nitrogênio (excreção urinária de uréia em 24h mais excreção de nitrogênio não-uréico, estimada como sendo de 0,031 g/kg) ^{68 69}.

Cinco pacientes foram submetidos a punção-biópsia renal sob controle ecográfico. Nestes, o diagnóstico histopatológico foi de glomerulosclerose nodular. Uma paciente não foi submetida à biópsia face à idade e por não ter aceito submeter-se ao procedimento. Num outro paciente foi identificado, pela ecografia, "rim em ferradura", sendo cancelada a biópsia devido aos riscos inerentes.

A evolução da diversas variáveis ao longo do período de observação foi analisada por meio de análise de correlação das variáveis com o tempo em meses (coeficiente de Pearson). A razão de evolução da filtração glomerular foi calculada como a declividade da reta de correlação da filtração glomerular com o tempo em meses ou como a divisão da diferença entre a filtração glomerular final e a filtração glomerular inicial pelo tempo de acompanhamento em meses. Correlações de diversas variáveis com a razão de evolução da filtração glomerular foram estimadas pelo coeficiente de Pearson. Comparações de médias iniciais e finais foram feitas por teste t para amostras emparelhadas. Foi adotado um nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Sete pacientes, 3 do sexo feminino, idades 47 a 75 anos, duração conhecida do DM 5 a 20 anos, preencheram os critérios de seleção e deram consentimento informado.

O tempo médio de acompanhamento foi de 83,6 (68 a 94) meses.

A Tabela I mostra as características clínicas iniciais dos pacientes.

Os valores médios das diversas variáveis no início e final do estudo estão listados na Tabela II. A filtração glomerular não se alterou significativamente. A glicemia de jejum e os níveis séricos de triglicérides se elevaram significativamente. Os níveis de colesterol e hemoglobina glicosilada, bem como o índice de massa corporal, a pressão arterial e a excreção urinária de uréia não se alteraram significativamente ao longo do período de observação. A excreção urinária de proteínas tendeu a se elevar, mas sem atingir significância estatística.

A Figura 1 ilustra a evolução dos níveis séricos de triglicérides durante o estudo. Embora a correlação com o tempo em meses só tenha sido significativa em 2 casos, a tendência para o aumento dos níveis de triglicérides é nítida, confirmando os achados da Tabela II.

A análise de evolução da filtração glomerular para cada paciente encontra-se detalhada na Tabela III; o valor r corresponde à correlação entre filtração glomerular ($\text{ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$) e o tempo de acompanhamento (meses). A correlação foi significativa em apenas 1 paciente e de significância limítrofe num segundo caso, embora em direções opostas (positiva no paciente 3, negativa no paciente 2).

A Figura 2 ilustra a progressão da FG em cada um dos pacientes acompanhados. O pequeno gráfico ilustra a tendência de evolução como relacionada na

Tabela III. Observe-se os padrões variados de evolução, confirmando os achados da Tabela III. A razão de progressão da FG no grupo, calculada como $(FG \text{ final} - FG \text{ inicial}) \div (n^\circ \text{ meses de acompanhamento})$, variou de -0,23 a 0,29 (média -0,04) ml/min/mês. Quando estimada pela declividade da reta de correlação entre FG e tempo em meses, variou de -0,22 a 0,19 (média -0,0758) ml/min/mês. Estes valores não diferiram de zero ($t = -1.21$, $p > 0,20$). Nenhum dos pacientes desenvolveu insuficiência renal terminal no período de observação. Um dos pacientes, que já apresentava evidências de macroangiopatia na admissão, sofreu um acidente vascular cerebral, com recuperação completa.

A Tabela IV detalha a análise de correlação entre tempo em meses e excreção urinária de proteínas (g/24h). O comportamento não seguiu um padrão característico. A correlação foi significativa em 2 pacientes, mas com tendências opostas (positiva no paciente 3, negativa no paciente 6), demonstrando a falta de um padrão de evolução previsível.

Na Tabela V, são expostas as correlações entre a razão de progressão da filtração glomerular (ml/min/mês) e a média de diversas variáveis durante o período de observação. As correlações com a pressão arterial sistólica média e com os níveis médios de triglicérides durante o acompanhamento foram de intensidade moderada ($r = 0,62$ e $r = 0,64$), mas não atingiram significância estatística ($p = 0,14$ e $p = 0,12$ respectivamente).

A filtração glomerular basal apresentou correlação de $r = -0,46$ com a razão de progressão da filtração glomerular no período de observação, mas esta correlação não foi significativa ($p = 0,3$).

A razão de progressão da filtração glomerular não se correlacionou com o índice de massa corporal médio ($r = -0,43$, $p = 0,49$), hemoglobina glicosilada A1c média ($r = 0,26$, $p = 0,57$) ou glicemia média ($r = 0,20$, $p = 0,67$).

Os valores individuais da filtração glomerular basal, pressão sistólica média e razão de progressão da filtração glomerular estão relacionados na Tabela VI. A filtração glomerular basal e a média da pressão sistólica durante o estudo correlacionaram-se de forma significativa ($r = -0,77$, $p = 0,04$) (Figura 3).

A ingestão protéica não se correlacionou com a filtração glomerular exceto em um paciente. No grupo como um todo, a média da ingestão protéica por paciente não se correlacionou com a respectiva evolução da filtração glomerular (Tabela VII).

Tabela I - Características clínicas iniciais dos pacientes.

Ident.	Idade (anos)	Sexo	Duração do DM (anos)	Tratamento do DM	Complicações do DM	Condições associadas	Outras drogas
1	57	M	5	HO	RP; NP; NA		
2	71	F	20	INS	RB; NP; NA		
3	47	M	7	INS	RB; NP; NA	HAS	CLO, HCT
4	75	F	11	HO	NP; NA	Glaucoma, hipertiroidismo	
5	52	M	20	INS	RP; NA; MA	HAS, glaucoma	HCT, TMT
6	66	M	12	INS	RP	HAS, hipotiroidismo	FRSM,AMD, T4
7	59	F	11	INS	RB; NP		

AMD: alfa-metil-dopa. CLO: clonidina. FRSM: furosemda. HAS: hipertensão arterial sistêmica. HCT: hidroclorotiazida. HO: hipoglicemiante oral. INS: insulina. MA: macroangiopatia. NA: neuropatia autônoma. NP: neuropatia periférica. RB: retinopatia não-proliferativa. RP: retinopatia proliferativa. T4: levotiroxina. TMT: triamterene. Os pacientes com hipo- e hipertiroidismo estavam tratados; clínica e laboratorialmente se mantiveram eutiroidianos durante todo o seguimento.

Tabela II - Características dos pacientes no início e no final do acompanhamento. Teste de Wilcoxon.

	Média ± D.P		p
	Inicial	Final	
Filtração glomerular (ml/min/1,73 m ²)	64,4 ± 16,4	61,7 ± 16,9	0,75
Glicemia de jejum (mg/dl)	139,2 ± 44,8	221,3 ± 86,4	0,05
Hemoglobina glicosilada A1c (%)	10,3 ± 2,1	9,4 ± 2,7	0,63
Colesterol (mg/dl)	243,2 ± 46,5	252,6 ± 57,1	0,77
Triglicerídeos (mg/dl)	113,3 ± 32,5	196,6 ± 65,2	0,02
Índice de massa corporal (kg/m ²)	25,8 ± 3,2	26,3 ± 3,4	0,65
Pressão arterial sistólica (mmHg)	148,1 ± 15,9	146,4 ± 22,1	1,00
Pressão arterial diastólica (mmHg)	78,5 ± 6,9	81,7 ± 10,8	0,69
Excreção urinária de uréia (g/24 h)	33,2 ± 21,0	29,9 ± 25,5	0,75
Excreção urinária de proteínas (g/24 h)	1,20 ± 0,81	1,33 ± 0,7	0,09

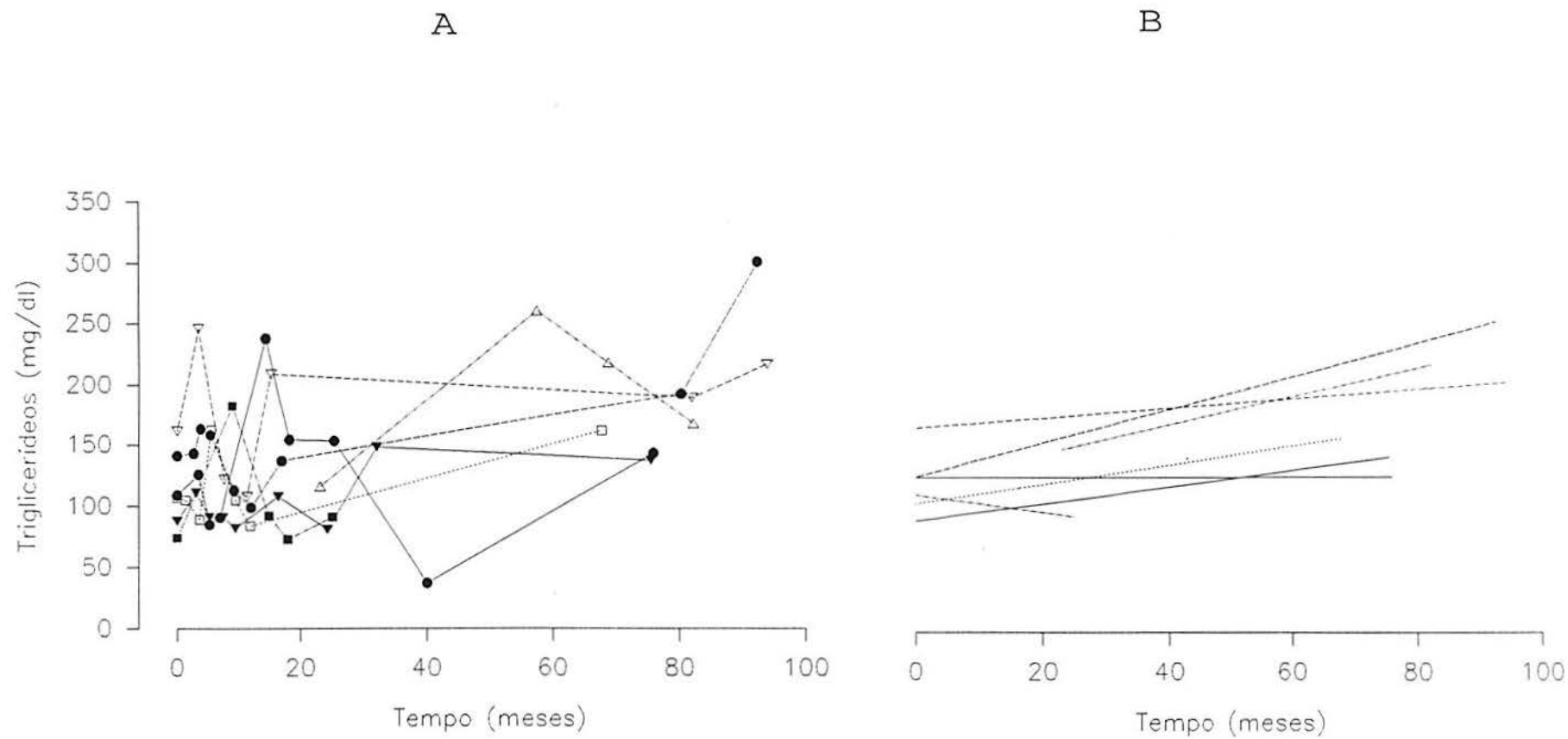


Figura 1 - Evolução dos níveis séricos de triglicerídeos ao longo do tempo de observação. Painel A: valores individuais a cada coleta. Painel B: retas de regressão (triglicerídeos X tempo em meses).

Tabela III - Correlação entre tempo de acompanhamento (em meses) e filtração glomerular (ml/min/1,73 m²).

Identificação	r	p
1	-0,450	0,192
2	-0,836	0,005
3	0,748	0,053
4	-0,338	0,374
5	-0,708	0,075
6	-0,017	0,975
7	-0,184	0,767

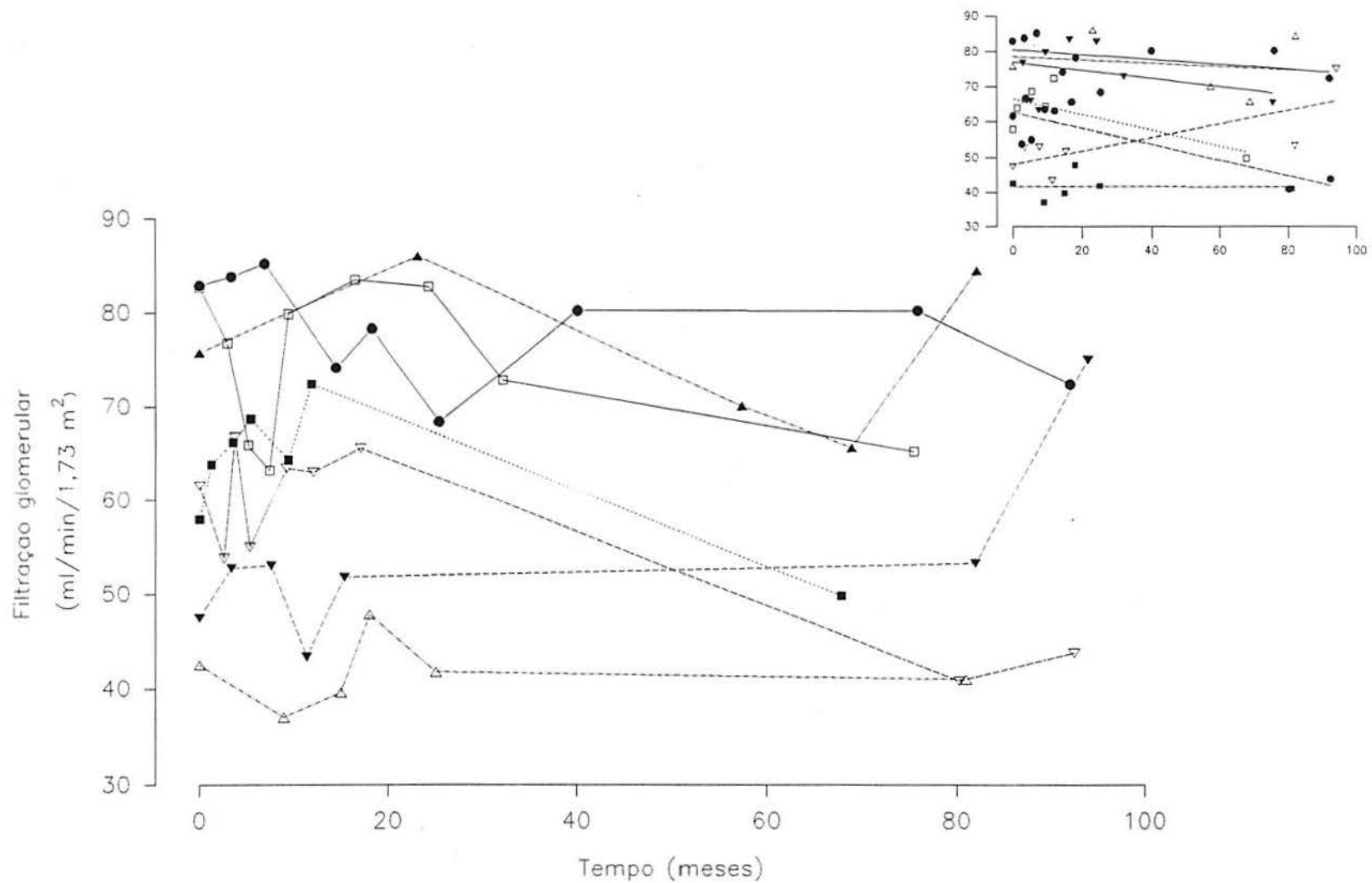


Figura 2 - Evolução da filtração glomerular de 7 pacientes com DM tipo 2 e proteinúria definida. O gráfico menor ilustra a reta de regressão para cada paciente.

Tabela IV - Correlação entre tempo de acompanhamento (meses) e excreção urinária de proteínas (g/24h).

Correlação entre tempo em meses e proteinúria de 24 h		
Identificação	r	p
1	-0,22	0,60
2	0,38	0,35
3	0,90	0,01
4	-0,34	0,45
5	-0,09	0,88
6	-0,95	0,01
7	-0,08	0,90

Tabela V - Correlações de diversas variáveis com a razão de evolução da filtração glomerular (ml/min/mês). O cálculo da correlação foi feito com base na média de cada variável durante o acompanhamento. A razão de evolução da filtração glomerular foi calculada como: (FG final - FG inicial)/tempo de acompanhamento (meses).

	Pressão arterial sistólica (mmHg)	Pressão arterial diastólica (mmHg)	Pressão arterial média (mmHg)	Excreção urinária de uréia (g/24h)	Excreção urinária de proteínas (g/24h)	Colesterol (mg/dl)	Triglicerídeos (mg/dl)	Glicose (mg/dl)	HbA _{1c} (%)
r	0,620	0,490	0,450	0,420	-0,217	-0,036	0,649	0,199	0,262
p	0,14	0,27	0,31	0,35	0,64	0,94	0,12	0,67	0,57

Tabela VI - Valores individuais da razão de progressão da filtração glomerular (FG, ml/min/mês), pressão arterial sistólica média (PASM) durante o período de observação (mmHg) e filtração glomerular basal (ml/min/1,73 m²).

Ident.	Progressão da FG (ml/min/mês)		PASM (mmHg)	FG basal (ml/min/1,73 m ²)
	$\frac{(FG\ inicial - FG\ final)}{meses}$	<i>Declividade da reta de correlação FG vs tempo</i>		
1	-0,11	-0,1106	124,3	82,92
2	-0,19	-0,2238	148,9	61,61
3	0,29	0,1900	165,0	47,47
4	-0,23	-0,1178	142,2	82,72
5	-0,12	-0,2201	142,9	57,97
6	-0,02	-0,0002	152,5	42,57
7	0,10	-0,0479	144,8	75,81

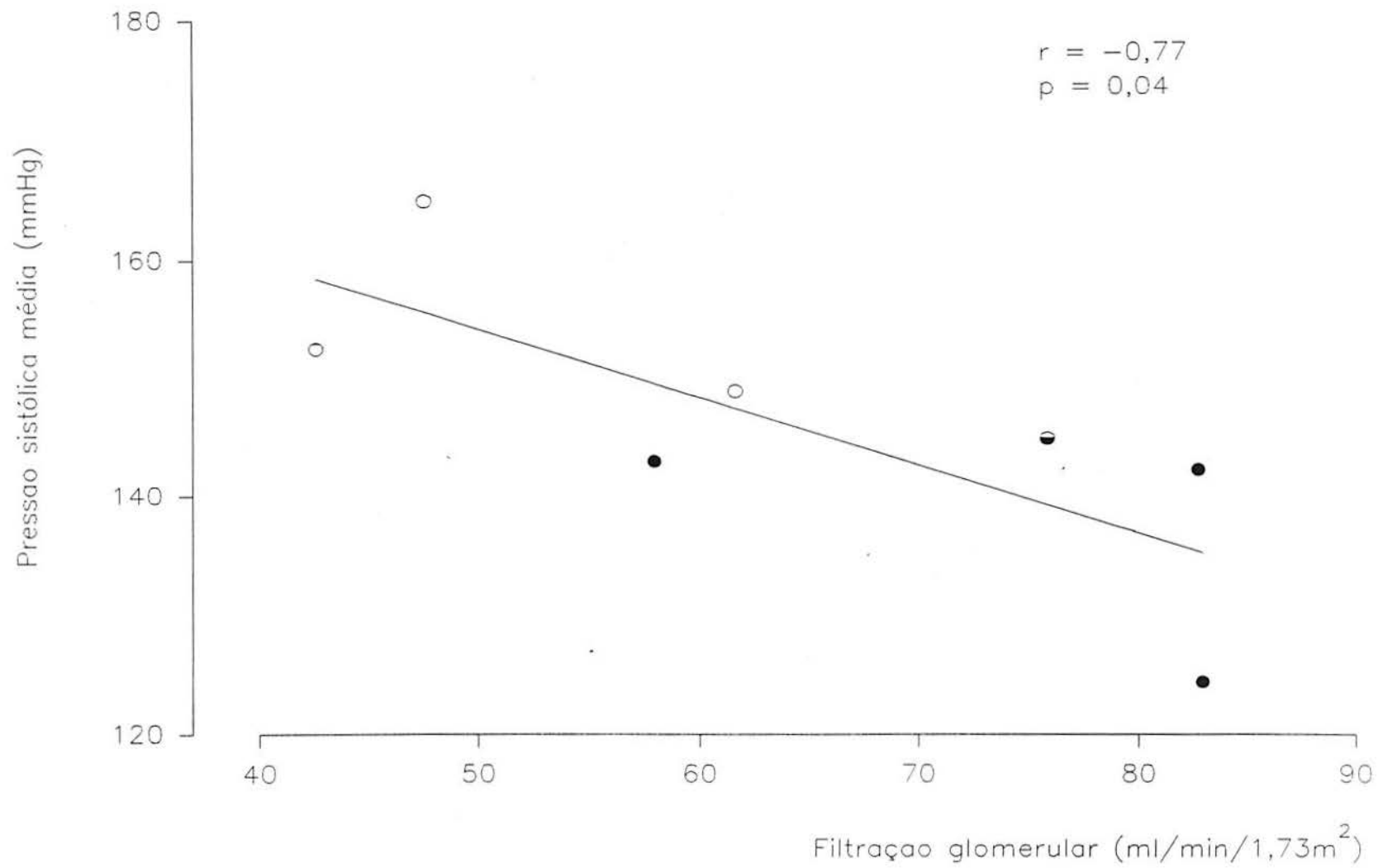


Figura 2 - Correlação entre pressão sistólica média durante o estudo e filtração glomerular basal.

Tabela VII - Ingestão protéica média durante o período de acompanhamento e correlação com a razão de evolução da filtração glomerular (FG), estimada pela declividade da reta de correlação da FG com o tempo em meses.

Identificação	Ingestão protéica (g/kg/dia)		Evolução da filtração glomerular (ml/min/mês)	Análise de correlação FG X ingestão protéica	
	Média	Desvio-padrão		r	p
1	1,9	0,7	-0,1106	-0,167	0,667
2	1,0	0,2	-0,2238	-0,218	0,603
3	1,8	0,7	0,1900	0,058	0,913
4	1,2	0,6	-0,1178	0,268	0,486
5	1,3	0,4	-0,2201	0,943	0,016
6	1,5	0,7	-0,0002	-0,033	0,958
7	1,2	0,2	-0,0479	0,303	0,804
Todos os pacientes	1,4	0,6	-0,0758 *	0,598 @	0,156

* Razão média

@ Correlação entre a ingestão protéica média de cada paciente e respectiva evolução da FG.

DISCUSSÃO

A razão de progressão da filtração glomerular (FG), em pacientes com diabetes melito tipo 2 e proteinúria clínica, é bastante variável. Embora no grupo como um todo pareça haver uma queda da FG ao longo do tempo de observação, quando se analisa caso a caso observa-se que os padrões são heterogêneos e que em 5 dos 7 pacientes a relação tempo X FG não foi significativa. Este achado confirma nossa impressão original, quando observamos o mesmo grupo por um tempo limitado ⁴⁸.

Recente estudo de Gall e colaboradores ⁵⁰ demonstrou, em 26 pacientes com DM tipo 2 e glomerulosclerose diabética, que a FG cai significativamente no grupo como um todo. No entanto, no mesmo estudo, há pacientes que não sofrem deterioração da FG e mesmo alguns que mostram incremento da FG.

Cinco de nossos pacientes têm confirmação histopatológica de nefropatia diabética. Dos dois pacientes não-biopsiados, pelo menos 1 apresentava retinopatia diabética, achado que tem sido constantemente associado à presença de glomerulosclerose diabética em pacientes com DM tipo 2 ^{6 70}. Embora classicamente considerada como critério de exclusão de nefropatia diabética em pacientes com diabetes melito e proteinúria, a ausência de retinopatia não é um bom critério de exclusão de nefropatia diabética nos pacientes com DM tipo 2, estando ausente em uma parcela significativa de pacientes com DM tipo 2, proteinúricos e com comprovação histológica de glomerulosclerose diabética ⁶. Sendo assim, não se pode atribuir esta heterogeneidade de comportamento a glomerulopatias não associadas ao DM.

A ingestão protéica não se alterou, afastando interferências desta variável sobre a evolução. A glicemia parece ter aumentado no grupo, o que poderia interferir com a

medida da FG, mascarando algumas diferenças. No entanto, as correlações da FG com a hemoglobina glicosilada média e glicemia média não foram significativas, o que fala contra um possível incremento da FG em função da glicose plasmática aumentada. A tendência para aumento de triglicérides pode estar relacionada com o aumento da glicemia, mas não se mostrou associada à progressão da FG. Elevação dos níveis de triglicérides é comum na síndrome nefrótica ⁷¹ e a longa duração do DM e da proteinúria nestes pacientes pode explicar a tendência observada; o achado provavelmente não se relaciona com o controle do DM a longo prazo, já que a hemoglobina glicosilada não se alterou.

Embora as cifras tensionais não se tenham alterado significativamente nos pacientes, a correlação significativa entre pressão arterial sistólica média e FG basal demonstra que existe uma relação entre pressão arterial e função renal nestes indivíduos. A correlação entre pressão sistólica média e razão de progressão da filtração glomerular, embora não significativa, foi de magnitude considerável, servindo como sugestão adicional de que haja uma relação estreita entre o comportamento da FG e pressão arterial nestes pacientes. No estudo de Gall e colaboradores ⁵⁰, a pressão sistólica média correlacionou-se significativamente com a razão de deterioração da função renal, permanecendo como única variável associada ao declínio da FG na análise multivariada. No presente estudo, o tamanho da amostra impossibilita tal tipo de análise. Uma vez que 3 dos 7 pacientes vinham em uso de anti-hipertensivos, os resultados não refletem o curso não-tratado da função renal em indivíduos com DM tipo 2 e proteinúria clínica. O efeito benéfico dos anti-hipertensivos em pacientes com DM tipo 1 está bem documentado ^{72 73 74 75 76}, mas não há estudos em pacientes com DM tipo 2. Nos índios Pima, a população com a maior prevalência conhecida de DM tipo 2, a incidência de insuficiência renal terminal em pacientes hipertensos com nefropatia diabética é 3,8 vezes maior do que nos normotensos ⁷⁷.

Um fator a considerar num estudo a longo prazo é a idade dos pacientes. A FG diminui com o avançar da idade ⁷⁸. Neste grupo, no entanto, o efeito da idade, se houve, teria sido o de "mascarar" uma maior estabilidade, ou mesmo um incremento da FG, já que em apenas 2 pacientes houve redução confirmada da FG.

O fato significativo é que a nefropatia diabética no DM tipo 2 cursa por uma evolução diferente da que se observa no DM tipo 1. Em nossos pacientes, a razão média de progressão da FG foi de -0,04 ml/min/mês, contrastando com a que se observa no DM tipo 1, que é, em média, da ordem de -1,0 ml/min/mês ^{52 53}. A deterioração de FG, quando ocorre de forma significativa, é mais lenta e os pacientes conservam função renal, mesmo limítrofe, por períodos de tempo relativamente prolongados.

Necessariamente devem-se considerar fatores genéticos e ambientais que podem interferir com a evolução da doença. Diferenças regionais e populacionais na incidência e progressão da nefropatia diabética já foram observadas. Em nosso meio, a população é bastante heterogênea, mas estudos populacionais ampliados não estão disponíveis.

Em conclusão, a observação a longo prazo de 7 pacientes diabéticos do tipo 2 com nefropatia clínica reforça nossa impressão inicial de que a deterioração de função renal possa ser mais lenta. Não se pode excluir, no entanto, um viés na seleção dos pacientes neste estudo: estes indivíduos poderiam ser os de melhor aderência ao tratamento que, por serem freqüentadores assíduos do ambulatório, aceitaram participar do estudo e se submeterem aos procedimentos. Há também que se ter cautela com relação ao poder dos testes empregados. Com uma amostra de 7 pacientes, o poder das análises de correlação fica em torno de 0,281. Estudos longitudinais, de duração pelo menos semelhante, mas com amostras maiores, serão necessários para melhor caracterizar a história natural da nefropatia diabética no DM tipo 2.

**QUALIDADE DAS PROTEÍNAS DA DIETA, FUNÇÃO RENAL E RESISTÊNCIA
PERIFÉRICA À INSULINA EM PACIENTES DIABÉTICOS COM
MICROALBUMINÚRIA**

INTRODUÇÃO

A ingestão de proteínas tem efeitos significativos na hemodinâmica e função excretória renais. Em indivíduos com doença renal pré-existente, a ingestão de quantidades de proteína maiores do que 1 g/kg/dia pode ter efeitos deletérios sobre a função renal ^{79 80 81}. Evidências experimentais indicam que uma restrição na quantidade de proteína da dieta pode evitar dano adicional em animais ^{82 83} e em seres humanos ^{84 85 86}. Em pacientes com nefropatia diabética, uma dieta hipoprotéica reduz significativamente a velocidade de deterioração da função renal ^{87 88}. Em pacientes diabéticos do tipo 1, uma dieta hipoprotéica é capaz de reduzir a excreção urinária de albumina em pacientes com microalbuminúria ⁸⁹ e de reduzir a filtração glomerular de pacientes hiperfiltrantes ⁹⁰. Dietas hipoprotéicas, mesmo tendo seu potencial valor terapêutico reconhecido, são de difícil aceitação pelos pacientes a longo prazo ⁹¹.

