

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**NÍVEIS URINÁRIOS DE TGF- β ₁ EM PACIENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 2: IMPACTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL
SISTÊMICA**

VÂNIA FRACALOSSI

ORIENTADORA: PROF Dr^a HELENA SCHMID

CO-ORIENTADOR: PROF Dr MARCELLO CASACCIA BERTOLUCI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2004

F797n Fracalossi, Vânia

Níveis urinários de TGF- β_1 em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2: Impacto da Hipertensão Arterial Sistêmica. / Vânia Fracalossi ; orient. Helena Schmid ; co-orient. Marcello Casaccia Bertoluci. – 2004.

89 f.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2004.

1. Diabetes mellitus tipo II 2. Hipertensão 3. Fator de Crescimento Transformador beta : Urina I. Schmid, Helena II. Bertoluci, Marcello Casaccia III. Título.

NLM: WK 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

DEDICATÓRIA

À minha família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Helena Schmid, orientadora deste trabalho, pelo seu permanente estímulo e por ter aberto as portas para que este se iniciasse.

Ao professor Dr. Marcello Casaccia Bertoluci, co-orientador, por sua contribuição e orientação durante as dosagens.

Aos colegas Fúlvio, Deise e Janaína; às funcionárias do laboratório de pesquisa da FFFCMPA e ao bioquímico Fábio Ramos Oliveira do HCPA pela ajuda e suporte técnico na parte laboratorial.

À Vânia Naomi Hirakata e ao colega Walter Nisa Castro Neto pela contribuição na análise estatística.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo e acreditaram na sua importância.

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	6
<u>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	9
<u>2.1 Microalbuminúria e Nefropatia Diabética</u>	9
<u>2.1.1 Alterações estruturais do rim diabético</u>	9
<u>2.1.2 Alterações funcionais do rim diabético</u>	10
<u>2.1.3 Patogênese da Glomeruloesclerose Diabética</u>	11
<u>2.1.3.1 O Efeito da Glicose</u>	11
<u>2.1.4 Fatores Genéticos</u>	12
<u>2.1.5 História natural da nefropatia diabética</u>	12
<u>2.1.6 Tratamento da nefropatia diabética</u>	13
<u>2.1.6.1 Efeito do controle glicêmico</u>	14
<u>2.1.6.2 Controle da Pressão Arterial</u>	14
<u>2.2 TGFβ₁ e Lesão Renal: Evidências Obtidas em Estudos <i>In Vitro</i> e Animais de Experimentação Laboratorial</u>	15
<u>2.3 TGFβ₁ e Lesão Renal: Evidências em Humanos</u>	18
<u>3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	20
<u>4 OBJETIVOS</u>	25
<u>5 ARTICLE: URINARY LEVELS OF TGF-β₁ IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS: IMPACT OF SYSTEMIC HYPERTENSION</u>	26
<u>6 ARTIGO: NÍVEIS URINÁRIOS DE TGF-β₁ EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2: IMPACTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA</u>	55
<u>ANEXO</u>	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA - Associação Americana de Diabetes

AGEs - Advanced Glycation end Products

DCCT - *Diabetes Control and Complications Trial*

DM - Diabete Mellitus

DM1 - Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

FFFCMPA - Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

GLUT - transportadores de glicose

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IECA - Inibidor da enzima conversora da angiotensina

IGF-1 - *Insulin Growth Factor-1*

IRC - Insuficiência Renal Crônica

MEC - Matriz extra-celular

MIU - Microalbuminúria

ND - Nefropatia Diabética

OMS - Organização Mundial de Saúde

PA - Pressão arterial

TGF- β - *Transforming Growth Factor-Beta*

TNF α - *Tumor Necrosis Factor*

UKPDS - *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) acomete cerca de 7,6 % da população brasileira entre 30 e 69 anos de idade, classificando-se em tipo 1 e tipo 2 (maioria dos casos) de acordo com a etiologia. (1) (2) (3)

As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela mortalidade e morbidade relacionada ao Diabetes.(4)

A doença renal característica do DM, ou Nefropatia Diabética (ND), é uma síndrome clínica caracterizada por proteinúria acima de 500 mg/24h, hipertensão e insuficiência renal progressiva (5) (6) (7). Acomete cerca de 30 % dos diabéticos e é a principal causa de insuficiência renal dos pacientes que ingressam em programas de hemodiálise.

A mortalidade dos pacientes diabéticos em programas de hemodiálise é maior do que a dos não diabéticos; em estudo realizado em nosso estado a sobrevida mediana foi de 26 meses. (8)

A ND apresenta uma fase inicial, denominada de nefropatia incipiente (fase de microalbuminúria), e uma fase mais avançada, definida como nefropatia clínica (fase de macroalbuminúria).

Embora algumas estratégias terapêuticas possam ser empregadas para reverter as alterações encontradas na fase de microalbuminúria e retardar a evolução da fase de macroalbuminúria para a fase de Insuficiência Renal Crônica (IRC), estratégias que buscam a reversão destas alterações tardias nos pacientes que já as apresentam são ainda sem sucesso.(9)

Os mecanismos patogênicos da ND, especialmente aqueles que regulam o acúmulo de matriz extracelular (MEC), característica da glomeruloesclerose diabética, são alvo de muitos estudos, principalmente após o advento da biologia molecular, a qual permitiu que diversos peptídeos de sinalização intra-celular conhecidos como citocinas e seu papel, começassem a ser investigados e relacionados a diversos achados das patologias renais.

Alguns destes peptídeos como o TGF- β (TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA), o IGF -1 (INSULIN GROWTH FACTOR-1), o TNF α (TUMOR NECROSIS FACTOR), têm sido identificados em diversas patologias inflamatórias renais, onde participam mediando diferentes estímulos como a hipertrofia celular ou a formação de MEC, e este interesse tem se estendido à hipertrofia renal e à glomeruloesclerose diabética. (10) (11)

Entre as citocinas citadas, o peptídeo TGF- β é o de maior importância na patogênese da nefropatia diabética. Ele se apresenta nos mamíferos sob 3 isoformas: TGF- β_1 , β_2 e β_3 . O protótipo do grupo, no entanto, é o TGF β_1 o qual exerce papel fundamental no controle da resposta inflamatória, da cicatrização e da remodelação tecidual.(12)

Considerando os achados anteriores de envolvimento do TGF- β_1 na patogênese da nefropatia diabética (13) e os níveis de TGF- β_1 urinários aumentados em pacientes com nefropatia, achou-se necessário definir as relações do TGF β_1 urinário com a presença de descompensação metabólica, hipertensão arterial e progressão da doença renal. A proposta no

presente estudo foi avaliar os níveis urinários de $TGF\beta_1$ de pessoas normais e pacientes com Diabetes Mellitus e nos pacientes diabéticos buscar a possibilidade de associação dos níveis de $TGF\beta_1$ urinário, taxa de excreção urinária de albumina, presença ou não de diagnóstico de hipertensão arterial sistêmica e níveis pressóricos abaixo ou acima dos recomendados pela Associação Americana de Diabetes (ADA).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microalbuminúria e Nefropatia Diabética

2.1.1 Alterações estruturais do rim diabético

A alteração estrutural mais precoce observada no rim de pacientes diabéticos é o aumento da massa renal que surge às custas de hipertrofia glomerular e tubular.(14)

Outro achado bem conhecido é o surgimento de espessamento da membrana basal glomerular que ocorre principalmente às custas de um aumento da produção de colágeno tipo IV que se distribui por toda a espessura da membrana.(15) (16) (17) (18).

A alteração estrutural mais marcante na ND é a presença de um progressivo acúmulo de MEC, ao nível da região mesangial, que caracteriza a glomeruloesclerose diabética (16). Dela decorre uma redução gradual da superfície de filtração capilar e, conseqüentemente, uma perda progressiva de néfrons filtrantes, resultando em queda progressiva da taxa de filtração glomerular que culmina em IRC.(17) (19)

2.1.2 Alterações funcionais do rim diabético

A hiperfiltração glomerular é a alteração funcional renal mais precocemente observada no Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) e tende a persistir até a instalação da fase clínica da ND, quando passa a cair progressivamente (2) (3) (19). O aumento inicial da taxa de filtração varia de 27 a 40 %, especialmente em jovens com DM tipo 1 de início recente (20) (21). Nesta fase, uma redução da TFG para níveis normais pode ser obtida com a normalização do controle glicêmico ou com dieta hipoprotéica. (22) (23) (24) (25) (26)

O mecanismo de aumento da taxa de filtração glomerular decorre da maior redução da resistência arteriolar aferente em relação à arteríola eferente. A maior vasodilatação na arteríola aferente provoca um aumento do fluxo plasmático capilar glomerular e da pressão hidráulica transcapilar, com aumento da filtração. (26) (27) (28)

Existem vários fatores que podem aumentar a pressão hidráulica transglomerular: a hiperglicemia aguda por si só, a deficiência de insulina e o aumento da concentração das prostaglandinas vasodilatadoras. Nenhum destes fatores mostrou ser capaz, no entanto, de, isoladamente, produzir hiperfiltração glomerular no DM humano, o que sugere a participação de múltiplos fatores etiológicos. (11) (25) (29) (30)

Não existem diferenças marcantes descritas entre as alterações nefrológicas que acompanham a doença renal do paciente DM1 comparada a do DM tipo 2 (DM2), com exceção de que parece haver mais esclerose arteriolar em rins de pacientes com DM tipo 2 e com nefropatia. (2) (3) (31)

2.1.3 Patogênese da Glomeruloesclerose Diabética

A composição da MEC encontrada no mesângio durante a glomeruloesclerose diabética apresenta diferenças quali-quantitativas nos seus componentes em relação ao glomérulo normal. Estudos de imunohistoquímica em biópsias renais humanas de pacientes com ND mostram que as lesões escleróticas difusas apresentam um aumento do colágeno tipo IV, tipo V, fibronectina e concomitantemente uma redução do heparan-sulfato.(32)

O mecanismo de acúmulo da MEC é multifatorial e ainda não totalmente conhecido. Tanto um aumento na produção como uma redução da degradação, parecem operar simultaneamente em consequência às alterações hemodinâmicas e metabólicas que se instalam após o surgimento da hiperglicemia. (11)

Está bem estabelecido que o aumento da pressão capilar glomerular é um dos principais fatores na patogênese da glomeruloesclerose diabética. O mecanismo pelo qual o aumento de pressão glomerular induz à estimulação da produção de MEC não está bem definido. O aumento da tensão na parede glomerular poderia estimular a produção de MEC. (33)

A redução da pressão capilar glomerular para níveis normais, utilizando inibidores do sistema renina-angiotensina, comprovadamente, confere proteção para o surgimento da glomeruloesclerose, confirmando o efeito deletério do aumento da pressão glomerular.(34)

2.1.3.1 O Efeito da Glicose

Fatores metabólicos como o efeito direto da glicose e o da glicosilação não-enzimática estão implicados na patogênese da glomeruloesclerose diabética.

De maior importância é a participação de produtos de glicosilação não enzimática. A glicose, conhecidamente, liga-se a proteínas plasmáticas e teciduais dando origem à formação de compostos estáveis conhecidos como produtos de Amadori e produtos de glicosilação avançada (ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS - AGEs).

Os AGEs, dentro dos efeitos descritos, poderiam aumentar a síntese de MEC em nível glomerular e aumentar a síntese de fibronectina e do mRNA para o colágeno tipo IV. Um dos AGEs que deriva da reação de pentoses com proteínas é a pentosidina, um marcador de aceleração das modificações teciduais que é encontrado em pacientes diabéticos com complicações graves. Existe uma associação entre os níveis de pentosidina e nefropatia. (10)

A redução da degradação da MEC é outro mecanismo importante para o acúmulo no glomérulo. McLennan demonstrou que a MEC é degradada mais lentamente por células mesangiais quando cultivadas em ambiente altamente concentrado de glicose. (35)

2.1.4 Fatores Genéticos

A predisposição familiar para hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a doença cardiovascular, poderiam aumentar o risco para o surgimento de ND em alguns pacientes, mas a base genética para este risco ainda não foi totalmente definida. (36) (37)

2.1.5 História natural da nefropatia diabética

A primeira evidência clínica de nefropatia é o aparecimento de valores levemente elevados, mas anormais, de albumina na urina, (> 30 mg/d ou 20 µg/min), classificada como microalbuminúria (MIU). (38)

Sem nenhuma intervenção específica cerca de 80 % dos pacientes com DM1 e com MIU

sustentada têm sua excreção urinária de albumina aumentada a uma taxa de 10 a 20% ao ano até o estágio de nefropatia avançada ou albuminúria clínica ($>$ ou = 300 mg/24h ou \sim 200 μ g/min), num período estimado de 10 a 15 anos, com HAS também aparecendo ao longo deste período.

Quando estabelecida a nefropatia e sem nenhuma intervenção específica a TFG cai gradualmente durante muitos anos a uma taxa que tem uma variação individual grande (2 a 20 ml/min/ano).

Em 10 anos 50 % dos DM1 com nefropatia clínica estarão no estágio de Doença Renal Terminal e em 20 anos, cerca de 75 %.

Uma grande proporção dos pacientes com DM2 já possui microalbuminúria e até nefropatia clínica por ocasião, ou logo após o diagnóstico, por este ter sido tardio.

Sem tratamento adequado 20 a 40% dos pacientes DM2 com microalbuminúria progredem para nefropatia clínica. Dos pacientes com nefropatia clínica, no entanto, em 20 anos, só cerca de 20% terão progredido para o estágio de doença renal terminal.

Em adição, a mais precoce manifestação de nefropatia, a albuminúria, é um marcador de aumento considerável da morbi-mortalidade cardiovascular tanto para os pacientes DM1 quanto para os DM2. (38) (39)

2.1.6 Tratamento da nefropatia diabética

Apesar das evidências indicarem que a nefropatia não pode ser curada, existem dados persuasivos de que o curso clínico desta complicação pode ser modificado substancialmente através do controle metabólico, modificação do estilo de vida, normalização da pressão

arterial e com certas terapias farmacológicas (31). A seguir, abordar-se-á estas intervenções dentro dos itens: efeito do controle glicêmico e controle/terapia da HAS.

2.1.6.1 Efeito do controle glicêmico

A mais importante intervenção que influencia a progressão da nefropatia é a otimização do controle glicêmico. (31)

Existem evidências de que pacientes levemente microalbuminúricos, submetidos a melhor controle metabólico, têm redução dos valores de excreção urinária de albumina, enquanto que níveis mais elevados de albuminúria são refratários ao tratamento, indicando lesão estrutural glomerular.(40)

Os resultados do DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) e do UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) mostraram definitivamente que o controle metabólico intensivo, pode reduzir significativamente o risco de desenvolver microalbuminúria e posterior nefropatia em pacientes diabéticos.(41) (42)

O controle glicêmico recomendado para todos os pacientes com DM é o mais próximo possível dos valores normais. (31)

2.1.6.2 Controle da Pressão Arterial

Em estudos com pacientes diabéticos tipo 1 e 2, nos quais se procedeu ao tratamento precoce e intensivo, tendo como objetivo a normalização da pressão arterial (PA), demonstrou-se uma queda significativa na velocidade de perda da função renal.(43) (44) (45)

Outros estudos têm demonstrado que em pacientes DM1 hipertensos, os inibidores da

enzima conversora da angiotensina (IECA) podem reduzir os níveis de albuminúria e a taxa de progressão da doença renal, se comparados com outros agentes anti-hipertensivos com mesmo efeito sobre a diminuição da PA. (34) (46) (47)

Pela grande proporção de pacientes que progridem da MIU para a nefropatia clínica dentre os DM1, o uso de IECA para todos os pacientes com MIU, mesmo os normotensos, tem sido preconizado.(48)

O UKPDS comparou o tratamento anti-hipertensivo com IECA e com β -bloqueador em pacientes DM2. As duas drogas mostraram-se igualmente eficazes em diminuir a PA e não houve diferenças significativas na incidência de MIU ou proteinúria, sugerindo que a redução da PA é mais importante do que o tratamento utilizado. A baixa prevalência de nefropatia na população estudada, no entanto, tem colocado em dúvida a validade da observação do efeito protetor destas drogas na progressão da nefropatia em DM2.(49)

2.2 TGF β_1 e Lesão Renal: Evidências Obtidas em Estudos *In Vitro* e Animais de Experimentação Laboratorial

Nos tecidos, o equilíbrio é garantido por um complexo sistema em permanente interação entre as células e uma gama de proteínas secretadas conhecidas como MEC. Esta interação envolve numerosas citocinas que agem sobre receptores de superfície específicos. Quando este balanço entre células e MEC é perturbado o resultado é a doença. Este mecanismo está claramente evidente nas interações mediadas pela citocina TGF- β .(50)

O TGF- β está implicado na regulação da proliferação e diferenciação celular, desenvolvimento embrionário e angiogênese.

Cada isoforma do TGF- β é sintetizada como parte de uma grande molécula precursora que é clivada posteriormente por proteases. Quando o complexo precursor é secretado pelas células, no entanto, ele permanece ligado ao propeptídeo por pontes não-covalentes. Após ser secretado a maior parte fica depositado na MEC como um complexo propeptídeo+ TGF- β + TGF- β de ligação latente (um peptídeo menor originado dos fragmentos da clivagem do precursor associado a latência). A ligação do TGF- β com a porção latente por pontes de ligação disulfeto previne que ele se ligue ao receptor. O TGF- β pode ser ativado por clivagem deste complexo mediada pela plasmina ou pela glicoproteína trombospondium 1.

