

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA, METABOLISMO E NUTRIÇÃO  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Microalbuminúria: aspectos do diagnóstico, manejo e medida da  
concentração de albumina urinária como fator de risco para  
nefropatia, eventos cardiovasculares e mortalidade em pacientes com  
diabetes melito."**

**LUCIANA VERÇOZA VIANA**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Mirela Jobim de Azevedo

Porto Alegre, junho de 2008

## Agradecimentos

Aos meus pais e irmãos, especialmente ao meu pai, por ter nos ensinado desde pequenos o valor do trabalho duro; e a minha mãe, pelo constante incentivo ao estudo.

Ao Dr. Jorge Gross e a Dra Mirela Jobim de Azevedo que literalmente me acolheram em sua casa e me ensinaram muito mais do que academicismo e medicina.

Aos meus amigos, impossível citar um a um sem ser injusta, pelo carinho, fidelidade e importância que vocês têm na minha vida.

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição. São apresentados dois manuscritos independentes sob a forma de artigos a serem enviados para publicação. O primeiro é um artigo de revisão geral do tema e o segundo manuscrito é apresentado como artigo original e descreve o trabalho de pesquisa propriamente dito. A formatação diferenciada dos dois manuscritos é justificada pela escolha de envio para diferentes revistas científicas.

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>Lista Geral de Abreviaturas .....</b>	<b>5</b>
<b>Lista Geral de Quadros, Figuras e Tabelas .....</b>	<b>7</b>
<b>I. Microalbuminúria na Prática Clínica: Aspectos relacionados ao Diagnóstico e Manejo.....</b>	<b>8</b>
Importância do problema.....	9
Aspectos epidemiológicos da microalbuminúria.....	10
Patogênese e fatores associados à microalbuminúria.....	10
Diagnóstico de microalbuminúria.....	12
Manejo da microalbuminúria .....	14
Comentários finais.....	17
Referências Bibliográficas.....	18
<b>II. “Random spot urinary albumin concentration predicts diabetic nephropathy, cardiovascular events and mortality rates in diabetes” .....</b>	<b>26</b>
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Research Design and Methods.....	28
Results .....	32
Discussion.....	35
References.....	37

**LISTA GERAL DE ABREVIATURAS**

AAS	Ácido Acetilsalicílico
ACE	“Angiotensin Converting Enzyme”
ADA	“ American Diabetes Association”
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BMI	“Body Mass Index”
BRA	Bloqueadores do Receptor da Angiotensina II
CV	Cardiovasculares
DBP	“Diastolic Blood Pressure”
DCCT	“Diabetes Control and Complications Trial”
DM	Diabetes Melito
DN	“Diabetic Nephropathy”
EDIC	“The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study”
eGFR	“estimated Glomerular Filtration Rate”
EUA	Excreção Urinária de Albumina
EURODIAB	“European Diabetes Prospective Complications Study Group”
FG	Filtração Glomerular
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HOPE	“Heart Outcomes Prevention Evaluation”
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”
IECA	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
IR	Insuficiência Renal

ITM	Imunoturbidimetria
ND	Nefropatia Diabética
NKF	“National Kidney Foundation”
PREVEND	“Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease Study Group”
RUS	“Random Urine Specimen”
SBP	“Systolic Blood Pressure”
TGF	Taxa de Filtração Glomerular
UAC	“ Urinary Albumin Concentration”
UACR	“ Urinary Albumin:Creatinine Rate”
UAE	“ Urinary Albumin Excretion”
UKPDS	“ United Kingdom Prospective Diabetes Study”

## Lista Geral de Quadros, Tabelas e Figuras

### Artigo I

Quadro 1- Risco para desfechos relacionados à albuminúria.....24

Quadro 2 - Valores de referência para albuminúria.....25

### Artigo II

Table 1 – Baseline clinical and laboratory characteristics according to UAC in 224 diabetic patients .....39

Table 2 – Cox Proportion Hazard Analyses models: UAC  $\geq 14$  mg/l and the relative risk for the presence of clinical diabetic nephropathy, renal failure, and cardiovascular events.....41

Figure 1. Kaplan-Meier survival curve comparing diabetic patients with baseline UAC  $\geq 14$  mg/l and  $< 14$  mg/l.....42

**MICROALBUMINÚRIA NA PRÁTICA CLÍNICA: ASPECTOS RELACIONADOS AO  
DIAGNÓSTICO E MANEJO**

Luciana Verçoza Viana  
Ennio Paulo Calearo da Costa Rocha  
Mirela Jobim de Azevedo

Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabologia e Nutrição  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



### Importância do problema

Valores pouco elevados de albumina urinária são considerados preditores de nefropatia diabética (ND) desde a década de 1980, quando os primeiros estudos europeus mostraram que uma pequena quantidade de albumina na urina, não detectável por métodos comuns, era capaz de prever o desenvolvimento de proteinúria em pacientes com diabetes (DM) tipo 1 e 2 (1). Embora nem todos os pacientes microalbuminúricos evoluam para nefropatia clínica (2), valores elevados de albuminúria vêm sendo reconhecidos como marcadores de desfechos cardiovasculares (CV) relacionados à aterosclerose, tanto em indivíduos diabéticos quanto em não diabéticos (3). Ainda, a microalbuminúria pode ser considerada um dos componentes da síndrome metabólica (4) condição também associada ao desenvolvimento de doença CV, DM e, possivelmente, insuficiência renal (IR) (5). Já foi demonstrada uma correlação positiva entre o número de componentes da síndrome metabólica e a prevalência de microalbuminúria (6). Em pacientes hipertensos, a presença de microalbuminúria se associa ao aumento de massa ventricular esquerda, creatinina sérica e de alterações retinianas compatíveis com retinopatia hipertensiva (7,8). A microalbuminúria é também um marcador de disfunção vascular como espessamento mio-intimal carotídeo (9).

O quadro 1 descreve alguns dos principais estudos que avaliaram riscos cardiovasculares e de mortalidade geral associados à albuminúria. No estudo HOPE, foram avaliados 3498 indivíduos considerados de alto risco, isto é, com doença cardiovascular prévia ou DM associados à pelo menos um dos seguintes fatores: dislipidemia, hipertensão, tabagismo atual ou albuminúria conhecida. A presença de albuminúria, em valores inferiores aos adotados atualmente para diagnóstico de microalbuminúria, aumentou em cerca de duas vezes a chance de doença cardiovascular e mortalidade e em mais de 3 vezes as hospitalizações por insuficiência cardíaca nos pacientes com níveis mais altos de excreção urinária de albumina(3). Já no estudo PREVEND, foram avaliados prospectivamente 40.548 indivíduos da população geral. O aumento de duas vezes na albuminúria em amostra casual matinal foi preditivo de mortalidade total e cardiovascular mesmo em análises ajustadas (10). Um total de 1586 indivíduos não diabéticos, não hipertensos e normoalbuminúricos, participantes do estudo Framingham com valores de albumina/ creatinina em amostra urinária iguais ou superiores à média apresentaram um aumento de risco cardiovascular de 3 vezes quando comparados aqueles abaixo da média. (11).

### Aspectos Epidemiológicos da microalbuminúria

Menos de 3% da população saudável tem valores de excreção urinária de albumina (EUA) maiores do que 15 µmg/min (12). Em aborígenes australianos a prevalência de microalbuminúria, é de 36% a 50% dependendo do critério adotado como albuminúria em diferentes estudos (13).

Em pacientes hipertensos não diabéticos, a microalbuminúria está presente em cerca de 30-40% dos indivíduos e se correlaciona com a gravidade e duração da hipertensão (14). A presença de hipertensão parece influenciar diretamente o aumento da excreção urinária de proteínas, sendo os níveis de albuminúria diretamente proporcionais à pressão sistólica, diastólica e média tanto em consultório quanto na monitorização ambulatorial (15). Quanto à função renal, a associação entre macroalbuminúria ou proteinúria com perda da função renal na população em geral é, de fato bem, estabelecida. Já a relação entre microalbuminúria e insuficiência renal terminal é menos definida (15). Pinto-Sietsma *et al* avaliaram a relação da EUA com a taxa de filtração glomerular (TGF) em 7.728 indivíduos não diabéticos estratificando-os de acordo com a EUA: normal, normal-alta, microalbuminúria e macroalbuminúria. Os autores observaram nos indivíduos com valores de EUA normal-altos e microalbuminúricos um aumento na TFG, enquanto nos macroalbuminúricos houve uma diminuição de TFG (16).