No entanto, nem todas as proteínas têm os mesmos efeitos sobre o rim. Há evidências de que a qualidade de proteína consumida pode ser tão significativa quanto a quantidade. Após serem submetidos a nefrectomia sub-total, ratos alimentados com proteína vegetal tiveram menos proteinúria, menos hipertrofia compensatória, menor dano histológico e sobrevida mais longa do que ratos alimentados com caseína ⁹². Vegetarianos têm filtração glomerular e excreção urinária de albumina significativamente mais baixas do que indivíduos onívoros ^{93 94}. Estes estudos, no entanto, apresentam uma falha em comum: a ingestão média de proteínas tende a ser mais baixa nos grupos vegetarianos.

Em seres humanos, estudos bem controlados têm oferecido evidências de que, de fato, a qualidade das proteínas da dieta tem efeitos sobre a função renal. Carnes de peixe e aves reduzem a hiperfiltração glomerular observada em alguns pacientes com diabete melito

tipo 1 ⁹⁵. Num recente estudo de "cross-over", em voluntários humanos normais, duas dietas isocalóricas e isoprotéicas, com teores de fibras e lipídios cuidadosamente equiparados, uma delas com proteínas predominantemente de origem animal, a outra com proteínas vegetais, consumidas durante 3 semanas alternadamente, tiveram efeitos muito distintos sobre diversos parâmetros de função renal. Em comparação à dieta de proteína animal, durante a dieta de proteína vegetal, a filtração glomerular e o fluxo plasmático renal foram significativamente mais baixos (8 e 12 %, respectivamente); a resistência vascular renal foi mais alta; a fração de filtração e a pressão arterial média foram semelhantes; a excreção urinária de albumina foi 58% menor e as depurações fracionais de albumina e IgG foram cerca de 48% e 35% mais baixas, respectivamente ⁹⁶. O estudo, no entanto, não conseguiu elucidar de forma cabal os mecanismos envolvidos nestes efeitos, sugerindo uma possível contribuição do glucagon e de prostaglandinas vasodilatadoras. De fato, um estudo onde a administração de indometacina, bloqueando a síntese de prostaglandinas, aboliu a resposta hemodinâmica aguda à ingestão de proteína animal, apoia esta hipótese ⁹⁷. Uma hipótese mal explorada é sugerida por estudos em animais: a ingestão protéica afeta a sensibilidade à insulina ^{98 99}. As associações entre resistência insulínica, hiperinsulinemia e pressão arterial ^{100 101} e a clássica relação entre pressão arterial e nefropatia diabética ^{102 103} sugerem uma possibilidade, não explorada, de que uma modulação da resistência insulínica por diferentes qualidades de proteínas da dieta poderia ser um dos mecanismos envolvidos na gênese dos efeitos observados sobre a função renal.

Assim, uma dieta isoprotéica, potencialmente mais tolerável (e, portanto, mais sujeita à aderência pelo paciente), onde se substitui a fonte "tradicional" de proteína (animal) por proteína vegetal, pode ter efeitos similares à dieta hipoprotéica em relação às alterações funcionais precoces e à preservação de função renal de pacientes com nefropatias

progressivas. Estes efeitos poderiam ser modulados por alterações na resistência insulínica. Esta possibilidade nunca foi adequadamente explorada.

A hiperinsulinemia associada à resistência insulínica poderia ser um elo de ligação entre doença vascular, hipertensão e complicações do diabetes melito. Evidências circunstanciais sustentam a noção de que níveis elevados de insulina podem contribuir para dano vascular na população em geral ¹⁰⁴ e de que a sensibilidade à insulina seja um fator independente na progressão da doença vascular em pacientes diabéticos ¹⁰⁵. Anormalidades no metabolismo dos lipídios são comuns em pacientes tratados com anti-hipertensivos como beta-bloqueadores e tiazídicos, mas também foram observadas em hipertensos não tratados ¹⁰⁶. Um achado importante nestes pacientes é uma elevação consistente nos níveis plasmáticos de triglicédeos. Resistência à insulina, hiperinsulinemia, aumento de VLDL e triglicédeos correlacionam-se significativamente em indivíduos saudáveis e em pacientes hiperlipidêmicos ¹⁰⁷.

Pacientes com diabetes melito tipo 2 são mais propensos a apresentar níveis elevados de lipídios do que pacientes diabéticos do tipo 1, quando comparados a controles adequados. A anormalidade mais comum é a hipertrigliceridemia, com triglicédeos totais e VLDL-triglicédeos de 50 a 100% acima dos valores encontrados em controles ^{108 109} e colesterol HDL mais baixo ¹¹⁰. Estes achados se devem a uma combinação de produção hepática aumentada e remoção diminuída. Seja porque a hiperinsulinemia estimula a produção de VLDL ou porque a relativa deficiência de insulina a nível celular leva a uma superprodução de VLDL, parece claro que a resistência insulínica está envolvida nos mecanismos que levam à elevação de triglicédeos ¹¹¹. Esta associação de anormalidades é fortemente relacionada com doença coronariana no diabetes melito ¹¹². Na população, um aumento da atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio associa-se

independentemente com hipertensão e hiperlipidemia ¹¹³. Em pacientes diabéticos do tipo 1, uma hiperatividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio está associada com predisposição para hipertensão arterial, micro- e macroalbuminúria ^{114 115 116}, com resistência insulínica, aumento nos níveis séricos de triglicérides e redução na relação LDL/HDL ¹¹⁷. Assim, pacientes com diabetes melito tipo 2 apresentam com freqüência uma associação de anormalidades celulares e metabólicas que podem estar implicadas na gênese de complicações crônicas do diabetes melito e que, em última instância, podem ter na resistência insulínica, elemento patogênico fundamental no diabetes tipo 2 ^{118 119}, o fator subjacente.

Uma abordagem terapêutica que interfira não só com as anormalidades funcionais e metabólicas, mas com a resistência insulínica em si, pode ser o modelo ideal para a prevenção da nefropatia avançada ou para retardar a deterioração da função renal em pacientes proteinúricos. No diabetes do tipo 1 o controle glicêmico por meio de insulino-terapia intensificada mostra-se capaz de reduzir a incidência de complicações crônicas ^{120 121}. No diabetes do tipo 2, a despeito de outras considerações, a abordagem de insulino-terapia intensiva esbarra no fato de que não mais do que 25 % dos pacientes com diabetes do tipo 2 usam insulina ¹²². A dieta é a peça fundamental do tratamento, associada ou não a hipoglicemiantes orais. Se as formas hoje disponíveis de dietoterapia, por eficazes que sejam, se mostram ineficientes, já que a aderência é fator limitante, uma abordagem dietoterápica capaz de interferir com mecanismos patogênicos e de produzir efeitos semelhantes seria por demais desejável.

PACIENTES E MÉTODOS

PACIENTES:

Entre os anos de 1990 e 1992, foram recrutados pacientes com diabetes melito tipos 1 e 2 (de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde), recrutados do ambulatório de diabetes do Guy's Hospital de Londres, com idade inferior a 70 anos na data de recrutamento, excreção urinária de albumina superior a 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ em 2 amostras estéreis, noturnas, creatinina sérica não superior a 1,65 mg/dl (150 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Os critérios de exclusão foram: evidências de insuficiência cardíaca, nefropatia obstrutiva, outras glomerulopatias. Pacientes com infecção urinária (urocultura positiva) eram tratados e re-examinados após a confirmação da cura por nova cultura.

DESENHO EXPERIMENTAL:

Trata-se de um estudo de "cross-over", com 2 semanas de observação basal, 4 semanas em dieta com predomínio de proteína animal (APD) ou vegetal (VPD), 2 semanas de "wash-out" e 4 semanas na dieta alternativa. A alocação inicial para uma ou outra dieta foi feita de forma aleatória.

PROTOCOLO (Fig. 1):

Uma vez identificado um paciente com base nos critérios acima, era obtido consentimento informado. Na primeira visita, era feita uma avaliação clínica (história e exame físico), visando identificar complicações crônicas do diabetes melito e/ou patologias

associadas. Os pacientes tinham seu peso, altura e pressão arterial registrados. Nesta ocasião, eram revisados os registros hospitalares dos pacientes. Os pacientes compareciam em jejum, trazendo uma amostra de urina de 24 horas para determinação de uréia, creatinina, sódio, glicose e excreção urinária de albumina (EUA). Uma amostra de sangue era então colhida para determinação de glicose, colesterol total e HDL, triglicerídeos, uréia, creatinina, hemoglobina glicosilada A1, frutamina, proteínas totais, albumina, cálcio, fósforo, magnésio, sódio, potássio e ácido úrico. Durante duas semanas ("run-in"), durante as quais mantinham sua dieta usual, os pacientes faziam uma avaliação dietética e eram treinados para fazerem relatórios e pesarem os alimentos consumidos. Completadas as duas semanas, eram reavaliados peso e pressão arterial e eram repetidos os exames acima mencionados. A seguir, era feita a alocação aleatória para uma das dietas, por sorteio simples. A dieta selecionada era tão somente do conhecimento dos pacientes e da nutricionista. Durante as 4 semanas seguintes, os pacientes mantinham a dieta para a qual foram alocados, fosse ela APD ou VPD. Ao final da segunda semana, o peso e a pressão arterial eram verificados, os pacientes eram examinados e entrevistados pelo médico e pela nutricionista. Ao completarem-se 4 semanas, os pacientes colhiam nova urina de 24h, desta vez se acrescentando 3-metil-histidina às determinações. Eram então admitidos, em jejum, à enfermaria metabólica, tendo peso e pressão avaliados. Uma amostra de sangue era colhida para que fossem medidos os parâmetros citados. Sob anestesia local, eram inseridas duas cânulas de Teflon® e os pacientes tinham então sua filtração glomerular e sensibilidade à insulina avaliadas. Ao término do experimento, os pacientes eram orientados a retornar à sua dieta usual ("wash-out"). Ao cabo de duas semanas, iniciavam a segunda dieta, com idêntico protocolo de acompanhamento.

PRESCRIÇÃO DIETÉTICA:

1. Energia:

As dietas foram isocalóricas, sendo mantido o valor calórico total (VCT) da dieta usual do paciente. O objetivo era manter o peso estável durante todo o estudo, evitando repercussões sobre pressão arterial, albuminúria, filtração glomerular e resistência insulínica.

2. Proteínas:

Foram mantidas em torno de 1 g/kg de peso/dia. Este nível de ingestão mostrou-se factível em recente estudo com voluntários normais ⁹⁶, embora fossem necessários acompanhamento constante, encorajamento e mesmo o fornecimento de alimentos com alto teor de proteínas vegetais e relativamente baixo teor de fibras e carboidratos.

3. Gorduras:

A composição de gorduras não ultrapassou 35% do valor calórico total em nenhuma das dietas. Gorduras saturadas tiveram que ser suplementadas durante a VPD, sendo utilizada manteiga para aproximar os perfis lipídicos das duas dietas.

4. Fibras:

Devido ao notório efeito das fibras dietéticas (particularmente as solúveis) sobre os lipídios séricos, foi necessário emparelhar o tipo e quantidade de fibras nas duas fases do estudo. Foram acrescentados suplementos de fibras na APD. Foi utilizada a goma de guar (Rybar, Inglaterra), em torno de 12 g/dia, de forma a aproximar a ingestão de fibras

da observável na VPD (na qual as fibras solúveis provêm principalmente de grãos como a soja), sem adicionar quantidades apreciáveis de proteínas vegetais.

5. Sódio, potássio, cálcio:

Mantidos nos mesmos níveis em ambas as dietas. Durante a VPD, foi utilizado tofu (queijo de soja) para manter o teor de cálcio.

6. Avaliação dietoterápica:

As dietas foram continuamente revisadas e novas informações, sugestões e receitas foram sendo fornecidas aos pacientes sempre que necessário. A cada 2 semanas, os pacientes faziam dois registros de ingestão, cobrindo diferentes dias da semana, pesando os alimentos consumidos em balanças eletrônicas fornecidas pelo hospital. Assim, todos os dias da semana eram cobertos, em ambas as dietas. Os registros foram analisados num programa específico, em um computador VAX. A uréia urinária foi utilizada como parâmetro adicional de controle de ingestão protéica. Sódio e potássio urinários foram utilizados para estimar a ingestão destes eletrólitos.

MÉTODOS:

1. Pressão arterial

A pressão arterial foi medida duas vezes, com intervalo de 3 minutos, estando o paciente sentado e tendo descansado por pelo menos 10 minutos. As medidas foram tomadas no braço direito, sempre que possível, sendo as fases I e V dos sons de Korotkoff utilizadas para marcar a pressão sistólica e a pressão diastólica, respectivamente. Foi empregado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio com zero aleatório e um manguito padrão de 12.5 cm (Hawksley, Lancing, Inglaterra). A média das duas medidas foi utilizada na avaliação dos resultados.

2. Lipídios séricos

Colesterol e triglicerídeos foram medidos por um método colorimétrico enzimático (colesterol oxidase/peroxidase-amidopirina e glicerol fosfato oxidase/peroxidase-amidopirina, Boehringer-Mannheim, Alemanha) em auto-analisador Cobas-Bio (Roche, Welwyn Garden City, Inglaterra) ⁶². O HDL colesterol foi medido após precipitação por heparina/manganês ¹²³.

3. Glicemia e proteínas glicosiladas

A glicose foi medida por glicose-oxidase ¹²⁴. Hemoglobina glicosilada A1, por eletroendosmose (Corning Chemical, Palo Alto, E.U.A.) ¹²⁵ (valores normais: 4,9 -

7,5 %, C.V. 6%). Frutosamina por um método enzimático em auto-analisador (Cobas Mira, Roche, Welwyn Garden City, Inglaterra) ¹²⁶ (valores normais: 1,8 a 2,8 mmol/).

4. Eletrólitos

Sódio, potássio, cálcio e fósforo foram medidos por fotometria de chama.

5. Creatinina e uréia

Creatinina foi quantificada pela reação de Jaffé com protocolo para auto-analisador Hitachi (Boehringer BCL, Lewes, Inglaterra) ⁶⁵. Uréia, por método enzimático ⁶³, em auto-analisador Cobas Mira.

6. Proteínas urinárias

Proteínas totais foram medidas pelo método do biureto ¹²⁷.

Albumina, por imunoturbidimetria ¹²⁸, em um analisador Cobas FARA (Roche Diagnostics, Welwyn Garden City, Inglaterra). O C.V. % do método varia de 8,95 % (10,75 mg/l) a 3,6 % (86,8 mg/l) e tem um limite mínimo de detecção da ordem de 1,25 mg/l ¹²⁹. Utilizou-se soro anti-albumina humana de cabra (Sanofi Diagnostics, Minnesota, E.U.A.) e padrões de albumina humana (Behring Diagnostics, Hoechst UK, Hounslow, Middx., Inglaterra).

7. 3-metil-histidina na urina

A 3-metil-histidina foi medida em amostras de urina estéril, cuidadosamente coletadas ao longo de 24 horas. O método utilizado foi a cromatografia de troca iônica ¹³⁰, com Sβ(4 Piridiletil)-L-cisteína (Sigma) como controle interno (C.V. de 5,9 %). Os resultados foram expressos como μmol/mmol de creatinina.

8. Filtração glomerular

Foi utilizado o método de infusão contínua de polifrutosano (Inutest, Laevosan-Gesellschaft, Linz, Áustria) ¹³¹. Este método dispensa a coleta de urina, fator de erro comum na avaliação da filtração glomerular, e se baseia na estimativa da depuração pela medida dos níveis plasmáticos de inulina em estado de equilíbrio. Guarda excelente correlação com a técnica clássica de depuração (r=0.993) e requer apenas 3 a 4 amostras de sangue para que se possa calcular a filtração glomerular ¹³². Uma dose de 35 mg/kg de polifrutosano é injetada "em bolo", seguindo-se de uma infusão contínua de 0,1 mg/kg/min. Após 60 minutos, atinge-se um estado de equilíbrio, durante o qual os níveis plasmáticos de inulina se mantêm estáveis. A partir de então, colhe-se 4 amostras de sangue, a intervalos de 15 minutos. Mede-se a concentração de inulina na infusão e no plasma, calculando-se a filtração glomerular pela fórmula:

Velocidade de infusão (mg/min)

Concentração plasmática de inulina (mg/ml)

A concentração plasmática de inulina é dada pela média das 4 amostras.

A velocidade de infusão é calculada por:

$$\text{Concentração de inulina na infusão (mg/ml)} \times \text{velocidade de infusão (ml/min)}$$

A concentração de inulina foi medida em auto-analisador ¹³³ (Cobas Mira, Roche, Welwyn Garden City, Inglaterra), por um método colorimétrico enzimático utilizando sorbitol desidrogenase em presença de B-NADH, no qual o polímero de frutose (inulina) é degradado a frutose.

9. Resistência insulínica (Fig. 2 e Fig. 3):

O "clamp" hiperinsulinêmico euglicêmico foi o método quantitativo empregado para estimar a resistência insulínica ¹³⁴. Por este método, insulina regular é infundida por via endovenosa de forma a elevar a insulinemia a um nível pré-estabelecido e aí mantê-la pela duração do estudo. O efeito previsível é uma queda da glicemia, a qual reflete a ação insulínica sobre o fígado e tecidos periféricos. A queda da glicemia é prevenida pela medição freqüente da glicemia e infusão de glicose por via endovenosa, de forma a manter a glicemia em torno de um nível pré-selecionado. Se associado ao uso de um isótopo de glicose, permite calcular a contribuição da glicose endógena para a manutenção da glicemia durante a infusão de insulina.

Duas cânulas de Teflon® eram inseridas sob anestesia local. A primeira, em veia calibrosa do antebraço, para infusão das soluções. A segunda, em uma veia distal da extremidade contra-lateral, o mais próximo possível da mão, retrogradamente, para coleta

das amostras de sangue. Esta mão era colocada em uma caixa com ar aquecido a 55-60°C de forma a arterializar o sangue venoso ^{135 136}. A permeabilidade da cânula de coleta era mantida por meio de uma infusão lenta de solução fisiológica de cloreto de sódio.

9.1. Infusão de insulina:

9.1.1. Fase A (0 a 120 minutos):

Durante 120 minutos, uma solução contendo 50 unidades de insulina regular humana U-100 (Novo Nordisk, Dinamarca) em 50 ml de solução fisiológica (Baxter, Inglaterra) era infundida em velocidade variável para aproximar de e manter a glicemia em torno de 90 mg/dl. A infusão de insulina era corrigida de acordo com a glicemia, medida a cada 15 minutos.

9.1.2. Fase B (insulina 16 mU/m²/min, 120 a 270 min.):

Aos 120 minutos, a infusão de insulina era de imediato substituída por uma solução contendo 12 unidades de insulina humana regular U-100 em 59 ml de solução fisiológica à qual se acrescentava 1 ml de sangue do paciente. Esta solução era infundida primeiro como um "bolo" escalonado e, a seguir, de forma contínua, de modo a infundir 16 mU/m²/min ¹³⁷. Esta infusão era mantida por 150 minutos. A interpretação dos dados desta etapa do estudo depende criticamente da disponibilidade dos resultados da glicose deuterada.

Até novembro de 1994, apenas uma parcela destes valores estava disponível. Assim, optamos por utilizar, no momento, apenas os dados da Fase C.

9.1.3. Fase C (insulina 80 mU/m²/min, 270 a 420 min.):

Aos 270 minutos, procedia-se a novo "bolo" de insulina, desta vez uma solução contendo 60 U de insulina humana regular U-100 em 59 ml de solução fisiológica e 1 ml de sangue do paciente, seguindo-se uma infusão contínua de 80 mU/m²/min, mantida até os 420 minutos, final do estudo. Com esta taxa de infusão, atinge-se insulinemias em torno de 100 μ UI/ml, suficientes para bloquear a produção endógena de glicose ¹³⁸ ¹³⁹ e os resultados podem ser interpretados mesmo sem que as contagens de glicose deuterada estejam disponíveis. Uma vez atingido o estado de equilíbrio, com insulinemia e glicemias estáveis, a razão de infusão de glicose exógena será igual à taxa de deposição corporal total de glicose. O resultado é uma inferência da resistência periférica à insulina.

9.1.4. Coleta de amostras:

Alíquotas de 1 ml de sangue eram colhidas aos 0, 75, 90, 105, 120 (Fase A), 150, 180, 210, 240, 250, 260, 270 (Fase B), 300, 330, 360, 390, 400, 410, e 420 minutos (Fase C), colocadas em 0,6 ml de solução de polietilenoglicol (peso molecular 8.000; Sigma, Poole, Inglaterra) tamponada com 0,02 mmol/l de fosfato de sódio, pH 7,4, em tubos gelados. As amostras eram agitadas vigorosamente e, tão logo possível, centrifugadas por 10 minutos a 1500 G e 4°C. O sobrenadante era imediatamente congelado a -20°C para

posterior medida de insulina livre no plasma. Seringas de insulina (Becton-Dickinson, Inglaterra) foram empregadas para assegurar a exatidão do volume colhido.

9.1.5. Medida da insulinemia:

A insulina livre no plasma foi medida por radioimunoensaio de duplo anticorpo em fase sólida (Phadesep, Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suécia) . A sensibilidade do ensaio é de 2,5 $\mu\text{U/ml}$ e os C.V.% são de 11,0, 7,3 e 10,2% para concentrações de 12,8, 40,5 e 67,8 $\mu\text{U/ml}$, respectivamente ¹⁴⁰.

9.2. Infusão de glicose a 20%:

Simultaneamente ao início da infusão de insulina na fase B, glicose a 20% (Baxter, Inglaterra) era infundida em velocidade variável, de forma a manter a glicose sanguínea em torno de 90 mg/dl, de acordo com glicemias medidas a cada 5 minutos, em duplicata. A glicose a 20% era infundida por meio de uma bomba de infusão eletrônica (IVAC, Inglaterra) e o protocolo era empírico. Iniciava-se aos 4 minutos, na dose de 2,5 mg/kg/min, sendo aumentada para 3,0 mg/kg/min aos 7, 3,5 mg/kg/min aos 9 e 4,0 mg/kg/min aos 10 minutos. Uma vez na fase C, nova infusão de glicose a 20% era iniciada, nos mesmos moldes.

9.3. Glicose deuterada:

9.3.1. Protocolo de infusão:

Logo de início, simultaneamente com a insulina, era injetada uma dose de 2 mg/kg de glicose deuterada (6-H₂-glicose, Tracer Technologies, Massachusetts, E.U.A.) seguindo-se uma infusão contínua na velocidade 0.02 mg/kg/min, por meio de uma bomba de infusão (Vickers, Inglaterra), mantida até o final do estudo.

9.3.2. Coleta das amostras:

Alíquotas de 3 ml de sangue eram colhidas aos 0, 75, 90, 105, 120 (Fase A), 150, 180, 210, 240, 250, 260, 270 (Fase B), 300, 330, 360, 390, 400, 410, e 420 minutos (Fase C), e colocadas em tubos plásticos revestidos com fluoreto de sódio e mantidos a 4°C. Os tubos eram centrifugados o mais precocemente possível, em centrífuga refrigerada a 4°C, e o plasma separado e congelado imediatamente para posterior análise.

9.3.2. Medida da glicose deuterada:

Espectrometria de massa/cromatografia gasosa em um aparelho VG Trio-2 5890 (Hewlet-Packard, Woking, Inglaterra), usando monitoramento seletivo de um derivado boronato da glicose. O C.V.% (intra-ensaio) é menor do que 2% ¹⁴¹.

Figura 1 - Protocolo do estudo

Variável	Dia						
	-14	0	14	28	42	56	70
Altura	x						
Peso	x	x	x	x	x	x	x
Revisão com nutricionista	x	x	x	x	x	x	x
Revisão de sintomas	x	x	x	x	x	x	x
Pressão arterial	x	x	x	x	x	x	x
Urina de 24 h (exceto 3-metil-histidina) *	x	x	x	x	x	x	x
3-metil-histidina				x			x
Sangue *	x	x		x	x		x
Estudo dinâmico *				x			x
		Run-in	Dieta 1		Wash-out	Dieta 2	

* Vide texto

Figura 2 - Protocolo de infusão no "clamp"

Tempo (min.)	Insulina (mU/m ² /min)	Glicose 20% (mg/kg/min)	D2-glicose
0 a 120	Variável, conforme glicemia.	0,0	2 mg/kg, em "bolo", seguido de 0,02 mg/kg/min. 0,02 mg/kg/min mantido até o final do estudo
120	51,0	2,5	
121	45,4		
122	40,4		
123	36,0		
124	32,0		
125	28,6	3,0	
126	25,4		
127	22,8	3,5	
128	20,2		
129	18,0		
130	16,0	4,0	
131 a 270	16,0	Variável conforme glicemia	
270	255,2	0,0	
271	227,0		
272	202,0		
273	180,0		
274	160,0	2,5	
275	143,0		
276	127,0		
277	114,0	3,0	
278	101,0		
279	90,0	3,5	
280	80,0	4,0	
280 a 420	80,0	Variável conforme glicemia	

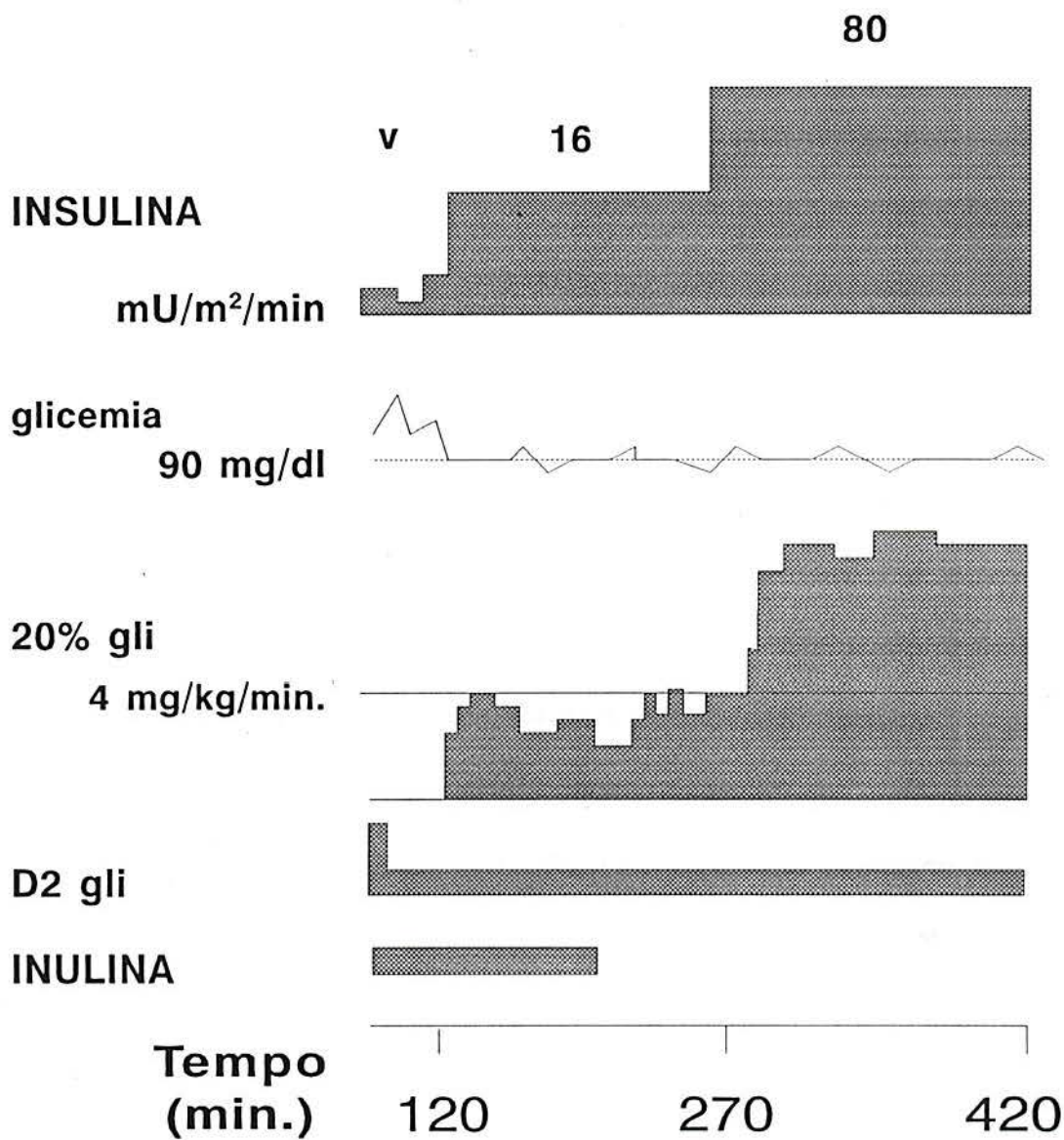


Figura 3 - Diagrama dos estudos dinâmicos. V: variável; 16: 16 mU/m²/min.; 80: 80 mU/m²/min; 20 % gli: solução glicosada a 20%; d2 gli: glicose deuterada.