Três tipos de receptores específicos para o TGF- β já foram descritos: I, II e III. Tanto o TGF- β quanto seus receptores estão presentes em vários tipos celulares e sua ativação é, provavelmente, fator decisivo para a ação do TGF- β .

Em estados iniciais do DM ocorre aumento do estímulo para produção do TGF- β e do seu receptor tipo II, o que contribui para o desenvolvimento da hipertrofia glomerular. No diabetes mais avançado está claro que a estimulação para o aumento da produção do TGF- β é determinada pela hiperglicemia, glicosilação das proteínas, ativação da proteína quinase C, angiotensina II e via alça de auto-regulação positiva. (12) (50) (51) (52) (53)

A demonstração do aumento da albuminúria e níveis urinários de TGF- β_1 secundário ao aumento da expressão de transportadores de glicose - GLUT 1 em nível cortical, sugere a hipótese de que o aumento dos níveis de GLUT 1 ampliaria os efeitos hiperglicêmicos ao nível das células mesangiais.(54)

Vários grupos já demonstraram claramente que o TGF- β_1 está envolvido na indução de acúmulo de MEC, seja em culturas celulares, ou em modelos animais de nefropatia diabética.(55)

As especulações, então, se voltaram para os mecanismos através dos quais o TGF- β seria capaz de estimular o acúmulo de MEC. Dentre eles, está descrito um mecanismo de transdução de sinais mediado pelo TGF- β_1 , seus receptores e proteínas de transcrição conhecidas como Smad (1 a 10). Uma série de fosforilações intracelulares daria origem a um complexo Smad que, intranúcleo, interagiria com formas celulares específicas, como fatores de transcrição, regulando a transcrição de vários genes. Embora contestado como mecanismo capaz de estimular a produção de MEC, é aceito como mecanismo de estimulação celular pelo TGF- β . (53) (56) (57)

Outros estudos mais recentes tem implicado a proteína quinase A como capaz de mediar a estimulação do TGF- β ao colágeno tipo 1 e a fibronectina. (58)

Estudos *in vitro* e em animais mostram ocorrer um aumento dos níveis de mRNA-TGF- β_1 em glomérulos de ratos com Diabetes Mellitus induzido pela estreptozotocina (STZ), em fases que precedem o surgimento da nefropatia clínica. (59) (60)

Em estudo anterior este grupo de estudo demonstrou que, além do mRNA-TGF β_1 aumentar precocemente no glomérulo durante a evolução da nefropatia diabética experimental, também ocorre um aumento subsequente da deposição da proteína do TGF- β_1 e de colágeno tipo I ao nível do mesângio e das alças capilares glomerulares. Ficou evidente, ainda, que existe uma correlação positiva significativa entre a deposição glomerular do TGF- β_1 e a carga excretada de albumina. (13)

Sharma e Cols demonstraram que, além do mRNA-TGF- β_1 , o seu receptor específico tipo II também se encontra aumentado no córtex renal nas fases iniciais da nefropatia diabética experimental, e que a inibição da atividade do TGF- β (através da injeção de anticorpo monoclonal anti - TGF- β_1 , β_2 e β_3) foi capaz de atenuar a hipertrofia renal e glomerular. (61)

Em outro estudo, utilizando ratos Wistar injetados com STZ, avaliou-se o efeito do tratamento com insulina/melhora do controle glicêmico sobre a excreção urinária do TGF- β_1 . Observou-se que os níveis de TGF- β_1 e albuminúria, determinados pelo estado diabético, foram parcialmente revertidos pelo tratamento com insulina (63). Este dado e achados prévios referidos anteriormente de Sharma e Cols sugerem que hiperglicemia e/ou deficiência de insulina são necessárias a um aumento da produção do TGF- β_1 . (61)

Estes dados demonstram claramente que o TGF- β_1 participa na patogênese da nefropatia diabética em animais.

2.3 TGF β_1 e Lesão Renal: Evidências em Humanos

É provável que o TGF- β_1 também seja um importante mediador da glomeruloesclerose diabética humana. Biópsias renais de pacientes com nefropatia diabética apresentaram reação imunohistoquímica para TGF- β_1 em nível de glomérulo, bem como aumento do seu mRNA específico, indicando que o rim diabético está produzindo TGF- β_1 . (60)

Coimbra e Cols demonstraram que pacientes com DM2 e Nefropatia Diabética apresentam níveis urinários bastante elevados de TGF- β_1 os quais chegaram a ser, em média, 10 vezes maiores do que aqueles encontrados em pacientes sem nefropatia clínica além de se correlacionar nestes pacientes com a concentração urinária de albumina. (63)

Estes dados levantaram a hipótese de que o TGF- β_1 poderia estar sendo filtrado em maior quantidade a exemplo da albumina, ou poderia estar sendo produzido em maior quantidade pelo rim diabético. Em um estudo recente de Sharma e Cols, dosando TGF- β_1 no sangue obtido de artéria e veia renais de pacientes diabéticos tipo 2, que eram submetidos a cateterismo para investigação de cardiopatia isquêmica, foi demonstrado haver um aumento

real na produção renal de TGF- β_1 . (64)

Como as evidências indicam que o TGF- β_1 é produzido pelo rim diabético, a hipótese de que a sua medida na urina possa refletir a presença de glomeruloesclerose, deve ser considerada. Assim sendo, esta medida poderia ser útil como marcador de progressão da glomeruloesclerose diabética, possivelmente mais específico e precoce que a microalbuminúria, uma vez que esta última reflete primariamente anormalidades da membrana basal e não acúmulo de matriz extracelular glomerular.

3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- 1 Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes. Study of prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. *Diabetes Care* 1992;15:1509-16.
- 2 Williams Textbook of Diabetes. In: Pickup J, Williams G, Bennett P eds. *Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance*. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1991;1:37-44.
- 3 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22 (Suppl 1):S5-23.
- 4 Nathan DM, Meigs J. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet is....or is it? *Lancet* 1997;350 (suppl 1):4-9.
- 5 Wilson JL, Root HF, Marble A. Diabetic Nephropaty: a clinical syndrome. *N Engl J Med* 1951;245:513-17.
- 6 Gall M A, Skott P, Damsbo P, et al. The prevalence of micro and macro albuminuria, retinopathy, arterial hypertension and large vessel disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1988;31:492.
- 7 Gall MA, Skott P, Damsbo P, et al. Prevalence of micro and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European Type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1991;34(9):655-61.
- 8 Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* 2000;14(5):266-71.
- 9 Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabete melito. Consenso brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999;43:7-13.

- 10 Brownlee M, Cerami A. Advanced glycosilation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-21.
- 11 Bertoluci MC, Schmid H, Coimbra TM. Patogênese da nefropatia diabética: o papel das citocinas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1996; 40:156-66.
- 12 Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
- 13 Bertoluci M, Schmid H, Coimbra T, et al. Transforming growth factor-beta (TGF - β 1)in the development of rat diabetic nephropaty. A 10 Month study with insulin-treated rats. *Nephron* 1996;74:189-96.
- 14 Mongensen CE, Andersen MJ. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 1973; 22:706-12.
- 15 Osterby R. Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med Scand* 1975;574(suppl):1-80.
- 16 Osterby R, Gundersen H. Glomerular size and structure in Diabetes Mellitus. Late abnormalities. *Diabetologia* 1975;13:43-8.
- 17 Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, et al. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int* 1995; 48(6):1929-35.
- 18 Haneda M, Kikkawa R. Glucose enhances tipo IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia* 1991;34:198-200.
- 19 Hostetter TH. Diabetic Nephropathy. *The Kidney* 1991; v1 2, 1695-727.
- 20 Christiansen JS, Gammelgaard J, Parvin H. Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 1981;20:451-6.
- 21 Mongensen CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in normal and diabetic man during elevation of blood sugar levels. *Scand J Clin Invest* 1971;28:177-82.
- 22 Mongensen CE, Andersen M. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin-treatment. *Diabetologia* 1975;11:221-4.
- 23 Sandhal-Christiansen J, Frandsen M, Parvin H-H. The effect of intravenous insulin infusion on kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981;20:199-204.
- 24 Wiseman MJ, Saunders AJ, Vibert GC. Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1985;312:617-21.

- 25 Stackhouse S, Miller PL, Meyer TW. Reversal of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes* 1990;39:989-95.
- 26 Zatz R, Meyer TW, Rennke EHG. Predominance of haemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:5963-7.
- 27 Feldt-Rasmussen B, Mathiensen ER, Deckert T. Kidney function during 12 months of strict metabolic control in insulin-dependent diabetic patients with incipient nephropathy. *N Eng J Med* 1986;314:665-70.
- 28 Hostetter TH, Troy JL. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes. *Kidney Int* 1981;19: 410-5.
- 29 Bank N. Mechanisms of diabetic hyperfiltration. *Nephrology forum. Kidney Int* 1991;40:792-807.
- 30 Schambelan M, Blake S, Wahbe F. Increased prostaglandin production by glomerular isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1985;75:404-12.
- 31 Consensus statement - American Diabetes Association. Diagnosis and manegement of Nephropathy in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1996;19:S103-6.
- 32 Nerlich A, Schleicher E. Imunohistochemical localization of extra-cellular matrix components in human diabetic glomerular lesion. *Am J Pathol* 1991;139: 889-991991.
- 33 Leung DM, Mathews MB. Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth cells in vitro. *Science* 1976;191: 475-7.
- 34 Mathiesen ER, Hommel E, Parving H-H. Randomised controlled trial of long term efficacy of captopril on preservation of kidney function in normotensive patients with insulin dependent diabetes and microalbuminuria. *Br Med J* 1999;319:24-5.
- 35 McLennan SV, Fisher EJ, Yue DK, et al. High glucose concentration causes a decrease in mesangium degradation. *Diabetes* 1994;43:1041-5.
- 36 Viberti GC, Keen H, Wiseman M. Raised arterial pressure in parents of proteinuric insulin-dependent diabetics. *Br Med J* 1987;295:515-7.
- 37 Krolewski AS, Warran JH, Krolewski M, et al. Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1988; 318: 140-5.
- 38 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22(suppl 1): S66-9.
- 39 Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinúria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984;310:356-9.

- 40 Vibert GC, Pickup JC, Phil D, et al. Effect of control of blood glucose on urinary excretion of albumin and beta2-microglobulin in insulin dependent diabetes. *N Engl J Med* 1979;300:638-41.
- 41 The diabetes control and complications trial research group (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
- 42 UK Prospective Diabets Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
- 43 Parving H-H, Smidt UM, Andersen AR, et al. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet* 1983;1:1175-8.
- 44 Parving H-H, Hommel E, Hansen HP. Long-term beneficial effect of ACE inhibition on diabetic nephropathy in normotensive type 1 diabetic patients. *Kid Int* 2001;60:228-34.
- 45 Estacio RO, Jeffers BW, Gifford N, et al. Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(suppl 2):B54-64.
- 46 Viberti GC, Mogensen CE, Groop LC, et al. Effect of captopril on progression to clinical proteinuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *JAMA* 1994;271:275-9.
- 47 North American Microalbuminuria Study Group. The beneficial effect of angiotensin-converting enzyme inhibition with captopril on diabetic nephropathy in normotensive IDDM patients with microalbuminuria. *The American Journal of Medicine* 1995; 99:497-503.
- 48 American Diabetes Association: Hypertension management in adults with diabetes. (Position Statement). *Diabetes Care* 2004;27:S65-7.
- 49 UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS 39): Efficacy on atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* 1998;317:713-20.
- 50 Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Mechanisms of Disease: Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. *Massachusetts Medical Society* 2000;342:1350-8.
- 51 Sinha S, Nevett C, Shuttieworin CA, et al. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-(beta) binding proteins. *Matrix Biol* 1998;17:529-45.
- 52 Ebner R, Chen RH, Lawler S, et al. Determination of type I receptor specificity by type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 1987;262:900-5.
- 53 Sharma K, McGowan TA. TGF- β in diabetic kidney disease: roles of novel signaling pathways. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000; 11:115-23.

- 54 Schaan BD, Lacchini SM, Schmid H, et al. Increased Renal GLUT1 Abundance and Urinary TGF- β 1 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Implications for the Development of Nephropathy Complicating Diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33:664-9.
- 55 Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and Diabetic Kidney Disease: The Case for Transforming Growth Factor-beta as a Key Mediator. *Am J Diabetes Association* 1995;44:1139-46.
- 56 Wrana JL, Arrisano L, Wlleser R, et al. Mechanism of activation of the TGF- (beta) receptor. *Nature* 1994;370:341-7.
- 57 Nakao A, Imamura T, Soucheinyrskyi S, et al. TGF- (beta) receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J* 1997;16:5353-62.
- 58 Wang L, Zhu Y, Sharma K. Transforming growth factor b-1 stimulates protein kinase A in mesangial cells. *J Biol Chem* 1998;273:8522-7.
- 59 Nakamura T, Fukui M, Koide H, et al : RNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993; 42: 450-6.
- 60 Yamamoto T, Nakamura T, Noble N, et al. Expression of transforming growth factor- β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1814-8.
- 61 Sharma K, Jin Y, Ziyadeh FN et al. Neutralization of TGF- β by Anti-TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and enhanced extracelular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996;45:522-30.
- 62 Godinho JM, Fracalossi V, Schmid H, et al. Diminuição do TGF- β ₁ urinário e albuminúria em ratos com Diabetes induzido por Estreptozocina (STZ) em resposta ao tratamento com insulina. 25º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia 2002- PO 102: S404.
- 63 Coimbra TM, Rivarola EWR, Moyses-Neto M, et al. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropaty. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1525-8.
- 64 Sharma K, Ziyadeh FN, Weisberg LS, et al. Increased renal production of TGF- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997;46: 854-9.

4 OBJETIVOS

Determinar os níveis urinários de TGF- β 1 em pessoas saudáveis e pacientes com DM2 com diferentes níveis de albuminúria.

Buscar a possibilidade de associação entre níveis urinários de TGF- β 1, presença de diagnóstico de HAS, níveis pressóricos no momento das coletas de urina, glico-hemoglobina e albuminúria.

5 ARTICLE: URINARY LEVELS OF TGF- β_1 IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS: IMPACT OF SYSTEMIC HYPERTENSION

Urinary Levels of TGF- β_1 in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus: Impact of Systemic Hypertension

Fracalossi, V^{1,4}; Thomazelli, FCS^{1,4}; Bertoluci, MC^{1,3} and *Schmid, H^{1,2,3,4}

1. Graduate Program in Medicine: Medical Sciences/UFRGS
2. *Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas do Rio Grande do Sul*
3. *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*
4. *Complexo Hospitalar Santa Casa*

Mailing Address:

Helena Schmid. Rua Felipe Neri, 296/301 - Porto Alegre - Brazil
CEP 90440-150 - Telephone: 55-51-32284055 Facsimile 55-51-321488246
e-mail address: hschmid@ffccmpa.tche.br

Funding: FIPE/HCPA,FFFCMPA, CNPq

ABSTRACT

A controlled cross-sectional study was performed with 44 patients with type-2 Diabetes Mellitus (DM2) and 8 healthy controls in order to assess the urinary excretion of TGF- β_1 . Diabetic subjects were divided into groups according to the presence of urinary albumin excretion (UAE), previous diagnosis of systemic hypertension (SH) and blood pressure (BP) control on the date of collection of the urine for the tests. Results did not show any differences in HbA1c levels among diabetics in any of the subgroups. Greater urinary excretion of TGF- β_1 was found in diabetic patients with macroalbuminuria when compared with normal and microalbuminuric subjects ($p=0.031$) and those with a history of SH in relation to those without this diagnosis ($p<0.001$). There was no significant difference in urinary TGF- β_1 among the groups when patients were ranked according to blood pressure levels on the date of urine collection: urinary levels of TGF- β_1 in the group with controlled blood pressure were similar to the levels observed when the subjects had increased blood pressure. A correlation was found between urinary TGF- β_1 levels and SH diagnosis ($r=0.39;p=0.01$) and urinary albumin excretion (UAE) ($r=0.31;p=0.04$). In a stepwise linear regression model where age, plasma creatinine, and SH were included as independent variables and the TGF β_1 /Cr Log as a dependent variable, only the effect of the presence of SH was found to be significant ($p=0.012$). It has been concluded that the presence of SH is an important risk factor, independent of metabolic control, age, and plasma creatinine, for the presence of increased levels of urinary TGF- β_1 . Results also suggest that only the short-term control of blood pressure without the use of drugs that act specifically on the production or action of angiotensin would not be enough to reverse renal production of TGF- β_1 and its probable deleterious effect on the mesangium and the glomerular basement membrane.