Em pacientes com DM, a microalbuminúria está presente em até 40% dos casos (1), principalmente quando associada à hipertensão (3). Dois importantes estudos avaliaram a incidência de microalbuminúria em pacientes diabéticos: no estudo EURODIAB a incidência cumulativa de microalbuminúria DM tipo 1 foi de 12, 6% ao longo de 7,3 anos de seguimento (17); e o estudo UKPDS, mostrou uma incidência de 2% ano em DM tipo 2 (18). Em uma população de pacientes diabéticos tipo 2 do sul do Brasil, a incidência cumulativa ao longo de 9 anos de seguimento foi de 27% (19). Embora exista correlação entre FG e EUA esta relação não está sempre presente uma vez que um grupo de pacientes apresenta normoalbuminúria e FG baixa, reforçando a necessidade da medição da TGF em todos os pacientes diabéticos para avaliação da ND (20,21).

### Fatores associados à microalbuminúria

Postula-se que a microalbuminúria seja um marcador de dano endotelial generalizado deflagrado por um estado de inflamação de baixo grau (14, 22). Este dano endotelial poderia estar associado a uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina e à liberação de marcadores

inflamatórios. No rim, o aumento da produção de angiotensina II leva a menor produção de uma proteína de integridade da membrana glomerular. A redução na produção dessa proteína resultaria em aumento da permeabilidade da barreira por aumento do tamanho nos poros da membrana glomerular, favorecendo a um aumento da excreção de albumina (22). Uma evidência importante dos efeitos do sistema renina- angiotensina sobre a albuminúria é que sua inibição diminui os níveis de EUA. A angiotensina II apresenta também ação direta sobre as arteríolas aferente e eferente renais que resulta na diminuição da perfusão renal e diminuição na FG. (23).

Outro aspecto da patogênese da microalbuminúria refere-se à glicação não enzimática de proteínas. Em pacientes diabéticos, acredita-se que a albumina em seu estado glicado funcione como uma molécula antigênica que age na formação de radicais livres, causando dano direto as células epiteliais do glomérulo, mesângio e parede vascular. Assim, o processo de filtração protéica fica danificado e ocorre um aumento inicial na EUA (15). É possível que a própria hiperglicemia, independente da presença de glicosúria, esteja relacionada a um aumento da renina plasmática, pressão arterial média e resistência vascular renal, ocasionando a ativação do sistema renina-angiotensina.

Os principais fatores de risco para microalbuminúria são hipertensão, dislipidemia, tabagismo e hiperglicemia tanto em pacientes diabéticos quanto em indivíduos não diabéticos (24, 25). Em indivíduos obesos, observa-se aumento na EUA na presença de obesidade andróide e mista, quando comparados à obesidade ginecóide (20). Além disso, fatores não modificáveis como sexo masculino e idade estão associados ao surgimento de microalbuminúria (26). Especificamente em relação à microalbuminúria no DM, há uma correlação positiva entre microalbuminúria e retinopatia diabética (19).

Finalmente, o fato de que um grupo de pacientes desenvolver ND independente do controle de fatores de risco, sugere que aspectos genéticos também estejam associados à presença e progressão da microalbuminúria. Canani *et al* estudando um grupo de pacientes diabéticos e seus familiares observou que macroalbuminúria ocorria mais frequentemente em familiares de pacientes macroalbuminúricos do que de normoalbuminúricos (27). Entretanto estudos que procuram identificar um único gene para as complicações tardias do diabetes, especialmente a ND, tem sido frustrantes e contraditórios, reforçando ainda mais a idéia de um polimorfismo gênico nas complicações da doença.

## Diagnóstico de Microalbuminúria

### *Métodos e Tipos de Amostra de Urina*

Na prática clínica atual, o método mais utilizado para o diagnóstico da microalbuminúria é a imunoturbidimetria (ITM). Esta técnica se baseia na formação de um complexo antígeno-anticorpo, através de um anticorpo específico para albumina humana (28). O método apresenta boa sensibilidade analítica e baixa variabilidade intra e inter-ensaios (29). No entanto, o método ideal para medida da albuminúria é o HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance – mais sensível e específico que os métodos tradicionais, como o radioimunoensaio (30). Modernamente, duas frações de albumina foram identificadas: a fração imunoreativa (medida por radioimunoensaio) e a não imunoreativa (30). O HPLC possibilita a medida da albuminúria total que inclui a fração imuno-reativa e a fração não imunoreativa. É possível que isto permita a detecção mais precoce da ND (31).

A medida de albumina em urina de 24-h, com tempo marcado ou não, representa ainda o critério de referência para o diagnóstico de ND. Este tipo de coleta apresenta algumas desvantagens que podem levar a erros: o incômodo da coleta, perda de algumas micções ou incorreção na anotação dos horários (32). Recentemente a recomendação de consensos de diferentes sociedades (21,33) é que o diagnóstico de microalbuminúria seja realizado em amostra isolada de urina: primeira urina da manhã ou amostra casual (1). Em amostras isoladas, pode-se utilizar a medida de albumina e creatinina na mesma amostra ou apenas medir a concentração de albumina urinária (1).

Alguns fatores influenciam a medida da albuminúria. Interferem na albuminúria: etnia, horário do dia (variabilidade durante o dia 40-100%), estado de jejum, quantidade de sal e proteínas ingeridos, volume e diluição da urina na amostra avaliada, controle glicêmico e pressórico (34,35,36). Aumentam a EUA: atividade física, insuficiência cardíaca, doença aguda acompanhada de febre, gestação, menstruação, hematúria, leucocitúria e leucorréia. Uso de medicações como inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da angiotensina II (BRA) diminuem a EUA. Outro aspecto é a recomendação de que a medida da albuminúria seja realizada em urina estéril. A presença de bacteriúria tem sido sugerida como um fator de confusão na interpretação dos valores de albuminúria (36). No entanto, apenas um estudo avaliou a influência de bacteriúria no diagnóstico da ND (37). Neste estudo prospectivo, embora com pequeno número de pacientes, não houve diferença na EUA antes e após o tratamento de bacteriúria assintomática em indivíduos diabéticos. Portanto, a recomendação de realização

concomitante de cultura de urina para o diagnóstico de microalbuminúria não é suficientemente baseada em evidências.

#### *Índice Albumina-Creatinina vs. Concentração de albumina*

O índice albumina:creatinina apresenta forte correlação com a EUA 24-h e é capaz de prever o desenvolvimento de ND (1,21). Entretanto, além do custo adicional pela medida da creatinina, devem ser lembradas as interferências sobre a própria dosagem de creatinina: como a excreção de creatinina varia de acordo com a massa muscular, sugere-se que sejam adotados diferentes valores de índice albumina: creatinina para homens e mulheres, embora esta recomendação não seja um consenso. Neste sentido, indivíduos de porte atlético ou com pouca massa muscular (idosos) teriam valores de índice albumina:creatinina subestimados e superestimados, respectivamente. A situação ficaria mais complexa se fossem seguidas recomendações de alguns autores sobre a necessidade de usar valores diferentes de acordo com a idade. Mais ainda, em indivíduos não diabéticos alguns estudos demonstraram que os valores de índice albumina:creatinina variam inclusive com a etnia (34).

A medida da concentração de albumina em amostra de urina parece ser um método prático, acurado e de menor custo quando comparado ao índice albumina:creatinina. Estudo realizado em Porto Alegre, RS, comparou o desempenho diagnóstico e custos de diferentes testes de albuminúria em amostra casual: índice albumina/creatinina, concentração (38, 39) e também com o Micral - Test® (40), uma fita reagente para medida semiquantitativa de albuminúria. A medida da concentração de albumina em amostra de urina casual apresentou a melhor acurácia e menor custo diagnóstico quando comparada ao índice albumina:creatinina e ao Micral-Test®. Foi também demonstrada uma forte correlação entre a medida da concentração de albumina na urina casual e a EUA 24-h, confirmando observação de outros autores (40). Recentemente, uma avaliação prospectiva demonstrou que a concentração de albumina em urina casual é também capaz de prever o desenvolvimento de nefropatia, insuficiência renal e eventos cardiovasculares em pacientes com DM (41).

#### *Valores de Referência*

Microalbuminúria é definida pela presença de albumina na urina acima dos valores de referência adotados. Como já citado, esses valores derivam de estudos com pacientes diabéticos da década de 80 com pequeno número de pacientes e de consensos entre especialistas e, muito

provavelmente, no futuro esses valores deverão ser revisados. De fato, estudo recente realizado em pacientes com DM mostrou que albuminúria normal-alta já está associada ao desenvolvimento de micro- e macroalbuminúria e aumento da mortalidade em pacientes com DM tipo 2 (43). Em indivíduos não diabéticos o risco conferido por valores elevados de EUA parece ser um *continuum*, e valores abaixo dos convencionais para diagnóstico de microalbuminúria já estão associados a aumento de risco cardiovascular (42).