RESULTADOS

Vinte e seis pacientes, 19 do sexo masculino, preencheram os critérios de inclusão. Destes, um não concordou em tomar parte no estudo e seis desistiram por diversas razões: intolerância à dieta de proteína vegetal (2), desconforto em relação aos "clamps" (4). Estes 7 pacientes não diferiram dos restantes em relação a idade, duração do DM, excreção urinária de albumina ou creatinina sérica.

Dezenove pacientes, 5 com DM tipo 1 e 14 com DM tipo 2, 4 mulheres, idade $55,0 \pm 11,8$ (25-69) anos, duração do diabetes melito $13,8 \pm 8,0$ (3-30) anos, concluíram os dois braços do experimento. Em um destes pacientes, não foi possível realizar o segundo "clamp" por mau acesso venoso, embora a filtração glomerular (FG) tenha sido medida. Um segundo paciente recusou-se a fazer o segundo "clamp" e a segunda FG. Os dados clínicos e laboratoriais basais destes pacientes estão dispostos nas Tabelas I e II.

A adesão dos pacientes às dietas pode ser confirmada pela excreção urinária de 3-metil-histidina, que foi menor durante a dieta vegetariana ($14,4 \pm 3,2$ vs $18,8 \pm 6,3$ $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina, $p = 0,0151$) (Tabela III). Os pacientes mantiveram uma ingestão protéica total semelhante nos dois braços do experimento, conforme estimado pelo registro diário de ingestão e excreção urinária de uréia (Tabela III). Os teores de proteína animal e vegetal foram diferentes, como planejado (Tabela III).

A análise dietética encontra-se detalhada na Tabela IV. Os registros de ingestão e pesagem dos alimentos feitos pelos pacientes permitiram estimar os diversos constituintes da dieta. O teor protéico e valor calórico totais foram semelhantes nas duas dietas, que diferiram em relação ao teor de carboidratos e fibras. As quantidades de gorduras totais, saturadas e mono-insaturadas foram equivalentes, tendo havido maior ingestão de

gorduras poli-insaturadas na APD, provavelmente devido às instruções sobre preparo de alimentos (usando óleos vegetais). O teor de colesterol foi mais alto na APD. Os conteúdos de sódio, potássio, cálcio e fósforo foram semelhantes.

A frutossamina foi mais alta ao final da dieta vegetariana (Tabela V). Em análise para medidas repetidas, a frutossamina não foi estatisticamente diferente no início e final das duas dietas e houve uma redução significativa apenas na APD (ANOVA de Friedman, $p < 0,05$, Figura 4). Glicemia de jejum e hemoglobina glicosilada foram semelhantes ao final das duas dietas (Tabela V).

Peso ($80,3 \pm 16,8$ vs $80,0 \pm 16,6$ kg, APD e VPD, $p = 0,102$) e pressão arterial (sistólica $130,9 \pm 17,6$ mmHg APD vs $133,4 \pm 18,0$ VPD, $p = 0,394$; diastólica $77,8 \pm 12,3$ APD vs $77,5 \pm 9,4$ VPD, $p = 1,00$) não se alteraram ao longo do estudo.

Os níveis de triglicerídeos permaneceram inalterados durante as duas dietas (Tabela VI). O colesterol total reduziu-se significativamente ao final de ambas as dietas, sendo esta redução de magnitude semelhante (Tabela VI, Figura 5). O HDL colesterol se reduziu significativamente apenas na VPD (Tabela VI, Figura 6).

A filtração glomerular foi significativamente mais baixa ao final da dieta vegetariana (APD: $92,4 \pm 30,9$ e VPD: $80,3 \pm 23,1$ ml/min/1,73 m², $p = 0,018$) (Figura 7). A excreção urinária de albumina (EUA) foi semelhante ao final de ambas as dietas (APD: $89,3 \pm 136,4$ e VPD: $95,4 \pm 143,0$ μ g/min, $p = 0,255$); houve redução da EUA durante ambas as dietas, mas esta só atingiu significância estatística na APD (Figura 8).

As insulinemias atingidas na fase C dos estudos dinâmicos foram da ordem de 100 μ UI/ml ($135,9 \pm 23,7$ na APD e $131,7 \pm 25,4$ na VPD, $p = 0,08$), assegurando a supressão da produção hepática de glicose.

A sensibilidade insulínica, expressa pela taxa de deposição de glicose (captação corporal total de glicose), não foi diferente ao final dos dois períodos de dieta (APD: $7,57 \pm 2,33$; VPD: $6,44 \pm 2,31$ mg/kg/min; $p = 0,124$).

Tabela I - Características dos pacientes na admissão ao estudo. Duração do DM: duração *conhecida* do DM; PAS: pressão sistólica; PAD: pressão diastólica; INS: insulina; GLI: glibenclamida; MTF: metformina.

PAC.	Idade anos	Duração do DM anos	Sexo	Tipo de DM	PAS mmHg	PAD mmHg	Peso kg	Tratamento do DM
1	57	30	M	1	136,0	73,5	65,2	INS
2	55	10	M	2	130,0	80,0	73,7	GLI+MTF
3	25	14	F	1	110,0	80,0	72,2	INS
4	61	6	M	2	118,0	77,0	102,3	GLI
5	60	9	M	2	125,0	81,0	129,5	GLI+MTF
6	63	8	M	2	137,5	92,5	94,8	INS
7	30	21	M	1	105,0	85,0	74,0	INS
8	60	9	M	2	158,5	96,0	63,1	DIETA
9	66	10	M	2	154,0	74,0	71,0	GLI
10	55	12	F	2	143,0	91,0	70,5	INS
11	61	30	M	2	184,5	99,5	95,7	INS
12	58	3	M	2	164,0	86,5	112,5	DIETA
13	68	12	M	2	151,0	64,0	76,3	INS
14	49	14,5	F	1	144,0	89,0	59,2	INS
15	58	21	M	2	123,0	69,0	82,4	INS
16	59	10	M	2	135,0	89,0	68,9	GLI+MTF
17	69	10	M	2	145,0	62,5	75,7	DIETA
18	41	6	F	2	117,0	86,0	84,0	INS+MTF
19	50	26	M	1	124,5	89,5	77,2	INS

Tabela II - Características dos pacientes na admissão ao estudo. EUA: excreção urinária de albumina; GLIC: glicemia de jejum; HbA1: hemoglobina glicosilada A1; COL: colesterol total; TG: triglicerídeos; HDL: HDL colesterol.

PAC.	EUA µg/min	GLIC mg/dl	HbA1 %	Frutosamina mmol/l	COL mg/dl	TG mg/dl	HDL mg/dl	Creatinina mg/dl
1	56,2	139	10,3	3,6	253	60	69	1,2
2	47,1	272	13,1	3,1	195	58	66	1,0
3	20,1	135	8,6	3,8	181	35	49	0,8
4	126,6	158	10,3	2,8	216	96	54	1,0
5	57,3	167	8,4	2,6	201	191	23	1,5
6	23,2	178	9,2	3,6	195	85	58	1,4
7	30,7	394	13,8	5,2	179	69	89	1,0
8	112,7	304	12,2	3,9	180	99	69	1,2
9	166,0	164	9,1	2,8	215	102	42	1,1
10	222,9	268	12,2	3,9	267	82	50	0,9
11	248,0	175	10,2	3,4	271	131	54	1,3
12	212,1	128	8,9	2,5	127	98	46	0,8
13	29,9	184	9,0	3,8	256	81	58	0,9
14	29,4	306	10,8	3,3	183	42	62	0,8
15	71,2	117	7,3	2,3	205	193	39	1,3
16	20,0	248	9,1	3,9	300	233	39	1,0
17	32,0	151	7,8	2,9	212	85	50	1,3
18	352,3	164	11,0	2,0	275	409	58	0,5
19	37,6	443	11,1	2,5	233	83	62	1,2

Tabela III - Adesão dos pacientes à dieta: avaliação da ingestão de proteínas totais, animais e vegetais (teste de Wilcoxon).

	APD	VPD	P
Excreção urinária:			
3-metil-histidina ($\mu\text{mol}/\text{mmol}$ creatinina)	18,8 \pm 6,3	14,4 \pm 3,2	0,0151
Uréia (mmol/24 h)	389,1 \pm 112,5	363,1 \pm 152,2	0,44
Registros diários de ingestão:			
Proteínas totais (g/dia)	73,0 \pm 15,5	68,8 \pm 13,1	0,28
Proteína animal (g/dia)	47,4 \pm 12,6	0,47 \pm 0,84 *	< 0,0005
Proteína vegetal (g/dia)	25,6 \pm 5,8	68,3 \pm 13,2	< 0,0005

* Principalmente da manteiga.

Tabela IV - Avaliação dietética. Comparações dos valores ao final de cada uma das dietas. Teste de Wilcoxon. Os valores foram calculados a partir de registros fornecidos pelos pacientes, que eram orientados a pesar e registrar todo e qualquer alimento ingerido. Cálculos feitos em programa de computador específico da Universidade de Londres.

Quantidades por 24 horas	APD	VPD	p
Energia (Kcal)	1645,4 ± 357,2	1732,1 ± 319,0	0,08
Proteínas totais (g)	73,0 ± 15,5	68,8 ± 13,1	0,28
Proteína animal (g)	47,4 ± 12,6	0,47 ± 0,84	< 0,0005
Proteína vegetal (g)	25,6 ± 5,8	68,3 ± 13,2	< 0,0005
Gorduras totais (g)	64,3 ± 18,3	65,9 ± 13,4	0,65
Gorduras saturadas (g)	24,2 ± 7,1	25,2 ± 5,2	0,47
Gorduras mono-insaturadas (g)	23,6 ± 7,4	26,1 ± 6,4	0,15
Gorduras poli-insaturadas (g)	16,0 ± 5,3	13,5 ± 3,9	0,012
Colesterol (mg)	216,9 ± 118,1	60,5 ± 25,6	< 0,0005
Álcool (g)	5,1 ± 9,2	5,9 ± 10,2	0,26
Carboidratos (g)	183,7 ± 42,2	206,8 ± 49,3	0,007
Açúcar (g)	13,1 ± 12,0	12,1 ± 10,8	0,15
Fibras totais (g)	24,9 ± 6,2	40,7 ± 12,1	< 0,0005
Fibras vegetais (g)	10,2 ± 4,0	33,7 ± 12,1	< 0,0005
Fibras cereais (g)	14,7 ± 4,8	6,7 ± 2,7	< 0,0005
Sódio (mg)	2425,6 ± 654,6	2430,9 ± 582,9	> 0,50
Cálcio (mg)	673,8 ± 274,0	582,4 ± 226,5	> 0,20
Potássio (mg)	3022,6 ± 620,5	3531,7 ± 853,5	0,25
Fósforo (mg)	1300,2 ± 309,4	1107,8 ± 310,5	0,052

Tabela V - Controle metabólico. Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Teste de Wilcoxon.

	Final da APD	Final da VPD	p *
Glicemia de jejum (mg/dl)	174,4 \pm 86,4	190,3 \pm 92,0	0,480
Hemoglobina glicosilada A1 (%)	8,74 \pm 1,38	8,63 \pm 2,08	0,710
Frutosamina (mmol/l)	2,87 \pm 0,55	3,02 \pm 0,57	0,0158

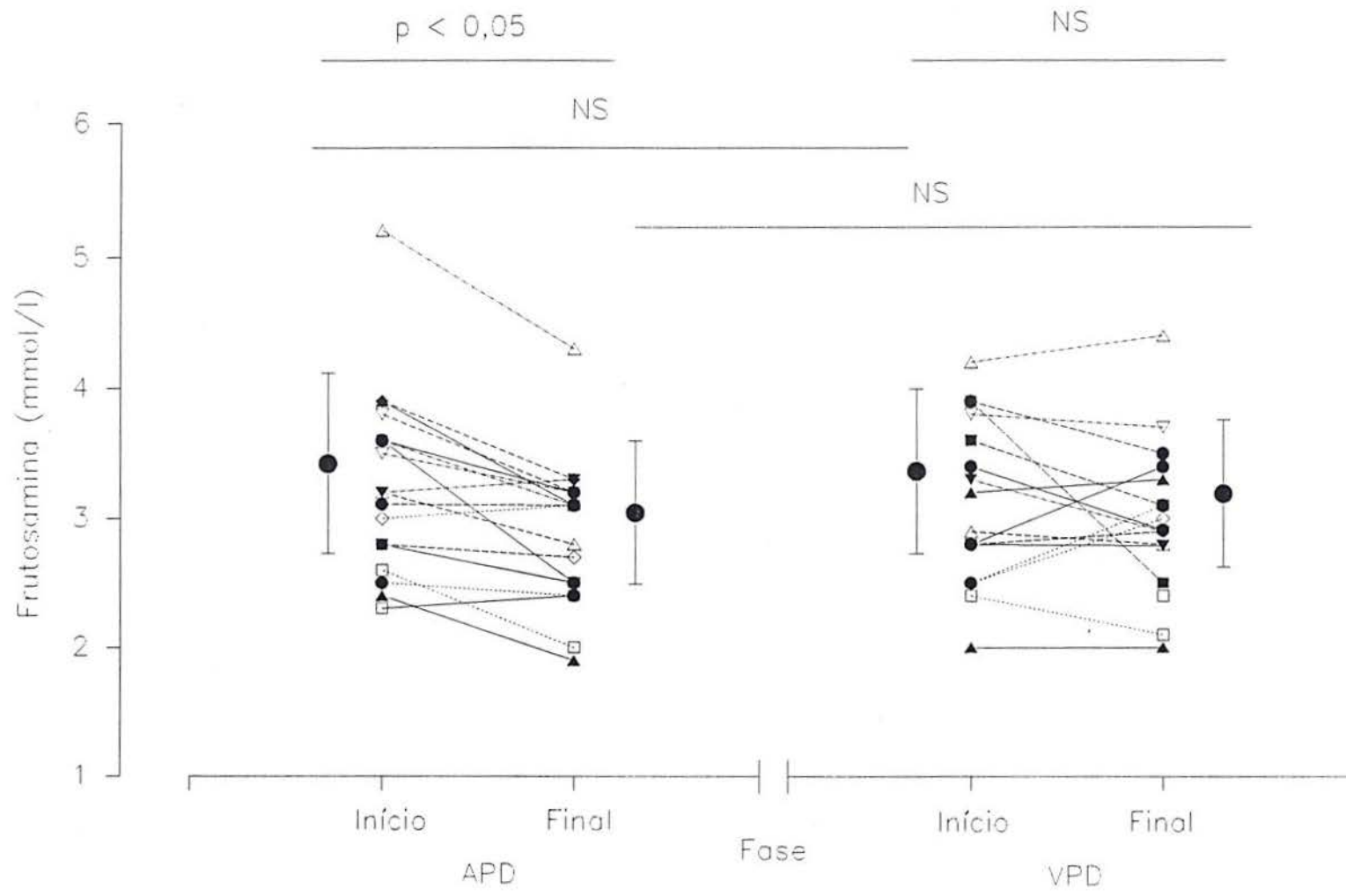


Figura 4 - Frutosamina nas diversas fases do estudo. Análise por ANOVA de Friedman com comparações múltiplas não-paramétricas.

Tabela VI - Perfil lipídico dos pacientes ao final de cada uma das dietas. Os valores são média \pm desvio-padrão. Comparação pelo teste de Wilcoxon.

	APD	VPD	P
Colesterol total (mg/dl)	181,4 \pm 32,4	184,9 \pm 39,4	0,571
Triglicerídeos totais (mg/dl)	110,6 \pm 70,8	102,7 \pm 55,8	0,387
HDL colesterol (mg/dl)	48,3 \pm 12,0	43,6 \pm 10,8	0,025

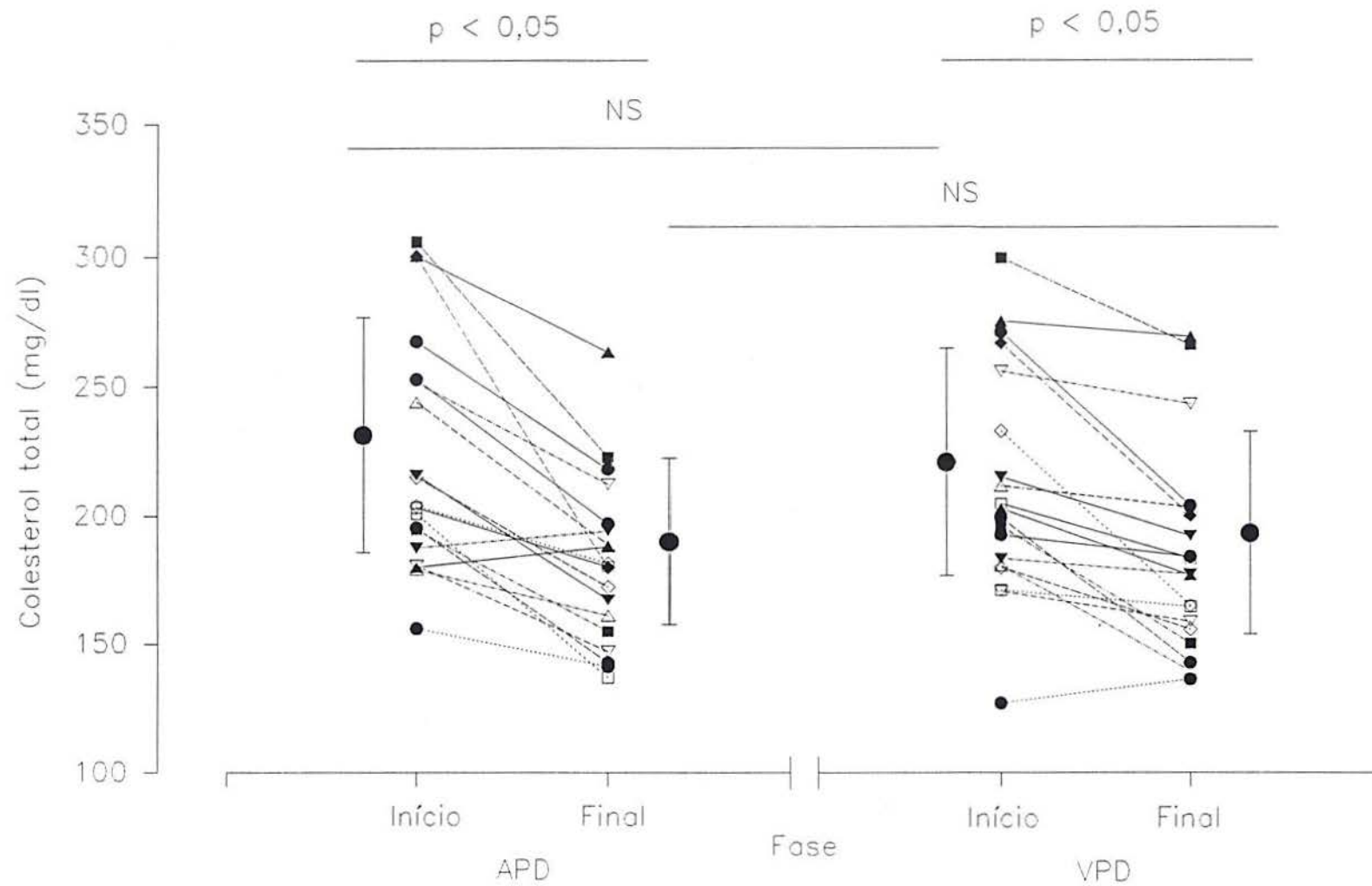


Figura 5 - Colesterol total durante as 2 dietas. Análise por ANOVA de Friedman com comparações múltiplas não-paramétricas.

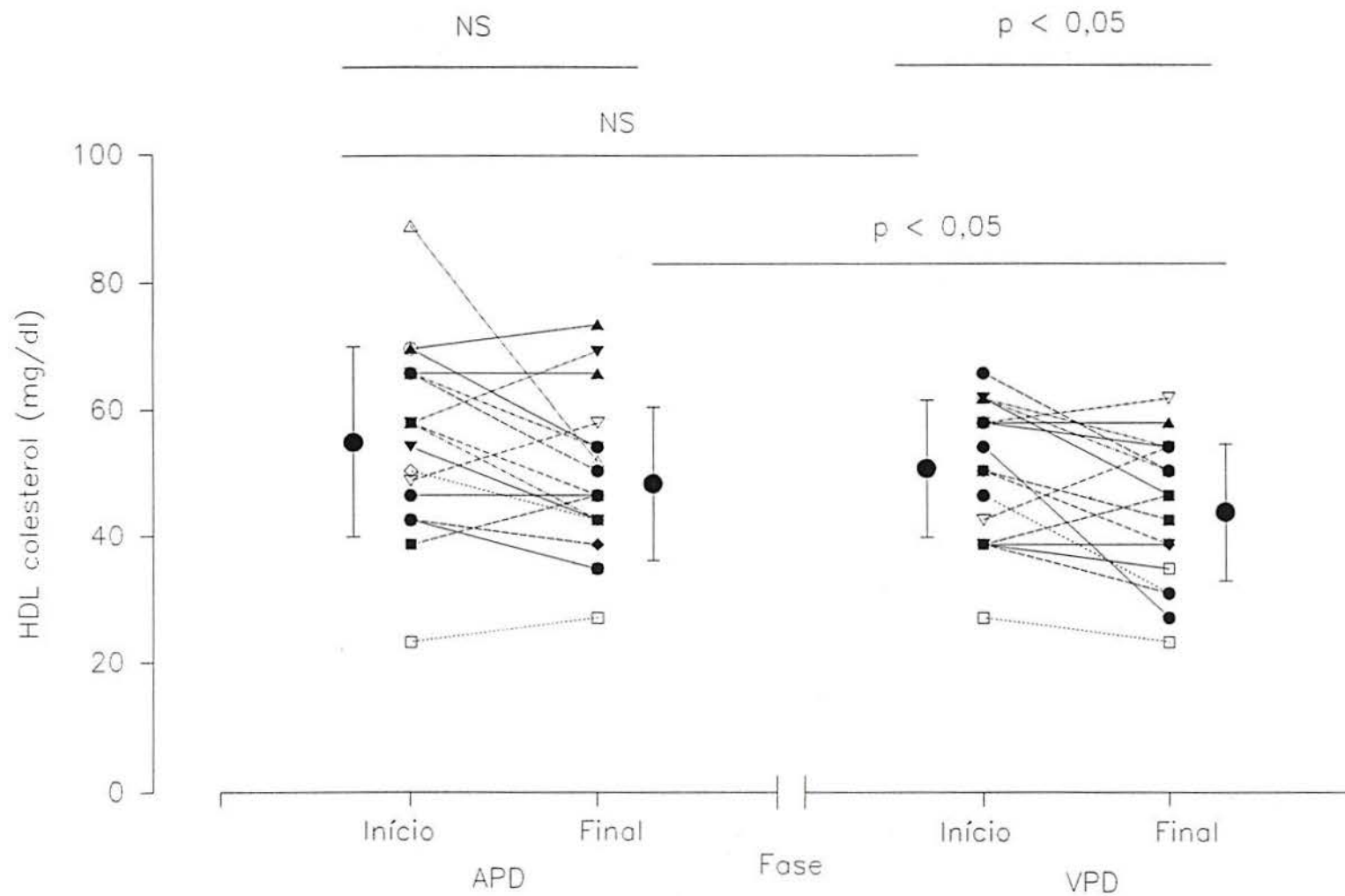


Figura 6 - Níveis de HDL colesterol durante as 2 dietas. Análise por ANOVA de Friedman com comparações múltiplas não-paramétricas.

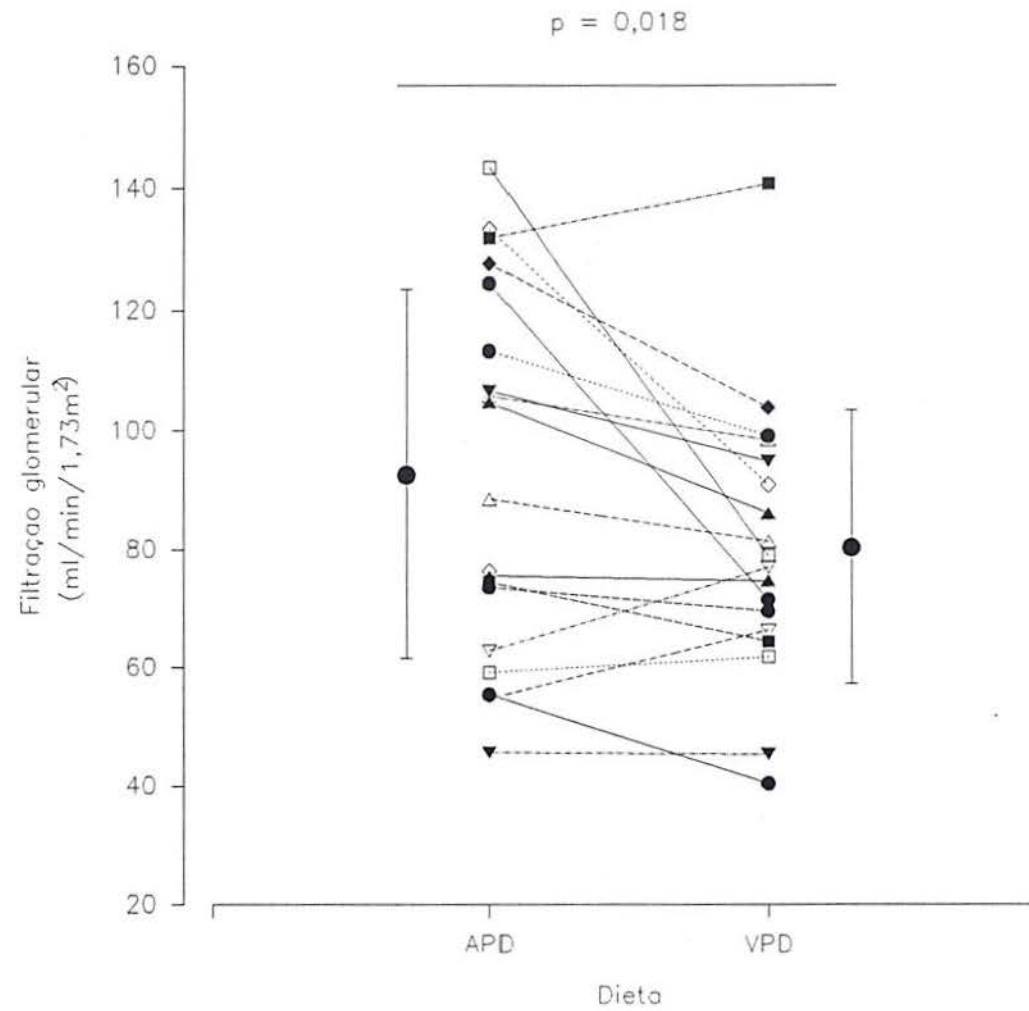


Figura 7 - Filtração glomerular ao final das dietas experimentais. Comparação pelo teste de Wilcoxon. Valores individuais e médias \pm DP.

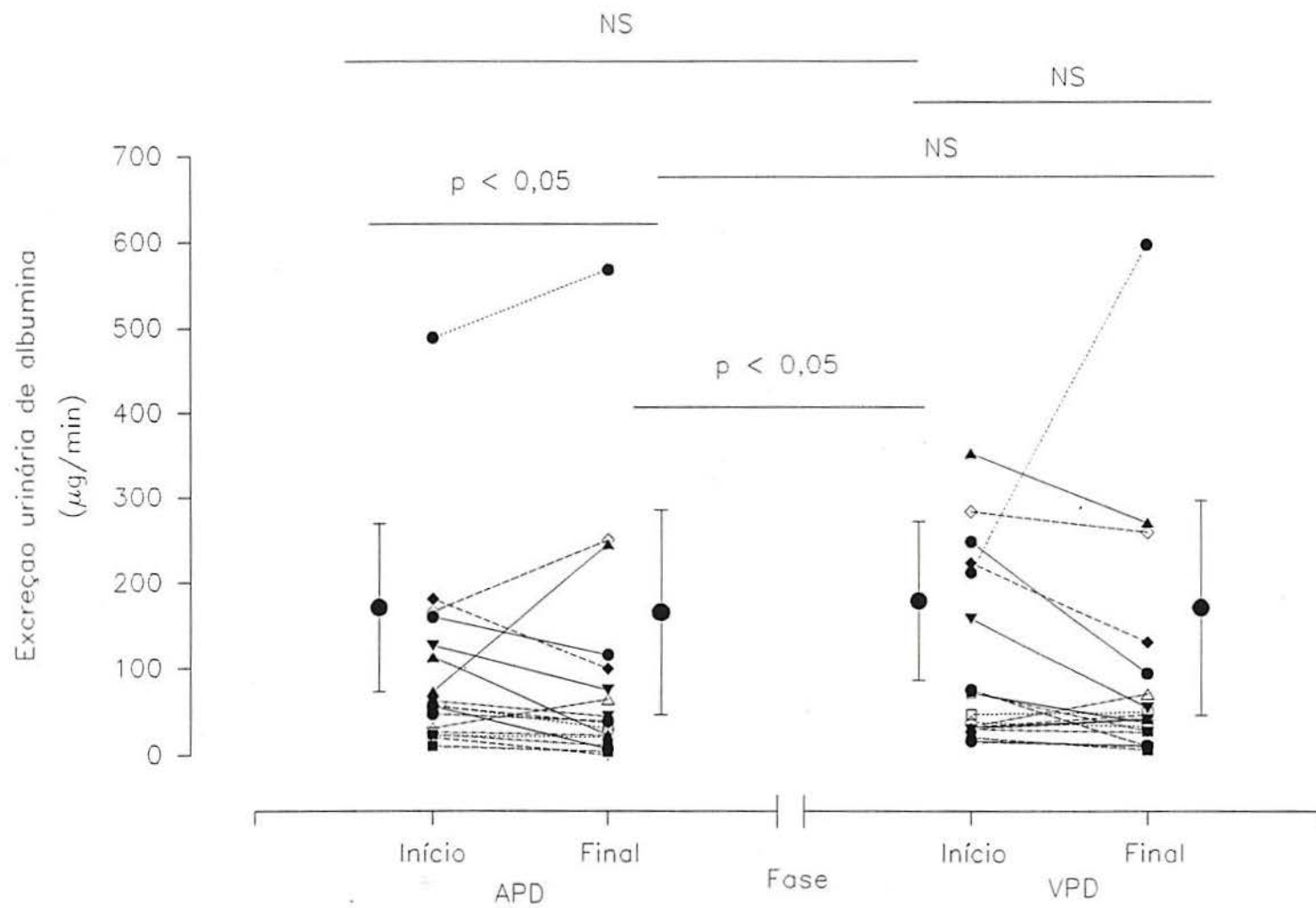


Figura 8 - Excreção urinária de albumina. ANOVA de Friedman, com comparações múltiplas não-paramétricas. Valores individuais e médias \pm D.P.