INTRODUCTION

Diabetic glomerulosclerosis is a condition characterized by progressive renal deposition of extracellular matrix (ECM) on the glomerular and tubular interstitial mesangial areas (1) (2) (3). Many studies have pointed the Transforming Growth Factor beta 1 TGF- β_1 , a cytokine with potent extracellular matrix synthesis inducing action, as the main mediator of the deposition of subcomponents of the ECM, both in animal models with experimental renal disease and in patients with several types of nephropathy. TGF- β_1 acts both, by increasing the synthesis of type-IV collagen and fibronectin and by preventing their breakdown through the inhibition of their degradation enzymes, thus promoting the ECM accumulation. (4) (5) (6) (7) (8)

In a previous study performed by this group of researchers, it was found that the glomeruli in rats with streptozotocin (STZ) induced Diabetes Mellitus (DM), present with increased levels of mRNA-TGF- β_1 in the phases that precede the deposition of the TGF- β_1 protein and type-I collagen at the mesangial region, thus indicating that the onset of diabetic nephropathy (DN) is preceded by an increase in TGF- β_1 synthesis. This increase is positively correlated with the excreted albumin load, thus suggesting that TGF- β_1 continues to mediate diabetic nephropathy in its more advanced stages. (9)

Renal biopsies in patients with DN present greater immunocytochemical reaction to TGF- β_1 in the glomeruli, as well as increase in its specific mRNA, thus indicating that the diabetic kidney produces TGF- β_1 in abundance. (10) Confirming these findings, in a study where TGF- β_1 fractional excretion was measured from blood collected from renal arteries and veins and from urine in patients with DM2 who underwent cardiac catheterization it was found that the latter presented a significant increase in renal production of TGF- β_1 in relation to non-diabetic individuals. (11)

In the kidneys, TGF- β_1 synthesis is mediated by 3 factors: 1) angiotensin II binding to the membrane receptors that activate the protein kinase C (PKC) system; 2) glucose uptake with DAG (Diacyl Glycerol) increase and PKC activation; and 3) mechanical strain on the mesangial cells that activate as yet unknown pathways, promoting an increase in TGF- β transcription.

In diabetes, the blocking of angiotensin II binding to membrane receptors leads to a delay in kidney damage, thus suggesting that this mechanism contributes to an increased TGF- β_1 production. (12) (13)

In relation to glucose uptake with increased DAG levels and PKC activation in diabetes, a recent study by this group showed that streptozotocin-induced diabetic rats present a significant increase in urinary TGF- β_1 and albuminuria 45 days after onset of hyperglycemia. These changes are related to the increase in the glucose transporting protein (GLUT-1) at the renal cortex level, indicating that the renal cortex in diabetic rats enhances the effects of hyperglycemia by allowing an increase in intracellular glucose levels, which might be the mediating factor for the increase in TGF- β_1 synthesis in this experimental model (14). Additionally, it was found that in streptozotocin-induced diabetic rats, insulin administration reduced urinary levels of TGF- β_1 . (15)

Several “in vitro” studies have shown that there is an increase in glucose uptake, DAG increase and PKC activation in mesangial cells exposed to a medium containing high glucose concentrations as is the case “in vivo” in Diabetes. (16) (17)

“In vitro” studies have also shown that another factor that should play a role in stimulating and maintaining high TGF- β_1 levels in glomerular cells is the mechanical strain of mesangial cells (18) (19) (20). “In vivo”, in Diabetes, this increased strain results in glomerular hemodynamic changes for which an increase in blood pressure, particularly a sustained one, plays a significant role in the progression of renal disease. (21)

In Afro-American, non-diabetic SH subjects, TGF- β_1 has been considered an important mediator of target organ damage. (22)

On the other hand, in type-2 diabetes patients with SH and increased UAE, Houlihan and coworkers found that angiotensin receptor blockade with losartan for 4 weeks resulted in decreases in urinary levels of TGF- β_1 . (21)

Therefore, we hypothesized that in type 2 Diabetes, micro or macroalbuminuria and/or Systemic Hypertension could be related to increased urinary levels of TGF- β_1 . If this hypothesis would be confirmed, the measure of TGF- β_1 in urine could be a marker for the occurrence of glomerulosclerosis in Diabetes and its high levels could be decreased both by metabolic and blood pressure control.

Taking the aforementioned findings into account, it is assumed that the determination of urinary TGF- β_1 in Diabetes with different degrees of albuminuria and the presence or not of hypertension could have pathophysiological and treatment implications in understanding the progress of diabetic nephropathy, provided it is possible to determine that its excretion is related or not to renal disease, metabolic control, previous SH diagnosis or blood pressure levels at the time of the study.

OBJECTIVES

Determine urinary levels of TGF- β_1 in healthy individuals and in patients with DM2 with differing levels of albuminuria.

Try to find a possible link between urinary levels of TGF- β_1 , the presence of SH, blood pressure levels at the time of urine collections and albuminuria.

MATERIAL AND METHODS

A controlled, cross-sectional study was performed. The sample was consecutive and according to the convenience of the patients who went to the outpatient units of the above-mentioned institutions (HCPA and Santa Casa) from January to December 2001 (until enough diabetic patients with differing degrees of albumin urinary excretion were included for the investigation proposed according to previous findings) (23). A total of 52 individuals were selected to participate in the study, 44 patients with DM2 and 8 individuals without diabetes or hypertension.

Inclusion Criteria

Male and female subjects aged 30 to 75 years with a diagnosis of DM2 were included in the study. (24)(25)

Parents and other family members of children that went to the outpatient units of the hospitals involved were included as control subjects. These male and females subjects, aged 30-75 years, presented no family history or previous diagnosis of DM, with occasional capillary blood glucose test lower than 100 mg/dl and absence of DM signs and symptoms; no previous history of other chronic diseases and an average of 2 blood pressure (BP) measurements below 140x90 mmHg.

Exclusion Criteria

Individuals with BMI above 40 Kg/m², pregnant women, with history of liver disease, previous diagnosis of hemoglobinopathy, renal replacement treatment (hemodialysis or renal transplantation), history of repeated urinary infections or class III or IV heart failure were excluded from the study. (26)

Study Protocol

All patients who accepted to be part of the study signed individual informed consents in the first visit. The ethics committees of Santa Casa and Hospital de Clínicas de Porto Alegre approved the protocol.

The diabetic patients selected came for a new visit under fasting conditions for glucose, HbA1c, lipid profile and serum creatinine test collections. They were advised to bring with them urine collected in the previous 24 hours for albuminuria measurement, qualitative urine test sampling and urine culture; during the visit, urine was collected for urinary creatinine and TGF- β_1 measurement.

Diagnostic criteria for SH and the BP measurement standards used were the ones recommended by the VI JOINT. (27)

Blood pressure of all participants was measured in the collection day after 5 minutes rest, in sitting position, on the right arm (which was at the level of the right atrium), with a

mercury sphygmomanometer. The first Korotkoff sound was considered as the systolic BP and the time it disappeared as the diastolic BP. Sequence measurements with a 2 minutes interval were made until stabilization (difference smaller than 5 mmHg between 2 measurements) with the average of 2 measurements being taken into account.

Laboratory Analyses

TGF- β_1 was measured in urine samples by the ELISA test (R&D Systems, Abingdon, UK) following the manufacturer's instructions. Urine samples were kept under refrigeration and centrifuged at 10,000 rpm for 30 minutes at 4°C. The supernatant was suctioned off and kept at -80°C. In the analysis day, urine samples (0.5 ml) were subjected to acidification to a pH of 2-3 with HCl 1N for 30 minutes, followed by neutralization to pH 7-8 with the same amount of NaOH 1N for the activation of the latent TGF- β_1 .

The detection threshold of the assay is from 31.2 to 2,000 pg/ml and urine samples did not have to be concentrated because all measures obtained were above the detection threshold of the method. In order to correct urine concentration variations, TGF- β_1 results were expressed in pg/mg of urinary creatinine of the same sample.

Serum and urinary creatinine was measured by Jaffé's method, albuminuria by immunoturbidimetry and proteinuria by the colorimetric method with Pyrogallol red.

Glucose was measured by Glico-DH and HbA_{1c} by HPLC (reference value up to 6.3%).

Total cholesterol was measured by CHOD-PAP, the HDL cholesterol fraction by the direct method by selective inhibition and for the calculation of the LDL cholesterol fraction, the Friedwald equation calculation was used. The measurement of triglycerides was made by the GOD-PAP method.

Statistical Analysis

An Excel (1998) database was created (1998). The program used for the analysis was SPSS for Windows version 10.0.

First, the descriptive analysis for all variables in the database was made. Using averages and standard deviations and the calculation of absolute and relative frequencies, a comparison was made of the groups in relation to quantitative variables using Student's t Test and for the categorical variables, Fisher's Exact Test was used.

Logarithmic transformations were made in the TGF- β_1 and UAE variables due to the known asymmetry of distribution for these variables. The correlation between themselves and the other variables was calculated by Pearson's Correlation Coefficient.

For the comparison of the Hypertensive and Normotensive subgroups and High BP and recommended BP, Student's t Test was used.

In order to make comparisons between the subgroups of patients, when classified as DMnormo, DMmicro and DMmacro, the variance analysis test (ANOVA with Bonferroni

correction) was used, followed by the minimal significant differences test (DMS) for multiple comparisons.

The stepwise regression analysis was made to check which variables would be independently linked to the outcome (TGF- β_1 /Cr).

Significance level considered was $p < 0.05$.

RESULTS

Influenced by selection criteria, diabetic patients differed from controls in relation to blood glucose ($p=0.003$), systolic blood pressure ($p=0.045$) and average blood pressure ($p=0.011$) (Table 1).

The first goal set in the study was to find if patients with DM presented increased TGF- β_1 levels in relation to non-diabetic, apparently normal controls. No statistically significant difference ($p=0.070$) was shown between the Log of the corrected TGF- β_1 urinary excretion (TGF- β_1 /Cr) of the diabetic patients group and the control group (Table 1).

In order to establish new evidences for future investigations, we tried to make correlations between the Log of urinary excretion of TGF- β_1 /Cr and the other characteristics of diabetic patients (Table 2).

One significant positive correlation was found between the Log of urinary excretion of TGF- β_1 /Cr and the UAE Log ($r=0.31$, $p=0.04$) (Figure 1) and previous SH diagnosis ($r=0.39$, $p=0.01$) (Figure 2a).

After confirming the existence of a correlation between the TGF- β_1 /Cr Log and the UAE Log and following the goal previously set in the study, namely to determine whether diabetic patients presented different levels of urinary excretion of TGF- β_1 , the diabetic patients group was divided according to the UAE levels into Normoalbuminuric (DMnormo) Diabetics, Microalbuminuric Diabetics (DMmicro) and Macroalbuminuric Diabetics (DMmacro). (28)

Table 3 shows that: the presence of hypertension and increase in serum creatinine levels was different between the groups ($p=0.01$ and 0.001 , respectively), corresponding to increasing albumin excretion rates; blood glucose tended to be statistically different ($p=0.051$) when the 3 subgroups were taken into account and, when compared on an individual basis, average blood glucose was greater in the DMmacro subgroup ($196\text{mg/dl}\pm 65$) in relation to the DMnormo ($155\text{mg/dl}\pm 28$; $p=0.049$) and the DMmicro ($147\text{mg/dl}\pm 62$; $p=0.022$) subgroups; no difference was found among the subgroups in the glucohemoglobine measure ($p=0.182$); triglycerides level was also different ($p=0.003$) when the 3 subgroups were compared, being also greater in the DMmacro ($292\pm 207\text{mg/dl}$) subgroup when compared with the DMnormo ($133\text{mg/dl}\pm 57$) and DMmicro ($124\text{mg/dl}\pm 63$) subgroups with equal significance level ($p=0.003$) (Table 3).

Systolic blood pressure (Table 3) was significantly different among the diabetic patients subgroups ($p=0.005$): it was 11 mmHg higher in the DMmacro subgroup in relation to the DMmicro subgroup and 29 mmHg higher in relation to the DMnormo subgroup. Average blood pressure was also different among the 3 subgroups ($p=0.018$).

The percentage of patients who used anti-hypertensive drugs in general and ACEI specifically was different among the subgroups ($p=0.001$ for both factors), being markedly higher in the DMmicro (73%, with 60% ACEI) and DMmacro (100%, with 92% ACEI) subgroups.

As expected, according to patient selection, the levels of urinary excretion of albumin were statistically different among all subgroups ($p<0.001$) (Figure 3).

Following the classification of the subgroups, the averages of the UAE Log were

progressively higher, being 0.9 ± 0.3 in the DMnormo subgroup, 1.9 ± 0.4 in the DMmicro subgroup and 3.1 ± 0.4 in the DMmacro subgroup.

When all subgroups were compared according to the Log of urinary excretion of TGF- $\beta 1$ /Cr, a trend towards difference was found ($p=0.053$). When subgroups were compared one to one, however, a higher average was found for the patients in the DMmacro (1.8 ± 0.4) subgroup when compared with the averages of the DMnormo (1.5 ± 0.2 , $p=0.023$) and DMmicro (1.6 ± 0.2 , $p=0.050$) subgroups. This difference was also found when patients from the DMmacro subgroup were compared with the patients from the DMnormo and DMmicro subgroups together ($p=0.031$).

Additionally, considering the existence of a correlation between previous SH diagnosis and the TGF- $\beta 1$ /Cr Log, an assessment was made of the results of the division of diabetic patients into Hypertensive and Normotensive (27) and according to the level of BP (blood pressure) control recommended by the ADA on collection date. (29)

Hypertensive diabetic patients presented a higher age average than Normotensive patients ($p=0.019$) and higher serum creatinine levels ($p=0.042$) (Table 4).

Metabolic control did not show a significant difference in any aspect when a comparison between Normotensive and Hypertensive diabetic patients was made.

Systolic blood pressure levels on the date of urine collection were lower in the Normotensive subgroup ($122\text{mmHg}\pm 10$) in relation to the Hypertensive subgroup ($149\text{mmHg}\pm 26$, $p<0.001$), the same applying to diastolic blood pressure and average blood pressure, respectively $p=0.001$ and $p<0.001$.

In the subgroup of Normotensive diabetic patients, 4 patients were on ACEI.

The UAE level found through its Log was 83% higher among Hypertensive patients (2.2 ± 0.9) when compared with Normotensive patients (1.2 ± 0.5 , $p<0.001$) (Figure 5).

The division of diabetic patients according to Previous Hypertension Diagnosis showed that urinary excretion of TGF- $\beta 1$ was higher in Hypertensive patients (1.7 ± 0.3) than in the Normotensive patients (1.4 ± 0.1 , $p=0.008$) (Figure 6).

Considering the previously described differences, according to the SH diagnosis among diabetic patients, it seemed important to assess the effect of blood pressure control as recommended by the ADA: 36% patients had BP levels $<130\times 80$ mmHg (Recommended BP) and 64% patients had BP values = 130×80 mmHg (High BP) on collection date. (29)

No significant differences were found among general and metabolic characteristics of the two subgroups.

Systolic blood pressure levels were significantly lower in the subgroup with Recommended BP ($119\text{mmHg}\pm 7$) in relation to the subgroup with High BP ($151\text{mmHg}\pm 24$, $p<0.001$), the same applying to diastolic blood pressure ($73\text{mmHg}\pm 5$ and $89\text{mmHg}\pm 7$) and average blood pressure ($89\text{mmHg}\pm 4$ and $110\text{mmHg}\pm 10$) respectively, with the same significance level ($p<0.001$).

In relation to the use of anti-hypertensive drugs in general, it was greater in the subgroup with High BP ($p=0.017$). The use of ACEI was also greater in patients from the High BP

subgroup ($p=0.013$) when compared to the subgroup with Recommended BP.

The UAE level (1.6 ± 0.8 and 2 ± 1) and the urinary excretion of TGF- β_1 /Cr (1.5 ± 0.2 and 1.7 ± 0.3), (Figure 2.b), respectively for the subgroup with Recommended BP and High BP did not show any statistical significance.

In a stepwise linear regression model, which included SH diagnosis, age and creatinine levels as independent variables and the TGF β_1 /Cr log as the dependent variable, only the effect of the SH presence was found to be significant (SE=0.10; beta=0.42; IC (95%)=0.06 to 0.48; $p= 0.012$). The presence of hypertension was also a risk factor for presence of increased levels of TGF β_1 /Cr log even when the other independent variables were excluded ($p =0.008$).

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

In this study, in type 2 Diabetes Mellitus subjects, it was found that: 1) the finding of clinically established nephropathy (macroalbuminuria) was related to higher urinary TGF- β_1 levels when compared to normo and microalbuminuria; 2) there was a positive correlation between urinary TGF- β_1 and levels of urinary excretion of albumin; 3) patients with previous SH diagnosis presented higher urinary concentrations of TGF- β_1 in relation to non-hypertensive diabetic patients; 4) controlled or uncontrolled blood pressure levels (29) in diabetic subjects do not determine significant differences in urinary TGF- β_1 levels, at least in the short-term; 5) the presence of a diagnosis of hypertension determined increased urinary concentration of TGF- β_1 , that was not related to the levels of HbA1c and blood pressure measured on the date of the evaluation of the urinary parameters; 6) on a multiple linear regression model analysis it was found that the presence of a previous diagnosis of hypertension determined an increase in the urinary concentration of TGF- β_1 , independently of age and plasma creatinine levels.