No Quadro 2 estão expressos os valores de albuminúria utilizados no diagnóstico de ND tanto pelo critério de referência – EUA 24-h com tempo marcado - quanto pela medida da concentração ou índice albumina-creatinina em amostra isolada. Independente do ponto de corte adotado para o diagnóstico da ND é necessário a confirmação de microalbuminúria em pelo menos uma segunda coleta de urina, idealmente em um período de 3 a 6 meses (1, 21). Este cuidado é recomendado devido à grande variabilidade biológica que ocorre normalmente nos valores de EUA.

Não existem evidências que justifiquem o rastreamento de microalbuminúria na população em geral, em especial nos indivíduos sem risco cardiovascular. O rastreamento da microalbuminúria é sugerido para pacientes com HAS (44, 45) e com DM (1,21). A Diretriz Européia de Manejo de Hipertensão considera a presença de microalbuminúria um indicador de lesão em órgão alvo e propõe que sua presença seja rastreada em todo paciente hipertenso, em especial quando considerado a facilidade de detecção e baixo custo. Além disso, a diretriz inclui todo o paciente com microalbuminúria em uma categoria de alto risco cardiovascular (45).

Em pacientes com DM o rastreamento deve iniciar no momento do diagnóstico para pacientes com DM tipo 2 e após 5 anos do diagnóstico de DM tipo 1, ou mais precocemente nesses pacientes se o controle metabólico for ruim ou houver desenvolvimento de puberdade (1,21).

### Manejo da microalbuminúria

#### *Pacientes não diabéticos*

Embora a presença de albuminúria em pacientes não diabéticos esteja associada a um aumento de risco cardiovascular e de mortalidade, não existem estudos cujo objetivo principal tenha sido avaliar efeitos benéficos resultantes da redução da EUA.

Estudos desenhados para avaliar efeitos cardiovasculares de intervenções medicamentosas demonstraram que a redução da albuminúria se correlacionou com uma redução de eventos CV (42,46). Como exemplo, o uso de losartana promoveu uma redução da albuminúria associada à

redução do risco de infarto, AVC e eventos cardiovasculares independente da redução da pressão arterial (46). A medida da albuminúria, além permitir uma avaliação mais completa de risco cardiovascular e renal dos pacientes hipertensos, poderia também ser utilizada para orientar a escolha inicial do tipo de medicação anti-hipertensiva. Os IECAs e BRAs são as drogas recomendadas para tratamento da hipertensão na presença de microalbuminúria. Independente do anti-hipertensivo em uso, a pressão arterial deve ser estritamente controlada para obter níveis tensionais menores do que 130/80 mmHg (7). Para que este objetivo seja atingido podem ser utilizadas doses máximas de IECA e BRA ou adicionadas drogas de outras classes.

Até o presente momento não está ainda definido o real benefício de reduzir a microalbuminúria em indivíduos fora das categorias de risco cardiovascular aumentado, como os pacientes com HAS, DM ou com doença cardiovascular prévia.

#### *Pacientes diabéticos*

Acredita-se que sem uma intervenção específica, 20-40% dos paciente diabéticos tipo 2 com microalbuminúria progridam para a fase proteinúrica e finalmente para estágios finais da doença renal (2). Pacientes diabéticos tipo 2 com microalbuminúria tem risco 2 vezes maior de desenvolver insuficiência renal terminal em 10 anos quando comparados com não microalbuminúricos (1). Embora nem todos os pacientes evoluam para estágios mais avançados da doença renal no DM, a presença de microalbuminúria *per se* é uma condição de risco CV bem estabelecida devendo ser tratada.

O tratamento recomendado para a microalbuminúria em pacientes com DM consiste no uso de drogas bloqueadoras do sistema renina-angiotensina: IECA e BRA (21,47), além da obtenção de um controle pressórico e glicêmico estritos. Modificações da dieta podem também ter efeito benéfico no manejo da microalbuminúria e devem ser utilizadas no tratamento.

Os bloqueadores do sistema renina-angiotensiva apresentam efeitos renoprotetores independente do efeito anti-hipertensivo ( 49) e estão indicados independente dos níveis de pressão arterial. Não existe comprovação de maior eficácia dos BRA em relação aos IECA na redução da albuminúria (21,48).

Nos pacientes com DM e hipertensão arterial, existem fortes evidências de que um bom controle pressórico, não relacionado ao tipo de anti-hipertensivo, está associado à redução do desenvolvimento de microalbuminúria (prevenção primária) (49). No final da década de 90, o estudo UKPDS demonstrou que em pacientes com microalbuminúria e DM tipo 2, a diminuição da

pressão arterial sistólica de 154 para 144 mmHg foi capaz de reduzir em 30% a excreção de albumina urinária (50). Atualmente, os valores alvo recomendados para o tratamento da pressão arterial em pacientes diabéticos são inferiores a 130/80 mmHg em microalbuminúricos e menores que 125/75 mmHg em macroalbuminúricos (1).

Em relação ao controle glicêmico, estudos como o UKPS (51) e DCCT (52) mostraram que o melhor controle metabólico tem efeito nefroprotetor, e quanto menores os valores do teste A1c menor o risco de desenvolvimento de microalbuminúria – prevenção primária (53). No entanto, o impacto do controle glicêmico em pacientes com DM tipo 2 e microalbuminúria estabelecida não é completamente definido (prevenção secundária). Dados do UKPDS não demonstraram impacto do controle glicêmico intensivo sobre a progressão de microalbuminúria para nefropatia clínica (52). Entretanto, estudos comprovaram uma associação de controle glicêmico e microalbuminúria (19,25, 51). Reforça este aspecto os dados do estudo EDIC, que seguiu pacientes diabéticos tipo 1 participantes do estudo DCCT após seu término e mostrou uma redução nos novos casos de DN nos pacientes tratados intensivamente(54).

Quanto às estratégias dietéticas, dietas hipoprotêicas (0,6 – 0,8 mg/kg/ dia) parecem retardar a perda de função renal e reduzir a proteinúria em pacientes com doença renal diabéticos ou não (55). Em pacientes com DM 1, foi confirmado em estudo prospectivo o efeito renoprotetor da dieta hipoproteica (56). No entanto, não só a quantidade, mas o tipo de proteína da dieta parece interferir no surgimento e no curso da doença renal (57). Em pacientes diabéticos tipo 2 a adoção de uma dieta normoprotêica constituída exclusivamente de carne de galinha em substituição a carne vermelha foi capaz de reduzir a EUA bem como melhorar o perfil lipídico desses pacientes após 4 semanas de intervenção (58). Esse efeito sobre a redução da EUA em pacientes com DM tipo 2 e microalbuminúria foi comprovado em estudo de longa duração e é de mesma magnitude que do uso de enalapril (59).

Em pacientes microalbuminúricos a estratégia multifatorial no tratamento do diabetes parece conferir vantagens adicionais aos pacientes (49). Gaede et al avaliaram o efeito do tratamento intensivo multifatorial vs. convencional em pacientes com DM tipo 2 e microalbuminúria. O tratamento intensivo consistia em modificações de estilo de vida e intervenções farmacológicas com o intuito de manter a pressão  $\leq$  130/80 mmHg, teste A1C  $<$ 6,5%, colesterol total  $<$ 174 mg/dL e triglicerídeos  $<$ 150 mg/dL; além disso, todos os pacientes do grupo intensivo foram aconselhados a utilizar IECA (ou BRA) e AAS. O tratamento intensivo se mostrou eficaz em preservar a função renal, com redução do risco relativo para progressão de nefropatia



clínica em 61% quando comparada ao grupo controle (60). Além disso, nestes pacientes o tratamento multifatorial apresentou uma redução de risco absoluto de 20% para eventos cardiovasculares (61) e mortalidade (62).

### Comentários finais

O aumento na EUA é um fator de risco para perda de função renal e para eventos cardiovasculares na população em geral e em especial em pacientes com DM e HAS. A medida da albuminúria em amostra isolada de urina é um procedimento acurado, prático e de baixo custo para avaliação da EUA. O rastreamento da microalbuminúria deve ser realizado em todos os pacientes hipertensos e portadores de DM. Os valores atualmente adotados como ponto de corte para o diagnóstico de microalbuminúria provavelmente não são definitivos e, é possível que no futuro, valores inferiores aos atuais sejam adotados.