DISCUSSÃO

Nossos resultados oferecem sugestão adicional de que não apenas a quantidade, mas também a qualidade da proteína ingerida tenha uma importante influência sobre a filtração glomerular. Os pacientes neste estudo conseguiram manter uma ingestão protéica semelhante nas duas dietas. A percentagem de proteína animal e vegetal foi certamente diferente, como confirmado pela excreção de 3-metil-histidina e pelos registros diários de ingestão.

Adultos alimentados com dietas ricas em proteínas apresentam uma elevação da filtração glomerular (FG) e do fluxo plasmático renal (FPR) basais. Quando alimentados com dietas de muito baixo teor protéico, a FG e o FPR caem ^{79 142 143}. Em pacientes diabéticos normoalbuminúricos, uma dieta restrita em proteínas é capaz de reduzir a FG após 4 ¹⁴⁴ ou mesmo 1 semana ¹⁴⁵. Em pacientes microalbuminúricos, 3 semanas de dieta hipoprotéica reduzem a depuração fracional da albumina ¹⁴⁶. Em pacientes diabéticos do tipo 1 proteinúricos, uma dieta restrita em proteínas reduz significativamente a proteinúria, sem afetar FG ou FPR ^{147 148}.

Nem todos os tipos de proteína têm o mesmo efeito. O aumento da FG observado após uma carga de proteína vegetal de soja é menor do que o observado após uma carga equivalente de carne vermelha ¹⁴⁹. Animais submetidos a nefrectomia quase total têm maior sobrevida e menor dano histológico quando alimentados com proteína de soja, se comparados a animais controles alimentados com caseína ⁹². Em seres humanos normais, uma substituição cuidadosa de proteína animal por vegetal, de forma isocalórica e isoprotéica, durante 3 semanas, reduz a FG, FPR e EUA ⁹⁶. Este estudo, controlando as dietas para teores de fibras e lipídios, confirmou os achados de FG e EUA mais baixas em indivíduos

vegetarianos estritos ("vegans")⁹⁴. Mais recentemente, foi demonstrado que a substituição de carne vermelha por carne de galinha ou peixe reduz a FG de pacientes com DM tipo 1 e hiperfiltração glomerular⁹⁵, um argumento adicional em favor do papel que a composição de aminoácidos das diversas proteínas desempenha na modulação da função renal.

Os mecanismos pelos quais a ingestão protéica pode influenciar a FG ainda não foram claramente estabelecidos. O aumento da FG não se relaciona ao conteúdo de sódio e água¹⁵⁰. Níveis aumentados de aminoácidos circulantes parecem ser necessários. Em animais, o aumento da FG após uma refeição de carne¹⁵¹ não é reproduzido quando se administra uréia, sulfato ou ácido em quantidades equivalentes às produzidas pelo catabolismo da carne¹⁵². A infusão de aminoácidos, em animais e humanos, aumenta a FG^{143 153}. A infusão renal unilateral de aminoácidos produz aumento bilateral da FG no cão¹⁵⁴, sugerindo que este efeito possa dever-se a um hormônio circulante. Glucagon e hormônio do crescimento (GH), que são liberados em resposta a infusão de aminoácidos ou ingestão de proteínas, produzem um aumento da FG quando infundidos¹⁵⁵. Este efeito é bloqueado pela somatostatina, a qual inibe a liberação de ambos hormônios¹⁵⁶. A infusão de glucagon diretamente na veia porta faz a FG aumentar de forma mais marcada¹⁵⁷, sugerindo que uma substância vasoativa produzida no fígado, ainda não identificada, poderia ser responsável por estes achados. Níveis aumentados de prostaglandinas vasodilatadoras produzidas no glomérulo foram detectados em animais diabéticos¹⁵⁸ e não-diabéticos¹⁵⁹. A indometacina impede o aumento da FG associado com ingestão de proteínas ou com o diabetes melito^{158 159}. Em humanos com doença glomerular, uma sobrecarga protéica aumenta os níveis plasmáticos de renina e aldosterona e a excreção urinária de prostaglandina E (PGE) e 6-ceto-prostaglandina F (6-ceto-PGF)¹⁶⁰. Outros mecanismos que já foram sugeridos incluem alterações no "feedback" glomérulo-tubular¹⁶¹.

Os níveis glicêmicos desempenham um papel na modulação da hemodinâmica renal ^{162 163 164 165}, sendo a hiperglicemia um fator de aumento da FG. O controle metabólico poderia ser um fator potencial de confusão em estudos envolvendo manipulação dietética. Em nossa série, não podemos atribuir a FG mais baixa observada durante a VPD a um melhor controle metabólico. A glicemia de jejum e a HbA_{1c} foram similares durante ambas as dietas. A única diferença encontrada foi nos níveis de frutossamina, mas estes tenderam a ser mais altos no final da VPD do que no final da APD e, assim mesmo, a média (3,02 mmol/l) foi pouco acima do limite superior da normalidade no laboratório do Guy's Hospital (2,8 mmol/l). Mesmo que as diferenças encontradas fossem consideradas de significância biológica, elas apontariam no sentido de um pior grau de controle durante a VPD e, assim, não proveriam uma explicação adequada para a FG mais baixa observada durante aquela dieta.

Em nossos pacientes, observamos redução da EUA durante a APD. Embora uma dieta hipoprotéica possa reduzir a EUA ⁸⁷, as dietas empregadas neste estudo foram isoprotéicas e é improvável que o achado em nossos pacientes se deva à natureza das proteínas na APD, já que este resultado seria o oposto do observado em não-diabéticos ⁹⁶. É mais provável que a diferença na EUA ao final da APD se relacione com o melhor controle metabólico obtido ao final daquela fase do estudo. Em pacientes diabéticos do tipo 1, o controle glicêmico tem efeito demonstrável sobre a permeabilidade microvascular e a glicemia guarda relação com o nível de albuminúria ¹⁶⁶; associações entre glicemias elevadas e microalbuminúria foram observadas também em pacientes com maior duração do DM ¹⁶⁷ e a correção da hiperglicemia no DM pode reduzir a microalbuminúria ^{168 169}.

Embora vegetarianos estritos saudáveis tenham pressão arterial mais baixa ⁹⁴, nós não encontramos nenhuma diferença significativa em nossos pacientes. Estudos prévios

mostraram que, uma vez que as dietas sejam emparelhadas para o teor protéico total e outros nutrientes importantes, uma dieta predominantemente vegetariana não reduz a pressão arterial ¹⁷⁰. Portanto, neste contexto, é improvável que a dieta tenha agido por meio de interferência com a pressão arterial.

Os níveis de triglicérides não se alteraram durante o estudo. Ambas as dietas reduziram o colesterol total de forma semelhante, sugerindo uma participação da adesão à dieta, de forma inespecífica. Houve uma redução significativa dos níveis de HDL colesterol durante a VPD. Vegetarianos estritos e lacto-vegetarianos tendem a ter níveis de HDL colesterol que não são diferentes dos observados em indivíduos que comem carne ¹⁷¹. Em índios Pima não-diabéticos, uma dieta com alto teor de carboidratos reduz os níveis plasmáticos de HDL colesterol, se comparada com uma dieta rica em gordura, mas o mesmo não se observa em índios Pima diabéticos ¹⁷². Alguns autores relataram níveis mais baixos de HDL colesterol em vegetarianos ^{173 174 175}, mas outros encontraram níveis mais altos ^{176 177}. É difícil colocar este achado em perspectiva. Poder-se-ia afirmar que reduzir os níveis de HDL colesterol representaria um fator de risco potencial para morbidade e mortalidade. No entanto, a tendência é de que vegetarianos tenham menores taxas de mortalidade global, coronariana ou relacionada com o diabetes melito ¹⁷⁸. Portanto, a significância biológico-epidemiológica de encontrar-se uma redução de HDL colesterol durante a VPD ainda necessita ser estabelecida.

Nós não encontramos uma diferença significativa nas taxas de deposição corporal total de glicose ao final das duas dietas. Este fato poderia indicar que a qualidade das proteínas tem mínimo ou nenhum efeito sobre a resistência insulínica. Este achado certamente indica que o efeito sobre a FG provavelmente não é mediado por uma modulação da resistência periférica à insulina. Um estudo empregando dietas com altos teores de

carboidratos e fibras demonstrou um significativo aumento da deposição periférica de glicose¹⁷⁹, mas as composições das dietas de teste e controle foram obviamente diferentes. Há evidências de que dietas com alto teor de carboidratos melhorem a tolerância à glicose¹⁸⁰, mas não há estudos controlados que poderiam indicar um efeito específico da proteína vegetal sobre a resistência insulínica. Nossos resultados não nos permitem dizer que a qualidade de proteínas da dieta tenha algum efeito sobre a resistência periférica à insulina.

Em resumo, não apenas a quantidade, mas também a qualidade das proteínas da dieta tem um efeito demonstrável sobre a hemodinâmica renal. Este efeito não está relacionado com mudanças na pressão arterial, peso corporal, controle metabólico ou resistência periférica à insulina. Este achado poderia ter implicações futuras no manejo dietético do diabetes melito, já que fornece elementos para uma dieta potencialmente mais aceitável e, portanto, mais efetiva, particularmente para pacientes em risco de nefropatia diabética. Estes achados e suas implicações a longo prazo necessitam ser avaliados em estudos adicionais.

**ATIVIDADE DO SISTEMA DE CONTRATRANSPORTE DE SÓDIO-LÍTIO EM
PACIENTES COM DIABETE MELITO TIPO 2 NORMO- E
MICROALBUMINÚRICOS**

INTRODUÇÃO

Nefropatia diabética clínica é definida como a presença de proteinúria persistente, superior a 500 mg em 24 horas, associada a retinopatia, elevação da pressão arterial e declínio da filtração glomerular, na ausência de outras doenças renais, infecção urinária ou insuficiência cardíaca ^{181 182}. A síndrome clínica não é vista em todos os pacientes diabéticos, embora na maioria dos pacientes se observe lesões glomeruloscleróticas ¹⁸³. Cerca de um terço dos pacientes com diabetes melito tipo 1 desenvolvem proteinúria clínica, em geral após 5 anos de doença; o pico de incidência dá-se em torno de 17 anos de evolução, diminuindo rapidamente a partir de 20 anos ^{184 185}. Uma vez observada proteinúria persistente, a deterioração da função renal tende a ser inexorável ¹⁸⁶, com aumento considerável da mortalidade, por insuficiência renal ^{184 185} e cardiopatia isquêmica ¹⁸⁷. Algumas formas de intervenção terapêutica, como tratamento anti-hipertensivo ^{72 188 189} e dieta hipoprotéica ^{87 88} conseguem reduzir a velocidade de deterioração da função, mas não evitam a progressão para insuficiência renal. O controle intensificado do DM provavelmente não modifica a perda de função renal ¹⁹⁰. A busca de marcadores precoces de doença e de fatores de risco tem sido motivada pelo caráter irreversível da nefropatia clínica e sua evolução desfavorável.

O fato de que a incidência cumulativa de nefropatia clínica não ultrapassa 45% após 40 anos de diabetes ^{184 191} sugere que existem indivíduos mais suscetíveis a esta complicação. O sexo masculino é mais afetado, numa razão de 1,7:1,0 ¹⁸². A idade no diagnóstico influencia o risco de nefropatia ^{192 193}, embora a duração pré-puberal do DM pouco contribua para tal ¹⁸⁵. O nível de hiperglicemia durante os primeiros 15 anos de diabetes está positivamente relacionado com risco de proteinúria persistente; no entanto, no mesmo

estudo a incidência de nefropatia caiu rapidamente após 15 anos de duração, embora o controle não tivesse melhorado, o que sugere que fatores não-metabólicos, provavelmente genéticos, estão envolvidos na gênese desta complicação ¹⁸⁵. As alterações metabólicas seriam, portanto, necessárias, mas não suficientes para que a nefropatia clínica se manifestasse.

Os métodos convencionais de quantificação de proteinúria, incluindo fitas reagentes, só conseguem detectar concentrações de albumina a partir de 250 mg/l, correspondendo a uma excreção de 200 $\mu\text{g}/\text{min}$. Estes valores são já nitidamente patológicos, representando proteinúria clínica. Em 1963, Keen and Chlouverakis ¹⁹⁴ descreveram um radioimunoensaio capaz de detectar albumina em baixas concentrações na urina. Em indivíduos normais, esta concentração corresponde a uma excreção de 1,5 a 20,0 $\mu\text{g}/\text{min}$ ¹⁹⁵, o que se convencionou chamar de "normoalbuminúria". Observou-se que uma parcela de pacientes diabéticos apresenta níveis supra-normais de excreção urinária de albumina em diversas situações. Inicialmente, um aumento da excreção urinária de albumina da ordem de 3 a 4 vezes acima do nível normal foi observado em pacientes com diabetes melito tipo 2 recém-diagnosticados ¹⁹⁶. Pacientes jovens, recém-diagnosticados com diabetes melito tipo 1 e pacientes com DM tipo 1 recente mal controlado freqüentemente apresentam elevações da albuminúria ^{166 197 198}. Elevações sub-clínicas da albuminúria são também observáveis em pacientes diabéticos do tipo 1 com evolução mais longa ¹⁶⁷. Estes níveis anormais, embora sub-clínicos, de excreção urinária de albumina foram chamados de "microalbuminúria".

A prevalência de microalbuminúria em pacientes diabéticos do tipo 1 tem sido estimada entre 5% e 37% ^{199 200 201 202 203}, sendo estas diferenças atribuídas a vícios de seleção. O fato é que, como na nefropatia clínica, não se observa microalbuminúria na

totalidade dos pacientes. A microalbuminúria não se correlaciona com idade. Há um predomínio do sexo masculino e estes pacientes tendem a ter diabetes há mais tempo ^{203 204}. Microalbuminúria persistente é excepcional nos primeiros 5 anos de DM tipo 1 ^{200 204} e não foi diagnosticada em crianças abaixo de 15 anos de idade ¹⁹⁹. A correção da hiperglicemia reduz a microalbuminúria ^{166 167 168 169 198}. Exercício exaustivo provoca um aumento na excreção de albumina de pacientes com valores normais no repouso ^{205 206}, mas este efeito é modulado pelo grau de controle metabólico ^{207 208 209} e é observado também em indivíduos não-diabéticos, desde que a intensidade do exercício seja adequadamente padronizada ²¹⁰.

Estudos clínicos demonstraram que a pressão arterial de pacientes com microalbuminúria, embora ainda dentro dos limites considerados "normais", é significativamente mais alta do que a pressão arterial de pacientes diabéticos normoalbuminúricos e que a pressão arterial se correlaciona de forma linear, positiva e independente com a microalbuminúria ^{211 212}. Além disso, pacientes diabéticos microalbuminúricos com função renal normal apresentam perfis lipídicos anormais, que não podem ser atribuídos a insuficiência renal crônica ^{213 214 215}.

No diabetes melito tipo 2, a prevalência de microalbuminúria varia de 8 a 46% em europeus ^{7 202 204 216 217} e é de até 47% em índios Pima ²¹⁸. Correlaciona-se com níveis glicêmicos também em pacientes com intolerância à glicose ^{196 216 218}. Não existe correlação com sexo, mas associações significativas foram observadas com pressão arterial diastólica ²¹⁹.

A microalbuminúria tem significado prognóstico para o desenvolvimento de nefropatia clínica no diabetes melito tipo 1 ^{168 220 221 222}. No entanto, não pode ser considerada como um marcador de suscetibilidade para o desenvolvimento de nefropatia

clínica, já que é indetectável nos primeiros 5 anos de diabete. É mais provavelmente um sinal de doença renal (ou microvascular) inicial, associando-se a lesões estruturais mais severas dos que as observadas em pacientes normoalbuminúricos e semelhantes àquelas dos pacientes proteinúricos ²²³. O que se está identificando é um sub-grupo de indivíduos com doença microvascular estabelecida, grande parte dos quais evolui para estágios mais avançados e eventualmente fatais.

No diabete melito tipo 2, a microalbuminúria é um fator de risco para doença cardiovascular. Estudos retrospectivos, cobrindo períodos de 10 a 14 anos, sugeriram que a microalbuminúria seria um indicador de risco para morte por doença cardiovascular nestes pacientes ^{20 21 217}. Em um recente estudo prospectivo, ficou confirmado que a incidência de morte por doença cardiovascular é significativamente mais alta entre pacientes diabéticos do tipo 2 com microalbuminúria quando comparados a pacientes diabéticos do tipo 2 normoalbuminúricos; a microalbuminúria é um poderoso marcador de risco para morte cardiovascular nestes pacientes, mesmo quando ajustada para outras variáveis ²³.

Este corpo de evidências levou Deckert a formular a hipótese de que a microalbuminúria seria na verdade um reflexo de dano microvascular generalizado e não apenas de injúria ao rim ²²⁴.

Manobras de intervenção são capazes de alterar a excreção urinária de albumina neste estágio. O uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), em pacientes diabéticos microalbuminúricos não-hipertensos, leva a uma normalização da excreção urinária de albumina em 50% dos pacientes, sem alteração da filtração glomerular e com redução da pressão arterial média da ordem de apenas 10 mmHg ²²⁵. Não há estudos adequados a longo prazo. Os objetivos mais importantes seriam redução de morbi/mortalidade e preservação de função renal. Estes objetivos não são contemplados neste

estudo. No momento, pode ser prematuro extrapolar, de pacientes proteinúricos para pacientes microalbuminúricos, conclusões acerca da proteção ao rim por anti-hipertensivos (particularmente inibidores da E.C.A). A redução do teor protéico da dieta em 50% reduz a depuração fracional de albumina em pacientes com microalbuminúria ⁸⁹ e reduz a filtração glomerular em pacientes hiperfiltrantes ⁹⁰, de forma independente do controle metabólico e da pressão arterial. Novamente, deve-se exercer cautela quanto às implicações destes achados a longo prazo.

O controle glicêmico intensificado provou ser altamente eficaz na prevenção das complicações crônicas do DM ^{120 121}. No entanto, o custo social deste tipo de abordagem torna-a quase inviável em comunidades menos privilegiadas. No Brasil, com instituições públicas em estado falimentar, o custo é proibitivo. Medidas de alto custo, no entanto, poderiam ser reservadas para aqueles pacientes cujo risco de desenvolver complicações crônicas, com custo de tratamento altíssimo, seja suficientemente grande. Um marcador mais precoce do que a microalbuminúria torna-se necessário.

A questão fundamental na nefropatia diabética humana continua sendo por que apenas uma parcela dos pacientes desenvolve insuficiência renal? Se as alterações metabólicas, que ocorrem em todos os pacientes em algum grau, fossem as únicas responsáveis pelo dano renal, TODOS os pacientes diabéticos eventualmente apresentariam proteinúria e insuficiência renal. Não se pode negar que o controle glicêmico tem um papel no desenvolvimento das complicações ²²⁶ e que, como já exposto, a intensificação do controle metabólico previne o desenvolvimento de nefropatia nos pacientes com diabetes melito tipo 1 ^{120 121}. No entanto, a maioria dos pacientes mantém uma função renal praticamente normal durante toda a vida.

Há diversas evidências na literatura apontando para uma agregação familiar de nefropatia diabética. A prevalência de nefropatia diabética entre irmãos diabéticos de pacientes com diabetes melito tipo 1 com nefropatia é cinco vezes maior do que a observada entre irmãos diabéticos de pacientes diabéticos do tipo 1 sem nefropatia ²²⁷. Em índios Pima, a presença de um progenitor diabético com proteinúria implica prevalência 50% maior de nefropatia diabética nos filhos diabéticos; se ambos os pais são proteinúricos, a prevalência de proteinúria nos filhos diabéticos mais do que dobra ²²⁸. Estes achados reforçam a idéia de que existe um fator genético na gênese da nefropatia diabética, mas não esclarecem a natureza deste fator. A pressão arterial dos pais (não-diabéticos) de pacientes diabéticos com proteinúria é significativamente mais alta do que a pressão arterial dos pais (não-diabéticos) de pacientes diabéticos não-proteinúricos ^{102 103}. Este tipo de evidência clínica leva a crer que a predisposição para o desenvolvimento de certas complicações microvasculares do diabetes melito ocorre paralelamente a uma predisposição para hipertensão arterial sistêmica.

Estudos de sistemas celulares de transporte de cátions vêm sugerindo possíveis mecanismos para esta predisposição para a nefropatia diabética e possivelmente para a doença cardiovascular que ocorre de forma concomitante. O contratransporte de sódio-lítio (Na^+/Li^+ CT) é um destes sistemas celulares cuja atividade é geneticamente determinada. Está associado com risco de hipertensão essencial na população não-diabética ^{229 230 231 232}. Em pacientes diabéticos do tipo 1, a atividade deste sistema é mais elevada em pacientes proteinúricos ^{102 233} e seus pais ²³⁴ do que em controles normoalbuminúricos. Pacientes microalbuminúricos também apresentam maior atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio ²³⁵. Estudando 185 pacientes diabéticos do tipo 1 de forma transversal, consecutiva, confirmamos que um aumento da atividade do sistema de

contratransporte de sódio-lítio está associado com micro- e macroalbuminúria de forma significativa, mas não totalmente independente de fatores como pressão arterial e controle glicêmico ²³⁶. Valores mais altos de contratransporte de sódio-lítio estão associados com aumento de LDL colesterol, VLDL triglicerídeos e triglicerídeos totais, bem como com níveis reduzidos de HDL₂ colesterol ²³⁷. Além disso, o aumento da atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio está relacionado com maior resistência insulínica ²³⁸ e hipertrofia ventricular esquerda em pacientes diabéticos do tipo 1 não-macroproteínúricos ¹¹⁷. A resistência insulínica pode ser o elo de ligação entre as anormalidades lipídicas, predisposição para hipertensão arterial, hipertrofia ventricular esquerda, aumento do volume renal e aumento da excreção urinária de albumina, todos fatores relacionados com dano vascular ^{239 240 241}. Nosso estudo transversal sugere que a interação entre o aumento da atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio e o mau controle do diabetes seria um fator de risco particularmente importante para nefropatia diabética ²³⁶.

Acredita-se que o sistema de contratransporte de sódio-lítio reflita o modo de operação do "antiporter" de sódio-hidrogênio (Na⁺/H⁺), um sistema fisiológico que participa da regulação do crescimento celular, da reabsorção renal de sódio e, portanto, da pressão arterial ²⁴². De fato, observa-se aumento da atividade do sistema de sódio-hidrogênio em pacientes diabéticos do tipo 1 com microalbuminúria ²⁴³ e maior crescimento de fibroblastos de pele de pacientes com nefropatia diabética ²⁴⁴. É provável, portanto, que as células de pacientes diabéticos que desenvolvem nefropatia tenham uma capacidade intrinsecamente aumentada de crescer e proliferar, sendo este fenômeno espelhado por um aumento da atividade do sistema de troca de sódio-hidrogênio e, talvez, por via indireta, do contratransporte de sódio-lítio. Vale a pena notar que, em períodos de maior crescimento corporal, como a puberdade, e particularmente quando o controle do diabetes é pior, existe

maior resistência insulínica ²⁴⁵. Seriam talvez os pacientes com predisposição para maior crescimento e proliferação celulares e diferente homeostase intracelular de sódio, refletidos por aumento da atividade dos sistemas de transporte de cátions, aqueles que, expostos à mudança ambiental provocada pelo diabetes melito, viriam a desenvolver complicações como a nefropatia (Figura 1).

O entendimento da nefropatia diabética no diabetes melito tipo 2 é incompleto e fragmentário. A prevalência de proteinúria clínica é em torno de 16% ⁷, variando de 7% em pacientes com diagnóstico há menos de 5 anos até 35% em pacientes com mais de 25 anos de doença, com predomínio do sexo masculino ^{7 34 246}. O comportamento da nefropatia nestes pacientes é diferente, com deterioração mais lenta da função renal ⁴⁸. No entanto, a mortalidade de pacientes diabéticos do tipo 2 não é menos significativa do que a observada no diabetes melito tipo 1. Caracteristicamente, os pacientes com DM tipo 2 morrem devido a complicações macrovasculares (como doença arterial periférica, distúrbios da circulação cerebral e, principalmente, cardiopatia isquêmica). A mortalidade cardiovascular excessiva observada nestes pacientes ²⁴⁷ se associa com a presença de microalbuminúria ^{20 23} e é ao menos em parte explicada por um perfil lipídico desfavorável, com aumento de colesterol e triglicérides ²³. Em nossa experiência, os pacientes diabéticos do tipo 2 proteinúricos são mais velhos, com maior duração conhecida do diabetes melito, apresentam glicemia de jejum e creatinina plasmática mais elevadas e maior frequência de complicações crônicas e hipertensão arterial sistêmica do que pacientes normoalbuminúricos ²⁸. Ao contrário do observado no diabetes do tipo 1, em que a mortalidade excessiva ocorre predominantemente entre os pacientes com proteinúria clínica, nos pacientes diabéticos do tipo 2, se nota um marcante excesso de morbi-mortalidade cardiovascular já na fase de microalbuminúria ²¹⁷. A taxa de mortalidade se eleva ainda mais quando existe

proteinúria ²⁴⁸. Portanto, a microalbuminúria se torna não um indicador de risco, mas um indicador de doença vascular estabelecida, com iminente possibilidade de agudização e morte. No DM tipo 2 também existe agregação familiar de nefropatia diabética ²²⁸. Os mecanismos desta agregação familiar são mal conhecidos. Estudos transversais não demonstraram o mesmo grau de associação entre sistemas de transporte de cátions e nefropatia diabética nestes pacientes. O contratransporte de sódio-lítio parece guardar alguma relação com a excreção urinária de albumina ²⁴⁹, mas não com a pressão arterial ou presença de hipertensão ²⁵⁰. No entanto, estes estudos são limitados pela seleção de pacientes. No estudo de Foyle ²⁴⁹ e colaboradores, os critérios de seleção e o valor da excreção urinária de albumina não são claros. No estudo de Trevisan ²⁵⁰ e colaboradores, pacientes foram selecionados de forma sistemática e classificados em normo- e hipertensos, mas não foi medida a excreção urinária de albumina.

Assim, no momento, o entendimento das relações entre predisposição genética, doença renal diabética e fatores de risco cardiovasculares no diabetes melito tipo 2 não é tão completo como no diabetes melito tipo 1. No entanto, os marcadores de risco hoje disponíveis, incluindo a microalbuminúria, podem estar indicando pacientes em risco imediato, ou mesmo pacientes com doença vascular já estabelecida, sendo portanto inadequados como tal. Um melhor entendimento das relações entre microalbuminúria, fatores de risco cardiovasculares e predisposição genética torna-se necessário para que a prevenção de complicações passe a ser eficiente.