The results showing higher urinary levels of TGF- β_1 in diabetics with macroalbuminuria in the present study are in agreement with recent studies in which similar results were described. (23)(30)(31)(32)

In a previous study performed by this group of researchers, it was found that the rats with streptozotocin (STZ) induced Diabetes Mellitus (DM), presented increased levels of UAE, which was related to immunocytochemical reaction for TGF- β_1 the glomerular level and deposition of total and type I collagen (9). Increased levels of urinary TGF- β_1 were also related to the increased abundance of cortical kidney GLUT1 and glycosuria, with partial reversion of results when the animals were treated with insulin. (14) (33)

Some studies in experimental models of diabetic nephropathy have also shown that TGF- β_1 is closely linked to ECM deposition at the glomerular level and that there is an increase in TGF- β_1 mRNA in the glomeruli a few weeks after onset of hyperglycemia (34), thus indicating that the onset of diabetic nephropathy (DN) is preceded by an increase in TGF- β_1 synthesis. This increase is positively correlated with the excreted albumin load, thus suggesting that TGF- β_1 continues to mediate diabetic nephropathy in its more advanced stages. (9)

These earlier observations of our group and also of others, which were results of studies performed in the STZ-induced rat model (which does not have blood pressure increase), showed that the metabolic control with insulin use, produced a TGF- β_1 decrease (15). It is also possible to speculate that the presence of hyperglycemia is deleterious for the diabetic kidney, at least in animals. Since these results indicate that both, hyperglycemia and probably, the secondary increase of glucose in the intracellular milieu, are important mechanisms, which determine an increase in renal production of TGF- β_1 , the effect in humans of the metabolic control should be better explored. In the present study it is impossible to make considerations about the impact of variations of the glycated hemoglobin upon urinary levels of TGF- β_1 , as it was done for the blood pressure effect, since the study was not designed for its evaluation, what is in accordance with a lack of association between the HbA1c and urinary TGF- β_1 in a regression analyses. On the other hand, a study by Houlihan and coworkers (21) showed that the impact of a blood pressure increase was greater than the impact of the hyperglycemia upon the urinary TGF- β_1 . It is also very important to take into account the fact that in patients with clinical nephropathy, blood pressure control is effective in decreasing the renal function decrease while the glycemetic control is not. (35)

In the present study, however, as glycated hemoglobin levels did not vary among diabetic patients, for any of the subgroups, we have had the opportunity to observe the effect on urinary TGF- β_1 , both of the presence of SH and of blood pressure levels at the time of urine collection, independent of variations in glycated hemoglobin. Since under these conditions a clear correlation was found between increased levels of urinary TGF- β_1 and the presence of previous SH diagnosis, but not between the former and blood pressure levels at the time of collection, it could be inferred that the decrease in blood pressure itself might not be enough to decrease urinary levels of TGF- β_1 . The observed effect of having increased blood pressure should be stressed since in a stepwise linear regression model, presence of a hypertension diagnosis, independent of age and plasma creatinine levels, was a risk factor for having a urinary TGF- β_1 increase. Acute variations in blood pressure levels probably have not the same impact.

Evaluating studies in patients with SH in the absence of Diabetes, one study with African Americans with SH and target organ damage is worthy of mention: high serum levels of TGF- β_1 were found in association with hyperexpression of its mRNA (22). A study published in 2002, also with patients with SH confirmed these findings (36). In none of them, however, a link between systolic and diastolic blood pressure levels and TGF- β_1 production was described. These results are in accordance with our findings in the present study.

In diabetic subjects, on the other hand, the study by Houlihan and coworkers showed that urinary TGF- β_1 in patients with albuminuria and DM2 decreased when the angiotensin-II receptor was blocked for 4 weeks with a secondary systolic blood pressure decrease (21). In patients assessed in this same study, HbA1c levels varied to the point that a correlation was also found between HbA1c baseline levels and urinary excretion of TGF- β_1 . It was assumed that variations in metabolic control in diabetic individuals should influence urinary levels of TGF- β_1 , as has been shown in animal models. (15)

Additionally, considering the findings by Houlihan and coworkers, it could be inferred that an effect of the blood pressure decrease could only be noticed when blood pressure control is kept 24 hours or, at least, for 4 weeks, or when agents that act specifically on angiotensin production or its action are used. (21)

The findings of a significant correlation between urinary levels of TGF- β_1 and previous SH diagnosis in type 2 Diabetes is an original observation that can also be explained at the light of previous studies.

The effect of the increase in blood pressure leading to glomerulosclerosis in diabetics has not been fully explained, but it seems to be mediated, at least in part, by TGF- β_1 , since hemodynamic forces on the endothelial wall of the capillaries, mechanical strain on mesangial cells or the presence of angiotensin-II could be competing in the promotion of increased levels of TGF- β_1 synthesis.

In the study that assessed the effect of the angiotensin receptor blocker (losartan) on the urinary excretion of TGF- β_1 , a decrease in renal production of TGF- β_1 was shown, thus suggesting that this reduction contributes to the renal protective effect of this class of drugs. (21)

The present study does not allow to conclude to what extent the high levels of TGF- β_1 found in patients with diabetic nephropathy could be predictive of progression to macroalbuminuria and loss of renal function. On the other hand, data suggest that an increase

in urinary TGF- β_1 only occurs when there is sustained systemic hypertension, which could enable the occurrence of glomerular mechanical strain. It is speculated that patients with progressively higher levels of TGF- β_1 could have an increased risk of progression of their glomerulosclerosis. This finding could represent the effect, in the medium term, of sustained high blood pressure on the glomeruli, corresponding to a biochemical marker for the presence of glomerular strain. Longitudinal studies are required to assess this possibility.

FUNDING SOURCES

This project was developed in the research laboratories of *Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas* and *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*. Support was requested to FFCMPA and FIPE/HCPA for the purchase of consumption material and to CNPq for supporting technical assistance.

REFERENCES

- 1 Osterby R. Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med Scand* 1975;574(suppl):1-80.
- 2 Osterby R, Gundersen H. Glomerular size and structure in Diabetes Mellitus. Late abnormalities. *Diabetologia* 1975;13:43-8.
- 3 Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, et al. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int* 1995; 48(6):1929-35.
- 4 Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
- 5 Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Mechanisms of Disease: Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. Massachusetts Medical Society 2000;342:1350-8.
- 6 Sinha S, Nevett C, Shuttieworin CA, et al. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-(beta) binding proteins. *Matrix Biol* 1998;17:529-45.
- 7 Ebner R, Chen RH, Lawler S, et al. Determination of type I receptor specificity by type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 1987;262:900-5.
- 8 Sharma K, McGowan TA. TGF- β in diabetic kidney disease: roles of novel signaling pathways. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000; 11:115-
- 9 Bertolucci M, Schmid H, Coimbra T, et al. Transforming growth factor-beta (TGF- β 1) in the development of rat diabetic nephropathy. A 10 Month study with insulin-treated rats. *Nephron* 1996;74:189-96.
- 10 Yamamoto T, Nakamura T, Noble N, et al. Expression of transforming growth factor- β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1814-8.
- 11 Sharma K, Ziyadeh FN, Weisberg LS, et al. Increased renal production of TGF- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997;46: 854-9.
- 12 González-Albarrán O, Gómez O, García-Robles R, et al. Role of systolic blood pressure on the progression of kidney damage in an experimental model of type 2 Diabetes Mellitus, obesity, and hypertension (zucker rats). *Am J Hypertens* 2003;16:979-985.
- 13 Wolf G. Link between angiotensin II and TGF- β in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:174-80.
- 14 Schaan BD, Lacchini SM, Schmid H, et al. Increased Renal GLUT1 Abundance and Urinary TGF- β 1 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Implications for the Development of Nephropathy Complicating Diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33:664-9.

- 15 Godinho JM, Fracalossi V, Schmid H, et al. Diminuição do TGF- β_1 urinário e albuminúria em ratos com Diabetes induzido por Estreptozocina (STZ) em resposta ao tratamento com insulina. 25º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia 2002- PO 102: S404.
- 16 Heilig CW, Liu Y, England RL, et al. D-glucose stimulates mesangial cell glut1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells. *Diabetes* 1997;46:1030-39.
- 17 Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, et al. High glucose causes an increased in extracellular matrix proteins in culture mesangial cells. *Am J Pathol* 1990;136:1339-48.
- 18 Riser BL, Ladson-Wofford S, Narins RG, et al. TGF- β receptor expression and binding in rat mesangial cells: Modulation by glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney Int* 1999;56:428-439.
- 19 Riser BL, Cortes P, Narins RG, et al. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor - β isoforms in culture rat mesangial cells. *Am J Pathol* 1996;148:1915-23.
- 20 Riser BL, Cortes P, Narins RG. Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J Clin Invest* 1992;90:1932-43.
- 21 Houlihan CA, Akdeniz A, Gilbert RE, et al. Urinary transforming growth factor β excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate. *Diabetes Care* 2002;25:1072-77.
- 22 Suthanthiran M, Li B, August P, et al. Transforming growth factor β_1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of Hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3479-84.
- 23 Coimbra TM, Rivarola EWR, Moyses-Neto M, et al. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1525-8.
- 24 Williams Textbook of Diabetes. In: Pickup J, Williams G, Bennett P eds. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1991;1:37-44.
- 25 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22 (Suppl 1):S5-23.
- 26 Bruce, RA. Evaluation of functional capacity and exercise tolerance of cardiac patients. *Mod. Concepts Cardiovasc Dis* 1956;25(4):321-6.
- 27 The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413-46.
- 28 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22(suppl 1): S66-9.

- 29 Hypertension Management in Adults With Diabetes. Position Statements-American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2004;27:S65-7.
- 30 Bertoluci MC, Schaan BD, Schmid H. Increased urinary TGF- β 1 in type 2 diabetic patients with Diabetic nephropathy. *Diabetes* 1998;Suppl I: A 129.
- 31 Bertoluci MC, Schaan BD, Schmid H, et al. Níveis elevados de TGF- β 1 urinário em pacientes com DM2 e nefropatia diabética comparativamente a nefropatias não diabéticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 1999; 43(Suppl I):S187
- 32 Sato H, Iwano M, Akai Y, et al. Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 1998;18:490-94.
- 33 Schmid H, Godinho JM, Bertoluci MC, et al. Decrease in urinary transforming growth factor β 1 after insulin treatment in rats with streptozotocin induced Diabetes. *Diabetes* 2004;53 (suppl I).
- 34 Iwano M, Kubo A, Dohi K, et al. Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996;49:1120-26.
- 35 Tanaka Y, Atsumi Y, Kawamori R, et al. Role of glycemic control and blood pressure in the development and progression of nephropathy in elderly Japanese NIDDM patients. *Diabetes Care* 1998;21:116-20.
- 36 Derhaschnig U, Shehata M, Hirschl MM. Increased levels of transforming growth factor-beta1 in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15(3):207-11.

Table 1: General characteristics, blood glucose, blood pressure and TGF- β_1 /Cr in the diabetic and control individuals studies. Results correspond to the average \pm average standard deviation. For the gender variable, the in-group percentage is shown.

Characteristics	Diabetics	Controls	p
	n=44	n=8	
Age (years)	56 \pm 9	64 \pm 6	NS
Male (%)	52	50	NS
BMI (kg/m ²)	30 \pm 5	26 \pm 3	NS
Blood Glucose (mg/dl)	164 \pm 56	90 \pm 8	0.003
Systolic BP (mmHg)	139 \pm 25	131 \pm 10	0.045
Diastolic BP (mmHg)	84 \pm 10	80 \pm 6	NS
Average BP (mmHg)	102 \pm 13	97 \pm 4	0.011
TGF β /Cr Log (pg/mg)	1.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.1	NS

Table 2: Pearson's simple linear correlation test (*r*) between the TGF- β_1 /Cr Log and several variables.

TGF-β_1/Cr Log	<i>r</i>	<i>p</i>
Age (years)	0.16	NS
BMI (kg/m ²)	0.28	NS
Blood glucose (mg/dl)	0.20	NS
HbA1c (%)	0.07	NS
Total cholesterol (mg/dl)	-0.21	NS
HDL (mg/dl)	0.05	NS
LDL (mg/dl)	-0.12	NS
Triglycerides (mg/dl)	0.09	NS
Serum Creatinine (mg/dl)	0.03	NS
Previous SH	0.39	0.01
Systolic BP (mmHg)	0.09	NS
Diastolic BP (mmHg)	0.07	NS
Previous use of anti-hypertensive drugs	0.21	NS
Previous use of ACEI	0.19	NS
UAE Log (mg/24h)	0.31	0.04

Table 3: General characteristics, metabolic profile, BP levels, UAE and urinary TGF- β_1 in the diabetic patients studied according to the level of urinary excretion of albumin. Results correspond to the average \pm average standard deviation. For the gender and SH variables, in-group percentage is shown.

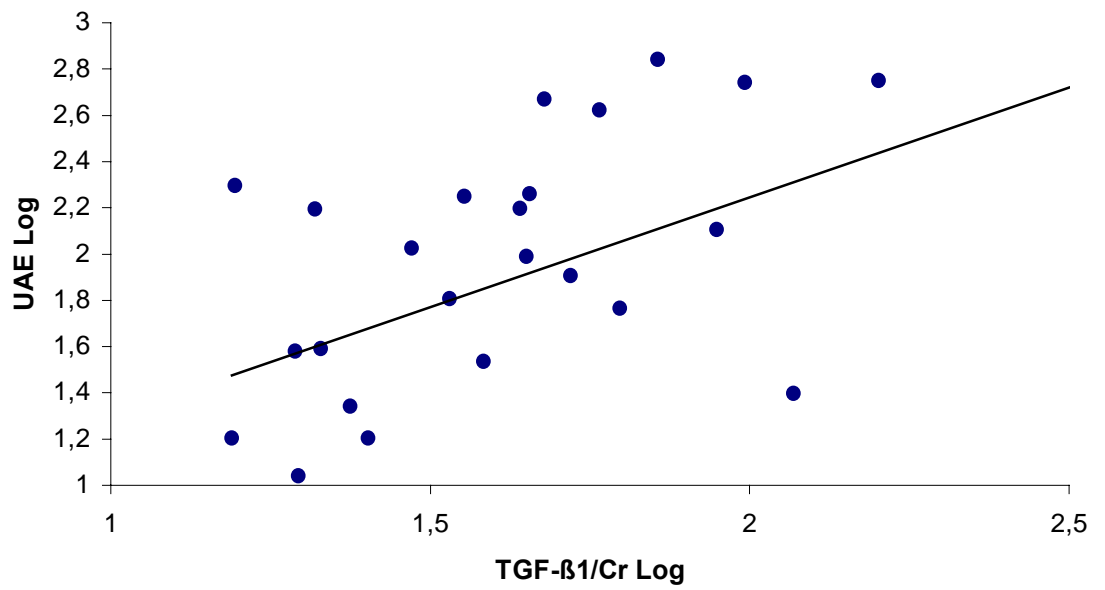
Characteristics	DMnormo n=16	DMmicro n=15	DMmacro n=13	p
Age (years)	53 \pm 9	58 \pm 8	57 \pm 9	NS
Male (%)	31	67	61	NS
BMI (kg/m ²)	29 \pm 4	30 \pm 4	29 \pm 6	NS
Patients with SH (%)	37	67 *	100 ‡	0.001
Serum Creatinine (mg/dl)	0.9 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2	1.3 \pm 0.3 †‡	<0.001
Blood Glucose (mg/dl)	155 \pm 28	147 \pm 62	196 \pm 65 †‡	NS
HbA1c (%)	8.0 \pm 2	7.3 \pm 1	8.5 \pm 2	NS
Total Cholesterol (mg/dl)	224 \pm 52	208 \pm 49	247 \pm 58	NS
HDL (mg/dl)	45 \pm 12	44 \pm 7	44 \pm 11	NS
LDL (mg/dl)	151 \pm 48	133 \pm 38	152 \pm 61	NS
Triglycerides (mg/dl)	133 \pm 57	124 \pm 63	292 \pm 207 †‡	0.003
Systolic BP (mmHg)	125 \pm 9	143 \pm 27 *	154 \pm 29 ‡	0.005
Diastolic BP (mmHG)	80 \pm 8	85 \pm 10	86 \pm 11	NS
Log UAE	0.9 \pm 0.3	1.9 \pm 0.4 *	3.1 \pm 0.4 †‡	<0.001
Log TGF- β_1 /Cr	1.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2	1.8 \pm 0.4 †‡£	0.053

* p< 0,05 vs DMnormo; † p < 0,05 vs DMmicro; ‡ p< 0,05 vs DMnormo;

£ p=0,031vsDMnormo+DMmicro

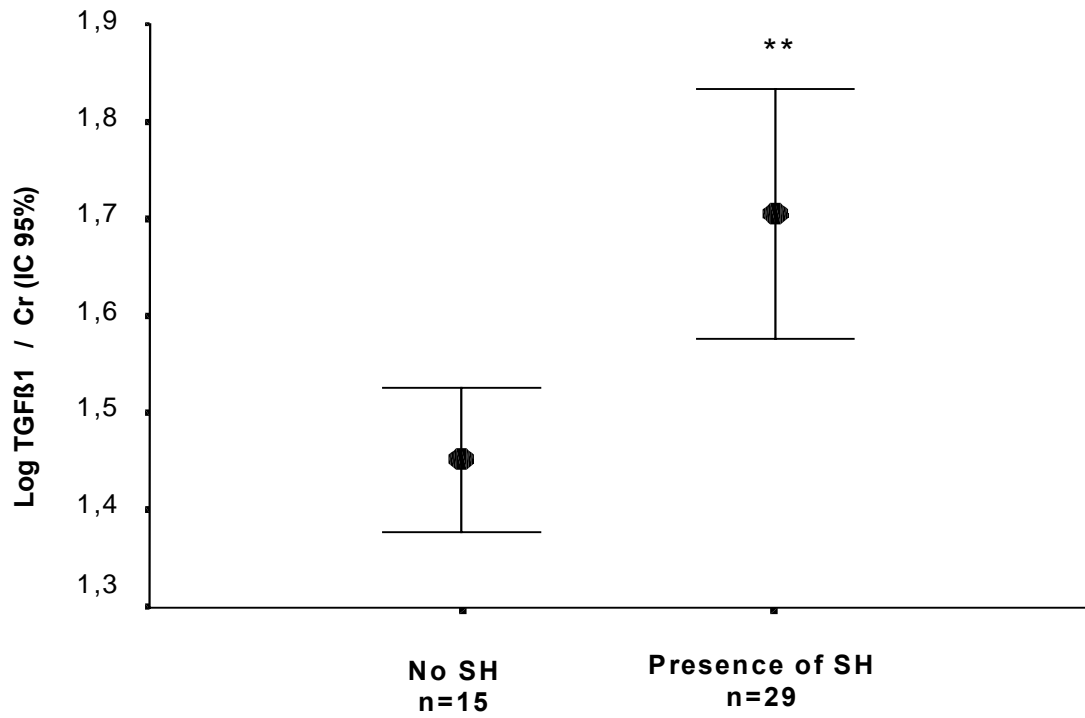
Table 4: General and metabolic characteristics, blood pressure, UAE and urinary TGF- β_1 in patients with Diabetes Mellitus according to the presence or absence of previous diagnosis of Hypertension. Results correspond to the average \pm average standard deviation. For the gender variable, the in-group percentage is shown.