Em relação ao manejo da microalbuminúria, não se sabe ainda quais são os reais benefícios de tratamento dirigido exclusivamente para redução da EUA em pacientes não diabéticos. Em pacientes hipertensos não diabéticos é razoável supor que a EUA possa ser utilizada, além da avaliação de risco CV, como um indicador da droga anti-hipertensiva inicial, dando-se preferência aos IECA ou BRA. Em pacientes com DM, hipertensos ou não, estes medicamentos são as drogas de escolha. A redução de proteínas na dieta é outro ponto importante, em especial em pacientes com FG baixa. É possível também que o tipo de proteína ingerido tenha um papel fundamental na EUA. Finalmente, para pacientes com DM e microalbuminúria, a associação de múltiplas estratégias de tratamento parece ser a chave para o controle da ND.

Em conclusão, a presença de microalbuminúria deve servir aos clínicos para avaliar e acompanhar a evolução de pacientes com risco CV e renal aumentados, sendo seu rastreamento simples e acessível na prática clínica.

### Referências Bibliográficas

1. Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* 28:164-176, 2005.
2. Caramori ML; Fioretton A; Maurer M. The Need for Early Predictors of Diabetic Nephropathy Risk. *Diabetes* 49: 1339-1408, 2000.
3. Gerstein HC, Johannes FEM, Quilong Y, Dineen SF et al. Albuminuria and Risk of Cardiovascular Events, Death and Heart Failure in Diabetic and Nondiabetic Individuals. *JAMA*, 286: 421, 2001.
4. WHO. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications: Part 1 Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva, 1999.
5. Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 17: S81–S85, 2006.
6. Hao Z, Konta T, Takasaki S et al. The Association between Microalbuminuria and Metabolic Syndrome in the General Population in Japan: The Takahata Study. *Intern Med.* 46:341-6, 2007.
7. Bassi S, Lewis JB. Microalbuminuria as a Target to Improve Cardiovascular and Renal Outcomes. *Am J Kid Dis* 47: 927 – 946, 2006.
8. Pontremoli R; Sofian A; Ravera A et al. Prevalence and Clinical Correlates of Microalbuminuria in Essential Hypertension. *Hypertension* 30: 1135 – 1143, 1997.
9. Bigazziz R; Bianchi S; Nenci R et al. Increased thickness of the carotid artery in patients with essential hypertension and microalbuminuria (abstract). *J Hum Hypertens* 9: 827-33, 1995.
10. Hillege HL, Fidler V, Diercks GFH, Gilst WH et al Urinary Albumin Excretion Predicts Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality in General Population. *Circulation* 106: 1777-1782; 2002.
11. Arlov J, Evans JC, Meigs JB *et al.* Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: The Framingham Heart Study. *Circulation* 112 :969-975, 2005.
12. Klausen K, Johsen KB, Rasmussen BF et. Al. Very low levels of albuminuria are associated with risk of coronary heart disease and death independently of renal function, hypertension, and diabetes. *Circulation* 110: 32-35, 2004.
13. The CARI Guidelines. Testing for Proteinuria. *Nephrology* 9, S3 – S7, 2004.

14. Volpe M. Microalbuminuria screening in patients with hypertension: recommendations for clinical practice. *Int J Clin Pract* 62: 97-108, 2008.
15. Khosla N, Sarafidis PA, Bakris GL. Microalbuminuria, *Clin Lab* 26:635-653, 2006.
16. Pinto-Sietsma SJ, Janssen WM, Hilleg HL et al. Urinary Albumin Excretion is associated with renal function abnormalities in nondiabetic population. *J Am Soc Nephrol* 11: 1882-1888, 2000.
17. Chaturvedi N, Bandinelli S, Mangili R, Penno G, Rottiers RE, Fuller JH: Microalbuminuria in type 1 diabetes: rates, risk factors and glycemic threshold. *Kidney Int* 60: 219-227, 2001.
18. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR: Development and Progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kidney Prospective Diabetes Study (UKPDS 64) *Kidney Int* 63: 225-232, 2003.
19. Murussi M, Baglio P, Gross JL, Silveiro SP. Risk factors for microalbuminúria in type 2 diabetic patients: a 9-year follow-up study. *Diabetes Care* 25:1101-1103, 2002.
20. Kraemer CK; Leitão CB; Pinto LC et al. Clinical and Laboratory Profile of Patients with type 2 Diabetes With Low Glomerular Filtration Rate and Normoalbuminuria. *Diabetes Care* 30: 1998 – 2000, 2007.
21. American Diabetes Association, (2008). Standards of Medical Care in Diabetes – 2008. *Diabetes Care* 31: S12 – S54, 2008.
22. Zanella MT. Microalbuminúria: Fator de Risco Cardiovascular e Renal Subestimado na Pratica Clinica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50: 313-320, 2006
23. Atlas AS. The Renin –Angiotensin Adosterone System: Pathophysiological Role and Pharmacologic Inhibition. *JMCP* 13: S9-S20, 2007.
24. Cirillo M, Senigalliese L, Laurenzi M et al. Microalbuminuria in nondiabetic adults: relation of blood pressure body mass index, plasma cholesterol levels and smoking: The Gubbio Population Study. *Arch Int Med* 158: 1933-9, 1998.
25. Rossi MCE, Nicolucci A, Pellegrini F et al. Identifying patients with type 2 diabetes at high risk of microalbuminuria: results of the DEMAND (Developing Education on Microalbuminuria for Awareness of renal and cardiovascular risk in Diabetes) Study. *Nephrol Dial Transplant* 23: 1278-84, 2008.
26. Romundstad S, Holmen J, Halan H, Kvenild K, Ellenkjaer H. Microalbuminuria and All-Cause Mortality in Treated Hypertensive Individuals: Does Sex Matter? *Circulation* 108:2783-2789, 2003.

27. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial Clustering of Diabetic Nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48: 909-913, 1999.
28. Wendland AE; Azevedo MJA; Gross JL; Camargo JL. Avaliação de diferentes Métodos para determinação de albuminúria: impacto na classificação dos estágios da nefropatia diabética. *J Bras Patol Med Lab* 43: 393-398, 2007
29. Camargo JL, Lara GM, Wendland AE; Gross JL; Azevedo MJ. Agreement of different immunoassays for urinary albumin measurement. *Clinical Chemistry (Baltimore)* 54: 925-927, 2008.
30. Comper WD, Osicka TM, Clark M, MacIsaac RJ, Jerums G. Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int* 65:1850-5, 2004.
31. Sarafidis PA, Khosla N, Bakris GL. Antihypertensive Therapy in the Presence of Proteinuria. *Am J Kid Dis* 49:12 – 26, 2007.
32. Leitão CB, Canani LH, Bolson PB et al. Que Valores devem ser Adotados para o Diagnóstico de Microalbuminuria no Diabete Melito? *Arq Bras Endocrinol Metab* 50: 322-326, 2006.
33. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease. Downloaded from: [http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guideline\\_diabetes/guide1.htm](http://www.kidney.org/professionals/kdoqi/guideline_diabetes/guide1.htm)
34. McCulloch DK, Bakris GL. Microalbuminuria and Diabetic Nephropathy, 2007. Downloaded from: <http://www.uptodate.com>.
35. Rose BD, Bakris GL. Microalbuminuria and Cardiovascular, 2007. Downloaded from: <http://www.uptodate.com>.
36. Mogensen CE, Vestbo E, Poulsen PL *et al*. Microalbuminuria and potential confounders. A review and some observations on variability of urinary albumin excretion. *Diabetes Care* 18:572-81, 1995.
37. Hernandez C, Simo R. Albumin excretion rate is not affected by asymptomatic urinary tract infection: a prospective study. *Diabetes Care* 27: 1565-1569, 2004.
38. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR *et al*. The Receiver Operating Characteristics Curve in the Evaluation of Random Urine Specimen as a Screening Test for Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* 20: 516-519, 1997.
39. Zelmanovitz, T; Gross JL; Oliveira J; Azevedo, MJ Proteinuria is still useful for screening and diagnosis of overt diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 21(7), 1998.