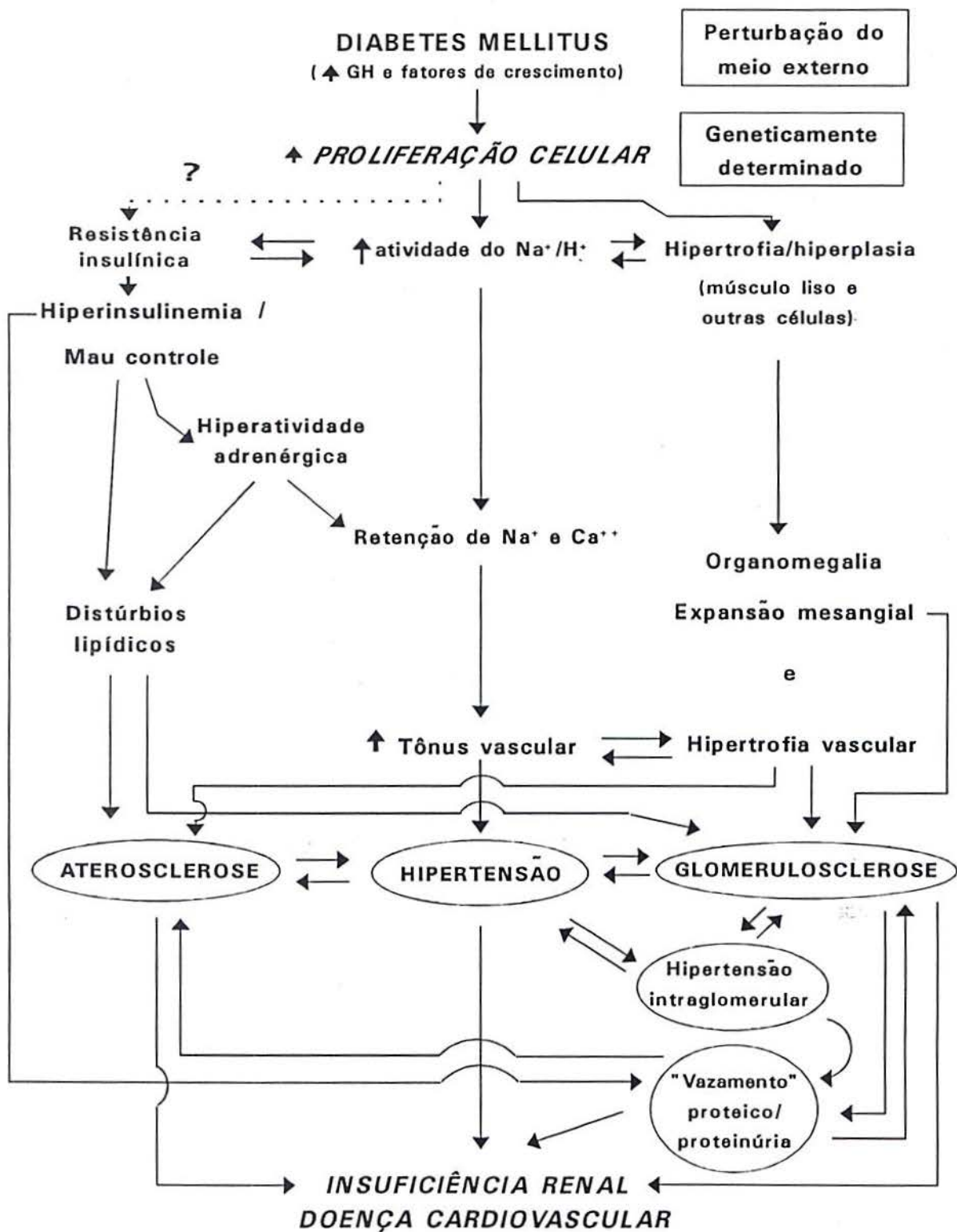


Figura 1 - Hipótese integradora da gênese de complicações crônicas do diabetes melito (adaptado da ref. 182).

PACIENTES E MÉTODOS

Pacientes diabéticos do tipo 2 (critérios da O.M.S.), caucasianos, cadastrados e freqüentando o ambulatório de diabetes do Lewisham Hospital foram recrutados para o estudo. Todos os pacientes que compareciam ao serviço eram testados para presença de proteínas na urina com fita reagente. Aqueles com leitura negativa eram convidados a participar do estudo. Os critérios de exclusão eram: insuficiência renal (creatinina > 1,65 mg/dl), insuficiência cardíaca, hematúria, história de outras nefropatias. Todos os pacientes recrutados deram consentimento pós-informação. O estudo foi autorizado pelo comitê ético do hospital.

Até a data da avaliação, os pacientes eram instruídos para coletarem três amostras de urina noturna, com o tempo de coleta cuidadosamente anotado, para medida de excreção urinária de albumina (EUA). A mediana dos três valores foi utilizada no estudo. As amostras eram necessariamente estéreis, com confirmação por cultura. Pacientes com infecção urinária eram tratados e os testes repetidos após confirmação da cura. Pacientes com uma EUA inferior a 20 $\mu\text{g}/\text{min}$ eram considerados normoalbuminúricos; com EUA igual ou superior a 20 e no máximo igual a 200 $\mu\text{g}/\text{min}$, microalbuminúricos. No dia do estudo, os pacientes eram admitidos pela manhã, em jejum, à enfermaria metabólica do Guy's Hospital. Uma história clínica onde se confirmava regime de tratamento, idade e duração do diabetes era obtida. Verificavam-se peso e altura. Após 10 minutos de descanso, a pressão arterial era medida por duas vezes, no membro superior direito, com um intervalo de 3 minutos, estando o paciente sentado. Foi utilizado um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio com zero aleatório (Hawksley, Lancing, Inglaterra) e um manguito padrão de 12,5 cm. O primeiro e o quinto sons de Korotkoff foram utilizados para determinar pressão sistólica e diastólica,

respectivamente. Foram considerados como hipertensos os pacientes com pressão arterial sistólica superior a 140 mmHg ou diastólica superior a 90 mmHg (hipertensão estágio 1 ²⁵¹) na ausência de drogas com efeito anti-hipertensivo ²⁵², ou com quaisquer valores em vigência de anti-hipertensivos. Nesta definição foram utilizadas as médias das duas aferições. Foram classificados como não-fumantes os pacientes que não tivessem fumado nos últimos 12 meses.

Os dados de história clínica eram confirmados no prontuário dos pacientes. Os pacientes foram classificados como portadores de retinopatia diabética quando apresentassem pelo menos 2 microaneurismas ou micro-hemorragias à fundoscopia direta, sob midríase. Neuropatia periférica foi diagnosticada quando houvesse diminuição do reflexo aquileu ou patelar. Os pacientes foram submetidos a um eletrocardiograma (ECG) para classificação pelo código Minnesota e responderam ao questionário cardiovascular da Organização Mundial da Saúde ²⁵³. De acordo com os resultados do questionário cardiovascular e do código Minnesota, os pacientes foram classificados como portadores de doença cardiovascular (CV+) ou livres de evidências de doença cardiovascular (CV-). Os pacientes com respostas positivas ao questionário (angina, infarto do miocárdio prévio, cirurgia de revascularização miocárdica, acidente vascular cerebral), e/ou códigos Minnesota 1-3, 4-1, 4-2 ou 4-3, acompanhados de 5-1, 5-2 ou 5-3 (suspeita de isquemia, Minnesota 1) ou 1-1, 1-2 ou 7-1 (provável isquemia, Minnesota 2) foram classificados como CV+. Foram considerados CV- aqueles pacientes com quaisquer outros códigos de ECG (ou ECG normal) e história negativa para doença cardiovascular.

A seguir, uma amostra de sangue era colhida para determinação de: glicose, hemoglobina glicosilada A1, colesterol total, triglicerídeos, LDL colesterol, VLDL colesterol, LDL triglicerídeos, VLDL triglicerídeos, HDL triglicerídeos e HDL colesterol,

ApoA, ApoB, Lp(a), creatinina, insulina e atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio.

PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS:

1. Contratransporte de sódio-lítio ^{102 229 230 254}:

Uma alíquota de sangue (20 ml), colhida em seringa tratada com heparina mucosa (Leo, Inglaterra) era imediatamente levada ao laboratório. A amostra era centrifugada a 450 x G por 10 minutos, a 4°C. O plasma e o creme de leucócitos eram aspirados e desprezados. A massa de eritrócitos era lavada por 4 vezes com a seguinte solução isotônica em água de-ionizada, pH 7,4, a 4°C:

	mmol
Cloreto de colina	149
Cloreto de magnésio	1
Cloreto de ácido tris (hidroximetil) aminometano morfolinpropano sulfônico (Tris-MOPS)	10
Glicose	10

Durante a fase de lavagem das células, o material era gentilmente suspenso na solução e, após, centrifugado a 650 X G durante 5 minutos, a 4°C. O líquido sobrenadante era aspirado e desprezado e a operação repetida, totalizando 4 lavagens.

Terminada a lavagem, as células eram incubadas a 37°C, durante 3 horas, pH 7,4, em um meio contendo:

	mmol
Cloreto de lítio	150
Cloreto de ácido tris (hidroximetil) aminometano morfolinpropano sulfônico (Tris-MOPS)	10
Glicose	10

Esta solução assegura concentrações intracelulares de lítio acima de 8 mmol. No laboratório do Guy's Hospital, as concentrações intracelulares de lítio têm se mantido sempre acima de 10 mmol/l ($11,0 \pm 0,7$ mmol/l, coeficiente de variação 6,6 %, dados do controle de qualidade, não publicados).

Após a incubação, as células eram novamente lavadas por 4 vezes, de modo a remover qualquer resíduo de lítio extracelular.

A seguir procedia-se ao estudo cinético. O efluxo de lítio em um meio contendo sódio consiste de uma associação do contratransporte, que depende do sódio extracelular, e do efluxo passivo, que independe do sódio. O contratransporte de sódio-lítio deve então ser calculado a partir da diferença entre o efluxo de lítio no meio com sódio (contratransporte + efluxo passivo) e o efluxo no meio sem sódio (efluxo passivo). As células eram então aliqüotadas e incubadas em dois meios: um, contendo sódio; o outro, livre de sódio. As seguintes soluções isotônicas, em água de-ionizada, pH 7,40 a 37°C, eram utilizadas:

SOLUÇÃO COM SÓDIO	mmol
Cloreto de sódio	150,0
Cloreto de ácido tris (hidroximetil) aminometano morfolinpropano sulfônico (Tris-MOPS)	10,0
Cloreto de magnésio	1,0
Ouabaína	0,1
Glicose	10,0

SOLUÇÃO SEM SÓDIO	mmol
Cloreto de colina	149,0
Cloreto de ácido tris (hidroximetil) aminometano morfolinpropano sulfônico (Tris-MOPS)	10,0
Cloreto de magnésio	1,0
Ouabaína	0,1
Glicose	10,0

A incubação era feita a 37°C, em banho de agitação. Aos 15 e 30 minutos de incubação, alíquotas duplas eram retiradas de cada tubo, imediatamente refrigeradas em banho de água e gelo a 4°C e separadas por centrifugação durante 1 minuto em uma mini-centrífuga (Beckman Microfuge B) mantida sob refrigeração. O sobrenadante era cuidadosamente removido com uma pipeta plástica descartável e transferido para um tubo de polipropileno que era imediatamente congelado a -20°C. Ao final da incubação, uma amostra da suspensão de células era tomada para determinação do hematócrito, de forma a estimar o volume de eritrócitos em cada meio (com e sem sódio). A concentração de lítio no sobrenadante era determinada por espectrofotometria de emissão atômica (Phillips Analytical Atomic Absorption PU 9400, Cambridge, Inglaterra); eram empregados padrões contendo 0,5 a 100,0 μmol de lítio, preparados a partir dos meios de incubação com e sem sódio. Desde que o contratransporte se mostrasse linear, com um coeficiente de correlação (r) significativo, da ordem de pelo menos 0,985, o valor era extrapolado para 60 minutos, por meio da reta de regressão. A atividade do contratransporte de sódio-lítio era então calculada como milimóis de lítio liberados por 1 litro de eritrócitos a cada hora. No laboratório do Guy's Hospital, uma atividade do Na^+/Li^+ CT igual ou inferior a 0,41 mmol/l eritrócitos x h é considerada normal ²³³.

A ouabaína foi adquirida da Sigma Chemical Company Ltd. Todos os demais reagentes foram adquiridos da BDH Chemical Ltd. A água de-ionizada era fornecida pelo laboratório do Serviço de Reumatologia do Guy's Hospital.

2. Lipídios, lipoproteínas e frações:

As frações lipoprotéicas lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) foram separadas por ultracentrifugação preparatória ²⁵⁵. Colesterol e triglicérides séricos totais e respectivas frações lipoprotéicas foram medidos por método enzimático (Boehringer Mannheim, Inglaterra) em um auto-analisador Cobas-Bio (Roche, Inglaterra). HDL colesterol foi medido após separação de LDL e VLDL do soro por precipitação com heparina e cloreto de magnésio. Lipoproteína (a) - Lp(a) - foi medida por ensaio imunoenzimático (ELISA) (Immuno Ltd., Inglaterra). Apolipoproteínas A e B foram medidas por imunoturbidimetria (Immuno Ltd., Inglaterra), em auto-analisador Cobas-Bio.

3. Insulina, glicose e hemoglobina glicosilada:

A insulina foi medida por um radioimunoensaio de duplo anticorpo (Pharmacia, Suécia). A glicose foi medida por método enzimático - glicose hexoquinase (Roche, Inglaterra) - em auto-analisador Cobas-Bio. A hemoglobina glicosilada foi medida como HbA1 por eletroendosmose (Ciba-Corning, Inglaterra).

4. Creatinina:

Reação cinética de Jaffé em auto-analisador Hitachi (Boehringer BCL, Inglaterra).

5. Albuminúria:

Imunoturbidimetria, em auto-analisador Cobas Fara (Roche, Inglaterra).

ESTATÍSTICA

Já que diversas variáveis (entre as quais EUA, triglicerídeos totais, VLDL triglicerídeos, VLDL colesterol e Na^+/Li^+ CT apresentassem distribuições não-normais, foram utilizados testes não-paramétricos na análise estatística. Quando necessários, foram empregados modelos de regressão logística. Nestes, foram testados modelos utilizando as variáveis não transformadas ou logaritmicamente transformadas; como os resultados foram semelhantes, optou-se pelo modelo utilizando as variáveis não-transformadas. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados são expressos como média \pm desvio-padrão, para fins de descrição. Em nosso meio, a descrição de variáveis por sua média e desvio padrão é mais difundida - embora não necessariamente correta para variáveis não-Gaussianas - e facilita o entendimento dos dados.

RESULTADOS

Trinta e oito pacientes com diabetes melito tipo 2 foram examinados. As características clínicas destes pacientes estão na Tabela I. As mulheres diferiram dos homens em relação a: idade, índice de massa corporal, insulina livre no plasma e níveis de LDL colesterol (Tabela II). Uma paciente apresentou níveis extremamente elevados de insulina livre no plasma ($517 \mu\text{UI/ml}$); a amostra foi re-examinada, com resultados semelhantes; a estatística foi revisada com a exclusão desta paciente, mas os resultados não foram afetados; sendo assim, optamos por manter seus resultados na amostra e os números que se seguem incluem este caso.

Vinte e oito pacientes (21 homens, 7 mulheres, 18 normoalbuminúricos) foram classificados como hipertensos. As comparações de diversas variáveis nestes pacientes encontram-se detalhadas na Tabela III. Nos pacientes hipertensos, além de uma maior atividade do Na^+/Li^+ CT, foram detectados níveis mais altos de insulina no plasma. Esta diferença parece ocorrer às custas das mulheres ($10,7 \pm 5,1 \mu\text{UI/ml}$ normotensas vs $102,7 \pm 183,4 \mu\text{UI/ml}$ hipertensas, $p = 0,030$), não sendo significativa nos pacientes de sexo masculino ($9,1 \pm 2,9 \mu\text{UI/ml}$ normotensos vs $15,9 \pm 10,6 \mu\text{UI/ml}$ hipertensos, $p = 0,124$). Em análise de variância de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas não-paramétricas, esta diferença só é significativa entre homens normotensos e mulheres hipertensas. O VLDL colesterol foi significativamente mais alto nos pacientes hipertensos. Os triglicérides totais e VLDL tenderam a ser mais altos nos pacientes hipertensos (Tabela III).

Vinte e um pacientes não apresentaram evidências de doença cardiovascular (pacientes CV-). Dezesete pacientes apresentaram pelo menos uma evidência de doença

cardiovascular (pacientes CV+): 16 com questionário positivo para doença cardiovascular e 1 com questionário negativo, mas com código Minnesota compatível com suspeita de isquemia. As características destes pacientes estão na Tabela IV. Quando as variáveis significativamente diferentes são incluídas em uma regressão logística tendo situação cardiovascular (CV+ ou CV-) como o desfecho, permanecem como significativamente relacionadas com doença cardiovascular as variáveis glicemia de jejum, VLDL colesterol e LDL triglicérides (Tabela V).

Os pacientes normoalbuminúricos diferiram significativamente dos microalbuminúricos em relação à atividade do Na^+/Li^+ CT e níveis de apolipoproteína B (Tabela VI). Quando selecionados os pacientes teoricamente situados nos extremos da distribuição, isto é, pacientes normoalbuminúricos normotensos (n=5) versus pacientes microalbuminúricos e hipertensos (n=10), constatou-se que a atividade do Na^+/Li^+ CT não diferia significativamente ($0,39 \pm 0,23$ mmol/l eritrócitos x h nos pacientes normoalbuminúricos normotensos versus $0,31 \pm 0,16$ mmol/l eritrócitos x h nos pacientes microalbuminúricos hipertensos, $p = 0,68$). Os pacientes foram a seguir reagrupados de acordo com a excreção urinária de albumina e pressão arterial, ou seja: normotensos e normoalbuminúricos (Na^+/Li^+ CT $0,39 \pm 0,23$ mmol/l eritrócitos x h, $n = 5$), normotensos e microalbuminúricos ($0,20 \pm 0,16$, $n = 5$), hipertensos e normoalbuminúricos ($0,50 \pm 0,20$, $n = 18$), hipertensos e microalbuminúricos ($0,31 \pm 0,16$, $n = 10$); a análise por ANOVA de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas não-paramétricas demonstrou que a atividade do Na^+/Li^+ CT diferiu significativamente apenas entre pacientes hipertensos normoalbuminúricos e normotensos microalbuminúricos ($p < 0,05$). A creatinina sérica tendeu a ser mais alta nos pacientes microalbuminúricos, mas a diferença não atingiu significância estatística plena (Tabela VI).

No grupo como um todo, 20 pacientes (52,6 %) apresentavam atividade do Na^+/Li^+ CT dentro dos limites normais. A atividade do Na^+/Li^+ CT correlacionou-se significativa e negativamente com a albuminúria ($r_s = -0,53$, $p = 0,001$) (Figura 2) e positivamente com os níveis de Lp(a) ($r_s = 0,46$, $p = 0,005$) e com a segunda medida de pressão sistólica ($r_s = 0,45$, $p = 0,017$). Comparações entre pacientes com atividade do Na^+/Li^+ CT dentro ou acima do normal estão expostas na Tabela VII. Os pacientes com Na^+/Li^+ CT mais alto tenderam a ter pressão arterial mais alta (Tabela VIII). As variáveis relacionadas com maior atividade do Na^+/Li^+ CT foram incluídas como variáveis independentes numa regressão logística, onde o desfecho foi a atividade do Na^+/Li^+ CT (normal ou elevada). Lp(a) e presença de microalbuminúria permaneceram como significativamente relacionadas com a atividade do Na^+/Li^+ CT (Tabela IX). A atividade do Na^+/Li^+ CT não se correlacionou com nenhuma das outras variáveis analisadas.

Tabela I - Características dos pacientes estudados (n = 38). Valores são média \pm desvio-padrão (mínimo e máximo) ou número de pacientes em cada categoria.

Sexo (M/F)	28/10
Idade (anos)	61,7 \pm 5,0 (44,0 a 71,0)
Duração conhecida do DM tipo 2 (anos)	11,6 \pm 5,0 (5,0 a 28,0)
Tratamento (Dieta/agentes orais/insulina)	6/26/6
EUA (normoalbuminúria/microalbuminúria)	23/15
Retinopatia diabética (sim/não)	11/27 @
Neuropatia periférica (sim/não)	06/31 *
Fumo (sim/não)	14/24 Φ

* Os 6 pacientes também apresentavam retinopatia diabética.

@ Dos pacientes com retinopatia, 5 eram microalbuminúricos e 6, microalbuminúricos, teste exato de Fischer $p = 0,722$; 5 apresentaram atividade do Na^+/Li^+ CT acima de 0,41 mmol/l eritrócitos x h e 6, dentro dos limites normais ($X^2 = 0,043$, $p = 0,836$).

Φ Fumantes: 11 homens, 3 mulheres, teste exato de Fischer $p = 0,715$

Tabela II - Características dos pacientes. Comparações entre homens e mulheres. São mostrados apenas os resultados significativamente diferentes. Valores são média \pm desvio-padrão. Teste de Mann-Whitney.

	Mulheres (n = 10)	Homens (n = 28)	Significância (p)
Idade (anos)	56,2 \pm 7,4	63,7 \pm 5,3	0,002
Índice de massa corporal (kg/m ²)	32,7 \pm 4,7	28,0 \pm 4,9	0,011
Insulina livre no plasma (μ UI/ml)	75,1 \pm 156,2	14,2 \pm 9,7	0,018
LDL colesterol (mg/dl)	146,7 \pm 54,0	150,5 \pm 30,9	0,041

Tabela III - Comparações entre pacientes hipertensos e normotensos. Teste de Mann-Whitney. Valores expressos como média \pm desvio-padrão.

	Hipertensos (n = 28)	Normotensos (n = 10)	Significância (p)
Sexo (M/F)	21/7	7/3	1,000 *
Atividade do Na ⁺ /Li ⁺ CT (mmol/l eritrócitos x h)	0,43 \pm 0,20	0,30 \pm 0,21	0,049
Insulina livre no plasma (μ UI/ml) @	37,6 \pm 95,0	9,6 \pm 3,5	0,018
VLDL colesterol (mg/dl)	30,9 \pm 23,2	15,4 \pm 7,7	0,026
Triglicerídeos totais (mg/dl)	212,4 \pm 115,1	132,8 \pm 53,1	0,052
VLDL triglicerídeos (mg/dl)	141,6 \pm 106,2	70,8 \pm 44,3	0,054
Excreção urinária de albumina (μ g/min)	24,2 \pm 27,6	20,0 \pm 12,6	0,466

* $X^2 = 0,0$

@ Vide texto

Tabela IV - Comparações entre indivíduos com (CV+) e sem (CV-) doença cardiovascular. Valores expressos como média \pm desvio padrão ou número de indivíduos. Comparações pelo teste de Mann-Whitney, exceto quando indicado.

Variável	CV- (n = 21)	CV+ (n = 17)	Significância (p)
Sexo (M/F)	17/4	11/6	0,294 *
Fumo (sim/não)	8/13	6/11	0,873 @
Glicemia de jejum (mg/dl)	207,0 \pm 61,2	153,0 \pm 45,0	0,005
Hemoglobina glicosilada A1 (%)	10,2 \pm 2,1	8,8 \pm 1,6	0,036
Triglicerídeos totais (mg/dl)	169,9 \pm 118,6	219,5 \pm 87,6	0,046
VLDL triglicerídeos (mg/dl)	112,4 \pm 112,4	137,2 \pm 71,7	0,076
LDL triglicerídeos (mg/dl)	34,5 \pm 18,6	85,8 \pm 111,5	0,037
VLDL colesterol (mg/dl)	21,2 \pm 22,4	30,9 \pm 16,6	0,019
Insulina livre no plasma (μ UI/ml)	14,3 \pm 13,2	50,0 \pm 120,9	0,035
Apoproteína B (mg/dl)	95,0 \pm 20,5	106,3 \pm 35,5	0,051
EUA (μ g/min)	19,4 \pm 19,3	27,6 \pm 29,6	0,490
Atividade do Na ⁺ /Li ⁺ CT (mmol/l eritrócitos x h)	0,357 \pm 0,189	0,441 \pm 0,230	0,395
Pressão arterial média (mmHg)	101,4 \pm 12,5	96,3 \pm 10,3	0,252

* Teste exato de Fischer.

@ X² = 0,026

Tabela V - Regressão logística. Situação cardiovascular como variável dependente (desfecho).

Variável	R	Exp (B)
Glicemia de jejum (mg/dl)	-0,2921	0,9789
VLDL colesterol (mg/dl)	0,1904	1,0539
LDL triglicerídeos (mg/dl)	0,0000	1,0136

Insulina, HbA1, triglicerídeos totais e VLDL e APOB foram excluídos do modelo. O percentual de acerto da equação logística utilizando as 3 variáveis é de 85,2%. Se incluídos sexo e/ou atividade do sistema de contratransporte de sódio-lítio no modelo, os resultados permanecem inalterados.

Tabela VI - Comparações entre pacientes normoalbuminúricos (excreção urinária de albumina [EUA] < 20 µg/min) e microalbuminúricos (20 ≤ EUA < 200 µg/min). Teste de Mann-Whitney. Valores expressos como média ± desvio-padrão.

	Normoalbuminúricos (n = 23)	Microalbuminúricos (n = 15)	p
Atividade do Na ⁺ /Li ⁺ CT (mmol/l eritrócitos x h)	0,47 ± 0,20	0,27 ± 0,16	0,003
Apolipoproteína B (mg/dl)	92,7 ± 29,3	124,3 ± 17,9	0,039
Creatinina sérica (mg/dl)	0,87 ± 0,17	1,00 ± 0,22	0,052
Duração conhecida do DM tipo 2 (anos)	11,9 ± 6,1	11,3 ± 2,6	0,528
Idade (anos)	61,5 ± 7,4	62,1 ± 5,8	0,799
Índice de massa corporal (kg/m ²)	28,5 ± 4,6	30,2 ± 6,1	0,412
Pressão arterial média (mmHg) *	100,8 ± 12,2	96,5 ± 10,7	0,296
Glicemia de jejum (mg/dl)	194,0 ± 61,7	166,7 ± 58,0	0,154
Hemoglobina glicosilada A1 (%)	9,9 ± 2,1	9,0 ± 1,7	0,174
Insulina livre no plasma (µUI/ml)	37,9 ± 105,3	18,4 ± 11,4	0,403
Colesterol total (mg/dl) @	224,2 ± 39,0	228,4 ± 25,1	0,754
Triglicerídeos totais (mg/dl) @	185,7 ± 112,5	201,8 ± 102,4	0,492
HDL triglicerídeos (mg/dl)	22,8 ± 8,7	27,3 ± 6,8	0,079
HDL colesterol (mg/dl)	46,6 ± 12,1	39,2 ± 11,3	0,073
Apolipoproteína A (mg/dl)	140,4 ± 18,4	124,3 ± 19,4	0,065
Lp(a) (mg/dl)	14,8 ± 15,0	15,5 ± 19,4	0,820

* Pressões sistólica e diastólica foram igualmente semelhantes nos 2 grupos.

@ Frações VLDL e LDL foram semelhantes nos 2 grupos.

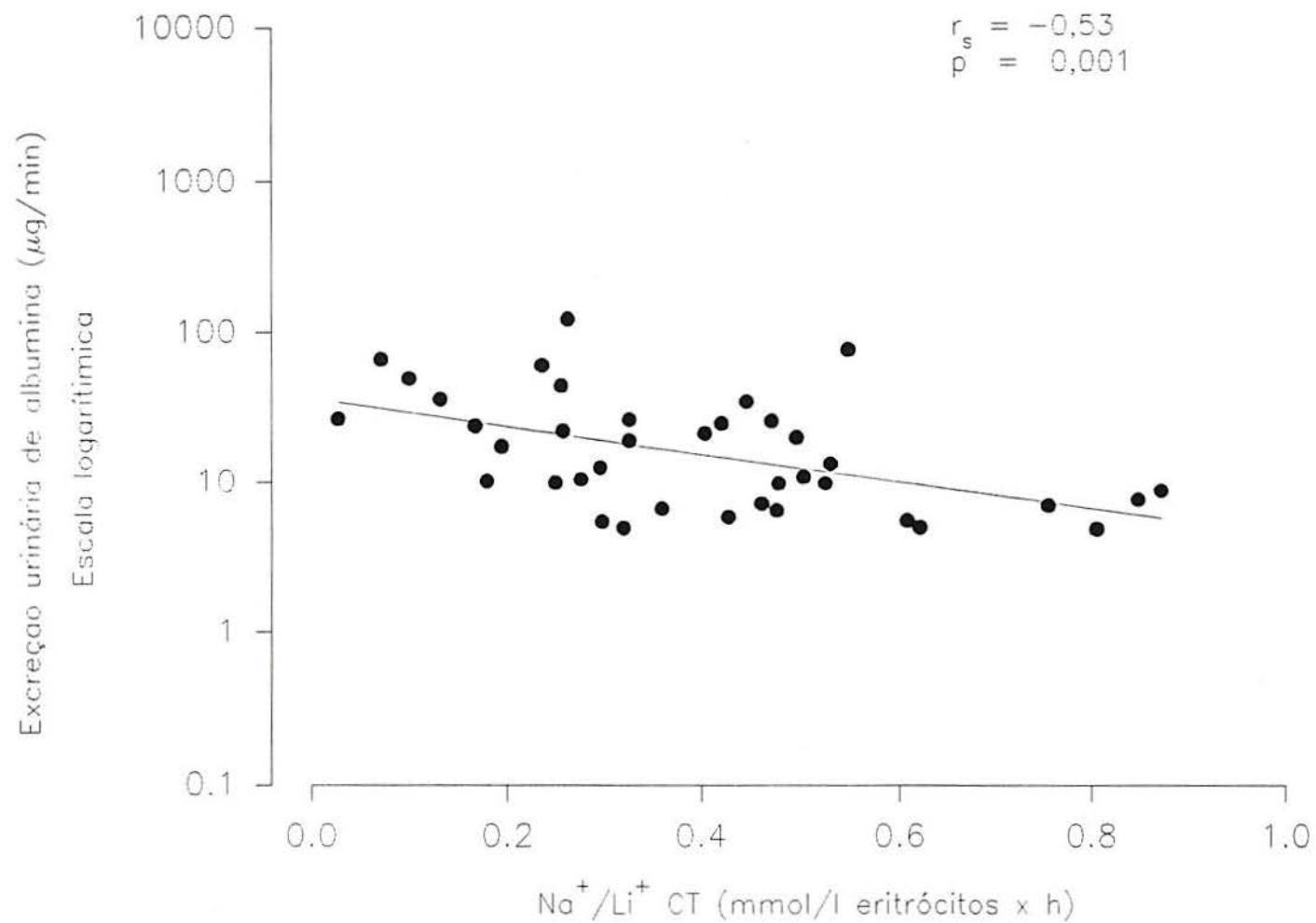


Figura 2 - Correlação entre atividade do contratransporte de sódio-lítio e albuminúria (r_s de Spearman). Foi utilizada escala logarítmica para permitir melhor visualização.