	No SH n=15	Presence of SH n=29	p
Age (years)	52 \pm 10	58 \pm 7	0.019
Males (%)	47	55	NS
BMI (kg/m ²)	30 \pm 4	30 \pm 5	NS
Serum Creatinine (mg/dl)	0.9 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	0.042
Blood Glucose (mg/dl)	149 \pm 35	172 \pm 64	NS
HbA1c (%)	7.4 \pm 1.4	8.2 \pm 1.8	NS
Total Cholesterol (mg/dl)	216 \pm 50	230 \pm 56	NS
HDL cholesterol (mg/dl)	44 \pm 12	44 \pm 9	NS
LDL cholesterol (mg/dl)	142 \pm 45	147 \pm 51	NS
Triglycerides (mg/dl)	142 \pm 64	201 \pm 170	NS
Systolic BP (mmHg)	122 \pm 10	149 \pm 26	<0.001
Diastolic BP (mmHg)	77 \pm 7	87 \pm 10	0.001
Log UAE	1.2 \pm 0.5	2.2 \pm 0.9	<0.001
Log TGF- β_1 /Cr	1.4 \pm 0.1	1.7 \pm 0.3	0.008

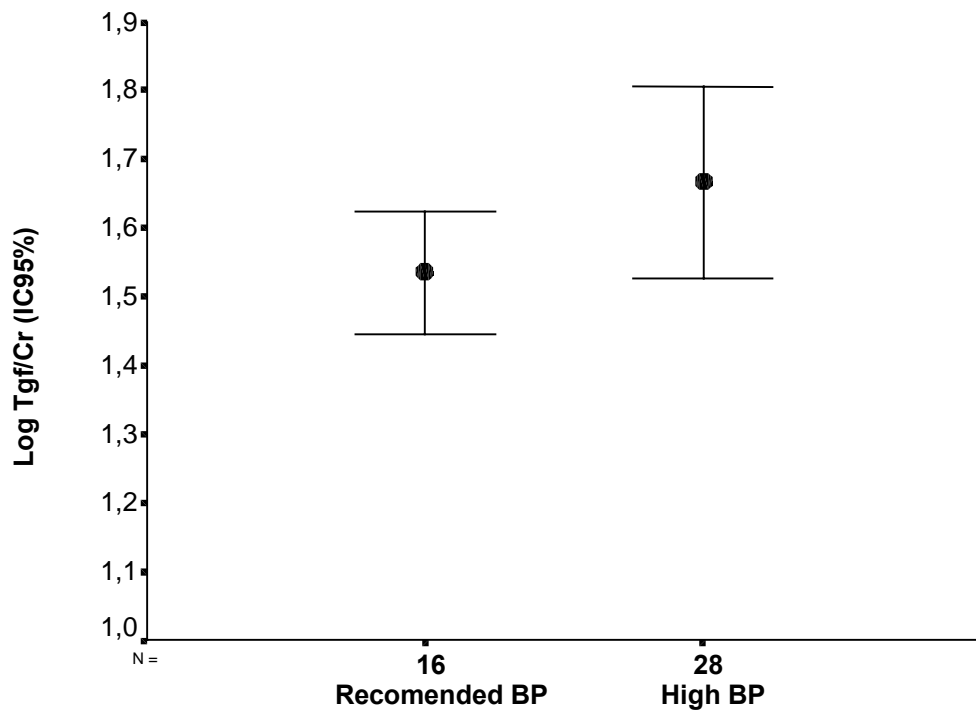


$r = 0.31$; $p = 0.04$

Figure 1: Correlation between UAE Log and the TGF- β_1 /Cr Log.



2.a) $**r=0.39; p = 0.01$



2.b) $p=0.175$

Figure 2: TGF- β_1 /Cr Log versus previous diagnosis of SH (2.a) and TGF- β_1 /Cr Log versus Recommended BP and High BP (2.b).

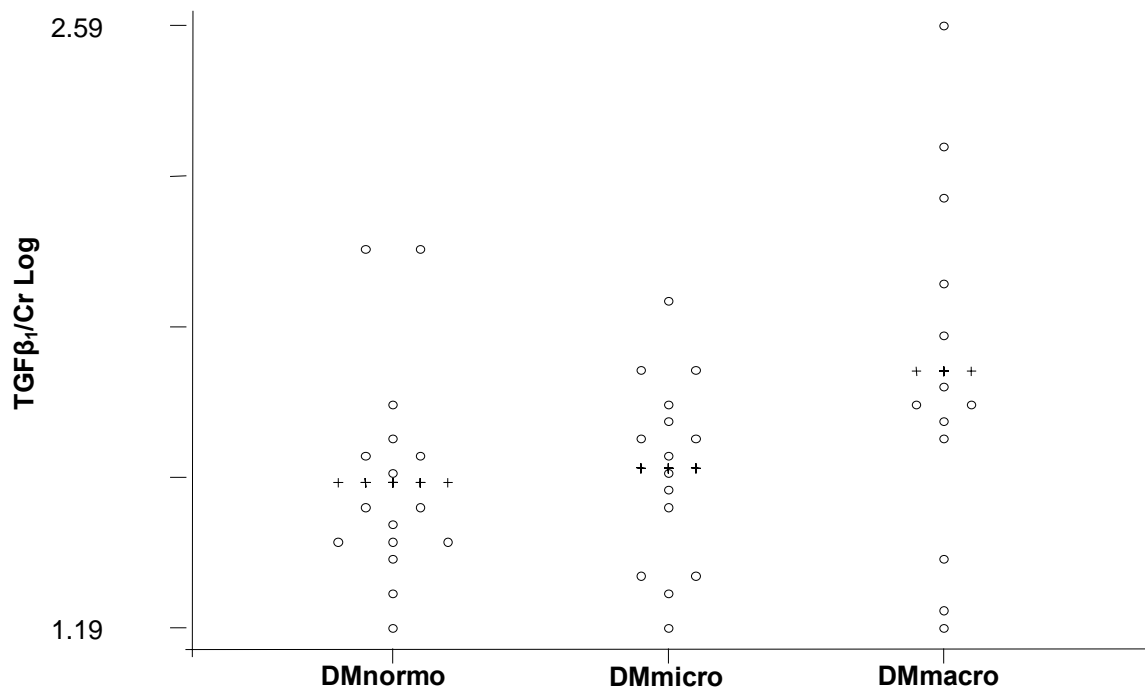


Figure 4: TGF- β 1/Cr (pg/mg) urinary levels according to the occurrence of normo(DMnormo), micro (DMmicro) and macroalbuminuria (DMmacro). The line of the (+) sign represents the group average; $p = 0.053$.

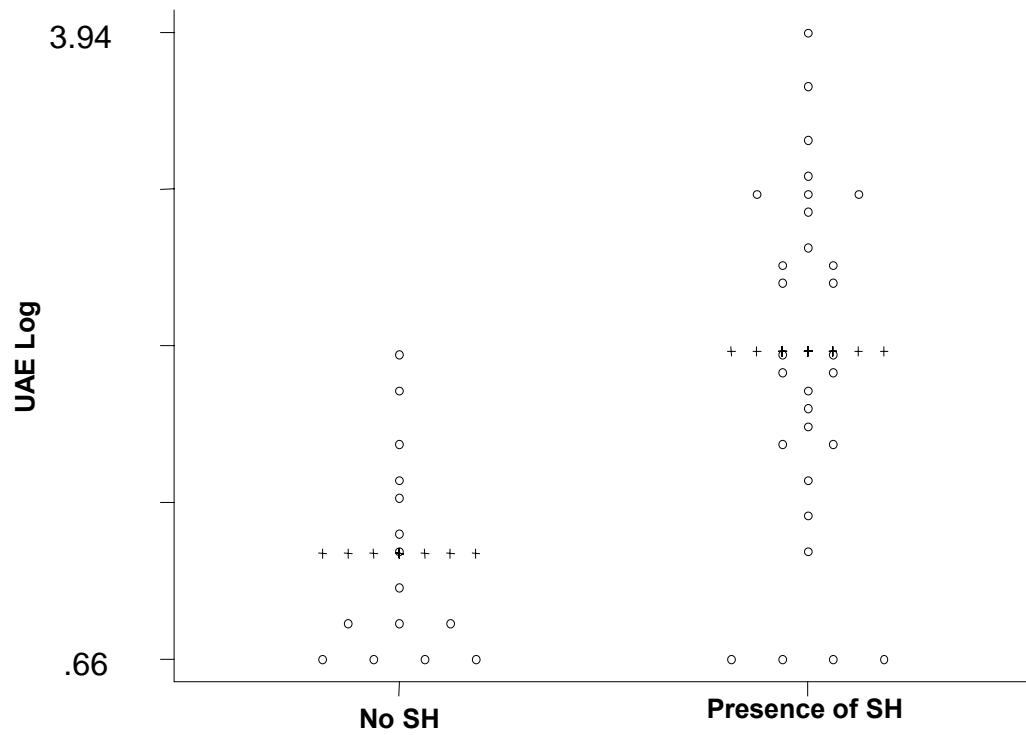


Figure 5: Urinary excretion of albumin (mg/24h) according to the absence or presence of SH. The line of the (+) sign represents the group average; $p < 0.001$.

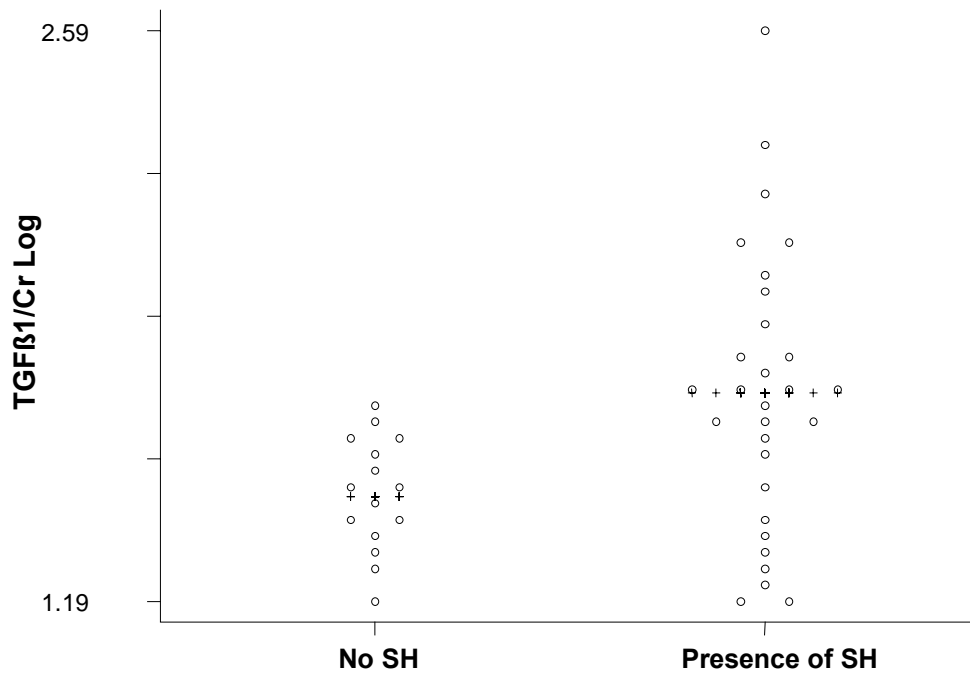


Figure 6: Urinary levels of TGF- β 1/Cr (pg/mg) according to the presence or absence of SH. The line of the (+) sign represents the group average; $p < 0.001$.

**6 ARTIGO: NÍVEIS URINÁRIOS DE TGF- β_1 EM PACIENTES COM
DIABETES MELLITUS TIPO 2: IMPACTO DA HIPERTENSÃO
ARTERIAL SISTÊMICA**

Níveis Urinários de TGF- β_1 em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2: Impacto da Hipertensão Arterial Sistêmica

Fracalossi, V^{1,4} ; Thomazelli, FCS^{1,4}; Bertoluci, MC^{1,3} e *Schmid, H^{1,2,3,4}

1. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica/UFRGS
2. Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas do Rio Grande do Sul
4. Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Complexo Hospitalar Santa Casa

Endereço para correspondência:

Helena Schmid. Rua Felipe Neri, 296/301 - Porto Alegre - Brasil
CEP 90440-150 - Fone: 55-51-32284055 Fax 55-51-321488246
e-mail: hschmid@fffcmpa.tche.br

Financiamento: FIPE/HCPA,FFFCMPA

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a excreção urinária de TGF- β_1 em indivíduos diabéticos e controles saudáveis e entre pacientes diabéticos com diferentes graus de excreção urinária de albumina, normotensos e hipertensos e com diferentes graus de controle da pressão arterial (PA), foi realizado um estudo transversal controlado envolvendo 44 pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e 8 controles saudáveis. Os pacientes diabéticos foram divididos em subgrupos, de acordo com a presença de albuminúria, diagnóstico prévio de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e controle da pressão arterial na data da coleta da urina para os testes. Os resultados não mostraram diferenças nos níveis de HbA1c entre os diabéticos em qualquer das divisões em subgrupos. Uma maior excreção urinária de TGF- β_1 foi observada nos pacientes diabéticos com macroalbuminúria em relação aos normo e microalbuminúricos ($p=0,031$) e naqueles com história de HAS em relação aos sem este diagnóstico ($p<0,001$). Não houve diferença significativa no TGF- β_1 urinário entre os grupos quando os pacientes foram classificados de acordo com os níveis pressóricos na data da coleta da urina. Foi encontrada correlação entre o TGF- β_1 urinário e o diagnóstico de HAS ($r=0,39;p=0,01$) e com a excreção urinária de albumina (EUA) ($r=0,31;p=0,04$). Em modelo de regressão linear (stepwise), no qual foram incluídas como variáveis independentes a idade, a creatinina plasmática e o diagnóstico de HAS e como variável dependente o Log TGF β_1 /Cr, observou-se que o efeito da presença de HAS foi significativo ($p=0,012$). Conclui-se que a ocorrência de HAS é um importante fator de risco, independente do controle metabólico, da idade e da creatinina plasmática para a presença de níveis aumentados do TGF- β_1 urinário. Os resultados sugerem que apenas o controle em curto prazo da pressão arterial, sem drogas que especificamente atuem sobre a produção ou ação da angiotensina, não seja suficiente para a reversão da produção renal de TGF- β_1 e seu provável efeito deletério no mesângio e membrana basal glomerular.