40. Incerti J, Zelmanovitz T, Camargo JL, Gross JL, Azevedo MJ. Evaluation of tests of microalbuminuria screening for patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 20:2402-2407, 2005
41. Viana LV, Gross J, Camargo JL, Zelmanovitz T, Rocha EPCC, Azevedo, MJ. Dissertação de Mestrado: Microalbuminúria: aspectos do diagnóstico, manejo e medida da concentração de albumina urinária como fator de risco para nefropatia, eventos cardiovasculares e mortalidade em pacientes com diabetes melito. UFRGS, 2008.
42. Murussi M, Campagnolo N, Beck MO, Gross JL, Silveiro SP. High –normal levels of albuminuria predict the development of micro and macroalbuminuria and increased mortality in Brazilian Type 2 diabetic patients: an 8 year follow-up study. *Diabetic Medicine* 24, 1136 – 1142; 2007.
43. Schmieder RE, Schrader JS, Tebbe U et al. Low-grade albuminuria and cardiovascular risk – What is the evidence. *Clin Res Cardiol* 96:247-257, 2007.
44. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR *et al.* Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 42:1206-1252, 2003.
45. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A et al. Guidelines for the management of arterial hypertension: the task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 25: 1105-87, 2007.
46. Ibsen H, Olsen MJ, Wachtell K et al. Reduction in Albuminuria Translate to Reduction in Cardiovascular Events in Hypertensive Patients: Losartan Interventions Endpoint Reduction in Hypertension Study. *Hypertension* 45: 198-202, 2005.
47. The ACE Inhibitors in Diabetic Nephropathy Trialist Group. Should all Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Microalbuminuria Receive Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors? *Ann Intern Med* 134: 370 – 379, 2001.
48. Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME et al. Complications of Diabetes Mellitus. In Williams Textbook of Endocrinology, 10<sup>th</sup> Edition. Saunders Elsevier, 1443-1450, 2008.
49. Barnett A. Preventing Renal Complications in Type 2 Diabetes: Results of the Diabetics Exposed to Telmisartan and Enalapril Trial. *J Am Soc Nephrol* 17: S132-S135, 2006.

50. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Tight Blood Pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ* 317:703-713, 1998.
51. Diabetes Complications and Control Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 329: 977-986, 1993.
52. UKPDS Group: Intensive Blood Glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and the risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352: 837 – 853, 1998.
53. Fioretto P, Bruseghin M, Berto I, Gallina P, Manzato E, Mussap M. Renal Protection in Diabetes: Role of Glycemic Control. *J Am Soc Nephrol* 17 S86-S89, 2006.
54. The Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/ Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Sustained Effect of Intensive Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus on Development and Progression of Diabetic Nephropathy: The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. *JAMA* 290: 2159 – 2167, 2003.
55. Pedrini MT, Levy AS, Lau J, Chalmers TC, Wang PH: The effect of diet protein restriction on the progression of diabetic and non-diabetic renal disease: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 124: 627-632, 1996.
56. Hansen HP, Tauber-Lassen E, Jensen BR, Parving HH. Effect of dietary protein restriction on prognosis in patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 62: 220-8, 2002
57. Mello VDF; Azevedo MJ; Zelmanovitz T; Gross JL. Papel da Dieta como Fator de Risco e Progressão da Nefropatia Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metab* 49: 485-493, 2005.
58. Gross JL, Zelmanovitz T, Moulin CC, De Mello V, Perassolo M, Leitão C, Hoefel A, Paggi A, Azevedo MJ: Effect of chicken-based diet on the renal function and lipid profile in patients with type 2 diabetes: a randomized crossover trial. *Diabetes Care* 25: 625-651, 2002.
59. Mello VDF, Zelmanovitz T, Azevedo MJ, Paula T, Gross JL. Long-term effect of a chicken-based diet versus enalapril on albuminuria in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Journal of Renal Nutrition*, 2008.
60. Gaede P, Tarnow L, Pernille V, Parving HH, Pedersen O. Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminúria. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2784-2788, 2004.

61. Gaede P, Pernille V, Larsen N, Jensen GVH, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in Patients with type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 348: 383-932, 2003.
62. Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a Multifactorial Intervention on Mortality in Type 2 Diabetes. *N Eng J Med* 358:580-91, 2008.

**Quadro 1 - Risco Relativo (RR) para desfechos relacionados à albuminúria.**

	<b>RR</b>	<b>95% CI</b>	<b>p</b>
<b>Indivíduos de Alto Risco CV (HOPE<sup>3</sup>)</b>			
Índice albumina/creatinina $\geq$ 2mg/mmol			
Doença Cardiovascular	1,83	1,64-2,05	<0,001
Mortalidade geral	2,09	1,84-2,38	<0,001
Hospitalizações por Insuficiência Cardíaca	3,23	2,54-4,10	<0,001
<b>População em geral (PREVEND<sup>10</sup>)</b>			
Aumento de 2 vezes no valor da amostra de urina casual			
Mortalidade Cardiovascular	1,35	1,24-1,46	<0,001
Mortalidade não-cardiovascular	1,17	1,09-1,25	<0,001
<b>Indivíduos sem Fatores de Risco (Framingham<sup>11</sup>)</b>			
Aumento índice albumina/creatinina (log)			
Eventos Cardiovasculares	1,36	1-1,87	0,05
Mortalidade	1,55	1,10-2,20	0,014



**Quadro 2 - Valores de referência para medidas de albuminúria.**

	Urina 24-horas	Índice albumina/ creatinina	Amostra Isolada de urina Concentração de albumina
Normal			
Normoalbuminúria	<20 µg/min <30 mg/ 24=h	<30 mg/g	<17 mg/l
Microalbuminúria	20 a 199 µg/min 30 - 300mg/24-h	30 - 300 mg/g	17 - 174 mg/l

RANDOM SPOT URINARY ALBUMIN CONCENTRATION PREDICTS DIABETIC NEPHROPATHY, CARDIOVASCULAR EVENTS AND MORTALITY RATES IN DIABETES

Luciana Verçoza Viana, MD<sup>1</sup>

Jorge Luiz Gross, MD<sup>1</sup>

Joiza Lins Camargo, BC<sup>2</sup>

Themis Zelmanovitz, MD<sup>1</sup>

Ennio Paulo Calearo da Costa Rocha<sup>1</sup>

Mirela Jobim de Azevedo, MD<sup>1</sup>

From the Endocrine Division<sup>1</sup> and Clinical Pathology Unit<sup>2</sup> of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:**

Mirela Jobim de Azevedo, MD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Prédio 12 – 4º andar. 90035-003 – Porto Alegre, RS – Brazil

Phone/FAX +55 51 332-5188/330-9100 e-mail: [mirelaazevedo@terra.com.br](mailto:mirelaazevedo@terra.com.br)

Word count: 2.838

Number of tables: 2

Number of figures 1

**Abstract**

**Objective** – To evaluate whether urinary albumin concentration (UAC) measured in a random urine sample can predict diabetic nephropathy (DN), renal failure, cardiovascular events, and mortality in patients with diabetes mellitus (DM).

**Design** – In this cohort conducted in diabetic outpatients, primary endpoints were clinical DN [urinary albumin excretion (UAE) >299 g/24-h or UAC >175 mg/l or increased total urinary protein], renal failure [estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 ml/min/1.73m<sup>2</sup>], new cardiovascular events and death.

**Results** – In a group of 224 patients (age 56.7 ± 13.4 years; 60.3% females; 199 type 2) followed for 6.1 ± 2.6 years, 163 patients were normoalbuminuric and 61 microalbuminuric based on 24-h UAE. A subset of 174 patients was also evaluated for cardiovascular endpoints. Clinical DN occurred in 12% of patients (1.97 events/100 patients-year) and renal failure in 20% (3.88 events/100 patients-year). At follow-up 26.4% of patients had new cardiovascular events (4.43 events/100 patients-year) and 17 (14.5 events/1000 patients-year) died. In multivariate Cox's proportional-hazard models, baseline UAC ≥14 mg/l was a risk factor for clinical DN (RR 9.12, 95%CI 2.66 – 31.28; P <0.001), renal failure (RR 3.66, 95%CI 1.76 – 6.412; P <0.001), CV events (RR 3.176; 95%CI 1.45 – 6.934; P = 0.004), and death (RR 5.45; 95%CI 1.17 – 25.43; P = 0.031). All multivariate regression models were adjusted for baseline A1C test, systolic blood pressure, eGFR, previous cardiovascular events, and HDL cholesterol according to univariate analyses.

**Conclusion** – UAC measured in a spot random urine specimen predicts clinical DN, CV events and death in patients with DM.