Tabela VII - Comparações entre pacientes com atividade do Na⁺/Li⁺ CT normal ou aumentada. Teste de Mann-Whitney. Valores expressos como média \pm desvio-padrão.

	Na ⁺ /Li ⁺ CT		Significância (p)
	$\leq 0,41$ (n = 20)	$> 0,41$ (n = 18)	
Lp(a) (mg/dl)	7,1 \pm 8,2	23,0 \pm 19,1	0,002
EUA (μ g/min)	29,7 \pm 28,2	15,8 \pm 17,5	0,026
Idade (anos)	61,3 \pm 7,7	62,1 \pm 5,6	0,872
Duração conhecida do DM (anos)	11,3 \pm 3,7	11,9 \pm 6,1	0,930
Índice de massa corporal (kg/m ²)	29,0 \pm 5,5	29,4 \pm 5,1	0,977
Insulina livre no plasma (μ UI/ml)	18,6 \pm 14,0	43,2 \pm 118,8	0,438
Glicemia de jejum (mg/dl)	180,0 \pm 55,8	187,2 \pm 66,6	0,616
Hemoglobina glicosilada A1 (%)	9,3 \pm 2,1	9,9 \pm 1,9	0,242
Creatinina (mg/dl)	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,430
Triglicerídeos totais (mg/dl) *	178,9 \pm 92,8	206,7 \pm 122,9	0,748
Colesterol total (mg/dl) *	225,8 \pm 35,2	224,7 \pm 33,1	0,861

* As frações lipoprotéicas e as apolipoproteínas A e B não foram diferentes entre os 2 grupos.

Tabela VIII - Valores de pressão arterial em pacientes com atividade do sistema de contratransporte de sódio lítio dentro dos limites normais ou com atividade aumentada. Pacientes sem macroalbuminúria. Teste de Mann-Whitney.

Na ⁺ /Li ⁺ CT (mmol/l eritrócitos x h)	Pressão arterial sistólica (mmHg)			Pressão arterial diastólica (mmHg)		
	1 ^a medida	2 ^a medida	Média	1 ^a medida	2 ^a medida	Média
≤ 0,41	132.7 ± 21.6	126.9 ± 25.4	132.5 ± 22.0	79.0 ± 11.4	76.0 ± 7.1	78.7 ± 10.0
> 0,41	139.3 ± 20.4	139.5 ± 20.9	138.9 ± 19.5	82.7 ± 8.5	82.4 ± 8.9	82.4 ± 8.6
p	0.27	0.03	0.18	0.18	0.07	0.16

Tabela IX - Regressão logística tendo atividade do Na⁺/Li⁺ CT como desfecho.

Variável	R	Exp (B)
Lp(a) (mg/dl)	0,2855	1,1288
Microalbuminúria (não/sim)	0,2233	2,9737

Hipertensão arterial (não/sim) foi excluída do modelo. O percentual de acerto da equação logística utilizando as 2 variáveis é de 83,3%. Se incluídos sexo e/ou pressão arterial (sistólica ou diastólica), os resultados permanecem inalterados.

DISCUSSÃO

De forma inesperada, este estudo sugere que, no DM tipo 2, uma atividade aumentada do sistema de contratransporte de sódio-lítio (Na^+/Li^+ CT) esteja *inversamente* relacionada com a excreção urinária de albumina (EUA). Este achado difere de todos os estudos no DM tipo 1, onde predomina uma relação direta entre atividade do Na^+/Li^+ CT e EUA ^{116 233 234 256}.

Nossa experiência sugere que a nefropatia no DM tipo 2 tenha um comportamento diferente do observado no DM tipo 1 ⁴⁸. Que mecanismos patogénéticos operam no DM tipo 2 é uma pergunta ainda sem resposta. Embora sugira-se uma agregação familiar de nefropatia diabética no DM tipo 2 ²²⁸, pouco se pode dizer a respeito dos mecanismos patogénéticos desta agregação.

Estudos no DM tipo 2 são escassos, incompletos e estão longe de permitir que se façam análises conclusivas a respeito do significado da presença de marcadores celulares de predisposição para doença vascular.

Foyle e colaboradores estudaram 23 pacientes brancos com DM tipo 2 e variados níveis de EUA, encontrando uma correlação positiva, significativa, entre atividade do Na^+/Li^+ CT e EUA e uma correlação positiva (não-significativa) entre pressão arterial sistólica e Na^+/Li^+ CT ²⁴⁹. Neste resumo, não são detalhadas as condições de coleta de sangue, os valores de EUA ou de Na^+/Li^+ CT. No entanto, contrariando estudos anteriores ^{257 258}, a atividade do Na^+/Li^+ CT não se correlacionou com a atividade do "antiporter" de Na^+/H^+ .

Trevisan e colaboradores ²⁵⁰ estudaram 44 pacientes com DM tipo 2 e 44 controles não-diabéticos. Os pacientes foram divididos em normotensos e hipertensos, mas

a EUA não foi medida. Os autores concluíram pela ausência de diferença na atividade do Na^+/Li^+ CT em pacientes com DM tipo 2 normo- ou hipertensos. No entanto, naquele estudo, nem todos os pacientes estavam em jejum; o estado pós-alimentar sabidamente pode afetar os resultados do Na^+/Li^+ CT, levando a uma subestimativa dos valores, particularmente dos mais altos ²⁵⁴. É interessante notar que, no estudo de Trevisan e associados, os valores de Na^+/Li^+ CT observados eram sistematicamente baixos, variando de 0,21 a 0,32 mmol/l eritrócitos x hora em pacientes e controles.

Morocutti e colaboradores observaram que pacientes com DM tipo 2 microalbuminúricos e hipertensos exibem uma maior atividade do Na^+/Li^+ CT do que pacientes com DM tipo 2 normotensos e normoalbuminúricos; mais do que isto, pacientes hipertensos com EUA aumentada apresentam maior atividade do Na^+/Li^+ CT do que os pacientes hipertensos normoalbuminúricos ²⁵⁹. O resumo não deixa claro quais foram as cifras tensionais dos pacientes e se a pressão arterial dos pacientes diabéticos proteinúricos hipertensos era diferente da pressão arterial dos pacientes diabéticos normoalbuminúricos hipertensos. Os pacientes do estudo, no entanto, foram altamente selecionados e não se pode excluir que representassem extremos do espectro. Em nossa amostra não foi possível reproduzir estes resultados; nossos pacientes hipertensos apresentaram atividades do Na^+/Li^+ CT que não foram diferentes entre si a despeito da EUA. Os pacientes normoalbuminúricos tenderam a ter a atividade do Na^+/Li^+ CT mais alta, tanto em normo- como em hipertensos.

Gall e colaboradores compararam a atividade do Na^+/Li^+ CT em pacientes com DM tipo 2 com e sem glomerulosclerose diabética comprovada por biópsia e observaram que os valores não diferiam, embora a pressão arterial dos pacientes nefropatas fosse significativamente mais alta ²⁶⁰. Naquele estudo, porém, o método empregado na avaliação

do Na^+/Li^+ CT utilizava carbonato de lítio, em vez de cloreto de lítio, e amostragem tardia das células nos meios de efluxo (superior a 60 minutos), o que pode implicar uma subestimativa do CT em pacientes com Na^+/Li^+ CT aumentado, "achatando" os resultados e mascarando eventuais diferenças ²⁵⁴. O método utilizado no presente estudo é considerado mais adequado ²⁵⁴ e, além disso, em todos os experimentos foi obtida excelente correlação linear ($> 0,985$) entre efluxo de lítio e tempo.

Existe um relato muito limitado de que, "in vitro", a insulina, em concentrações da ordem de $17 \mu\text{UI/ml}$, reduz a atividade do Na^+/Li^+ CT em até 40% ²⁶¹; no mesmo estudo, a proinsulina, em concentrações ao redor de 5 pmol/l - valor também encontrado em pacientes com DM tipo 2 ²⁶² - aumenta a atividade do sistema. Níveis elevados de insulina "total" ²⁶³ e de proinsulina ²⁶⁴ são descritos em pacientes com DM tipo 2. Os efeitos da proinsulina sobre o Na^+/Li^+ CT "in vivo" são desconhecidos. Há porém evidências de que a hiperinsulinemia, observada em hipertensos resistentes à insulina, e mesmo aumentos fisiológicos da insulina, observados no período pós-prandial, podem levar a uma subestimativa da atividade do Na^+/Li^+ CT ²⁵⁴. Sendo o DM tipo 2 uma condição heterogênea, na qual, dependendo do grau de hiperglicemia, a capacidade secretória de insulina e a resistência insulínica contribuem de forma variada para a fisiopatologia ²⁶⁵, os valores de Na^+/Li^+ CT também podem estar sendo afetados de forma heterogênea, dificultando a caracterização dos indivíduos.

No DM tipo 1, pacientes que apresentam microalbuminúria após 15 a 20 anos de DM, sem hipertensão arterial sistêmica, não apresentam atividade de contratransporte elevada ou história familiar de hipertensão arterial; um aumento da atividade do Na^+/Li^+ CT também é observado nos pacientes que desenvolvem hipertensão arterial sistêmica na ausência de nefropatia ²⁶⁶. Em recente estudo de Zerbini e colaboradores ²⁶⁷, a atividade do

Na⁺/Li⁺ CT foi significativamente elevada em pacientes com DM tipo 1 com menos de 6 anos de duração, normoalbuminúricos, quando comparada com a atividade em pacientes microalbuminúricos com mais de 16 anos de duração. Estes dados reforçam a idéia de que o Na⁺/Li⁺ CT seja um indicador de risco para nefropatia precoce e não necessariamente para nefropatia diabética "latu sensu". Sugere-se então que os fatores determinantes de proteinúria tardia sejam diferentes dos determinantes de proteinúria precoce. No DM tipo 2 não estão claros os fatores determinantes de proteinúria e, em se tratando de doença cujo começo raramente é bem definido, a "precocidade" do surgimento de microalbuminúria é incerta.

No presente estudo, como em trabalhos anteriores, a atividade do Na⁺/Li⁺ CT parece estar relacionada com a pressão arterial e com um perfil lipídico "desfavorável".

Os estudos em pacientes diabéticos do tipo 1 tendem a concluir que o Na⁺/Li⁺ CT se associa a uma predisposição para doença renal diabética mediada, talvez, por uma predisposição para hipertensão arterial sistêmica. O Na⁺/Li⁺ CT é sem dúvida o fenótipo intermediário mais bem caracterizado para hipertensão essencial em humanos ²³¹. Embora a freqüência de história familiar de hipertensão seja semelhante entre pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2 ²⁶⁸, estudos de necropsia mostram que insuficiência renal associada a glomerulosclerose diabética como causa de morte ocorre em 30 a 50% dos pacientes com DM tipo 1, mas apenas 5 a 10% dos pacientes com DM tipo 2 ^{269 270}. Em índios Pima portadores de DM tipo 2, história de proteinúria nos pais diabéticos implica maior prevalência de proteinúria nos filhos diabéticos, mas, diferentemente do observado no DM tipo 1 ¹⁰³, a pressão arterial dos pais não se associou à doença renal dos filhos ²²⁸. Neste último estudo, a pressão arterial dos pais foi, em muitos casos, medida após o surgimento de obesidade e do DM tipo 2. Em estudo prospectivo de incidência de hipertensão arterial sistêmica, com base na comunidade, Hunt e colaboradores ²⁷¹ observaram que uma

atividade elevada do Na^+/Li^+ CT isolada, no ingresso ao estudo, não aumentou o risco de hipertensão futura. Apenas quando selecionados pacientes por análise de segregação (isto é, história familiar de doença cardiovascular precoce ou hipertensão arterial), sugerindo a presença de um genótipo específico, a atividade do Na^+/Li^+ CT foi preditiva do desenvolvimento de hipertensão; os autores concluíram que não é a presença de uma maior atividade do Na^+/Li^+ CT mas sim um gen maior para o contratransporte ou um gen fortemente ligado ao contratransporte que aumenta o risco. Valores elevados de Na^+/Li^+ CT não aumentariam o risco de hipertensão futura em indivíduos nos quais apenas fatores poligênicos e ambientais (por exemplo, obesidade, hiperlipidemia) determinam o nível de contratransporte. Fatores poligênicos e ambientais relacionados com hipertensão arterial são facilmente evidenciáveis no contexto do DM tipo 2. A patogênese da microalbuminúria é heterogênea e, mesmo no DM tipo 1, 40% dos pacientes com nefropatia diabética não apresentam aumento do Na^+/Li^+ CT, sugerindo que outros fatores sejam importantes na determinação da doença ¹¹⁶. No DM tipo 2, os fatores patogênicos poderiam ser ainda mais variados e, face à maior idade dos pacientes, maior frequência de obesidade, maior resistência insulínica e assim por diante, o significado da hipertensão arterial sistêmica e de marcadores de predisposição poderia ser diferente. A pressão arterial não parece influenciar a incidência de doença renal terminal em certas populações específicas com DM tipo 2 ²⁷². Assim, atribuir o risco de nefropatia a uma predisposição para hipertensão essencial, estendendo achados no DM tipo 1, pode não ser adequado no DM tipo 2. Se no DM tipo 1 uma predisposição para hipertensão arterial sistêmica, indicada por hiperatividade do Na^+/Li^+ CT, se associa com maior prevalência de nefropatia diabética de forma quase inequívoca, no DM tipo 2 uma maior atividade do Na^+/Li^+ CT poderia estar associada a um outro caráter

fenotípico, a saber, doença cardiovascular. Os dados do presente estudo não são suficientes para comprovar esta hipótese.

Hipertensão arterial é mais freqüente em pacientes diabéticos do que na população em geral ^{8 273 274 275 276}. Se no DM tipo 1 a nefropatia diabética constitui a maior causa de hipertensão arterial, no DM tipo 2 a hipertensão essencial parece ser o fator dominante ²⁷⁷. Não há informações válidas sobre a patogênese da hipertensão arterial sistêmica em pacientes diabéticos do tipo 2 com nefropatia diabética ²⁷⁷. Entre os pacientes sem nefropatia, a obesidade é uma associação freqüente; hipertensão ocorre em 50% dos indivíduos obesos ²⁷⁸. Obesidade (expressa pelo índice de massa corporal) pode estar associada com níveis mais altos de atividade do do Na^+/Li^+ CT ²⁷⁹. No presente estudo, apesar de o Na^+/Li^+ CT guardar correlação com a pressão arterial, o índice de massa corporal foi semelhante nos pacientes normotensos e hipertensos e não se correlacionou com a pressão arterial ou com a atividade do Na^+/Li^+ CT; os pacientes com atividade de contratransporte elevada não diferiram daqueles com atividade normal em relação ao índice de massa corporal.

Existe uma associação bem estabelecida entre pressão arterial elevada e proteinúria (mesmo em grau mínimo) no diabetes melito tipo 1, mas a situação no diabetes melito tipo 2 é menos clara. No estudo de Fabre e colaboradores ⁷, a pressão diastólica estava associada com proteinúria de 24 h, mas os valores de pressão arterial não foram ajustados para idade ou obesidade. No estudo Bedford ¹⁹⁶, foram encontradas correlações entre pressão arterial sistólica e o logaritmo da excreção urinária de albumina. Em um estudo dinamarquês, em pacientes estratificados pela duração do DM e concentração urinária de albumina, não se encontrou associação entre esta última e a pressão arterial ²¹. Em estudo comparando pacientes diabéticos do tipo 2 indianos com europeus caucasianos, Allawi e

colaboradores encontraram uma associação positiva entre pressão arterial e relação albumina/creatinina na urina nos pacientes indianos, mas não nos europeus ²⁸⁰. Assim, existe uma falta de consistência na literatura no que diz respeito à relação entre pressão arterial e nefropatia no DM tipo 2. Diferenças metodológicas poderiam explicar as discrepâncias, mas a verdade é que a associação entre pressão arterial e proteinúria é menos impressionante no DM tipo 2 do que no DM tipo 1.

A maior atividade do Na^+/Li^+ , CT está relacionada com níveis elevados de LDL colesterol, VLDL triglicérides e triglicérides totais e com níveis reduzidos de HDL₂ colesterol ²³⁷. A relação com lipoproteína (a) - Lp(a) - não havia sido descrita anteriormente. Postula-se que a Lp(a), por ser estruturalmente similar ao plasminogênio e por ligar-se aos receptores de plasminogênio, seria capaz de promover trombose por interferir com a ativação do plasminogênio ^{281 282}. Além disso, a localização preferencial da Lp(a) em placas ateromatosas sugere que a lipoproteína seja diretamente aterogênica ²⁸³. Os níveis séricos de apoproteína(a) - o componente glicoprotéico da Lp(a) - são geneticamente controlados ²⁸⁴. No DM tipo 2, a apoproteína(a) aumenta progressivamente com a passagem de normo- para micro- e macroalbuminúria; o desenvolvimento de microalbuminúria se acompanha de elevação nos níveis de apoproteína(a), mas esta elevação independe dos níveis iniciais de apoproteína(a), sugerindo que a predisposição para nefropatia não está ligada à herança de isoformas da apoproteína(a) ²⁸⁵. No DM tipo 1, níveis mais altos de Lp(a) são encontrados em pacientes do sexo masculino com micro- ou macroalbuminúria, sugerindo que este fator se agregue aos "clássicos" fatores de risco cardiovasculares ²⁸⁶.

Triglicérides totais são reconhecidos como fator de risco cardiovascular em pacientes diabéticos do tipo 2 ¹¹². Estudos recentes confirmam o papel de LDL triglicérides

como fator de risco independente para mortalidade cardiovascular tanto em pacientes diabéticos do tipo 2 como em não diabéticos ²⁸⁷.

A albuminúria parece preceder o desenvolvimento de anormalidades lipoprotéicas e, portanto, é preditiva do desenvolvimento de anormalidades que favorecem a aterogênese ²⁸⁸. A albuminúria tem um importante valor preditivo para mortalidade cardiovascular ²³ e se relaciona com doença vascular periférica ^{204 289} no DM tipo 2. A microalbuminúria tem valor preditivo de doença vascular e mortalidade num período de 3 a 6 anos em indivíduos não-diabéticos ²⁹⁰. Em pacientes diabéticos do tipo 2 com proteinúria clínica, os níveis de apolipoproteína B são mais altos do que em pacientes micro- e normoalbuminúricos ²⁹¹. No DM tipo 1, micro- e macroalbuminúria estão associadas com níveis mais altos de colesterol total e LDL, triglicérides totais e massa das IDL e LDL ²⁹² e com anormalidades das lipoproteínas que contêm Apoproteína B (VLDL, IDL, LDL, VLDL₂ apoB e IDL apoB) ²⁹³.

Os achados da literatura - e deste estudo mesmo -apontam para uma relação da atividade do Na⁺/Li⁺ CT com fatores de risco cardiovasculares (pressão arterial e perfil lipídico). No estudo de Mattock e colaboradores, a presença de hipertensão se associou com a presença de microalbuminúria na avaliação inicial, transversal, da coorte. No entanto, longitudinalmente, a pressão arterial não se associou com mortalidade cardiovascular. Os fatores significativa e independentemente preditivos de mortalidade cardiovascular foram colesterol total e microalbuminúria ²³.

Embora a raça possa influenciar os valores de Na⁺/Li⁺ CT ²⁹⁴, todos os pacientes por nós estudados pertenciam a um mesmo grupo étnico (europeus, caucasianos, predominantemente britânicos). Também não se pode atribuir estes resultados ao uso de medicamentos anti-hipertensivos, os quais não alteram o valor do contratransporte ^{295 296}.

Nenhuma das mulheres estava em uso de estrógenos e nenhum dos pacientes apresentava hipocalcemia ²⁹⁵.

O fato de que, no presente estudo, apenas 11 pacientes apresentaram evidências de retinopatia diabética e/ou neuropatia periférica poderia sugerir um viés de seleção. Pacientes freqüentando serviços terciários são, não raro, os mais motivados, mais aderentes ao tratamento e os que aceitam participar de estudos clínicos. Face a estes achados, existe a questão da representatividade da amostra em relação à comunidade, o que não invalida a relação inversa dos valores do Na^+/Li^+ CT com a albuminúria. A ausência de retinopatia poderia indicar que pelo menos parte dos pacientes examinados não apresentaria nefropatia diabética, já que no DM tipo 1 apenas uma pequena parcela dos pacientes com nefropatia clínica não apresenta retinopatia ²⁰³. No entanto, 41% dos pacientes com DM tipo 2 e glomerulosclerose diabética comprovada por biópsia ²⁹⁷, e até 60% dos pacientes com DM tipo 2 e nefropatia clínica ^{204 217}, não apresentam retinopatia; portanto, a ausência de retinopatia não é um bom critério de exclusão de nefropatia diabética neste contexto. Como já referido, no DM tipo 2 a microalbuminúria é preditiva de maior mortalidade, predominantemente cardiovascular e freqüentemente não associada a uremia ²¹⁷ (ao contrário do que se observa no DM tipo 1); apesar disso, a microalbuminúria é preditiva de futuro desenvolvimento de proteinúria clínica no DM tipo 2 ²⁹⁸, mesmo quando se ignora a histopatologia dos glomérulos. Portanto, a ausência de retinopatia não invalida as considerações de risco em pacientes com DM tipo 2 e microalbuminúria.

A relação negativa entre Na^+/Li^+ CT e albuminúria em pacientes com DM tipo 2 é intrigante e não encontra eco na literatura. No entanto, face à heterogeneidade dos pacientes e aos problemas metodológicos de todos os estudos disponíveis, a questão da

contribuição da hipertensão arterial sistêmica e da predisposição genética para o risco de microalbuminúria e nefropatia clínica no DM tipo 2 deve ficar em aberto.

Embora devam ser interpretados com cautela, os resultados deste estudo apontam para uma caracterização da predisposição genética para hipertensão arterial sistêmica como um fator de risco para doença cardiovascular, muito mais do que renal, em caucasianos com DM tipo 2.

As relações entre microalbuminúria, hipertensão arterial sistêmica, marcadores de predisposição genética, características raciais e outros fatores de risco só poderão ser completamente entendidas a partir de estudos longitudinais com base na comunidade. A tecnologia para desenvolvermos tal tipo de estudo já existe em nosso meio. Resta lutar pelos recursos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kimmelstiel, P. & Wilson, C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *American Journal of Pathology* 12: 83-97, 1936.
2. Grenfell, A. & Watkins, P. J. Clinical diabetic nephropathy: natural history and complications. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 15: 783-805, 1986.
3. Chihara, J.; Takebayashi, S.; Taguchi, T.; Yokohama, K.; Horada, T.; Naito, S. Glomerulonephritis in diabetic patients and its effect on the prognosis. *Nephron* 43: 45-9, 1986.
4. Amoah, E.; Glickman, J. L.; Malchoff, C. D.; Steergill, B. C.; Kaiser, D. L.; Bolton, W. K. Clinical identification of nondiabetic renal disease in diabetic patients with Type I and Type II disease presenting with renal dysfunction. *American Journal of Nephrology* 8: 204-11, 1988.
5. Taft, J. L.; Billson, V. R.; Nankervis, A.; Kincaid-Smith, P.; Martin, F. J. R. A clinical-histological study of individuals with diabetes mellitus and proteinuria. *Diabetic Medicine* 7: 215-21, 1990.
6. Parving, H-H.; Gall, M-A.; Skøtt, P.; Jørgensen, H. E.; Løkkegaard, H.; Jørgensen, F.; Nielsen, B.; Larsen, S. Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic patients. *Kidney International* 41: 758-62, 1992.
7. Fabre, J.; Balant, L. P.; Dayer, P.; Fox, H. M.; Vernet, A. T. The kidney in mature onset diabetes mellitus: A clinical study of 510 patients. *Kidney International* 21: 730-8, 1982.
8. Panzram, G. Mortality and survival in type 2 (non-insulin- dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30: 123-31, 1987.
9. Cameron, J. S. & Challah, S. Treatment of end-stage renal failure due to diabetes in the United Kingdom, 1975-84. *The Lancet*, october 25, 1986, p. 962-6.
10. Palumbo, P. J.; Elveback, L. R.; Chu, C-P.; Connoly, D.; Kurland, L. T. Diabetes mellitus: incidence, prevalence, survivorship and causes of death in Rochester, Minnesota, 1945-70. *Diabetes* 25: 566-73, 1976.
11. Stein, A. C. R. *Estudo comparativo e evolutivo de pacientes diabéticos com diferentes graus de proteinúria*. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Nefrologia. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984, 85 páginas.
12. Friedman, E. A. Diabetes with kidney failure (letter). *The Lancet*, november 29, 1986, p. 1285.

13. Friedman, E. A. Nephrology forum. Diabetic nephropathy: strategies in prevention and management. *Kidney International* 21: 780-91, 1982.
14. Seshiah, V.; Venkataraman, M.; Hariharahan; Sanjeevi; Seshasayanam; Sarada. Pattern of proteinuria in NIDDM- one year follow-up. *Journal of The Medical Association of Thailand* 70 (suppl.2): 163-7, 1987.
15. Gross, J. L.; Eizirik, D.; Kruter, R. Duração do diabete mérito e complicações microangiopáticas. *Revista AMB* 28: 140-2, 1982.
16. Olivarius, N. de F.; Andreasen, A. H.; Keiding, N.; Mogensen, C. E. Epidemiology of renal involvement in newly-diagnosed middle-aged and elderly diabetic patients. Cross-sectional data from the population-based study "Diabetes Care in General Practice", Denmark. *Diabetologia* 36: 1007-16, 1993. ...
17. Silveiro, S.; Friedman, R.; Gross, J. L. Glomerular hyperfiltration in NIDDM patients without overt proteinuria. *Diabetes Care* 16: 115-119, 1993.
18. Schmitz, A.; Christensen, T.; Taagehoj Jensen, F. Glomerular filtration rate and kidney volume in normoalbuminuric non-insulin dependent diabetics - lack of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy in uncomplicated NIDDM. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 49: 103-8, 1989.
19. Vora, J. P.; Dolben, J.; Dean, J. D.; Thomas, D.; Williams, J. D.; Owens, D. R.; Peters, J. R. Renal hemodynamics in newly presenting non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney International* 41: 829-35, 1992.
20. Jarrett, R. J.; Viberti, G. C.; Argyropoulos, A.; Hill, R. D.; Mahmud, U.; Murrells, T. J. Microalbuminuria predicts mortality in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetic Medicine* 1: 17-9, 1984.
21. Mogensen, C. E. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *The New England Journal of Medicine* 310: 356-60, 1984.
22. Mattock, M. B.; Keen, H.; Viberti, G. C.; El Gohary, M. R.; Murrells, T. J.; Scott, G. S.; Wing, J. R.; Jackson, P. G. Coronary heart disease and urinary albumin excretion in type-2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 31:82-7, 1988.
23. Mattock, M. B.; Morrish, N. H.; Viberti, GC.; Keen, H.; Fitzgerald, A.; Jackson, G. Prospective study of microalbuminuria as a predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 41: 736-41, 1992.
24. Damsgaard, E. M.; Nielsen, J. R.; Mogensen, C. E. Increased glomerular permeability to albumin in type 2 (non- insulin-dependent) diabetic patients before and after exercise. *Diabetologia* 25: 149, 1983.