INTRODUÇÃO

A glomerulosclerose diabética é uma condição caracterizada pela deposição renal progressiva de matriz extracelular (MEC) nas regiões mesangial glomerular e túbulo-intersticial (1) (2) (3). Muitos estudos têm apontado o Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β_1), uma citocina de potente ação indutora da síntese de matriz extracelular, como o principal mediador da deposição de subcomponentes da MEC, tanto em animais com doença renal experimental, como em pacientes com diversos tipos de nefropatia. O TGF- β_1 age tanto aumentando a síntese de colágeno tipo IV e fibronectina como impedindo a sua degradação através da inibição de suas enzimas de degradação, promovendo, assim, acúmulo de MEC.(4) (5) (6) (7) (8)

Em estudo prévio desse grupo de pesquisadores observou-se que glomérulos de ratos com Diabetes Mellitus (DM) induzido pela estreptozotocina (STZ), apresentam aumento dos níveis de mRNA-TGF- β_1 nas fases que precedem a deposição da proteína do TGF- β_1 e de colágeno tipo I ao nível da região mesangial, indicando que o surgimento da nefropatia diabética (ND) é precedido por aumento de síntese de TGF- β_1 . Este aumento se correlaciona positivamente com a carga excretada de albumina, sugerindo que o TGF- β_1 continua a mediar também a nefropatia diabética nas suas fases mais avançadas. (9)

Biópsias renais de pacientes com ND apresentam maior reação imunohistoquímica para TGF- β_1 nos glomérulos, bem como aumento do seu mRNA específico, indicando que o rim diabético produz TGF- β_1 em abundância.(10). Confirmando estes achados, em estudo onde foi medida a excreção fracional de TGF- β_1 a partir do sangue obtido de artéria e veia renais e urina de pacientes com DM2 submetidos a cateterismo cardíaco, foi observado que estes apresentam aumento significativo na produção renal de TGF- β_1 em relação a indivíduos sem diabetes. (11)

Nos rins, a síntese de TGF- β 1 é mediada por 3 fatores: 1) a ligação da angiotensina II a receptores de membrana que ativam o sistema da proteína quinase C (PKC); 2) a internalização de glicose com aumento do DAG (Diacyl Glycerol) e ativação da PKC; e 3) o estiramento mecânico sobre as células mesangiais que ativam vias ainda desconhecidas, promovendo aumento da transcrição do TGF- β .

No diabetes, o bloqueio da ligação da angiotensina II a receptores de membrana tem como efeito retardo do dano renal, sugerindo que este mecanismo contribua para uma maior produção do TGF- β 1.(12) (13)

Em relação à internalização da glicose com aumento do DAG e ativação da PKC no diabetes, em estudo recente desse grupo, observou-se que ratos com diabetes induzido pela STZ apresentam aumento significativo do TGF- β 1 urinário e da albuminúria 45 dias após o início da hiperglicemia. Estas alterações se correlacionaram com o aumento da proteína transportadora de glicose (GLUT-1) ao nível do córtex renal, indicando que o córtex renal de ratos diabéticos amplifica o efeito da hiperglicemia ao permitir o aumento dos níveis de glicose intracelular, o que pode ser o fator mediador para o aumento da síntese de TGF- β 1 neste modelo experimental (14). Também observou-se que em ratos com diabetes por estreptozotocina a administração de insulina foi capaz de diminuir os níveis urinários de TGF- β 1. (15)

Vários estudos “in vitro” mostram que há aumento da internalização da glicose, aumento do DAG e ativação da PKC nas células mesangiais expostas a meio contendo concentrações elevadas de glicose, como ocorre “in vivo” no Diabetes.(16) (17)

Vários estudos “in vitro” também mostram que outro fator que deve ser importante em estimular e manter altos níveis de TGF- β 1 em células glomerulares, é o estiramento mecânico das células mesangiais (18) (19) (20). “In vivo”, no Diabetes, este estiramento aumentado

resulta de alterações hemodinâmicas glomerulares, para as quais o aumento da pressão arterial, especialmente se sustentado, tem significativa participação na progressão da doença renal.(21)

Em pacientes com HAS, afro-americanos, não diabéticos, o TGF- β 1 tem sido considerado como um importante mediador de lesão em órgãos-alvo. (22)

Por outro lado, em pacientes diabéticos tipo 2 com HAS e aumento da EUA, Houlihan e cols, observaram que o bloqueio do receptor da angiotensina com losartan, por 4 semanas, resultou em queda dos níveis urinários de TGF- β 1. (21)

Por isso nossa hipótese é que em DM2 micro e macroalbuminúria e/ou hipertensão arterial sistêmica podem estar relacionados com o aumento do TGF- β 1. Se esta hipótese for confirmada a medida do TGF- β 1 na urina poderia ser um marcador para a ocorrência de glomerulosclerose no Diabetes e esses níveis elevados poderiam ser diminuídos tanto pelo controle metabólico como pelo controle da pressão arterial.

Tendo em vista os achados descritos, entendeu-se que a determinação do TGF- β 1 urinário no Diabetes com diferentes graus de albuminúria e presença ou não de hipertensão arterial, poderia ter implicações fisiopatológicas e terapêuticas na evolução da nefropatia diabética, desde que fosse possível demonstrar que seus níveis urinários tenham correlação ou não com doença renal, com controle metabólico, com diagnóstico prévio de HAS ou com os níveis pressóricos no momento do estudo.

OBJETIVOS

Determinar os níveis urinários de TGF- β 1 em pessoas saudáveis e pacientes com DM2 com diferentes níveis de albuminúria.

Buscar a possibilidade de associação entre níveis urinários de TGF- β 1, presença de diagnóstico de HAS, níveis pressóricos no momento das coletas de urina, glico-hemoglobina e albuminúria.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudo transversal controlado. A amostra foi consecutiva e de conveniência a partir dos pacientes que freqüentaram os ambulatórios das referidas instituições (HCPA e Santa Casa) no período de janeiro a dezembro de 2001 (até que fossem incluídos pacientes diabéticos com diferentes graus de excreção urinária de albumina, suficientes para a investigação proposta de acordo com os achados prévios) (23). Um total de 52 indivíduos foi selecionado para participar do estudo, sendo 44 pacientes com DM 2 e 8 indivíduos sem diabetes ou hipertensão.

Crítérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo homens e mulheres entre 30 e 75 anos com diagnóstico de DM2. (24)(25)

Como indivíduos controles foram alocados pais e outros familiares de crianças que procuraram os ambulatórios dos hospitais envolvidos, homens e mulheres de 30-75 anos, sem história familiar ou diagnóstico prévio de DM, com teste de glicemia capilar ocasional menor que 100 mg/dl e ausência de sinais e sintomas de DM; sem história prévia de outras patologias crônicas e com média de 2 aferições de pressão arterial (PA) menores que 140x90 mmHg.

Crítérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos com IMC superior a 40 Kg/m², gestantes, com história de doença hepática, hemoglobinopatia previamente detectada, tratamento de substituição renal (hemodiálise ou transplante renal), história de infecções urinárias de repetição ou insuficiência cardíaca classe III ou IV.(26)

Protocolo do Estudo

Todos os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram documento de consentimento informado individual na primeira visita. O protocolo foi aprovado pelos comitês de ética da Santa Casa e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pacientes diabéticos selecionados compareceram para nova consulta em jejum para coleta de glicose, HbA1c, perfil lipídico e creatinina plasmática. Foram orientados que, na consulta, trouxessem a urina coletada das últimas 24 horas para dosagem da albuminúria e amostra para EQU e urocultura; coletaram, na visita, urina para dosagem da creatinina urinária e TGF- β_1 . Os indivíduos controles compareceram para nova visita quando foi coletada amostra sanguínea para glicemia e urina para EQU e urocultura, creatinina urinária e TGF- β_1 .

O paciente diabético era considerado hipertenso se já possuísse HAS diagnosticada pelo serviço durante seu acompanhamento prévio, ou apresentasse média de 2 medidas de pressão arterial nas duas consultas maior ou igual a 140x90 mmHg.(27)

A pressão arterial foi medida em todos os participantes, no dia da coleta, de acordo com as recomendações do VI JOINT (27): após 5 minutos de descanso, na posição sentada, no braço direito (este estando ao nível do átrio direito), com esfigmomanômetro de mercúrio. Foi considerada como PA sistólica o primeiro som de Korotkoff e PA diastólica o momento do desaparecimento do som. Medidas em seqüência com intervalo de 2 minutos foram obtidas até a estabilização (diferença menor que 5 mmHg entre 2 medidas) e foi considerada a média de 2 medidas.

Análises Laboratoriais

O TGF- β_1 foi dosado em amostras de urina por ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras de urina foram mantidas resfriadas e imediatamente centrifugadas a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e guardado a -80°C. No dia da análise as amostras de urina (0,5 ml) foram submetidas a acidificação até pH 2-3 com HCl 1N por 30 minutos, seguida de neutralização para pH 7-8 com a mesma quantidade de NaOH 1N para ativação do TGF- β_1 latente.

O limite de detecção do ensaio é de 31,2 a 2000 pg/ml e não foi necessário proceder a concentração das amostras de urina já que todas as medidas obtidas ficaram acima do limite de detecção do método. Para correção das variações de concentração de urina os resultados do TGF- β_1 foram expressos em pg/mg de creatinina urinária da mesma amostra.

A creatinina sérica e urinária foi dosada por Jaffé, a albuminúria por imunoturbidimetria e a proteinúria pelo método colorimétrico com vermelho de Pirogalol.

A glicose foi dosada por Glico-DH e a HbA_{1c} por HPLC (valor referência até 6,3%).

O Colesterol total foi dosado por CHOD-PAP, a fração HDL colesterol pelo método direto por inibição seletiva e para o cálculo da fração LDL colesterol foi utilizado o cálculo da equação de Friedwald. A dosagem dos triglicerídeos foi feita pelo método GOD-PAP.

Análise Estatística

Foi criado um banco de dados em Excel (1998). O programa utilizado para análise foi o SPSS para Windows versão 10.0.

Inicialmente foi elaborada a análise descritiva para todas as variáveis do banco de dados.

Utilizando-se as médias e desvios padrões e cálculo de frequências absolutas e relativas procedeu-se a comparação dos grupos em relação às variáveis quantitativas através do Teste t de Student e para as variáveis categóricas, utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

Foram realizadas transformações logarítmicas nas variáveis TGF- β_1 e EUA devido à conhecida assimetria de distribuição destas variáveis. A correlação entre as mesmas e as demais variáveis foi calculada através do Coeficiente de Correlação de Pearson.

Para comparação dos sub-grupos Hipertenso e Normotenso e PA Elevada e PA recomendada foi usado Teste t de Student.

A fim de proceder a comparações entre os sub-grupos de pacientes, quando classificados como DMnormo, DMmicro e DMmacro, foi usado teste de análise de variâncias (ANOVA) seguido do teste das diferenças mínimas significativas (DMS) para comparações múltiplas.

Foi realizada a análise de regressão linear (stepwise) a fim de verificar quais as variáveis estariam associadas independentemente ao desfecho (TGF- β_1 /Cr).

O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Influenciados pelos critérios de seleção os pacientes diabéticos diferiram dos controles em relação à glicemia ($p=0,003$), à pressão arterial sistólica ($p=0,045$) e à pressão arterial média ($p=0,011$) (Tabela 1).

O primeiro objetivo definido no estudo foi determinar se pacientes com DM apresentavam níveis urinários de TGF- β_1 aumentados em relação a indivíduos controles não diabéticos aparentemente normais. Não se demonstrou a existência de diferença estatisticamente significativa ($p=0,070$) entre o Log da excreção urinária TGF- β_1 corrigida (TGF- β_1 /Cr) do grupo de pacientes diabéticos em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Em busca de estabelecer novos indícios para investigações futuras procurou-se estabelecer correlações entre o Log da excreção urinária do TGF- β_1 /Cr com as demais características dos pacientes diabéticos (Tabela 2).

Uma significativa correlação positiva foi encontrada entre o Log da excreção urinária TGF- β_1 /Cr com o Log da EUA ($r=0,31, p=0,04$) (Figura 1) e o diagnóstico prévio de HAS ($r=0,39, p=0,01$) (Figura 2a).

A partir da visualização da correlação existente entre o Log TGF- β_1 /Cr com o Log da EUA e de acordo com o objetivo previamente definido no estudo, de determinar se pacientes diabéticos apresentavam diferentes níveis urinários de excreção de TGF- β_1 , procedeu-se a divisão do grupo de pacientes diabéticos, conforme seus níveis de EUA em Diabéticos Normoalbuminúricos (DMnormo), Diabéticos Microalbuminúricos (DMmicro) e Diabéticos Macroalbuminúricos (DMmacro).(28)

Pode-se observar a partir da Tabela 3 que: a presença de hipertensão e o incremento da creatinina plasmática foi diferente entre os subgrupos ($p=0,001$ e $p<0,001$ respectivamente) e

correspondeu as crescentes taxas de excreção de albumina; a glicemia não foi estatisticamente diferente ($p=0,051$) quando considerados os 3 subgrupos em conjunto, mas quando comparados individualmente, a média da glicemia foi maior no subgrupo DMmacro ($196\text{mg/dl}\pm 65$) em relação aos subgrupos DMnormo ($155\text{mg/dl}\pm 28$; $p=0,049$) e DMmicro ($147\text{mg/dl}\pm 62$; $p=0,022$); não houve diferença entre os subgrupos na medida da glicohemoglobina ($p=0,182$); o nível de triglicérides foi maior no subgrupo DMmacro ($292\pm 207\text{mg/dl}$; $p=0,003$) quando comparado aos subgrupos DMnormo ($133\text{mg/dl}\pm 57$) e DMmicro ($124\text{mg/dl}\pm 63$)(Tabela 3).

A pressão arterial sistólica (Tabela 3) foi diferente entre os subgrupos de pacientes diabéticos ($p=0,005$) e foi maior nos subgrupos DMmacro e DMmicro em relação ao subgrupo DMnormo. A pressão arterial média também foi diferente entre os 3 subgrupos ($p=0,018$).

A porcentagem de pacientes que fizeram uso de anti-hipertensivos e especificamente IECA foi diferente e foi maior nos subgrupos DMmicro (73%, sendo 60% IECA) e DMmacro (100%, sendo 92% IECA).

Conforme previsto, de acordo com a seleção dos pacientes, os níveis de excreção urinária de albumina foram progressivamente maiores, sendo no subgrupo DMnormo ($0,9\pm 0,3$), no subgrupo Dmmicro($1,9\pm 0,4$) e no subgrupo DMmacro ($3,1\pm 0,4$) (Figura 3).

Quando comparados todos os subgrupos de acordo com o Log da excreção urinária de TGF- $\beta 1/\text{Cr}$, encontrou-se uma tendência para diferença ($p=0,053$)(Figura 4). Comparando os subgrupos, encontrou-se uma média maior para os pacientes do subgrupo DMmacro ($1,8\pm 0,4$) quando comparada às médias dos subgrupos DMnormo ($1,5\pm 0,2$; $p=0,023$) e DMmicro ($1,6\pm 0,2$; $p=0,050$). Esta diferença também foi observada quando comparou-se os pacientes do subgrupo DMmacro em relação aos pacientes DMnormo e DMmicro agrupados ($p=0,031$).

Considerando a presença de correlação entre o diagnóstico prévio de HAS e Log TGF- β 1/Cr, também avaliou-se os resultados quando os pacientes diabéticos foram divididos em Hipertensos e Normotensos (27) e de acordo com o nível de controle da PA recomendado pela ADA na data da coleta.(29)

Os pacientes diabéticos Hipertensos apresentaram média de idade maior que os pacientes Normotensos ($p=0,019$) e maiores níveis de creatinina plasmática ($p=0,042$) (Tabela 4).

O controle metabólico não diferiu significativamente sob nenhum aspecto quando da comparação dos pacientes diabéticos Normotensos e Hipertensos.

Os níveis de pressão arterial sistólica, na data da coleta de urina, foram menores no subgrupo Normotenso ($122\text{mmHg}\pm 10$) em relação ao Hipertenso ($149\text{mmHg}\pm 26$, $p<0,001$), o mesmo ocorrendo em relação a pressão arterial diastólica e pressão arterial média, respectivamente $p=0,001$ e $p<0,001$.

No subgrupo de pacientes diabéticos Normotensos 4 pacientes usavam IECA.

O nível de EUA foi 83% maior entre os pacientes Hipertensos ($2,2\pm 0,9$) em relação aos pacientes Normotensos ($1,2\pm 0,5$; $p<0,001$) (Figura 5).

A divisão dos pacientes diabéticos de acordo com o Diagnóstico Prévio de Hipertensão mostrou que ocorria maior excreção urinária de TGF- β 1 nos Hipertensos ($1,7\pm 0,3$) em relação aos Normotensos ($1,4\pm 0,1$; $p=0,008$) (Figura 6).

Visualizadas as diferenças anteriormente descritas, de acordo com o diagnóstico de HAS entre os pacientes diabéticos, pareceu importante avaliar o efeito do controle pressórico recomendado pela ADA: 36 % dos pacientes possuíam níveis de PA $<130\times 80$ mmHg (PA Recomendada) e 64% dos pacientes possuíam valores de PA $\geq 130\times 80$ mmHg (PA

Elevada) na data da coleta.(29)

Não houve diferenças significativas entre as características gerais e metabólicas dos dois subgrupos.

Os níveis de pressão arterial sistólica foram significativamente menores no subgrupo com PA Recomendada ($119\text{mmHg}\pm 7$) em relação ao subgrupo com PA Elevada ($151\text{mmHg}\pm 24$, $p<0,001$), o mesmo ocorrendo em relação a pressão arterial diastólica ($73\text{mmHg}\pm 5$ e $89\text{mmHg}\pm 7$) e a pressão arterial média ($89\text{mmHg}\pm 4$ e $110\text{mmHg}\pm 10$) respectivamente, com o mesmo nível de significância ($p<0,001$).

O uso de anti-hipertensivos em geral e IECA foi maior no subgrupo com PA Elevada, ($p=0,017$) e ($p=0,013$) respectivamente, em relação ao subgrupo PA Recomendada.