## Introduction

Microalbuminuria affects up to 40% of patients with diabetes mellitus (DM), and besides predicting clinical diabetic (DN) nephropathy it is also a risk factor for cardiovascular disease and mortality in diabetic and non-diabetic subjects (1). Urinary albumin measurement is the main parameter used to diagnose DN. The preferred urine sample for DN diagnosis is a random urine spot according to the American Diabetes Association (2) and the National Kidney Foundation (3). Measurement of urinary albumin concentration (UAC) in a random urine specimen seems to be the best choice for the diagnosis of microalbuminuria in diabetic patients, considering its cost and accuracy (4). Studies that established the predictive value of albuminuria for DN progression or cardiovascular diseases were based mainly on albumin measurements in timed or 24-h urine collections (5, 6).

In a population based prospective study high values of UAC in spot morning urine specimens were associated with increased mortality, especially from cardiovascular causes (7). In the 80's, Mogensen showed that microalbuminuria in morning urine specimens could predict clinical proteinuria and increased mortality in type 2 diabetic patients (8). However, only two other small studies using random urine specimens, both with a case-controlled design, were performed in type 1 (9) and type 2 (10) DM. These studies demonstrated that mortality and progression to DN was positively associated with high UAC levels as measured in random urine samples.

Therefore the aim of this study was to evaluate whether random spot UAC can predict DN, renal failure, new cardiovascular events and mortality rates in patients with DM.

## Research Design and Methods

This retrospective cohort study started between 1994 and 2002 in the outpatient diabetic clinic of the Endocrine Division of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, a university hospital (4). Briefly, consecutively attended diabetic patients were selected and patients with clinical DN

(albuminuria greater than 300 mg/ 24-h or proteinuria >500 mg/24-h or positive Combur-Test<sup>®</sup>) were not included. Patients with non-sterile urine samples, clinical conditions causing dehydration (due to possibility of false positive results in albumin measurements), or any wasting diseases that could cause severe undernourishment were also excluded. Informed consent was obtained at baseline from each patient and the Ethics Committee of the Hospital approved the present extended study protocol.

### Endpoints

Renal and cardiovascular outcomes and general mortality were evaluated at the end of follow-up. Renal endpoints were clinical DN [urinary albumin excretion (UAE) >299g/24-h or UAC >175 mg/l in a random spot urine sample or total urinary protein >500 mg/24-h or positive test strip for total protein read by an automated device in spot urine sample] and renal failure [estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> for  $\geq 3$  months]. The diagnosis of clinical DN at the end-of-study was confirmed in a second urine sample, except in 4 patients. Three of these patients died before the confirmation of DN and in one patient a second urine sample was unavailable. The cardiovascular endpoints were: new cardiovascular events [new myocardial infarct (Minnesota codes 1-1 to 1-3 or 7-1 on resting ECG or exercise test, fixed non-perfused area on myocardial scintigraphy, or episode of chest pain with compatible ECG and enzyme alterations); myocardial revascularization procedures; amputation or lower limb revascularization procedures, and stroke confirmed by image exams or by disability. Patients with type 1 DM were excluded from the evaluation of cardiovascular events. Cause of death was collected from medical records for mortality analysis.

The time of follow-up was considered the period between the first assessment and the moment when a study endpoint occurred, or the time of the last medical evaluation.

### Baseline evaluation

Patients collected a 24-h urine sample followed by collection of a random urine specimen the next day. This spot urine sample was collected during the medical visit, at any time of day, and without any special recommendation. In the random urine sample, a sediment analysis and a culture were performed, and albumin and creatinine were measured.

Clinical and laboratory data from these patients at the beginning of the study were reviewed from the original database and from hospital records in the last trimester of 2007 simultaneously by two of the researchers (LVV, EPCCR). Glucose control indexes, lipid profile, and serum creatinine data were recorded. Patients were considered as current smokers or non-smokers. Ethnic definition was self-classified as white or non-white. Body mass index (BMI) was calculated. Blood pressure levels were registered. The presence of cerebrovascular disease was established in the presence of a history of stroke confirmed by image exams and/or compatible findings (sequelae). The diagnosis of baseline ischemic heart disease was based on the presence of at least one of the followings: ECG abnormalities [Minnesota Codes: Q and QS patterns (1-1 to 1-3); and complete left bundle branch block (7-1)] (11), and perfusion abnormalities on myocardial scintigraphy at rest (fixed).

At baseline normoalbuminuria was defined using 24-h urine samples. UAE values  $<30$  mg/24-h were considered as normoalbuminuria and values from 30 to 300 mg/24-h as microalbuminuria (12). Albuminuria was also defined according to UAC in random spot urine samples: UAC  $<14$  mg/l – nomoalbuminuria and UAC = 14 – 174 mg/l – microalbuminuria (4). These spot urine samples were also classified according to urinary albumin:creatinine ratio (UACR) as normoalbuminuric, (UACR  $\leq 30$  mg/g ) or microalbuminuric (UACR 30 – 300 mg/g) (12).

## Methods

Total protein measurement (semi-quantitative) was performed using a test strip (Combur-Test<sup>®</sup>; Boehringer Mannheim, Lewes, UK). Albuminuria was measured by

immunoturbidimetry [TinaQuant Roche<sup>®</sup> (Basel, Switzerland)] and creatinine by Jaffe's reaction. All urinary measurements were performed in sterile specimens.

Fasting plasma glucose was measured by the glucose oxidase ultraviolet (UV) enzymatic method. Urea, cholesterol, and triglycerides were measured by enzymatic methods. Low-density lipoprotein cholesterol was calculated using the Friedewald equation. Serum creatinine was measured by a kinetic alkaline picrate Jaffé reaction and converted to the standardized Jaffe Roche (CREA), traceable method, by linear regression (traceable Jaffé creatinine =  $-0.236 + 1.061 \times$  non-compensated Jaffe creatinine) [13]. All chemistry parameters were analyzed in a Modular P (Roche<sup>®</sup> (Basel, Switzerland)). The A1C test measurements (%) were performed by different methods during the follow-up period. However, all A1C results were traceable to DCCT method by off-line calibration or through conversion formulae (14). Glomerular filtration rate was estimated by MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) study equation:  $GFR (ml/min/1.73 m^2) = 175 \times$  (serum creatinine  $_{mg/dl})^{-1.154} \times$  (age  $_{years})^{-0.203} \times$  (0.742 if female)  $\times$  (1.212 if black) (13)

Myocardial scintigraphy was obtained after intravenous infusion of dipyridamole or exercise and at rest [single-photon emission computed tomography (SPECT); GE Starc am 4000i, Milwaukee, WI]. Segmental myocardial perfusion patterns were classified as normal pattern or fixed defect pattern (necrosis).

### Statistical analysis

Baseline comparisons were performed by Student's t test, Mann-Whitney U test, or chi-square test, as appropriate. Incidence was expressed as cumulative rate and as incidence density, calculated by multiplying the total number of outcomes and dividing this result by the total number of years at risk. Kaplan-Meier curves and log rank test were used to compare the probability of death according to baseline UAC values ( $\geq 14$  mg/l or  $< 14$  mg/l). Multivariate Cox's proportional-hazard models were used to estimate the risk for the presence of outcomes (dependent variables) at

the end of study in patients with  $\text{UAC} \geq 14$  mg/l, adjusted for possible confound factors. Independent variables were selected based on their significance in univariate analyses or according to their biological relevance. Results are expressed as mean  $\pm$  SD, median (range) or number of cases with the characteristic (%). P values  $<0.05$  (two-sided) were considered to be statistically significant. SPSS 14.0 - Professional Statistics™ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used.

## Results

Two hundred and twenty-four patients (82%) of the original cohort had data available to evaluate renal endpoints and 174 for cardiovascular outcomes analyses. Missing patients from the original cohort did not differ from the patients followed regarding age, diabetes duration, proportion of females, and ethnic definition. Missing patients had lower eGFR ( $79.2 \pm 26.2$  vs.  $88.9 \pm 21.2$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>;  $P = 0.047$ ) than included patients.

### Analyses of Renal Endpoints

In these analyses, 224 patients (age  $56.7 \pm 13.4$  years; 60.3% females; 199 type 2 DM patients; 25 type 1 DM patients) were followed for  $6.1 \pm 2.6$  years (1 to 13 years). One hundred and sixty-three (72.8%) of these patients were normoalbuminuric and 61 (27.2%) microalbuminuric according to baseline 24-h UAE. Baseline features of patients divided according to UAC values,  $<14$  mg/l or  $\geq 14$  mg/l, were shown in Table 1. Patients with  $\text{UAC} \geq 14$  mg/L were most frequently male, had more cardiovascular events, higher levels of systolic blood pressure and triglycerides, and lower eGFR than patients with  $\text{UAC} < 14$  mg/l. The follow-up time of patients with  $\text{UAC} \geq 14$  mg/l ( $6.1 \pm 2.8$  years) or  $\text{UAC} < 14$  mg/l ( $6.2 \pm 2.4$  years) was not different ( $P = 0.908$ ).