25. Mohamed, A.; Wilkin, T.; Leatherdale, B. A.; Rowe, D. Response of urinary albumin to submaximal exercise in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes. *British Medical Journal* 288: 1342-3, 1984.
26. Vasquez, B.; Flock, E. V.; Savage, P. J.; Nagulesparan, M.; Bennion, L. J.; Baird, H. R.; Bennett, P. H. Sustained reduction of proteinuria in type 2 (non-insulin- dependent) diabetes following diet-induced reduction of hyperglycemia. *Diabetologia* 26: 127-33, 1984.
27. Damsgaard, E. M.; Frøland, A.; Moestrup, B.; Mogensen, C. E. Albuminuria before and during exercise in non insulin- dependent diabetic patients with and without retinopathy. *Diabetic Nephropathy* 5: 40-1, 1986.
28. Gross, J. L.; Stein, A. C. R.; Beck, M. O.; Fuchs, S. C.; Silveiro, S. P.; de-Azevedo, M. J.; Friedman, R. Risk factors for development of proteinuria by type II (non-insulin dependent) diabetic patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 26: 1269-78, 1993.
29. Nelson, R. G.; Wolfe, J. A.; Horton, M. B.; Pettit, D. J. Proliferative retinopathy in NIDDM. *Diabetes* 37 (suppl. 1): 85A, 1988 (abstract).
30. Ballard, D. J.; Humphrey, L. L.; Melton III, J.; Frohnert, P. P.; Chu, C. P.; O'Fallon, W. M.; Palumbo, P. J. Epidemiology of persistent proteinuria in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 37: 405-12, 1988.
31. Howard-Williams, J.; Hillson, R. M.; Bron, A.; Awdry, P.; Mann, J. I.; Hockaday, T. D. R. Retinopathy is associated with higher glycaemia in maturity-onset diabetes. *Diabetologia* 27: 198-202, 1984.
32. Nathan, D. M.; Singer, D. E.; Godine, J. E.; Harrington, C. H.; Perlmutter, L. C. Retinopathy in older type II diabetics. Association with glucose control. *Diabetes* 35: 797-801, 1986.
33. Mogensen, C. E. A complete screening of urinary albumin concentration in an unselected diabetic outpatient clinic population. *Diabetic Nephropathy* 2: 11-3, 1982.
34. Klein, R.; Klein, B. E. K.; Moss, S.; DeMets, D. L. Proteinuria in diabetes. *Archives of Internal Medicine* 148: 181-6, 1988.
35. Pugh, J.A. The epidemiology of diabetic nephropathy. *Diabetes/Metabolism Reviews* 5: 531-46, 1989.
36. Morrish, N. J.; Stevens, L. K.; Head, J.; Fuller, J. H.; Jarrett, R. J.; Keen, H. A prospective study of mortality among middle-aged diabetic patients (the London cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics) II: associated risk factors. *Diabetologia* 33: 542-8, 1990.

37. Jerums, G.; Cooper, M. E.; Seeman, E.; Murray, R. M. L.; McNeil, J. J. Spectrum of proteinuria in type I and type II diabetes. *Diabetes Care* 10: 419-27, 1987.
38. Lavender, S.; Hilton, P. J. & Jones, N. F. The measurement of glomerular filtration-rate in renal disease. *The Lancet* 2: 1216-9, 1969.
39. Shemesh, O.; Golbetz, H.; Kriss, J. P.; Myers, B. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney International* 28: 830-8, 1985.
40. Friedman, R.; Azevedo, M. J.; Gross, J. L. Is endogenous creatinine clearance still a reliable index of glomerular filtration rate in diabetic patients? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21: 941-4, 1988.
41. Friedman, R.; Azevedo, M. J.; Gross, J. L. Use of the serum creatinine to estimate glomerular filtration rate in health and early diabetic nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* XVII (6): 725-6, 1991.
42. Gross, J. L.; Silveiro, S. P.; Azevedo, M. J.; Pecis, M. P.; Friedman, R. Estimated creatinine clearance is not an accurate index of glomerular filtration rate in normoalbuminuric diabetic patients. *Diabetes Care* 16: 407-8, 1993.
43. Carrie, B. J.; Golbetz, H. V.; Michaels, A. S.; Myers, B. Creatinine: an inadequate filtration marker in glomerular diseases. *The American Journal of Medicine* 69: 177-82, 1980.
44. Doolan, P. D.; Alpen, E. L. & Theil, G. B. A clinical appraisal of the plasma concentration and endogenous clearance of creatinine. *American Journal of Medicine* 32: 65-79, 1962.
45. Dodge, W. F.; Travis, L. B. & Daeschner, C. W. Comparison of endogenous creatinine clearance with inulin clearance. *American Journal of Diseases of Children* 113: 683-92, 1967.
46. Favre, H. R. & Wing, A. J. Simultaneous ⁵¹Cr edetic acid, inulin and endogenous creatinine clearances in 20 patients with renal disease. *British Medical Journal* 1: 84-6, 1968.
47. Kim, K. E.; Onesti, G.; Ramirez, O.; Brest, A. N.; Swartz, C. Creatinine clearance in renal disease. A reappraisal. *British Medical Journal* 4: 11-4, 1969.
48. Friedman, R. & Gross, J. L. Evolution of glomerular filtration rate in proteinuric NIDDM patients. *Diabetes Care* 14: 355-9, 1991.
49. Friedman, R. *Nefropatia diabética no diabete mérito tipo II - aspectos da filtração glomerular em pacientes com e sem macroproteinúria*. Dissertação de

Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1988, 122 páginas.

50. Gall, M. A.; Nielsen, F. S.; Smidt, U. M.; Parving, H-H. The course of kidney function in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 36: 1071-8, 1993.
51. Gross, J. L.; Azevedo, M. J.; Friedman, R.; Silveiro, S.; Pecis, M. Medida da filtração glomerular pela técnica de ⁵¹Cr-EDTA. In: Cruz, J.; Neto, E. D.; Burdmann, E. A.; Alves, M. A.; Salgado Filho, N.; Magalhães, R. L.; Barros, R. T. (editores). *Atualidades em Nefrologia-2*. São Paulo, Sarvier, 1992, p. 21-26.
52. Parving, H-H.; Smidt, U. M.; Friisberg, B.; Bonnevie-Nielsen, V.; Andersen, A. R. A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 20: 457-61, 1981.
53. Viberti, GC.; Bilous, R. W.; Mackintosh, D.; Keen, H. Monitoring glomerular function in diabetic nephropathy. *The American Journal of Medicine* 74: 256-64, 1983.
54. Zaret, B. L. Nuclear Cardiology. In: Wyngaarden, J. B.; Smith Jr., L. H.; Bennett, J. C. (editores). *Cecil Textbook of Medicine*. W. B. Saunders, Philadelphia, E.U.A., 19^a ed., 1992, p. 180-4.
55. Obesity. A report of The Royal College of Physicians. *Journal of The Royal College of Physicians of London* 17: 5-65, 1983.
56. WHO (World Health Organization). Arterial hypertension. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series* n° 628, 1978.
57. Blankenship, G. & Skyler, J. Diabetic retinopathy: a general survey. *Diabetes Care* 1: 127-37, 1978.
58. Neumann, C.; Amon, L. C.; Canani, L. H.; Gross, J. L.; Schmid, H. Testes autônomos no diabetes mérito: padronização dos valores normais. *Anais do VI Congresso Brasileiro de Diabetes*. Salvador, Sociedade Brasileira de Diabetes, 1987.
59. Ewing, D. J.; Martyn, C. N.; Young, R. J.; Clarke, B. F. The value of autonomic function tests: 10 years' experience in diabetes. *Diabetes Care* 8: 491-8, 1985.
60. Trinder, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology* 22: 158-61, 1969.

61. Richardson, T. A modification of the Trinder Autoanalyser method for glucose. *Annal of Clinical Biochemistry* 14: 223-7, 1977.
62. Stein, E. A. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Tietz, N. W. (editor). *Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1986, p. 829-900.
63. Gutman, I. & Bergmeyer, H. U. *Methoden der enzymatischen analyse*, 3^a ed., vol. II, 1974.
64. Chasson, A.; Grady, H.; Stanley, M. Determination of creatinine by means of automatic chemical analysis. *The American Journal of Clinical Pathology* 35: 83-8, 1961.
65. Fabiny, D. L. & Ertingshausen, G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem. *Clinical Chemistry* 17: 696-700, 1971.
66. Schriever, H. & Gambino, S. R. Protein turbidity produced by trichloroacetic acid and sulfosalicylic acid at varying temperatures and varying ratios of albumin and globulin. *American Journal of Clinical Pathology* 44: 667-72, 1965.
67. Trivelli, L. A.; Ranney, H. M.; Lai, H. T. Microchromatographic system for determination of glycosylated hemoglobin. *The New England Journal of Medicine* 284: 353-7, 1971.
68. Maroni, B. J.; Steinman, T. I.; Mitch, W. E. A method for estimating nitrogen intake of patients with chronic renal failure. *Kidney International* 27: 58-65, 1985.
69. Isaksson, B. Urinary nitrogen output as a validity test in dietary surveys. *American Journal of Clinical Nutrition* 33: 4-5, 1982.
70. Gall, M-A.; Rossing, P.; Skøtt, P. Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 34: 655-61, 1991.
71. Bernard, D. B. Metabolic abnormalities in nephrotic syndrome. Pathophysiology and complications. In: Brenner, B. M. & Stein, H. J. (editores). *Contemporary issues in nephrology*. Vol. 9. Nova York, Churchill Livingstone, 1982, p. 85-95.
72. Mogensen, C. E. Long-term antihypertensive treatment inhibiting progression of diabetic nephropathy. *British Medical Journal* 285: 685-8, 1982.
73. Parving, H-H.; Andersen, A. R.; Smidt, U. M.; Hommel, E.; Mathiesen, E. R.; Svendsen, P. A. Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy. *British Medical Journal* 294: 1143-7, 1987.

74. Björck, S.; Nyberg, G.; Mulec, H.; Granerus, G.; Herlitz, H.; Aurell, M. Beneficial effects of angiotensin converting enzyme inhibition of renal function in patients with diabetic nephropathy. *British Medical Journal* 293: 471-4, 1986.
75. Parving, H-H. Impact of blood pressure and antihypertensive treatment on incipient and overt nephropathy, retinopathy, and endothelial permeability in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 14: 260-9, 1991.
76. Björck, S.; Mulec, H.; Johnsen, S. A.; Nordén, G.; Aurell, M. Renal protective effect of enalapril in diabetic nephropathy. *British Medical Journal* 304: 260-9, 1992.
77. Nelson, R. G.; Newman, J. M.; Knowler, W. C. Incidence of end-stage renal disease in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in Pima Indians. *Diabetologia* 31: 730-6, 1988.
78. Gross, J. L.; Friedman, R.; Azevedo, M. J.; Silveiro, S.; Pecis, M. Effect of age and sex on glomerular filtration rate measured by ⁵¹Cr-EDTA. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25: 129-34, 1992.
79. Pullman, T. N.; Alving, A. S.; Dern, R. J.; Landwone, M. The influence of dietary protein intake on specific renal functions in normal man. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44: 320-3, 1954.
80. Brenner, B. M.; Meyer, T. E.; Hostetter, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of haemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation and intrinsic renal disease. *New England Journal of Medicine* 307: 652-9, 1982.
81. Remuzzi, A.; Battaglia, C.; Rossi, L.; Zoja, C.; Remuzzi, G. Glomerular size selectivity in nephrotic rats exposed to diets with different protein content. *American Journal of Physiology* 253: F318-27, 1987.
82. Zatz, R.; Meyer, T. W.; Rennke, H. G.; Brenner, B. M. Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proceedings of the National Academy of Science* 82: 5963-7, 1985.
83. Nath, K. A.; Kren, S. M.; Hostetter, T. H. Dietary protein restriction in established renal injury in the rat: selective role of glomerular capillary pressure in progressive glomerular dysfunction. *Journal of Clinical Investigation* 78: 1199-1205, 1986.
84. Alvestrand, A.; Ahlberg, M.; Bergstrom, J. Retardation of the progression of renal insufficiency in patients treated with low protein diets. *Kidney International* 24 (Suppl. 16): S268-72, 1983.

85. Attman, P. O.; Bucht, H.; Larsson, O.; Uddebous, G. Protein-reduced diet in diabetic renal failure. *Clinical Nephrology* 19: 217-220, 1983.
86. Evanoff, G. V.; Thomson, C. S.; Brown, J.; Weinman, E. J. The effect of dietary protein restriction on the progression of diabetic nephropathy. *Archives of Internal Medicine* 147: 492-5, 1987,
87. Walker, J. D.; Bending, J. J.; Dodds, R. A.; Mattock, M. B.; Murrells, T. J.; Keen, H.; Viberti, GC. Restriction of dietary protein and progression of renal failure in diabetic nephropathy. *Lancet* 2: 1411-5, 1989.
88. Zeller, K.; Whittaker, E.; Sullivan, L.; Raskin, P.; Jacobson, H. R. Effect of restricting dietary protein on the progression of renal failure in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 324:78-84. 1991.
89. Cohen, D.; Dodds, R.; Viberti, GC. Effects of protein restriction in insulin-dependent diabetics at risk of nephropathy. *British Medical Journal* 294: 795-8, 1987.
90. Wiseman, M. J.; Boggetti, E.; Dodds, R.; Keen, H.; Viberti, GC. Changes in renal function in response to protein restricted diet in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 30: 154-9, 1987.
91. Giovanetti, S. The compliance with supplemented diet by chronic uremics and their nutritional status. *Infusions Therapie* 14 (suppl. 5): 4-7, 1987.
92. Williams, A. J.; Baker, F.; Walls, J. Effect of varying quantity and quality of dietary protein intake in experimental renal disease in rats. *Nephron* 46: 83-90, 1987.
93. Margetts, B. M.; Beilene, L. J.; Vandongen, R.; Armstrong, B. K. Vegetarian diet in mild hypertension: a randomised controlled trial. *British Medical Journal* 293: 1468-71, 1986.
94. Wiseman, M. J.; Hunt, R.; Goodwin, A.; Gross, J. L.; Keen, H.; Viberti, GC. Dietary composition and renal function in healthy subjects. *Nephron* 46: 37-42, 1987.
95. Pecis, M.; Azevedo, M. J.; Gross, J. L. Chicken-and-fish diet reduces glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 17: 665-72, 1994.
96. Kontessis, P.; Jones, S.; Dodds, R.; Trevisan, R.; Nosadini, R.; Fioretto, P.; Borsato, M.; Sacerdoti, D.; Viberti, GC. Renal, metabolica and hormonal responses to ingestion of animal and vegetable proteins. *Kidney International* 38: 136-44, 1990.

97. Fioretto, P.; Trevisan, R.; Valerio, A.; Avogaro, A.; Borsato, M.; Doria, A.; Semplicini, A.; Sacerdoti, D.; Jones, S.; Boggetti, E.; Viberti, GC.; Nosadini, R. Impaired renal response to a meat meal in insulin-dependent diabetes. Role of glucagon and prostaglandins. *American Journal of Physiology* 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 27): F675-83, 1990.
98. Rossetti, L.; Rothman, D. L.; DeFronzo, R. A.; Shulman, G.I. Effect of dietary protein on in vivo insulin action and liver glycogen repletion. *American Journal of Physiology* 257 (Endocrinol. Metab. 20) E212-E219, 1989.
99. Crace, C. J.; Swenne, I.; Jansson, L.; Milner, R. D. G. Effects of low protein diet at weaning on insulin secretion and sensitivity. *Diabetologia* 30: 510A, 1989.
100. Ferrannini, E.; Buzzigoli, G.; Bonadonna, R.; Giorico, M.A.; Loeggini, M.; Graziadel, L.; Pedrinelli, R.; Brandi, L.; Bevilacqua, S. Insulin resistance in essential hypertension. *New England Journal of Medicine* 317: 350-7, 1987.
101. Reaven, G.M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. *Diabetes*, 37: 1595-1607, 1988.
102. Krolewski, A. S.; Canessa, M.; Warram, J. H.; Laffel, L. M. B.; Chrsitlieb, A. R.; Knowler, W. C.; Rano, L. I. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 318: 140-5, 1985.
103. Viberti, GC.; Keen, H.; Wiseman, M. J. Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin-dependent diabetic patients. *British Medical Journal* 295: 515-17, 1987.
104. Zavaroni, I.; Bonara, E.; Pagliara, M.; Dall'aglio, E.; Luchetti, L.; Bunonno, G.; Bonati, P. A.; Bergonzani, M.; Gnudi L.; Passeri, M.; Reaven, G. Risk factors for coronary artery disease in healthy persons with hyperinsulinemia and normal glucose tolerance. *New England Journal of Medicine* 320: 702-6, 1989.
105. Martin, F. I. R. & Hopper, J. L. The relationship of acute insulin sensitivity to the progression of vascular disease in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30: 149-53, 1987.
106. MacMahon, S. W.; Macdonald G. J.; Blacket, R. B. Plasma lipoprotein levels in treated and untreated hypertensive men and women. *Arteriosclerosis* 391-396, 1985.
107. Tobey, T.A.; Greenfield, M.; Kraemer, F.; Reaven, G. M. Relationship between insulin resistance, insulin secretion, very low density lipoprotein kinetics and plasma triglyceride levels in normotriglyceridemic man. *Metabolism* 29: 303-5, 1980.

108. Mancini, M. A.; Rivellese, A.; Rubba, P.; Riccardi, G. Plasma lipoproteins in maturity onset diabetes. *Nutrition Metabolism* 24: 65-73, 1984.
109. West, K. M.; Ahuja, M. M. S.; Bennett, P. H. et al. The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other 'risk factors' as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO Multinational Study. *Diabetes Care* 6: 361-9, 1983.
110. Barrett-Connor, E.; Witztum, J. L.; Holdbrook, M. J. A community study of high density lipoprotein in adult non-insulin-dependent diabetics. *American Journal of Epidemiology* 117: 186-92, 1983.
111. Gibbons, G. F. Hyperlipidaemia of diabetes. *Clinical Science* 71: 477-86, 1986.
112. Fontbonne, A.; Eschwege, E.; Cambien, F.; Richard, J-L.; Ducietriere, P. Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes: Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. *Diabetologia* 32: 300-4, 1989.
113. Carr, S. J.; Thomas, T. H.; Laker, M. F.; Wilkinson, R. Elevated sodium-lithium countertransport: a familial marker of hyperlipidaemia and hypertension? *Journal of Hypertension* 8: 139-46, 1990.
114. Lopes de Faria, J. B.; Friedman, R.; Tariq, T.; Viberti, GC. Prevalence of raised sodium-lithium countertransport activity in type 1 diabetics. *Diabetologia* 34 (suppl.2): A67, 1991.
115. Friedman, R.; Lopes de Faria, J. B.; Ferreira, S. R.; MacDonald, F. A.; Hill, C.; Viberti, G. C. Sodium-lithium countertransport in normoalbuminuric, normotensive diabetic patients. *Diabetologia* 3 (suppl): A 150, 1990.
116. Lopes de Faria, J B; Friedman, R., Tariq, T.; Viberti, G C. Prevalence of raised erythrocyte sodium-lithium countertransport activity in type 1 diabetic patients. *Kidney International* 41: 877-882, 1992.
117. Lopes de Faria, J. B.; Jones, S. L.; MacDonald, F.; Chambers, J.; Mattock, M. B.; Viberti, GC. Sodium-lithium countertransport activity and insulin resistance in normotensive IDDM patients. *Diabetes* 41: 610-15, 1992.
118. Reaven, G. M. Insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus: does it exist and can it be measured? *American Journal of Medicine* 74: 3-17, 1983.
119. DeFronzo, R. A.; Simonson, D.; Ferranini, E. Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 23: 313-9, 1982.

120. Reichard, P.; Nilsson, B-Y.; Rosenqvist, U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 329: 304-9, 1993.
121. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 329: 977-86, 1993.
122. Martin, D. B. & Quint, A. R. Therapy for diabetes. In: Harris, M. I. & Haman, R. F. (editores). *Diabetes in America* (NIH publ. no. 85-1468) U.S. Govt. Printing Office, Washington, E.U.A., 1985, p. XXIV-2.
123. *Manual of laboratory operations, lipid research clinics program. Vol. I: Lipid and lipoprotein analysis.* DHEW Publication 1974, No (NIH) 75-268.
124. Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Annals of Clinical Biochemistry* 6: 24, 1969.
125. Moore, J.; Outlaw, M. C.; Barnes, A. J.; Turner, R. C. Glycosylated plasma protein measurement by a semi-automated method. *Annals of Clinical Biochemistry* 23: 198, 1986.
126. Johnson, R. N.; Metcalf, P. A.; Baker, J. R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clinica Chimica Acta* 127: 87-95, 1982.
127. Foster, P. W.; Rick, J. J.; Wolfson, W. Q. Studies in serum proteins. VI. The extension of the standard Biuret method to the estimation of total protein in urine. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 39: 618-23, 1952.
128. Kearney, E. M.; Mount, J. N.; Watts, G. F.; Slavin, B. M.; Kind, P. R. N. Simple immunoturbidimetric method for determining urinary albumin at low concentrations using the Cobas Bio centrifugal analyser. *Clinical Pathology* 40: 465-8, 1987.
129. Collins, A. C. G.; Sethi, M.; MacDonald, F. a.; Brown, D.; Viberti, GC. Storage temperature and differing methods of sample preparation in the measurement of urinary albumin. *Diabetologia* 36: 993-7, 1993.
130. Blom, W. & Huijmans, J. G. M. Differential diagnosis of (inherited) amino acid metabolism or transport disorders. *Amino Acids* 2: 25-67, 1992.
131. Sweny, P. & Varghese, Z. *Clinical Tests - Renal Disease.* Wolfe, Londres, 1988, p. 68-9.

132. Cole, B. et al. Measurement of renal function without urine collection. A critical evaluation of the constant-infusion technique for the determination of inulin and para-aminohippurate. *New England Journal of Medicine* 287: 1109-14, 1972.
133. Dawborn, J. K. Application of Heyrovsky's inulin method to automatic analysis. *Clinica Chimica Acta* 12: 63-6, 1965.
134. DeFronzo, R. A.; Tobin, J. D.; Andres, R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *American Journal of Physiology* 237: E214-23, 1979.
135. McGuire, E. A. H.; Helderman, J. H.; Tobin, J. D.; Andres, R.; Berman, M. Effects of arterial versus venous sampling on analysis of glucose kinetics in man. *Journal of Applied Physiology* 41: 565-73, 1976.
136. Abumrad, N. N.; Rabin, D.; Diamond, M. P.; Lacy, W. W. Use of heated superficial hand vein as a alternative site for the measurement of amino acid concentrations and for the study of glucose and alanine kinetics in man. *Metabolism* 30: 936-40, 1981.
137. Sherwin, R. S.; Kramer, K. J.; Tobin, J. D.; Insel, P. A.; Liljenquist, J. E.; Berman, M.; Andres, R. A model of the kinetics of insulin in man. *Journal of Clinical Investigation* 53: 1481-5, 1974.
138. De Fronzo, R. A.; Hendler, R.; Simonson, D. Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 31: 795-9, 1982.
139. Doberne, L. Greenfield M. S.; Rosenthal, M.; Widstrom, A.; Reaven, G. Effect of variations in basal plasma glucose concentration on glucose utilization (M) and metabolic clearance rate (MCR) during insulin clamp studies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 396, 1982.
140. Collins, A. C. G. & Pickup, J. C. Sample preparation and radioimmunoassay for circulating free and antibody-bound insulin concentrations in insulin-treated diabetics: a re-evaluation of methods. *Diabetic Medicine* 2: 456-60, 1985.
141. Weicko, J. & Sherman, W. R. Boroacetylation of carbohydrates. Correlations between structure and mass spectral behaviour in monoacetylhexose cyclic boronic esters. *Journal of The American Chemistry Society* 98: 7631-7, 1976.
142. Bosch, J. P.; Saccaggi, A.; Lauer, A.; Ronco, C.; Belledonne, M.; Glabman, S. Renal functional reserve in humans-effect of protein intake on glomerular filtration rate. *American Journal of Medicine* 75: 943-50, 1983.

143. Bergström, J.; Ahlberg, M.; Alvestrand, A. Influence of protein intake on renal hemodynamics and plasma hormone concentrations in normal subjects. *Acta Medica Scandinavica* 217: 189-96, 1985.
144. Pedersen, M. M.; Mogensen, C. E.; Schonau-Jorgensen, F.; Muller, B.; Lykke, G.; Pedersen, O. Renal effects from limitation of high dietary protein in normoalbuminuric diabetic patients. *Kidney International* 36 (suppl. 27): S115-21, 1989.
145. Azevedo, M. J.; Padilha, L. M.; Gross, J. L. A short-term low-protein diet reduces glomerular filtration rate in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 23: 647-54, 1990.
146. Cohen, P.; Dodds, R.; Viberti, GC. Effect of protein restriction in insulin dependent diabetics at risk of nephropathy. *British Medical Journal* 294: 795-8, 1987.
147. Ciavarella, A.; Di Mizio, G.; Stefoni, S.; Borgnino, L. G.; Vannini, P. Reduced albuminuria after dietary protein restriction in insulin-dependent diabetic patients with clinical nephropathy. *Diabetes Care* 10: 407-13, 1987.
148. Bending, J. J.; Dodds, R. A.; Keen, H.; Viberti, GC. Renal response to restricted protein intake in diabetic nephropathy. *Diabetes* 37: 1641-6, 1988.
149. Riella, M. C.; Martins, C.; Emed, L. S.; Lowen, J. The effect of different dietary protein loads on glomerular filtration rate in normal subjects. In: *Fifth International Congress on Nutrition and Metabolism in Renal Disease*, 1988, p. 145.
150. Hostetter, T. H. Human renal response to a meat meal. *American Journal of Physiology* 250: F613-18, 1986.
151. O'Connor, W. J. & Summerill, R. A. The effect of a meal of meat on glomerular filtration rate in dogs at normal urine flows. *Journal of Physiology (Lond)* 256: 81-91, 1976.
152. O'Connor, W. J. & Summerill, R. A. Sulphate excretion by dogs following ingestion of ammonium sulphate or meat. *Journal of Physiology (Lond)*: 260: 597-607, 1976.
153. Pitts, R. F. The effects of infusing glycine and of varying the dietary protein intake on renal hemodynamics of the dog. *American Journal of Physiology* 142: 355-65, 1982.
154. Epstein, F.; Brosman, J. T.; Tange, J. D.; Ross, B. D. Improved function with amino acids in the isolated perfused kidney. *American Journal of Physiology* 243: F284-92, 1982.

155. Johannesen, J.; Lie, M.; Kill, F. Effect of glycine and glucagon on glomerular filtration and renal metabolic rates. *American Journal of Physiology* 233: F61-6, 1977.
156. Castelino, P.; Coda, B.; DeFronzo, R. A. Effect of amino-acid infusion on renal hemodynamics in humans. *American Journal of Physiology* 251: F132-40, 1986.
157. Premen, A. J. Importance of the liver during glucagon - mediated increases in canine renal hemodynamics. *American Journal of Physiology* 249: F319-22, 1985.
158. Schambelan, M.; Blake, S.; Sraer, J.; Bens, M.; Nivens, M. P.; Wahle, F. Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 75: 404-15, 1985.
159. Stahl, R. A.; Kudelka, S.; Helmchen, U. High protein intake stimulates glomerular prostaglandin formation in remnant kidneys. *American Journal of Physiology* 252: F1083-94, 1987.
160. Rosenberg, M. E.; Swanson, J. E.; Thomas, B. L.; Hostetter, T. H. Glomerular and hormonal responses to dietary protein intake in human renal disease. *American Journal of Physiology* 253: F1083-90, 1987.
161. Seney, F. D. & Wright, F. S. Dietary protein suppresses feedback control of glomerular filtration in rats. *Journal of Clinical Investigation* 75: 558-68, 1985.
162. Christiansen, J. S. On the pathogenesis of the increased glomerular filtration rate in short-term insulin-dependent diabetes. *Danish Medical Bulletin* 31: 349-61, 1984.
163. Brøchner-Mortensen, J. The glomerular filtration rate during moderate hyperglycemia in normal man. *Acta Medica Scandinavica* 194: 31-7, 1973.
164. Brøchner-Mortensen, J. Glomerular filtration rate and extra-cellular fluid volumes during normoglycemia and moderate hyperglycemia in diabetics. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 32: 311-6, 1973.
165. Christiansen, J. S. Effect of intravenous glucose infusion on renal function in normal man and in insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 21: 328-73, 1981.
166. Parving, H-H.; Noer, I.; Deckert, T; Evrin, P. E.; Nielsen, S. L.; Lyngsøe; J. Mogensen, C. E.; Rørth, M.; Svendsen, P. Aa.; Trap-Jensen, J.; Lassen, N A. The effect of metabolic regulation on microvascular permeability to small and large molecules in short-term juvenile diabetics. *Diabetologia* 12: 161-6, 1976.