O nível de EUA ($1,6\pm 0,8$ e 2 ± 1) e a excreção urinária do TGF- β_1/Cr ($1,5\pm 0,2$ e $1,7\pm 0,3$), (figura 2.b), respectivamente para os subgrupos PA Recomendada e PA Elevada, não se mostraram estatisticamente diferentes.

Em modelo de regressão linear (stepwise), no qual foram incluídas como variáveis independentes a idade, a creatinina plasmática e o diagnóstico de HAS e como variável dependente o Log TGF β_1/Cr , observou-se que somente o efeito da presença de HAS foi significativo (SE=0,10; beta=0,42; IC (95%)=0,06 a 0,48; $p= 0,012$). A presença de HAS foi também um fator de risco para a presença de níveis elevados de TGF β_1 urinário mesmo quando as outras variáveis independentes foram excluídas ($p=0,008$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente estudo, em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, observou-se que: 1) o achado de nefropatia clinicamente estabelecida (macroalbuminúria) relacionou-se a níveis aumentados de TGF- β_1 urinário comparativamente a ocorrência de normo e microalbuminúria; 2) o TGF- β_1 urinário correlacionou-se com a excreção urinária de albumina; 3) quando houve o diagnóstico prévio de HAS foi observada maior concentração urinária de TGF- β_1 ; 4) níveis pressóricos controlados ou não (29) não determinaram diferenças importantes nos níveis de TGF- β_1 urinários, pelo menos em curto prazo; 5) a presença do diagnóstico prévio de hipertensão arterial determinou aumento na concentração urinária de TGF- β_1 , independente dos níveis de HbA1c e pressão arterial medida na data da avaliação dos parâmetros urinários; 6) em modelo de regressão linear, a presença de HAS mostrou ser fator de risco para o aumento do TGF- β_1 , independente da idade e dos níveis de creatinina plasmática.

A observação, no presente estudo, de maiores níveis urinários de TGF- β_1 em diabéticos com macroalbuminúria, está em acordo com outros estudos recentes, nos quais achados semelhantes foram descritos. (23) (30) (31) (32)

Anteriormente nosso grupo descreveu, em modelo animal (ratos diabéticos STZ-induzido), elevação da albuminúria relacionada com progressivos e maiores níveis de reação imuno-histoquímica a nível glomerular para o TGF- β_1 e deposição de colágeno total e do tipo I, bem como aumento dos níveis urinários de TGF- β_1 relacionados à aumento da expressão de GLUT1 e glicosúria, e reversão parcial dos achados após controle metabólico parcial com insulina (9) (14) (33). Vários estudos em modelos experimentais de nefropatia diabética também demonstraram que o TGF- β_1 está intimamente ligado com a deposição de MEC em nível glomerular e que há um aumento do mRNA TGF- β_1 nos glomérulos algumas semanas após o início da hiperglicemia. (34)

Como estas observações do nosso grupo, realizadas em ratos com Diabetes induzido por estreptozotocina (modelo experimental no qual não ocorre hipertensão arterial sistêmica), mostraram que o controle glicêmico com insulina determinou queda significativa do TGF- β 1 urinário (15), entende-se que a falta de controle metabólico do Diabetes é deletéria para o rim diabético, pelo menos em animais. Tendo em vista estes achados, os quais indicam que a hiperglicemia e provavelmente a consequente ocorrência de um meio intracelular com glicose elevada no mesângio sejam um mecanismo importante para determinar um aumento da produção renal de TGF- β 1, o papel do controle metabólico em humanos também precisa ser melhor investigado. No presente estudo não é possível inferir sobre o impacto das variações da HbA1c como se faz sobre as variações da pressão arterial, uma vez que com o delineamento proposto não houve variação importante do controle metabólico entre os pacientes estudados, o que está de acordo com a observação de ausência de correlação entre HbA1c e TGF- β 1 urinário na regressão múltipla. Por outro lado, Houlihan (21) observou que valores elevados HbA1c tiveram menor efeito do que elevações da PA sobre o TGF- β 1 urinário. É importante lembrar ainda que, outros dados da literatura sugerem que na fase de Nefropatia Diabética o controle pressórico seja mais importante que o próprio controle glicêmico para impedir a progressão para Insuficiência Renal terminal.(35)

Como os níveis de hemoglobina glicada não variaram entre os subgrupos, teve-se a oportunidade de observar, neste estudo, o efeito quase que isolado da PA sobre o TGF- β 1 urinário, tanto avaliando a presença de diagnóstico prévio de HAS como dos níveis pressóricos no momento da coleta de urina. O observado efeito da presença de HAS pode ser enfatizado já que em modelo de regressão linear (step wise), a presença de HAS mostrou ser fator de risco para o aumento do TGF- β 1, independente da idade e dos níveis de creatinina plasmática. Como nestas condições foi observada nítida correlação entre aumento do TGF- β 1 urinário e presença do diagnóstico prévio de HAS, mas não com os níveis de pressão arterial

no momento da coleta, pode-se inferir a presença do diagnóstico de HAS tem importante efeito sobre os níveis urinários de TGF- β 1 e que variações agudas da pressão arterial parecem ter menor impacto.

Quanto a estudos em paciente com HAS, na ausência de Diabetes, chama a atenção um estudo realizado em pacientes afro-americanos com HAS e lesão de órgãos-alvo, em que foi observada a ocorrência de níveis séricos elevados de TGF- β 1, associados à hiperexpressão do seu mRNA (22). Estudo publicado em 2002, também em pacientes com HAS, confirma estes achados (36). Em nenhum deles, no entanto, é descrita uma associação entre os níveis de pressão arterial sistólica e diastólica com a produção de TGF- β 1.

Do estudo de Houlihan e cols, é possível inferir também que, um efeito na queda da PA só se observa quando o controle pressórico for mantido por pelo menos 4 semanas, ou quando se utilizam agentes que atuam especificamente sobre o sistema renina- angiotensina (como o losartan, que foi utilizado no estudo) sugerindo que, a observada redução do TGF- β 1 contribua para o conhecido efeito reno-protetor desta classe de medicamentos(21). Em suporte a estes achados, estudo de Bertoluci e cols (submetido a publicação) mostrou que o TGF- β 1 urinário cai significativamente após 12 semanas de controle pressórico intensivo em pacientes com DM2 e nefropatia.

O achado de uma correlação significativa entre os níveis urinários de TGF- β 1 e o diagnóstico prévio de HAS é uma observação original que pode ser explicada à luz de estudos anteriores. O efeito do aumento da pressão arterial induzindo glomeruloesclerose no diabético não é totalmente esclarecido, mas parece ser mediado, pelo menos em parte, pelo TGF- β 1, uma vez que forças hemodinâmicas sobre a parede endotelial dos capilares, tração mecânica nas células mesangiais e presença de angiotensina II, podem estar concorrendo na promoção de aumento na síntese do TGF- β 1.

O presente estudo permite concluir que no DM2 o TGF- β 1 urinário se correlaciona com o grau de doença renal e hipertensiva podendo ser um marcador de sua progressão. Por outro lado, os dados sugerem que um aumento do TGF- β 1 urinário só ocorra quando existe hipertensão arterial sistêmica mantida, a qual poderia permitir a ocorrência de estiramento mecânico glomerular. Especula-se que pacientes que apresentem níveis urinários progressivamente elevados de TGF- β 1 possam ter um risco aumentado para progressão de sua glomerulosclerose. Será necessário realizar estudos longitudinais para avaliar esta possibilidade.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este projeto foi desenvolvido nos laboratórios de pesquisa da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas e Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi solicitado auxílio à FFFCMPA e ao FIPE/HCPA para aquisição do material de consumo.

REFERÊNCIAS

- 1 Osterby R. Early phases in the development of diabetic glomerulopathy. *Acta Med Scand* 1975;574(suppl):1-80.
- 2 Osterby R, Gundersen H. Glomerular size and structure in Diabetes Mellitus. Late abnormalities. *Diabetologia* 1975;13:43-8.
- 3 Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, et al. Sequential renal biopsies in insulin-dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. *Kidney Int* 1995; 48(6):1929-35.
- 4 Border WA, Noble NA. Transforming Growth Factor- β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
- 5 Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Mechanisms of Disease: Role of Transforming Growth Factor (beta) in Human Disease. Massachusetts Medical Society 2000;342:1350-8.
- 6 Sinha S, Nevett C, Shuttieworin CA, et al. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-(beta) binding proteins. *Matrix Biol* 1998;17:529-45.
- 7 Ebner R, Chen RH, Lawler S, et al. Determination of type I receptor specificity by type II receptors for TGF- β or activin. *Science* 1987;262:900-5.
- 8 Sharma K, McGowan TA. TGF- β in diabetic kidney disease: roles of novel signaling pathways. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2000; 11:115-
- 9 Bertoluci M, Schmid H, Coimbra T, et al. Transforming growth factor-beta (TGF- β 1) in the development of rat diabetic nephropathy. A 10 Month study with insulin-treated rats. *Nephron* 1996;74:189-96.
- 10 Yamamoto T, Nakamura T, Noble N, et al. Expression of transforming growth factor- β is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:1814-8.
- 11 Sharma K, Ziyadeh FN, Weisberg LS, et al. Increased renal production of TGF- β 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997;46: 854-9.
- 12 González-Albarrán O, Gómez O, García-Robles R, et al. Role of systolic blood pressure on the progression of kidney damage in an experimental model of type 2 Diabetes Mellitus, obesity, and hypertension (zucker rats). *Am J Hypertens* 2003;16:979-985.
- 13 Wolf G. Link between angiotensin II and TGF- β in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 1998;24:174-80.
- 14 Schaan BD, Lacchini SM, Schmid H, et al. Increased Renal GLUT1 Abundance and Urinary TGF- β 1 in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Implications for the Development of Nephropathy Complicating Diabetes. *Horm Metab Res* 2001;33:664-9.

- 15 Godinho JM, Fracalossi V, Schmid H, et al. Diminuição do TGF- β_1 urinário e albuminúria em ratos com Diabetes induzido por Estreptozocina (STZ) em resposta ao tratamento com insulina. 25º Congresso Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia 2002- PO 102: S404.
- 16 Heilig CW, Liu Y, England RL, et al. D-glucose stimulates mesangial cell glut1 expression and basal and IGF-I-sensitive glucose uptake in rat mesangial cells. *Diabetes* 1997;46:1030-39.
- 17 Ayo SH, Radnik RA, Garoni JA, et al. High glucose causes an increased in extracellular matrix proteins in culture mesangial cells. *Am J Pathol* 1990;136:1339-48.
- 18 Riser BL, Ladson-Wofford S, Narins RG, et al. TGF- β receptor expression and binding in rat mesangial cells: Modulation by glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney Int* 1999;56:428-439.
- 19 Riser BL, Cortes P, Narins RG, et al. Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor - β isoforms in culture rat mesangial cells. *Am J Pathol* 1996;148:1915-23.
- 20 Riser BL, Cortes P, Narins RG. Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat. *J Clin Invest* 1992;90:1932-43.
- 21 Houlihan CA, Akdeniz A, Gilbert RE, et al. Urinary transforming growth factor β excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate. *Diabetes Care* 2002;25:1072-77.
- 22 Suthanthiran M, Li B, August P, et al. Transforming growth factor β_1 hyperexpression in African-American hypertensives: A novel mediator of Hypertension and/or target organ damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(7):3479-84.
- 23 Coimbra TM, Rivarola EWR, Moyses-Neto M, et al. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1525-8.
- 24 Williams Textbook of Diabetes. In: Pickup J, Williams G, Bennett P eds. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance. Oxford: Blackwell Scientific Publications 1991;1:37-44.
- 25 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22 (Suppl 1):S5-23.
- 26 Bruce, RA. Evaluation of functional capacity and exercise tolerance of cardiac patients. *Mod. Concepts Cardiovasc Dis* 1956;25(4):321-6.
- 27 The Sixth Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413-46.
- 28 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1999;22(suppl 1): S66-9.

- 29 Hypertension Management in Adults With Diabetes. Position Statements-American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2004;27:S65-7.
- 30 Bertoluci MC, Schaan BD, Schmid H. Increased urinary TGF- β 1 in type 2 diabetic patients with Diabetic nephropathy. *Diabetes* 1998;Suppl I: A 129.
- 31 Bertoluci MC, Schaan BD, Schmid H, et al. Níveis elevados de TGF- β 1 urinário em pacientes com DM2 e nefropatia diabética comparativamente a nefropatias não diabéticas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 1999; 43(Suppl I):S187
- 32 Sato H, Iwano M, Akai Y, et al. Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 1998;18:490-94.
- 33 Schmid H, Godinho JM, Bertoluci MC, et al. Decrease in urinary transforming growth factor β 1 after insulin treatment in rats with streptozotocin induced Diabetes. *Diabetes* 2004;53 (suppl I).
- 34 Iwano M, Kubo A, Dohi K, et al. Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 1996;49:1120-26.
- 35 Tanaka Y, Atsumi Y, Kawamori R, et al. Role of glycemic control and blood pressure in the development and progression of nephropathy in elderly Japanese NIDDM patients. *Diabetes Care* 1998;21:116-20.
- 36 Derhaschnig U, Shehata M, Hirschl MM. Increased levels of transforming growth factor-beta1 in essential hypertension. *Am J Hypertens* 2002;15(3):207-11.

Tabela 1: Características gerais, glicemia, pressão arterial e TGF- β_1 /Cr dos indivíduos diabéticos e controles estudados. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão da média. Para a variável sexo está representada a porcentagem dentro do grupo.

Características	Diabetes n=44	Controles n=8	p
Idade (anos)	56 \pm 9	64 \pm 6	NS
Sexo Masculino (%)	52	50	NS
IMC (kg/m ²)	30 \pm 5	26 \pm 3	NS
Glicemia (mg/dl)	164 \pm 56	90 \pm 8	0,003
PA sistólica (mmHg)	139 \pm 25	131 \pm 10	0,045
PA diastólica (mmHg)	84 \pm 10	80 \pm 6	NS
PAM (mmHg)	102 \pm 13	97 \pm 4	0,011
Log TGF β /Cr	1,6 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1	NS

Tabela 2: Teste de correlação linear simples de Pearson (r) entre Log TGF- β_1 /Cr e diversas variáveis.

Log TGF-β_1/Cr	r	p
Idade (anos)	0,16	NS
IMC (kg/m ²)	0,28	NS
Glicemia (mg/dl)	0,20	NS
HbA1c (%)	0,07	NS
Colesterol Total (mg/dl)	-0,21	NS
HDL (mg/dl)	0,05	NS
LDL (mg/dl)	-0,12	NS
Triglicerídios (mg/dl)	0,09	NS
Creatinina Plasmática (mg/dl)	0,03	NS
HAS Prévia	0,39	0,01
PA Sistólica (mmHg)	0,09	NS
PA Diastólica (mmHg)	0,07	NS
Uso prévio de Anti-Hipertensivos	0,21	NS
Uso prévio de IECA	0,19	NS
Log EUA	0,31	0,04

Tabela 3: Características gerais, perfil metabólico, níveis de PA, excreção urinária de albumina e TGF- β_1 urinário dos pacientes diabéticos estudados de acordo com o nível de excreção urinária de albumina. Os resultados correspondem a média \pm o desvio padrão da média. Para as variáveis sexo e HAS está apresentada a porcentagem dentro do grupo.