### *Diabetic nephropathy*

At the end of the study, clinical DN occurred in 12% of the patients (1.97 events/100 patients-year). The diagnosis of DN at follow-up was established by 24-h UAE in 157 patients, by UAC in 58 patients, and by Combur-Test® in 10 patients.



Renal endpoints were evaluated according to baseline UAC values. Among the patients with baseline UAC <14 mg/l, 112 patients (85%) were normoalbuminuric and 16 (12%) microalbuminuric at follow-up, and 1 patient developed clinical nephropathy. In the group of patients with baseline UAC  $\geq$ 14 mg/l, 31 patients (33%) were microalbuminuric, 38 (40.8%) macroalbuminuric, and 24 (25.4%) normoalbuminuric at end- of-study.

Multivariate Cox's proportional-hazard models using clinical DN as the dependent variable were constructed and adjusted for baseline systolic blood pressure, A1C test, and eGFR (Table 2). Baseline UAC  $\geq$ 14 mg/l increased the risk for the presence of clinical DN (RR 9.12, 95%CI 2.66 – 31.28; P <0.001) at the end of study. This risk was also significant when UAC  $\geq$ 14 mg/l was replaced for baseline UACR  $\geq$ 30 mg/g (RR 9.35, 95%CI 2.75 - 31.79; P <0.001) or for baseline UAE >30 mg/24-h (RR 11.61, 95%CI 3.79 - 35.66; P <0.001) in the same model.

Data analysis using only end-of-study UAE measurements performed in 24-h urine collections to established the diagnosis of clinical DN, confirmed the higher risk in patients with UAC  $\geq$ 14 mg/l at the beginning of the study: RR 10.44, 95%CI 2.31 - 35.66 (P <0.001). Furthermore, UAC  $\geq$ 14 mg/l was also a risk factor for either micro- or macroalbuminuria (RR 4.21, 95%CI 2.41 - 7.34; P <0.001), adjusted for systolic blood pressure, A1C test, and eGFR.

#### *Renal failure*

In these analyses only patients with baseline eGFR >60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> (n = 194; 148 normoalbuminuric and 46 microalbuminuric according to 24-h UAE (170 type 2 and 24 type 1 DM patients) were taken into account. Renal failure was detected in 20% of these patients at the end of the follow-up (3.88 events/100 patients-year). UAC  $\geq$ 14 mg/l at baseline increased the risk for renal failure about 3.4 times (Table 2). The respective risk value conferred by baseline UACR  $\geq$ 30 mg/g was 3.91 (95%CI 1.89 – 8.32; P <0.001) and by baseline UAE >30 mg/24-h was 3.45 (95%CI 1.86

– 6.409;  $P < 0.000$ ). All Cox multivariate regression models were adjusted for baseline systolic blood pressure and A1C test.

#### Analyses of Cardiovascular Events

In these analyses, 174 type 2 DM patients followed for  $6.1 \pm 2.8$  years (1 to 13 years) were included. There was no difference in this subgroup as compared to the original cohort regarding age, proportion of females, UAE and eGFR (data not shown). During the follow-up 26% of patients ( $n = 46$ ) had cardiovascular events (4.43 events/100 patients-year): 35 (76%) had cardiac events, 6 (13 %) lower limb amputations, and 5 (11 %) stroke. Multivariate Cox's proportional-hazard models for cardiovascular outcomes were adjusted for baseline systolic blood pressure, A1C test, HDL cholesterol, eGFR, and previous cardiovascular events. The risk for cardiovascular events was 3.2 in patients with  $UAC \geq 14$  mg/l (Table 2). Similar values were observed when using in the same model  $UACR \geq 30$  mg/g (RR 2.89, 95%CI 1.29 - 6.45;  $P = 0.009$ ), or  $UAE > 30$  mg/24-h (RR 2.20, 95%CI 1.08 - 4.49;  $P = 0.03$ ) instead of  $UAC \geq 14$  mg/l.

#### Mortality analyses

Seventeen patients died during the follow-up: four patients from cardiovascular death, five from infectious causes, four from neoplastic disease, one from liver failure, one from pulmonary embolism, and two patients from unknown causes. Fifteen patients with  $UAC \geq 14$  mg/l (22.38 deaths /1000 patients' year) and two patients with  $UAC < 14$  mg/l (2.27 deaths/1000 patients' year) died. Patients who died had higher A1C test values (8.57 vs. 10.19 %;  $P = 0.006$ ) and lower eGFR (69.53.v 84.11  $P = 0.046$ ) than survivors. A Kaplan-Meier curve grouping patients according to baseline UAC values, demonstrated a higher mortality rate in patients with baseline  $UAC \geq 14$  mg/l as compared to patients with  $UAC < 14$  mg/l (12.4 vs. 1.52 %;  $P = 0,001$ ) (Figure 1). The presence of  $UAC \geq 14$  mg/L increased the risk of mortality during follow up 5.45 times (95%CI 1.17 - 25.43;

P = 0.031), adjusted for baseline eGFR. Including the baseline A1C test in this Cox multivariate regression model did not change the results.

## Discussion

This study demonstrated that UAC measured in a random spot urine sample predicts progression to DN, including renal failure, cardiovascular events and mortality in patients with DM. In addition, the relative risk for DN conferred by UAC was almost identical to risk conferred by abnormal 24-h UAE, still considered as the standard method for DN diagnosis. Furthermore, all statistical analyses were adjusted for traditional risk factors for DN, such as glucose control and blood pressure levels. We had previously demonstrated that UAC was as accurate as and less expensive than UACR (4). In a prospective approach, the present study confirms that UAC measured in a random specimen, a practical test easily performed anywhere at any time, can predict renal and cardiovascular outcomes as much as 24-h UAE.

The risk of developing DN observed in this cohort was about 9 times higher for patients with UAC >14 mg/l as compared to patients with UAC <14 mg/l. This cohort seems to be representative of DM patients, especially type 2 DM, since the incidence of progression of micro- to macroalbuminuria was similar to that observed by other authors (15). Furthermore, when only patients with baseline GFR >60 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> were evaluated at the end of the study, elevated UAC was also able to predict renal failure, an important endpoint to be surveyed concurrently with albuminuria progression.

Incidence of new cardiovascular events and death were lower than observed in other studies (16, 17). These difference could be attributed to more strict glucose (A1C test: 8.6 vs. 9.1%) and blood pressure (systolic blood pressure: 139.1 vs. 143 mmHg) controls in our cohort as compared with those studies. In fact, the mortality rate (21.63 deaths/1000 patient's year) observed in microalbuminuric type 2 diabetic patients submitted to a tight metabolic and blood pressure glucose

control using a multifactorial approach was similar to that observed in the present study (22.38 deaths /1000 patients' year ) (18). Even though, in the present study UAC  $\geq 14$ mg/dl was able to predict cardiovascular events (RR = 3.24) and deaths (RR = 5.45).

A possible limitation of the present cohort is its historical data collection. However, all patients were regularly attended by the same research team that used a standardized clinical and laboratory protocol in their routine. Furthermore we did not have a significant loss of patients (<20%), and the main clinical characteristics of missing patients did not differ from included ones.

In conclusion, the present study definitively demonstrated that UAC can be used to diagnose DN and to monitor renal and cardiovascular endpoints in patients with DM. Measuring UAC probably might be adopted as the preferred albumin measurement tool for the surveillance of the renal and cardiovascular status of diabetic patients.

## References

1. Gross JL, Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Diabetes Care* 28:164-76, 2005.
2. American Diabetes Association, (2008). Standards of Medical Care in Diabetes – 2008. *Diabetes Care* 31:S12-S54, 2008.
3. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, et al. Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the national kidney foundation (NKF) and the national institute of diabetes and digestive and kidney diseases (NIDDK). *Am J Kidney Dis* 42:617-622, 2003.
4. Incerti J, Zelmanovitz T, Camargo JL, Gross JL, Azevedo JA. Evaluation of tests of microalbuminuria screening for patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 20:2402-2407, 2005.
5. Steinke JM, Sikaiko AR, Kramer MS. The Early Natural History of Nephropathy in Type 1 Diabetes: III. Predictors of 5-Year Urinary Albumin Excretion Rate Patterns in Initially Normoalbuminuric Patients. *Diabetes* 54:2164-2171, 2005.
6. Hovind P, Tarnow L, Rossing P et al. Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study. *BMJ* 328:1105-1110, 2004.
7. Hillege HL, Fidler V, Diercks GFH, Gilst WH et al. Urinary Albumin Excretion Predicts Cardiovascular and Noncardiovascular Mortality in General Population. *Circulation* 106:1777-1782, 2002.
8. Mogensen CE. Microalbuminuria Predicts Clinical Proteinuria and Early Mortality in Maturity-Onset Diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310:356-60.
9. Beatty OL et al. Is a Random Urinary Albumin Concentration a Useful Screening Test in Insulin-Treated Diabetic Patients? *IJMS* 163:406-9, 1996.