167. Viberti, G.C.; Mackintosh, D.; Bilous, R. W.; Pickup, J. C.; Keen, H. Proteinuria in diabetes mellitus: role of spontaneous and experimental variation of glycaemia. *Kidney International* 21: 714-20, 1982.
168. Mathiesen, E. R.; Øxenboll, B.; Johansen, K.; Svendsen, P. A.; Deckert, T. Incipient nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 26: 406-10, 1984.
169. Viberti, G. C.; Pickup, J. C.; Jarret, R. J.; Keen, H. Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and beta-2 microglobulin in insulin-dependent diabetes. *New England Journal of Medicine* 300: 638-41, 1979.
170. Prescott, S. L.; Jenner, D. A.; Beilin, L. J.; Margetts, B.; Vandongen, R. A randomized controlled trial of the effect on blood pressure of dietary non-meat protein versus meat protein in normotensive omnivores. *Clinical Science* 74: 665-72, 1988.
171. Thorogood, M.; Carter, R.; Benfield, L.; McPherson, K.; Mann, J. I. Plasma lipids and lipoprotein cholesterol concentrations in people with different diets in Britain. *British Medical Journal* 295: 351-3, 1987.
172. Abbott, W. G. H.; Swinburn, B.; Ruotolo, G.; Hara, H.; Patti, L.; Harper, I.; Grundy, S.; Howard, B. Effect of a high-carbohydrate, low-saturated-fat diet on apolipoprotein B and triglyceride metabolism in Pima Indians. *The Journal of Clinical Investigation* 86: 642-50, 1990.
173. Kahaner, N.; Fuches, H. M.; Floch, M. H. Effect of dietary fiber supplementation in man. I. Modification of eating habits. *American Journal of Clinical Nutrition* 29: 1437-42, 1976.
174. Ruys, J.; Hickie, J. B. Serum cholesterol and triglyceride levels in Australian adolescent vegetarians. *British Medical Journal* 87-92, 1976.
175. Masarei, J. R. L.; Rouse, I. L.; Lynch, W. J.; Robertson, K.; Vandongen, R.; Beilin, L. J. Effects of a lactoovovegetarian diet on serum concentrations of cholesterol, triglyceride, HDL-C, HDL-2-C, HDL-#-C, apoprotein B, and Lp(a). *American Journal of Clinical Nutrition* 40: 468-79, 1984.
176. Burr, M. L. L.; Bates, C. J.; Fehily, A. M.; St. Leger, A. S. Plasma cholesterol and blood pressure in vegetarians. *Journal of Human Nutrition* 35: 437-41, 1981.
177. West, R. O.; Hayes, O. B. Diet and serum cholesterol levels: a comparison between vegetarians and nonvegetarians in a Seventh-Day Adventist group. *American Journal of Clinical Nutrition* 21: 853-62, 1968.

178. Snowdown, D. A. Animal product consumption and mortality because of all causes combined, coronary heart disease, stroke, diabetes, and cancer in Seventh-Day Adventists. *American Journal of Clinical Nutrition* 48: 739-48, 1988.
179. Anderson, J. W.; Zeigler, J. A.; Deakins, D. A.; Floore, T. L.; Dillon, D. W.; Wood, C. L.; Oeltgen, P. R.; Whitley, R. J. Metabolic effects of high-carbohydrate, high-fiber diets for insulin-dependent diabetic individuals. *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 936-43, 1991.
180. Brunzell, J. D.; Lerner, R. L.; Hazzard, W. R.; Porte Jr., D.; Bierman, E. L. Improved glucose tolerance with high carbohydrate feeding in mild diabetes. *The New England Journal of Medicine* 284: 521-5, 1971.
181. Mogensen, C. E.; Christensen, C. K.; Bittinghus, E. The stages in diabetic renal disease with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes* 32 (suppl. 2): 64-78, 1983.
182. Viberti, GC.; Walker, J. D.; Pinto, J. Diabetic Nephropathy. In: Alberti, K. G. M.; DeFronzo, R. A.; Keen, H.; Zimmet, P. (editores). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra, 1992, v. 2, p. 1267-328.
183. Thomsen, O. F.; Andersen, A. R.; Christiansen, J. S.; Deckert, T. Renal changes in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without clinical nephropathy: a light microscopic, morphometric study of autopsy material. *Diabetologia* 26: 361-5, 1984.
184. Andersen, A. R.; Christiansen, J. S.; Andersen, J. K.; Kreiner, S.; Deckert, T. Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 25: 496-501, 1983.
185. Krolewski, A. S.; Warran, J. H.; Cristlieb, A. R.; Busick, E.; Kahn, C. R. The changing natural history of nephropathy in type 1 diabetes. *American Journal of Medicine* 78: 785-94, 1985.
186. Viberti, GC.; Bilous, R. W.; Mackintosh, D.; Keen, H. Monitoring glomerular function in diabetic nephropathy - a prospective study. *The American Journal of Medicine* 74: 256-64, 1983.
187. Krolewski, A. S.; Kosinski, E. J.; Warram, J. H.; Leland, O. S.; Busick, E. J.; Asmal, A. C.; Rand, L. I.; Cristlieb, A. R.; Bradley, R. F.; Kahn, C. R. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *American Journal of Cardiology* 59: 750-5, 1987.

188. Parving, H-H.; Andersen, A. R.; Smidt, U. M.; Svendsen, P. Aa. Early aggressive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet* i: 1175-9, 1983.
189. Parving, H-H.; Hommel, E.; Smidt, U. M. Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin-dependent diabetics with nephropathy. *British Medical Journal* 297: 1086-91, 1988.
190. Viberti, GC.; Bilous, R. W.; Mackintosh, D.; Bending, J. J; Keen, H. Long-term correction of hyperglycaemia and progression of renal failure in insulin-dependent diabetes. *British Medical Journal* 296: 598-602, 1983.
191. Kofoed-Enevoldsen, A.; Borch-Johnsen, K.; Kreiner, S.; Nerup, J.; Deckert, T. Declining incidence of persistent proteinuria in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients in Denmark. *Diabetes* 36: 205-9, 1987.
192. Derby, L.; Laffel, L. B. M.; Krolewski, A. S. Risk of diabetic nephropathy declines with age in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 31: 485A, 1988.
193. Deckert, T.; Poulsen, J. E.; Larsen, M. Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. *Diabetologia* 14: 363-70, 1978.
194. Keen, H. & Chlouverakis, C. An immunoassay method for urinary albumin at low concentrations. *The Lancet* 2: 913-6, 1963.
195. Hemmingsen, L. & Saarup, P. The 24-hour excretion of plasma proteins in the urine of apparently healthy subjects. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 35: 347-53, 1975.
196. Keen, H.; Chlouverakis, C.; Fuller, J. H.; Jarrett, R. J. The concomitants of raised blood sugar: studies in newly detected hyperglycaemics. II. Urinary albumin excretion, blood pressure and their relation to blood sugar levels. *Guy's Hospital Report* 118: 247-52, 1969.
197. Mogensen, C. E. Urinary albumin excretion in early and long term juvenile diabetes. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 28: 183-93, 1971.
198. Mogensen, C. E. Renal function changes in diabetes. *Diabetes* 25: 872-9, 1976.
199. Mathiesen, E. R.; Saurbrey, N.; Hommel, E.; Parving, H-H. Prevalence of microalbuminuria in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 29: 640-3, 1986.
200. Close, C. F., on behalf of the MCS group. Sex, diabetes duration and microalbuminuria in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30: 508A, 1987.

201. Gardete, L. M.; Silva-Graça, A.; Boavida, J. M.; Cruz, M.; Carreiras, F.; Nunes-Correa, J. Microalbuminuria - an early marker of developing microangiopathy. *Diabetologia* 29: 539A, 1986.
202. Gatling, W.; Knight, C.; Mullee, M. A.; Hill, R. D. Microalbuminuria in diabetes: a population study of the prevalence and an assessment of three screening tests. *Diabetic Medicine* 5: 343-7, 1988.
203. Parving, H-H.; Hommel, E.; Mathiesen, E.; Skøtt, P.; Edsberg, B.; Bahnsen, M.; Lauritzen, M.; Hougaard, P.; Lauritzen, E. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin-dependent diabetes. *British Medical Journal* 296: 156-60, 1988.
204. Marshall, S. M. & Alberti, K. G. M. M. Comparison of the prevalence and associated features of abnormal albumin excretion in insulin-dependent and non-insulin dependent diabetes. *Quarterly Medical Journal* 70: 61-71, 1989.
205. Mogensen, C. E. & Vittinghus, E. Urinary albumin excretion during exercise in juvenile diabetes: a provocation test for early abnormalities. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* 35: 295-300, 1975.
206. Viberti, GC.; Jarrett, R. J.; McCartney, M.; Keen, H. Increased glomerular permeability to albumin induced by exercise in diabetic subjects. *Diabetologia* 14: 293-300, 1979.
207. Koivisto, V. A.; Huttenen, N. P.; Vierikko, P.; Continuous subcutaneous insulin infusion corrects exercise-induced albuminuria in juvenile diabetes. *British Medical Journal* 282: 778-9, 1981.
208. Viberti, GC.; Pickup, J. C.; Bilous, R. W.; Keen, H.; Mackintosh, D. Correction of exercise-induced microalbuminuria in insulin-dependent diabetes after 3 weeks of subcutaneous insulin infusion. *Diabetes* 30: 818-23, 1981.
209. Vittinghus, E. & Mogensen, C. E. Graded exercise and protein excretion in diabetic man and the effect of insulin treatment. *Kidney International* 21: 725-9, 1982.
210. Bertoluci, M. C.; Friedman, G.; Schaan, B. D.; Ribeiro, J. P.; Schmid, H. Intensity-related exercise albuminuria in insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 19: 217-25, 1993.
211. Wiseman, M. J.; Viberti, GC.; Mackintosh, D.; Jarrett, R. J.; Keen, H. Glycaemia, arterial pressure and micro-albuminuria in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 2: 401-5, 1984.
212. Jensen, T.; Borch-Johnsen, K.; Deckert, T. Changes in blood pressure and renal function in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus prior to clinical diabetic nephropathy. *Diabetes Research* 4: 159-62, 1987.

213. Jones, S.; Close, C. E.; Mattock, M. B.; Jarrett, R. J.; Keen, H.; Viberti, GC. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *British Medical Journal* 298: 487-90, 1989.
214. Dullaart, R. P. F.; Dikkeschei, L. D.; Doorenbos, H. H. Alterations in serum lipids and apolipoproteins in male type 1 (insulin-dependent) diabetics with microalbuminuria. *Diabetologia* 32: 685-9, 1989.
215. Groop, P-H; Elliott, T; Ekstrand, A; Franssila-Kallunki, A; Friedman, R; Viberti, GC; Taskinen M-R. Characterization of lipid abnormalities in IDDM patients with incipient and established kidney disease. *Acta Endocrinologica* 126 (suppl. 3): 7, 1992.
216. Damsgaard, E. M. & Mogensen, C. E. Microalbuminuria in elderly hyperglycaemic patients and controls. *Diabetic Medicine* 3: 430-5, 1986.
217. Schmitz, A. & Vaeth, M. Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin dependent diabetes. A 10 year follow-up study of 503 patients. *Diabetic Medicine* 5: 126-34, 1988.
218. Nelson, R. G.; Kunzelman, C. L.; Pettitt, D. J.; Saad, M. F.; Bennett, P. H.; Knowler, W. C. Albuminuria in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Pima Indians. *Diabetologia* 32: 870-6, 1989.
219. Allawi, J. & Jarrett, R. J. Microalbuminuria and cardiovascular risk factors in Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 7: 115-8, 1990.
220. Mogensen, C. E. & Christensen, C. K. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetic patients. *New England Journal of Medicine* 311: 89-93, 1984.
221. Viberti, GC.; Hill, R. D.; Jarrett, R. J.; Argyropoulos, A.; Mahmud, U.; Keen, H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* i: 1430-2, 1982.
222. Parving, H-H.; Øxenboll, B.; Svendsen, P. A.; Christiansen, J. S.; Andersen, A. R. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion. *Acta Endocrinologica* 100: 550-5, 1982.
223. Chavers, B. M.; Bilous, R. W.; Ellis, E. N.; Steffes, M. W.; Mauer, S. M. Glomerular lesions and urinary albumin. excretion in type 1 diabetes without overt proteinuria. *New England Journal of Medicine* 320: 966-70, 1989.

224. Deckert, T.; Feldt-Rasmussen, B.; Borch-Johnsen, K.; Jensen, T.; Kofoed-Enevoldsen, A. Albuminuria reflects widespread vascular damage. *Diabetologia* 32: 219-26, 1989.
225. Marre, M.; Chatelier, G.; Leblanc, H.; Guyene, T. T.; Menard, J.; Passa, P. Prevention of diabetic nephropathy with enalapril in normotensive diabetics with microalbuminuria. *British Medical Journal* 297: 1092-5, 1988.
226. Steffes, M. W.; Sutherland, D. E. R.; Gøetz, F. C.; Rich, S. S.; Mauer, S. M. Studies of kidney and muscle biopsy specimens from identical twins discordant for type 1 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 312: 1282-7, 1985.
227. Seaquist, E. R.; Gøetz, F. C.; Rich, S.; Barbosa, J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *New England Journal of Medicine* 320: 1161-5, 1989.
228. Pettitt, D. J.; Saad, M. F.; Bennett, P. M.; Nelson, R. G.; Knowler, W. C. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 33: 438-43, 1990.
229. Canessa, M.; Adragna, N.; Solomon, H.; Connolly, T. M.; Tosteson, B. S., Tosteson, D. C. Increased sodium-lithium countertransport in red cells of patients with essential hypertension. *New England Journal of Medicine* 302: 772-6, 1980.
230. Adragna, N. C.; Canessa, M. L.; Solomon, H.; Slater, E.; Tosteson, D. C. Red cell lithium-sodium countertransport and sodium-potassium cotransport in patients with essential hypertension. *Hypertension* 4: 795-804, 1982.
231. Dadone, M. M.; Hasstedt, S. J.; Hunt, S. C.; Smith, J. B.; Ash, K. O.; Williams, R. R. Genetic analysis of sodium-lithium countertransport in ten hypertension-prone kindreds. *American Journal of Medicine* 17: 565-77, 1984.
232. Boerwinkle, E.; Turner, S. T.; Weinshilboum, R.; Johnson, M.; Richelson, E.; Sing, C. F. Analysis of the distribution of sodium-lithium countertransport in a sample representative of the general population. *Genetics Epidemiology* 3: 365-78, 1986.
233. Mangili, R.; Bending, J. J.; Scott, G.; Li, L. K.; Gupta, A.; Viberti, GC. Increased sodium-lithium countertransport activity in red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *New England Journal of Medicine* 318: 146-50, 1988.
234. Walker, J. D.; Tariq, T.; Viberti, GC. Sodium-lithium countertransport activity in red cells of patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy and their parents. *British Medical Journal* 301: 635-8, 1990.

235. Jones, S. L.; Trevisan, R.; Tariq, T.; Semplicini, A.; Mattock, M.; Walker, J. D.; Nosadini, R.; Viberti, GC. Sodium-lithium countertransport in microalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. *Hypertension* 15: 570-5, 1990.
236. Lopes de Faria, J. B.; Friedman, R.; Tariq, T.; Viberti, GC. Prevalence of raised sodium-lithium countertransport activity in type 1 diabetic patients. *Kidney International* 41: 877-82, 1992.
237. Jones, S. L.; Faria, J.; Tariq, T.; Mattock, M. B.; Viberti, GC. Sodium-lithium countertransport activity and serum lipoproteins in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetic Medicine* 6 (suppl.2): 28A, 1989.
238. Lopes de Faria, J. B.; Jones, S. L.; MacDonald, F.; Friedman, R.; Hill, C.; Viberti, GC. Insulin resistance and sodium-lithium countertransport activity in non-hypertensive insulin-dependent diabetic patients. *3^o Congresso Anual do European Diabetic Nephropathy Study Group*, Stoke Poges, Inglaterra, 11-12 de maio de 1990.
239. Silberberg, J. S.; Barre, P. E.; Prichard, S. S.; Sniderman, A. D. Impact of left ventricular hypertrophy on survival in end-stage renal disease. *Kidney International* 36: 286-90, 1989.
240. Sampson, M. J.; Chambers, J.; Springings, D.; Drury, P. L. Intraventricular septal hypertrophy in type 1 diabetic patients with microalbuminuria or early proteinuria. *Diabetic Medicine* 7: 126-31, 1990.
241. Reaven, G. M. & Hoffman, B. P. A role for insulin in the aetiology and course of hypertension? *Lancet* ii: 435-7, 1987.
242. Manhensmith, R. L. & Aronson, P. S. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathological processes. *Circulation Research* 56: 773-88, 1985.
243. Ng, L. L.; Simmons, D.; Frigh, V.; Garrido, M. C.; Bomford, J. Effect of protein kinase C modulators on the leucocyte Na⁺-H⁺ antiport in type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with albuminuria. *Diabetologia* 33: 278-84, 1990.
244. Li, L. K.; Trevisan, R.; Walker, J. D.; Viberti, GC. Overactivity of Na⁺/H⁺ antiport and enhanced cell growth in fibroblasts of type 1 (insulin-dependent) diabetics with nephropathy. *Kidney International* 37: 199, 1990.
245. Amiel, S. A.; Sherwin, R. S.; Simonson, D. C.; Lauritano, A. A.; Tamborlane, W. V. Impaired insulin action in puberty. A contributing factor to poor glycemic control in adolescents with diabetes. *New England Journal of Medicine* 315: 215-9, 1986.

246. Parving, H-H.; Gall, M. A.; Skøtt, P.; Jørgensen, H. E.; Jørgensen, F.; Larsen, S. Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) patients. *Kidney International* 37: 243-9, 1990.
247. Morrish, N. J.; Stevens, L. K.; Head, J.; Fuller, J. H.; Jarrett, R. J.; Keen, H. A prospective study of mortality among middle-aged diabetic patients (the London cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics). I: causes and death rates. *Diabetologia* 33: 538-541.
248. Nelson, R. G.; Pettitt, D. J.; Carraher, J. M.; Naird, H. R.; Knowler, W. C. Effect of proteinuria on mortality in NIDDM. *Diabetes* 37: 1499-504, 1988.
249. Foyle, W-J.; Denver, A. E.; Sampson, M. J.; Pinkney, J. H.; Dawson, D.; Yudkin, J. Sodium-lithium countertransport, sodium-hydrogen ion exchange and cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. *Diabetologia* 36 (suppl. 1): A206, 1993.
250. Trevisan, M.; Vaccaro, O.; Laurenzi, M.; De Chiara, F.; Di Muro, M.; Iacone, R.; Franzese, A. Hypertension, non-insulin-dependent diabetes, and intracellular sodium metabolism. *Hypertension* 11: 264-8, 1988.
251. *The Fifth Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure*. Bethesda, E.U.A., National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute, 1993.
252. Consensus statement: Treatment of hypertension in diabetes. *Diabetes Care* 16: 1394-401, 1993.
253. Rose, G.; Blackburn, H.; Gillium, R. F.; Prineas, R. J. *Cardiovascular Survey Methods*. Organização Mundial da Saúde, Genebra, 1992. (Monografia n° 56).
254. Canessa, M.; Zerbini, G.; Laffel, L. M. B. Sodium activation kinetics of red blood cell Na⁺/Li⁺ countertransport in diabetes: methodology and controversy. *Journal of the American Society of Nephrology* 3 (suppl. 4): S41-49, 1992.
255. Havel, R. J.; Eder, H. A.; Bragdon, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation* 34: 1345-53, 1955.
256. Jones, S. L.; Trevisan, R.; Tariq, T.; Semplicini, A.; Mattock, M.; Walker, J. D.; Nosadini, R.; Viberti, GC. Sodium-lithium countertransport in microalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. *Hypertension* 15: 570-5, 1990.
257. Canessa, M.; Morgan, K.; Semplicini, A. Genetic differences in lithium-sodium exchange and regulation of sodium-hydrogen exchange in essential

- hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 12 (suppl. 3): 592-8, 1988.
258. Semplicini, A.; Mozzatto, M. G.; Sama, B.; Nosadini, R.; Fioretto, P.; Trevisan, R.; Pessina, A. C.; Crepaldi, G.; Dal Palu, C. Na/H and Li/Na exchange in red cells of normotensive and hypertensive patients with insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *American Journal of Hypertension* 2: 174-7, 1989.
259. Morocutti, A.; Barzon, I.; Duner, E.; Cipollina, M. R.; Sambataro, M.; Solini, A.; Trevisan, R.; Nosadini, R. Type 2 (non-insulin dependent) diabetics with hypertension and abnormal albumin excretion rate have higher sodium-lithium countertransport activity in red blood cells than diabetic without hypertension and microalbuminuria. *Diabetologia* 34 (suppl. 2): A68, 1991.
260. Gall, M. A.; Rossing, P.; Jensen, J. S.; Funder, J.; Parving, H-H. Red cell Na⁺/Li⁺ countertransport in non-insulin-dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Kidney International* 39: 135-40, 1991.
261. Foyle, W. J. & Drury, P. L. Proinsulin and insulin opposing effects on sodium-lithium countertransport. *Diabetic Medicine* 8 (suppl. 1): 3A, 1991.
262. Nagi, D. K.; Hendra, T. J.; Ryle, A. J.; Cooper, T. M.; Temple, R. C.; Clark, P. M. S.; Schneider, A. E.; Hales, C. N.; Yudkin, J. S. The relationships of concentrations of insulin, intact proinsulin and 32-33 split proinsulin with cardiovascular risk factors in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 33: 532-7, 1990.
263. Laasko, M.; Pyörälä, K.; Voutilainen, E.; Marniemi, J. Plasma insulin and serum lipids and lipoprotein in middle aged non-insulin-dependent diabetic and non-diabetic subjects. *American Journal of Epidemiology* 125: 611-21, 1987.
264. Hales, C. N. The pathogenesis of NIDDM. *Diabetologia* 37(suppl. 2): S162-8, 1994.
265. DeFronzo, R. A.; Bonadonna, R. C.; Ferrannini, E. Pathogenesis of NIDDM: a precarious balance between insulin action and insulin secretion. In: Alberti, K. G. M. M.; DeFronzo, R. A.; Keen, H.; Zimmet, P. (editores). *International Textbook of Diabetes Mellitus*. Chichester, John Wiley and Sons, 1992, p. 570-633.
266. Barzilay, J.; Warram, J. H.; Bak, M.; Laffel, L. M. B.; Canessa, M.; Krolewski, A. S. Predisposition to hypertension: risk factor for nephropathy and hypertension in IDDM. *Kidney International* 41: 723-30, 1992.
267. Zerbini, G.; Mangili, R.; Garbetta, F.; Boggetti, E. Red blood cell Na⁺/Li⁺ countertransport and risk of nephropathy in type I diabetes mellitus. *Diabetes* 40: 498A, 1991.

268. Pugh, J. A.; Medina, R.; Ramirez, M. Comparison of the course to end-stage renal disease of Type 1 (insulin-dependent) and Type 2 (non-insulin dependent) diabetic nephropathy. *Diabetologia* 36: 1094-8, 1993.
269. Marks, H-H. Longevity and mortality of diabetics. *American Journal of Public Health* 55: 416-22, 1965.
270. Balodimus, M. C. Diabetic nephropathy. In: Marble, A.; White, P.; Bradley, R. F.; Krall, L. P. (editores). *Joslin Diabetes*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1971, p. 526-71.
271. Hunt, S. C.; Stephenson, S. H.; Hopkins, P. N.; Hasstedt, S. J.; Williams, R. R. A prospective study of sodium-lithium countertransport and hypertension in Utah. *Hypertension* 17: 1-7, 1991.
272. Nelson, R.G.; Knowler, W.C.; McCance, D.R.; Sievers, M. L.; Pettitt, D.J.; Charles, M.A.; Hanson, R.L.; Liu, Q.Z.; Bennett, P.H. Determinants of end-stage renal disease in Pima Indians with Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus and proteinuria. *Diabetologia* 36: 1087-93, 1993.
273. Pell, S. & D'Alonzo, C. A. Some aspects of hypertension in diabetes mellitus. *Journal of the American Medical Association* 202: 104-10, 1967.
274. Chrsitlieb, A. R. Diabetes and hypertensive vascular disease. *American Journal of Cardiology* 32: 592-606, 1973.
275. Parving, H-H.; Andersen, A. R.; Smidt, U. M.; Oxenbøll, B.; Edsberg, B.; Sandahl-Christiansen, J. Diabetic nephropathy and arterial hypertension. *Diabetologia* 24: 10-2, 1983.
276. Klein, R.; Klein, B. W. K.; Moss, S. E.; DeMets, D. L. Blood pressure and hypertension in diabetes. *American Journal of Epidemiology* 122: 75-89, 1985.
277. Parving, H-H. Arterial hypertension in diabetes mellitus. In: Alberti, K. G. M. M.; DeFronzo, R. A.; Keen, H.; Zimmet, P. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. John Wiley, Chichester, 1992, vol. 2, p. 1521-34.
278. Berchtold, P.; Jorgens, V.; Finke, C.; Berger, M. Epidemiology of obesity and hypertension. *International Journal of Obesity* 5 (supl. 1): 1-7, 1981.
279. Trevisan, M. & Laurenzi, M. (on behalf of the Gubbio Collaborative Study Group). Correlates of sodium-lithium countertransport: findings from the Gubbio epidemiological study. *Circulation* 84: 2011-9, 1991.
280. Allawi, J.; Rao, P. V.; Gilbert, R. et al. Microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes: higher frequency of Indian compared with European patients. *British Medical Journal* 296: 462-4, 1988.

281. Dahlen, G. H.; Guyton, J. R.; Attar, M.; Farmer, J. A.; Kautz, J. A.; Gotto, A. M. Jr. Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 74: 758-65, 1986.
282. Utermann, G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 246: 904-10, 1989.
283. Kusumi, Y. & Wissler, R. W. The localization of Lp(a) in the aortas of young people. *Proceedings of the 9th International Symposium on Atherosclerosis*. Abstract 230, p 75, 1991.
284. Utermann, G.; Menzel, H. J.; Kraft, H. G.; Duba, H. C.; Kemmler, M. G.; Seitz, C. Lp(a) glycoprotein phenotypes: inheritance and relation to Lp(a) concentration in plasma. *Journal of Clinical Investigation* 80: 458-65, 1987.
285. Jerums, G.; Allen, T. J.; Tsalamandris, C.; Akdeniz, A.; Sinha, A.; Gilbert, R.; Cooper, M. E. Relationship of progressively increasing albuminuria to apóprotein(a) and blood pressure in Type 2 (non-insulin dependent) and Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 36: 1037-44, 1993.
286. Groop, P-H.; Elliott, T. G.; Einholm, C.; Jauhiainen, M.; Friedman, R.; Viberti, GC.; Taskinen, M-R. Lp(a) is increased in IDDM patients with nephropathy. *UMDS Research Day*, Londres, 1º de novembro de 1991.
287. Uusitupa, M. I. J.; Niskanen, L. K.; Siitonen, O.; Voutilainen, E. Pyörälä, K. Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in Type 2 (non-insulin dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 36: 1175-84, 1993.
288. Niskanen, L.; Uusitupa, M.; Sarlund, H. Microalbuminuria predicts the development of serum lipoprotein abnormalities favouring atherogenesis in newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33: 237-43, 1990.
289. Patrick, A. W.; Leslie, P. J.; Clarke, B. F.; Frier, B. M. The natural history and associations of microalbuminuria in type 2 diabetes during the first year after diagnosis. *Diabetic Medicine* 7: 902-8, 1990.
290. Nielsen, F. S.; Voldsgaard, A. I.; Gall, M-A.; Rossing, P.; Hommel, E.; Andersen, P.; Dyerberg, J.; Parving, H-H. Apolipoprotein(a) and cardiovascular disease in Type 2 (non-insulin dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy. *Diabetologia* 36: 438-44, 1993.
291. Yudkin, J. S.; Forrest, R. D.; Jackson, C. A. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. *Lancet* 2: 530-3, 1988.

292. Groop, P-H.; Elliott, T.; Friedman, R.; Taskinen, M-R.; Viberti, GC. Characterization of lipid abnormalities in Type 1 diabetic patients with incipient and established renal disease. *Diabetic Medicine* 9 (Suppl. 1): 28A, 1992.
293. Groop, P-H.; Elliott, T.; Lahdenperä, S.; Ekstrand, A.; Franssila-Kallunki, A.; Viberti, GC.; Taskinen, M-R. Apo B containing lipoproteins show multiple abnormalities in insulin-dependent diabetic patients with kidney disease. *Diabetologia* 35 (suppl. 1): A64, 1992.
294. Smith, J. B.; Wade, M. B.; Fineberg, N. S.; Weinberger, N. H. Influence of race, sex and blood pressure on erythrocyte sodium transport in humans. *Hypertension* 12: 251-8, 1988.
295. Beuckelmann, D.; Meyer, H. D.; Erdmann, E. Na⁺/Li⁺ countertransport in human erythrocytes - effects of hypokalemia, oral contraceptives and antihypertensive medication. *Klinische Wochenschrift* 63 (suppl. 3): 1 39-42, 1985.
296. Nutta, E.; Tripodi, M. G.; Cusi, D.; Pati, C.; Dossi, F.; Elii, A.; Bianchi, G. Effects of captopril and other antihypertensive drugs on cell membrane ion transport- A preliminary report. *Postgraduate Medicine* 62 (suppl.1): 13-15, 1986.
297. Parving, H-H.; Gall M-A.; Skøtt, P.; Jørgensen, H. E.; Løkkegaard, H.; Jørgensen, F.; Nielsen, B.; Larsen, S. Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin dependent diabetic patients. *Kidney International* 41: 758-62, 1992.
298. Mogensen, C. E.; Damsgaard, E. M.; Frøland, A.; Nielsen, S.; de Fine Olivarius, N.; Schmitz, A. Microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes. *Clinical Nephrology* 38 (suppl. 1): S28-38, 1992.