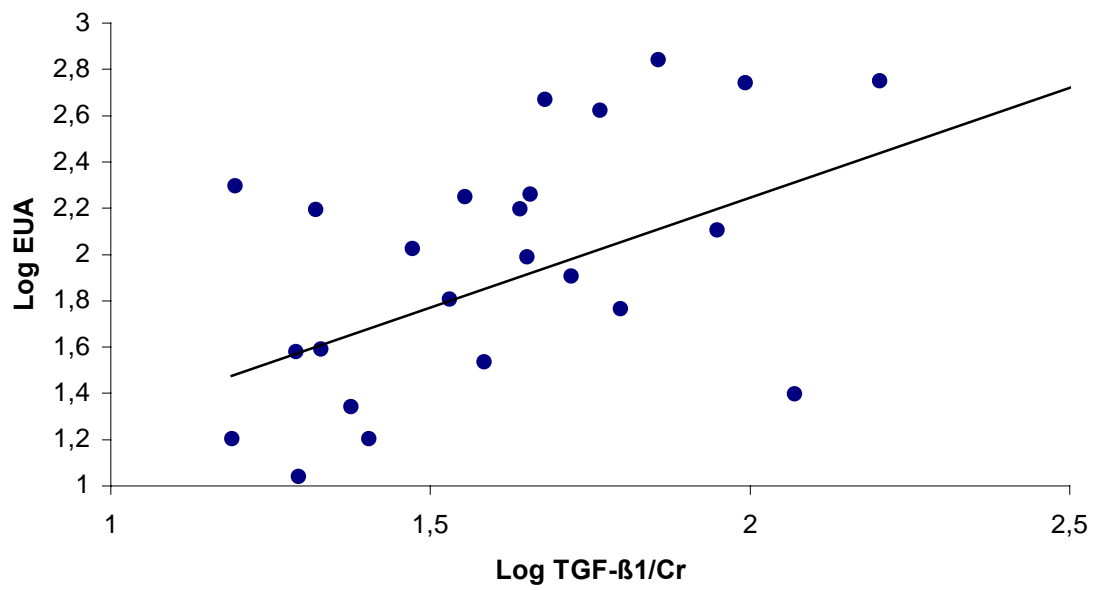
Características	DMnormo	DMmicro	DMmacro	p
	n=16	n=15	n=13	
Idade (anos)	53 \pm 9	58 \pm 8	57 \pm 9	NS
Sexo Masculino (%)	31	67	61	NS
IMC (kg/m ²)	29 \pm 4	30 \pm 4	29 \pm 6	NS
Pacientes com HAS (%)	37	67 *	100 ‡	0,001
Creatinina Plasmática(mg/dl)	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3 †‡	<0,001
Glicemia (mg/dl)	155 \pm 28	147 \pm 62	196 \pm 65 †‡	NS
HbA1c (%)	8,0 \pm 2	7,3 \pm 1	8,5 \pm 2	NS
Colesterol Total (mg/dl)	224 \pm 52	208 \pm 49	247 \pm 58	NS
HDL (mg/dl)	45 \pm 12	44 \pm 7	44 \pm 11	NS
LDL (mg/dl)	151 \pm 48	133 \pm 38	152 \pm 61	NS
Triglicerídios (mg/dl)	133 \pm 57	124 \pm 63	292 \pm 207 †‡	0,003
PA Sistólica (mmHg)	125 \pm 9	143 \pm 27 *	154 \pm 29 ‡	0,005
PA Diastólica (mmHG)	80 \pm 8	85 \pm 10	86 \pm 11	NS
Log EUA	0,9 \pm 0,3	1,9 \pm 0,4 *	3,1 \pm 0,4 †‡	<0,001
Log TGF- β_1 /Cr	1,5 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	1,8 \pm 0,4 †‡ £	0,053

* p< 0,05 vs DMnormo; † p < 0,05 vs DMmicro; ‡ p< 0,05 vs DMnormo;

£ p= 0,031 vs DMnormo+DMmicro

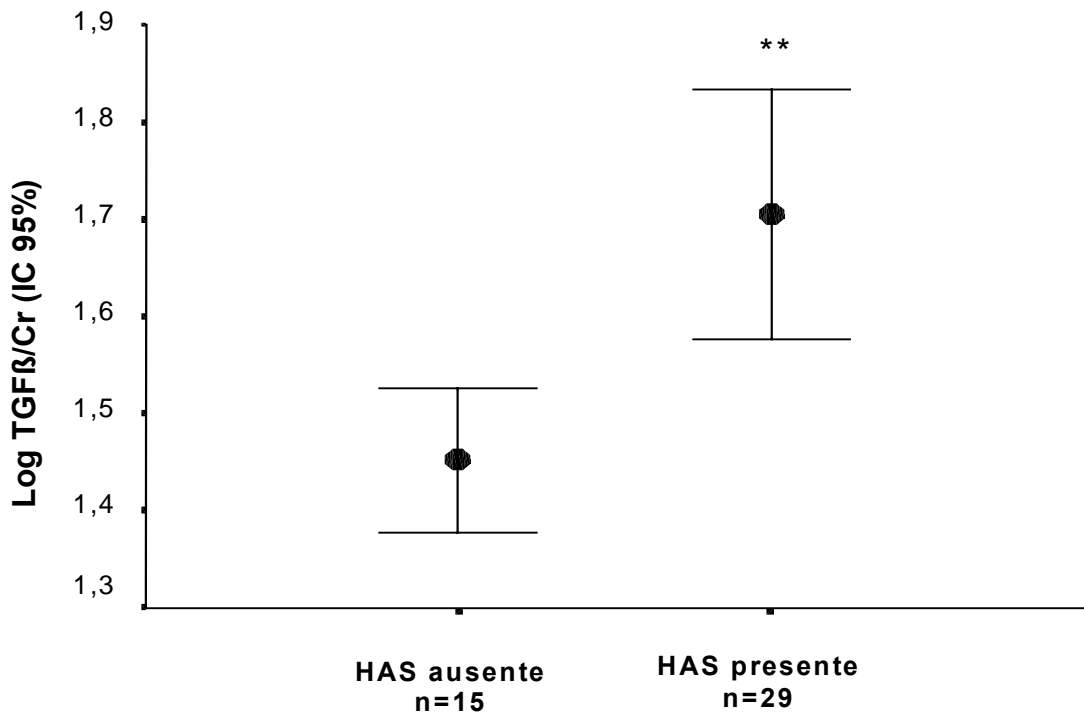
Tabela 4: Características gerais, metabólicas, pressão arterial, excreção urinária de albumina e TGF- β_1 urinário dos pacientes com Diabetes Mellitus conforme a presença ou ausência de diagnóstico prévio de Hipertensão Arterial. Os resultados correspondem a média \pm desvio padrão da média. Para a variável sexo está apresentado o percentual dentro do grupo.

	HAS ausente n=15	HAS presente n=29	p
Idade (anos)	52 \pm 10	58 \pm 7	0,019
Sexo Masculino (%)	47	55	NS
IMC (kg/m ²)	30 \pm 4	30 \pm 5	NS
Creatinina Plasmática (mg/dl)	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	0,042
Glicemia (mg/dl)	149 \pm 35	172 \pm 64	NS
HbA1c (%)	7,4 \pm 1,4	8,2 \pm 1,8	NS
Colesterol Total (mg/dl)	216 \pm 50	230 \pm 56	NS
HDL colesterol (mg/dl)	44 \pm 12	44 \pm 9	NS
LDL colesterol (mg/dl)	142 \pm 45	147 \pm 51	NS
Triglicerídios (mg/dl)	142 \pm 64	201 \pm 170	NS
PA Sistólica (mmHg)	122 \pm 10	149 \pm 26	<0,001
PA Diastólica (mmHg)	77 \pm 7	87 \pm 10	0,001
Log EUA	1,2 \pm 0,5	2,2 \pm 0,9	<0,001
Log TGF- β_1 /Cr	1,4 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3	0,008

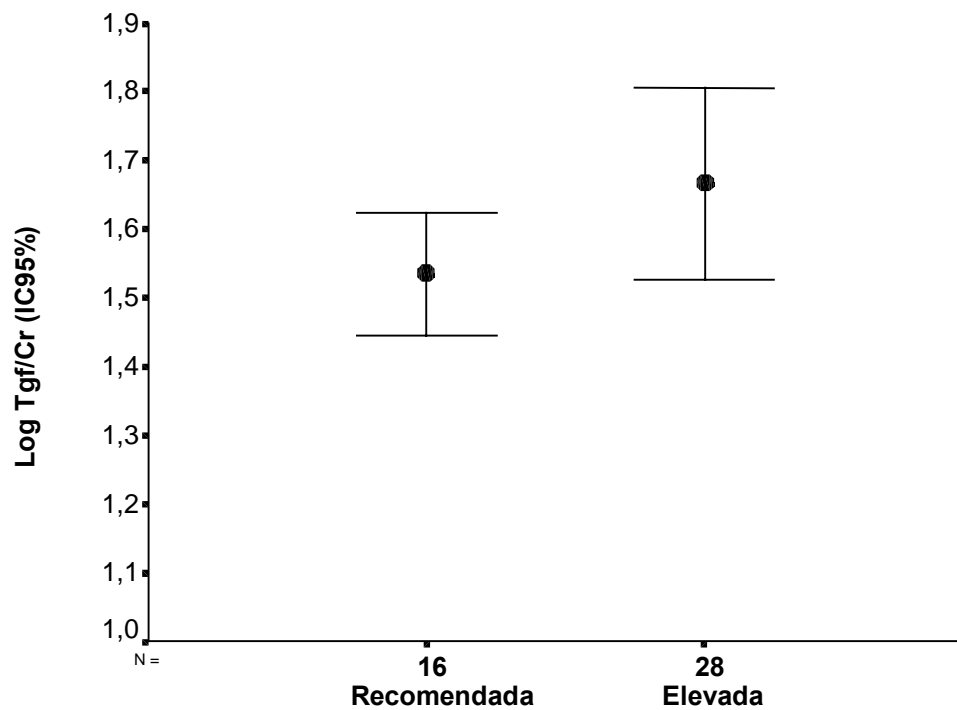


$r = 0,31$; $p = 0,04$

Figura 1: Correlação entre o Log da EUA e o Log do TGF- β_1 /Cr.



2.a) $**r=0,39; p = 0,01$



2.b) $p=0,175$

Figura 2: Log do TGF- β_1 /Cr versus diagnóstico prévio de HAS (2.a) e Log do TGF- β_1 /Cr versus PA Recomendada e PA Elevada (2.b).

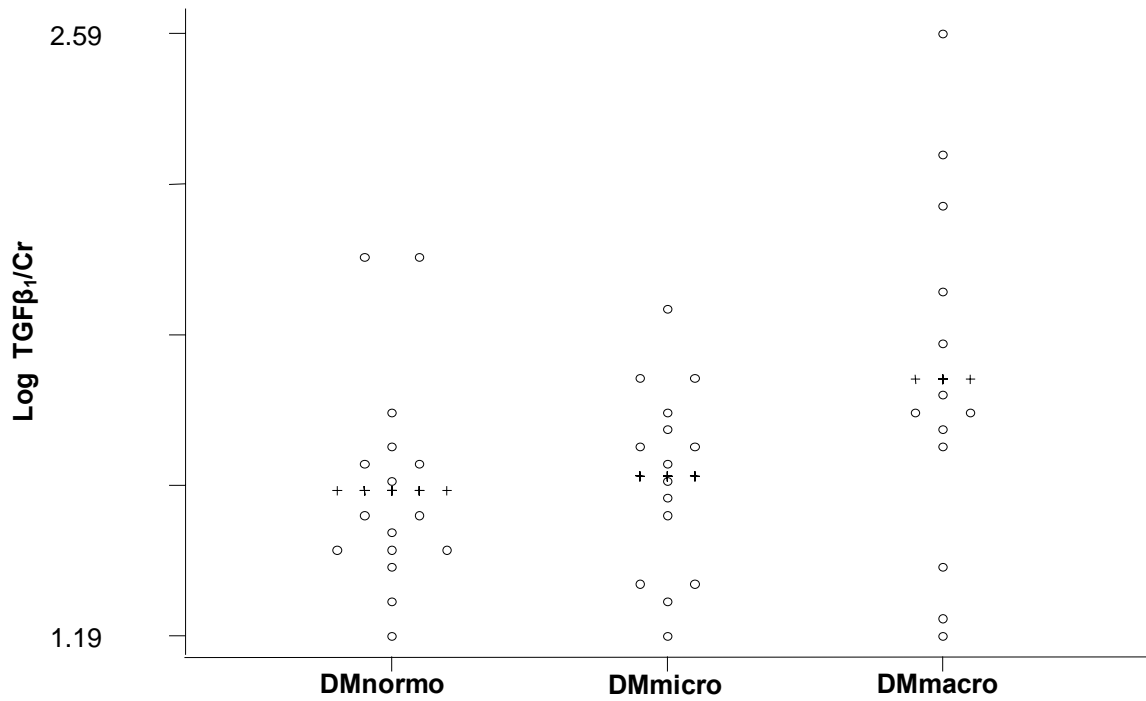


Figura 4: Níveis urinários de TGF- β₁/Cr (pg/mg) de acordo com a ocorrência de normo(DMnormo), micro (DMmicro) e macroalbuminúria (DMmacro). A linha do sinal (+) representa a média; p = 0,053.

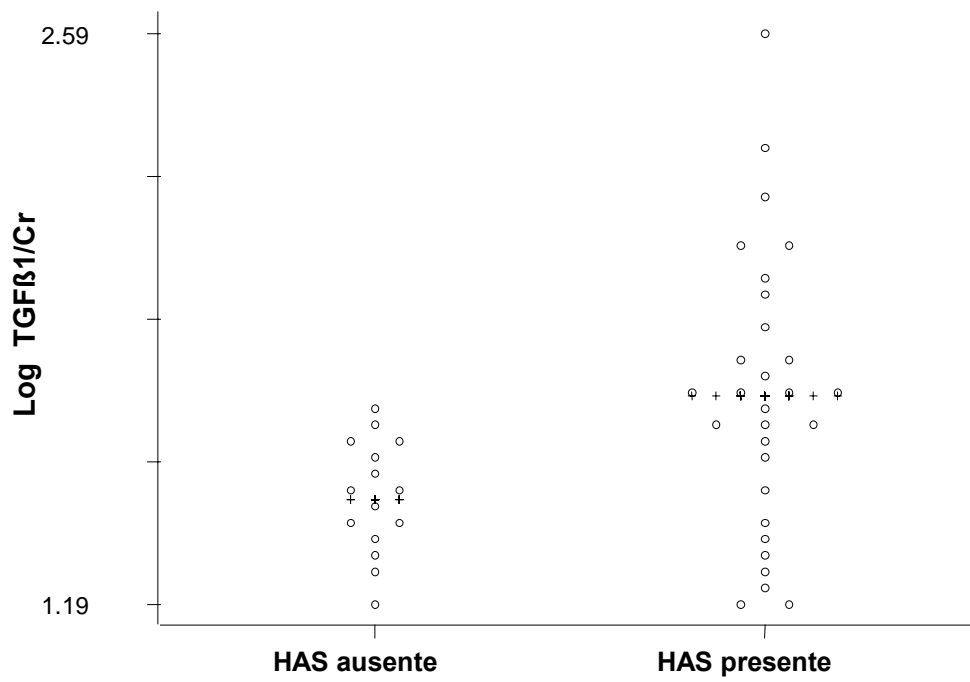


Figura 6: Níveis urinários de TGF- β 1/Cr (pg/mg) de acordo com a ausência ou presença de HAS. A linha do sinal (+) representa a média; $p < 0,001$.

ANEXO

INFORMAÇÕES AO PACIENTE E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Níveis Urinários de TGF- β_1 em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2: Impacto da Hipertensão Arterial Sistêmica.

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode interromper sua participação durante o estudo, a qualquer momento, sem qualquer penalidade. Seus dados médicos serão tratados como confidenciais pelo médico do estudo e equipe e os dados obtidos deste estudo que não o identificarem individualmente poderão ser publicados.

Por meio deste você autoriza a Dr^a Helena Schmid e/ou seus assistentes a realizar em sua pessoa o estudo abaixo descrito.

Resumo do Estudo:

Justificativa para a realização do presente estudo:

Em mais ou menos um terço das pessoas com Diabetes pode ocorrer doença renal. A doença dos rins da pessoa com Diabetes é o principal motivo pelo qual pacientes com Diabetes Mellitus necessitam entrar em programas de diálise e transplante dos rins. A primeira evidência desta doença nos rins é o aparecimento, na urina, de valores anormais de proteína na urina, a albumina (microalbuminúria).

Existem estudos demonstrando que a progressão da doença renal e outras complicações do Diabetes podem ser retardadas através do controle dos níveis de açúcar (glicose) no sangue e do controle da pressão arterial.

Objetivo do Estudo:

O objetivo é testar a hipótese de que pessoas com Diabetes apresentam uma alteração na sua urina a qual deve estar relacionada ao controle da glicose e da pressão arterial. Esta

alteração corresponde a um aumento dos níveis urinários de uma proteína, Fator Modulador do Crescimento (TGF- β 1) na urina, o qual talvez seja um marcador precoce de doença renal.

Delineamento:

Será realizado um estudo envolvendo pessoas de 30 a 75 anos com diabetes e pessoas sem diabetes e sem hipertensão.

Os participantes com diabetes serão avaliados para os níveis urinários de TGF- β 1 (medido na urina), perfil dos lipídeos, creatinina e glico-hemoglobina (medidos no sangue). Como você já deve saber, a dosagem da glico-hemoglobina é utilizada para verificar se o controle dos níveis de açúcar no sangue está adequado.

Os participantes sem diabetes serão avaliados para os níveis urinários de TGF- β 1 (medido na urina), e glicose (medida no sangue).

Procedimentos utilizados:

Na sua primeira consulta, se você concordar em participar deste estudo, você passará por um exame físico e deverá contar sua história médica e os tratamentos que vem utilizando. Se você não sabe se tem diabetes realizará um teste de glicose que envolve a retirada de uma gota de sangue.

Duas semanas após a primeira visita será feita a segunda visita em que, se você estiver apto a participar do estudo, será coletada uma amostra de urina (semelhante a de um exame normal de urina) e serão solicitados exames que exigem a retirada de aproximadamente 14 ml de sangue.

Riscos Potenciais:

Poderá ocorrer mancha ou dor no local da coleta de sangue.

Consentimento propriamente dito:

Após a leitura e compreensão das informações contidas neste Consentimento Livre e Esclarecido, e de todas as minhas dúvidas terem sido respondidas, concordo voluntariamente em participar deste estudo de pesquisa .

Estou certo de que posso desistir deste estudo a qualquer momento e de que circunstâncias podem ocorrer as quais podem determinar que minha participação seja interrompida pelos investigadores.

Caso eu ou meus familiares necessitem de mais algum esclarecimento poderei entrar em contato com a equipe de pesquisa pelos números: 3332-9409 ou 3214-8073.

Uma cópia deste documento de Informação e Consentimento Livre e Esclarecido me será fornecida.

Nome do paciente

Assinatura

Local e data

Nome do médico e CRM

Assinatura

Local e data