10. Beatty OL et al. Microalbuminuria as identified by a spot morning urine specimen in non-insulin-treated diabetes: an eight-year follow-up study. *Diabetic Medicine* 12:261-6, 1995.
11. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. Cardiovascular survey methods. WHO Monograph Series # 56, 2<sup>nd</sup> ed, WHO, England.
12. American Diabetes Association: Nephropathy in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 27:S79-S83, 2004.
13. Levey AS, Coresh J, Greene T et al. Using standardized serum creatinine values in Modification of Diet in Renal Disease equations for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 145:247-254, 2006.
14. Camargo JL, Zelmanovitz T, Paggi A, Friedman R, Gross JL. Accuracy of conversions formulae for estimation of glycohaemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 58:521-528, 1998.
15. Gall MA, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *BMJ* 314:783-788, 1997.
16. Mattock MB, Barnes DJ, Viberti JC et al. Microalbuminuria and Coronary Heart Disease in NIDDM: An Incidence Study. *Diabetes* 47, 1786 – 1792, 1998.
17. Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, Klein BEK. The risk of cardiovascular Disease Mortality Associated with Microalbuminuria and Gross Proteinuria in Persons with Older-Onset Diabetes Mellitus. *Arch Intern Med.* 160:1093-1100, 2000.
18. Gaede P, Pernille V, Larsen N, Jensen GVH, Parving HH, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in Patients with type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 348: 383-932, 2003.

**Table 1 – Baseline clinical and laboratory characteristics according to UAC in 224 diabetic patients.**

	UAC <14 mg/l	UAC ≥14 mg/l	P
	131	93	-
Age (years)	56.0 ±14.2	57.0 ±12.2	0.350
Type 2 diabetes	113 (86.2 %)	86 (92.5%)	0.146
White ethnicity	123 (93.8%)	88 (94.6%)	0.700
Female sex	88 (67.1%)	47 (50.5%)	0.120
Diabetes duration (years)	11.9 ± 7.5	11.0 ± 6.8	0.356
Previous cardiovascular event	25 (19.0%)	30 (32.3%)	0.022
Current Smoking	13 (9.92%)	11 (11.8%)	0.099
Hypertension	74 (56.4%)	71 (76.4%)	0.003
SBP (mmHg)	135.7 ± 23.0	143.8 ± 23.2	0.010
DBP (mmHg)	81.1 ± 12.2	83.78 ± 11.9	0.104
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.45 ± 6.64	27.69 ± 4.07	0.758
Using statin	17 (13%)	10 (10.8%)	0.614
Using aspirin	27 (20.6%)	21 (22.6%)	0.723
Using diabetic oral agents	75 (57.2%)	57 (61.3%)	0.545
Using insulin	61 (46.6%)	47 (50.5%)	0.558
Using inhibitors ACE (%)	28 (21%)	27 (29%)	0.189
Total cholesterol (mg/dl)	202.1 ± 38.8	212.3 ± 53.0	0.101
HDL cholesterol (mg/dl)	49.3 ± 11.9	47.3 ± 14.3	0.278
Triglycerides (mg/dl)	116 (25 - 1128)	156 (32 - 1508)	0.009

LDL cholesterol (mg/dl)	123.8 ± 33.1	125.1 ± 37.7	0.799
A1C test (%)	8.5 ± 1.8	8.7 ± 2.3	0.320
eGFR (ml/min per 1.73 m <sup>2</sup> )	86.7 ± 19.1	79 ± 26	0.011

---

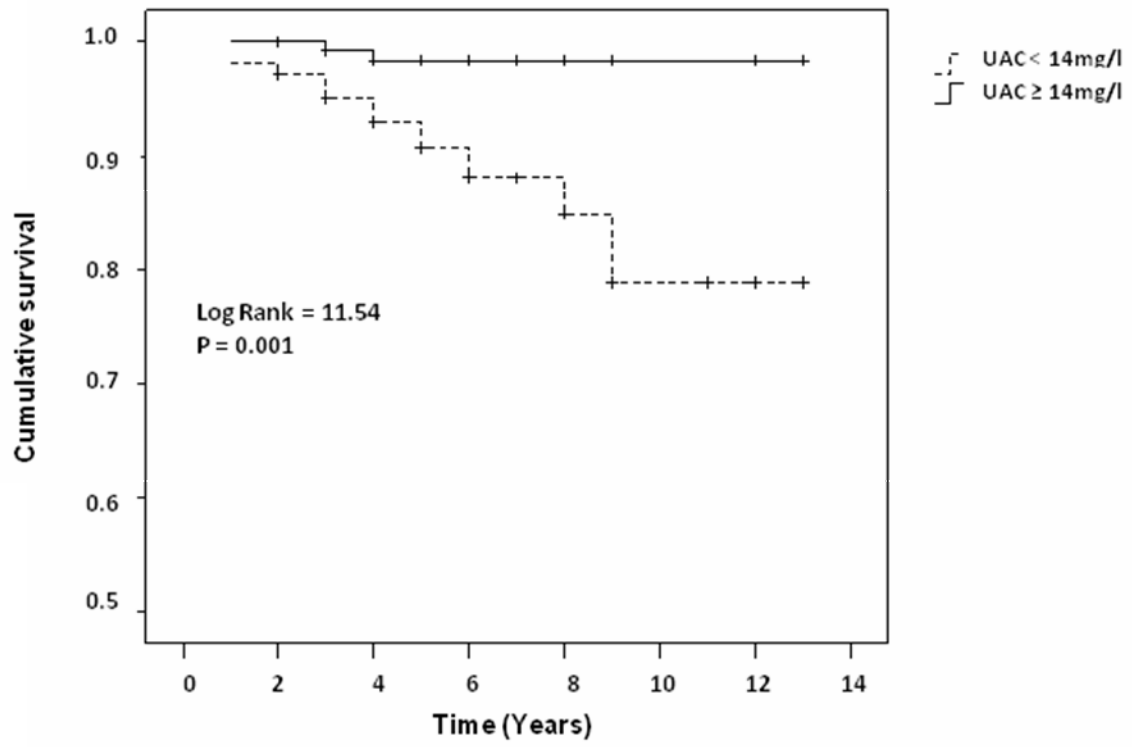
Data are means ± SD, median (minimum–maximum), or n (%). SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; BMI = Body Mass Index; ACE = angiotensin converting enzyme; eGFR = estimated glomerular filtration rate.



**Table 2 – Cox Proportion Hazard Analysis models: UAC  $\geq$ 14 mg/l and the relative risk for the presence of clinical diabetic nephropathy, renal failure, and cardiovascular events.**

	RR	95% CI	P
<b>Model 1</b>			
<b>Clinical Diabetic Nephropathy</b>			
UAC $\geq$ 14 mg/l	9.12	2.66-31.29	<0.001
Systolic blood pressure (mmHg)	1.00	0.98-1.02	0.772
A1C test (%)	1.03	0.85-1.24	0.777
eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	1.00	0.97-1.01	0.286
<b>Model 2</b>			
<b>Renal Failure</b>			
UAC $\geq$ 14 mg/l	3.36	1.76-6.42	<0.001
Systolic blood pressure	1.03	1.01-1.04	<0.001
A1C test	1.07	0.93-1.23	0.375
<b>Model 3</b>			
<b>Cardiovascular Events</b>			
UAC $\geq$ 14 mg/l	3.25	1.43-7.38	0.005
Systolic blood pressure	1.00	0.99-1.02	0.881
A1C test	1.03	0.87-1.16	0.966
eGFR	0.99	0.98-1.01	0.297
HDL Cholesterol	0.98	0.95-1.01	0.232
Previous cardiovascular event	1.01	0.46-5.20	0.985

UAC = urinary albumin concentration; eGFR = estimated glomerular filtration rate.



**Figure 1. Kaplan-Meier survival curve comparing diabetic patients with baseline UAC  $\geq 14$  mg/l or  $< 14$  mg/l.**