Tatiana Souza Pelaes

Análise longitudinal de uma coorte de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 para caracterização da taxa de declínio da função renal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pelaes, Tatiana Souza
Análise longitudinal de uma coorte de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 para caracterização da taxa de declínio da função renal / Tatiana Souza Pelaes. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 1 2.Taxa de filtração glomerular 3.Doença renal crônica 4.Incidência 5.Prevalência 6.Tiorredoxina 7.Microglobulina beta-2

USP/FM/DBD-330/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho:

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por estar sempre ao meu lado, colocando pessoas maravilhosas no meu caminho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lucia Cardillo Corrêa-Giannella. Admiro muito você. Sempre presente e atenciosa. Obrigada por ter me apoiado e incentivado a continuar no período em que vivi o momento de maior fragilidade da minha vida.

À Dra Márcia Queiroz, com quem aprendi muito do ambulatório de Diabetes. Você despertou em mim a vontade de aprofundar meu conhecimento na área. Receba todo o meu carinho.

Aos meus pais, Evaldo e Marise, que sempre me ensinaram a importância dos meus estudos, desde à escola, faculdade e residência. Obrigada pela ajuda com as planilhas e correções de textos. Obrigada por todo o carinho, cuidado e dedicação à nossa família.

Aos meus irmãos, Thaís e Thiago, por todo companheirismo. Essa conquista reflete uma vitória de toda a nossa família.

À minha amiga Daniele Santos-Bezerra, por ter deixado meus dias mais leves com nossos almoços felizes. Sua alegria transborda, amiga.

À Maria Beatriz Monteiro, que me ensinou na prática a importância da biologia molecular. Obrigada por toda a ajuda e orientação nos experimentos. Você tornava as coletas de urina mais divertidas.

À Karina Thieme, que ajudou a identificar e corrigir os erros dos meus experimentos.

Aos amigos da residência que entraram logo na pós-graduação, Marilena

Nakaguma, Mirela Miranda, Nathalie Oliveira, Carlos Minanni, Edoarda Albuquerque e Aécio Lira. Partilhamos momentos de dificuldades e vitórias.

Aos “Malunos”, Daniele Santos Bezerra, Maria Beatriz Monteiro, Karina Thieme, Sharon Admoni, Gustavo Daher, Juliana Zucare, Marcos Tadashi e Ricardo Perez. Formamos um grupo leve e descontraído, como nossa orientadora.

Aos amigos da residência, Ana Luiza Cardoso, Cláudia Schmidt, Carlos Minanni, Marilena Nakaguma, Mirela Miranda, Nathalie de Oliveira, Christiane Gruetzmacher, Iara Bento, Edoarda Albuqueque e Sandra. Obrigada pela amizade e troca de experiências

À Dra Gisele Sampaio e ao Dr Feres Chaddad que, além de se dedicarem ao meu tratamento e acompanhamento, também incentivaram a conclusão deste projeto.

À minha terapeuta, Alessandra Lemes, que sempre me acolhe e me aconselha.

Aos meus amigos do Hospital São Luiz, Mônica Tourinho, Camila Chiavoni e Rafael Shiraiwa, por entenderem meus momentos de ausência e pedido de ajuda nas visitas hospitalares.

À Carmen Laís e Raiane Crespo, minhas R1s que viraram amigas muito queridas.

À Lígia Battaini, por tirar minhas dúvidas de nefrologia.

Agradeço por todas as adversidades vividas após o término da residência. Ser médica e paciente, estar do outro lado, não é fácil. No entanto, aprendi a entender melhor as dificuldades dos pacientes. Hoje, consigo oferecer um atendimento mais humanizado.

Superação e gratidão definem minha trajetória até aqui.

Depois de dois acidentes vasculares cerebrais hemorrágicos, seis neurocirurgias, inúmeras internações e do trabalho exaustivo no hospital durante a pandemia de COVID-19, consegui finalizar mais um ciclo da minha vida.

“A gratidão é a memória do coração.”
(Autor desconhecido)

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Summary
1 INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Doença renal diabética..... 2
1.2 Etiopatogenia da doença renal diabética..... 5
1.2.1 Fatores metabólicos..... 6
1.2.2 Fatores hemodinâmicos..... 7
1.2.3 Fatores inflamatórios..... 8
1.2.4 Fatores genéticos..... 9
1.3 Marcadores de risco para o declínio da função renal..... 10
1.4 Sistema tiorredoxina (TXN) e a proteína de interação com a TXN (TXNIP)... 11
1.5 Beta-2 microglobulina 14
2 OBJETIVOS..... 16
3 MÉTODOS..... 18
3.1 População estudada..... 19
3.2 Características clínicas..... 20
3.3 Exames laboratoriais..... 21
3.4 Diagnóstico das complicações crônicas do diabetes Tratamento endovascular..... 22
3.5 Doença renal diabética..... 23
3.6 Avaliação longitudinal da função renal..... 24
3.7 Expressão de mRNA alvos no sedimento urinário..... 25
3.8 Aspectos éticos..... 26
3.9 Análise estatística..... 27
4 RESULTADOS..... 29
4.1 Casuística..... 30
4.2 Desfechos da doença renal e tempo de seguimento..... 33
4.3 Dinâmica da TFG..... 36
4.4 Fatores associados ao declínio renal..... 39
4.5 Associação entre albuminúria e doença cardiovascular..... 45
4.6 Avaliação da expressão do mRNA dos genes TXNIP, B2M e TXN..... 46
5 DISCUSSÃO..... 53
6 CONCLUSÃO..... 64
7 ANEXOS..... 66
8 REFERÊNCIAS..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs	Produtos finais de glicação avançada *(Advanced Glycation End-pducts*)
B2M	Beta-2 microglobulina
BRA	Bloqueadores do receptor de angiotensina II
CCR2	Receptor de quimiocina CC2
cDNA	DNA complementar
CKD-EPI	*Chronic Kidney Disease Collaboration*
DCCT	*Diabetes Control and Complications Trial*
DCV	Doença cardiovascular
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes tipo mellitus 2
DP	Desvio padrão
DRC	Doença renal crônica
DRD	Doença renal diabética
DRLA	Declínio renal lento ou ausente
DRM	Declínio renal moderado
DRR	Declínio renal rápido
DRT	Doença renal terminal
EDIC	*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications*
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Excreção urinária de albumina
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1 (*Glucagon like peptide 1*)
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL-c	Colesterol na lipoproteína de alta densidade
HF	Alta frequência
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HR	*Hazard ratio*
IC	Intervalo de confiança
iECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IIQ	Intervalo interquartílico
IMC	Índice de massa corpórea
KDIGO	*Kidney Disease Improving Global Outomes*

LDL-c	Colesterol na lipoproteína de baixa densidade
LF	Baixa frequência
MCP1	Sistema proteína quimiotática de monócitos-1
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase
NAC	Neuropatia autonômica cardiovascular
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NDS	*Neuropathy Disability Score*
NFkB	Fator nuclear kappa B
NGSP	*National Glyco Hemoglobin Standardization Program*
NLRP3	*NLR family pyrin domain containing 3*
NP	Neuropatia periférica
NSS	*Neuropathy Symptoms Score*
PKC	Proteína cinase C
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RAGEs	Receptores dos produtos finais de glicação avançada (*AdvancedGlycation End-products*)
RD	Retinopatia diabética
RDNP	Retinopatia diabética não prolilerativa
RDP	Retinopatia diabética prolilerativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SGLT2	Cotransportador sódio-glicose tipo 2
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TGFβ1	Fator de crescimento transformante β1
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral 1
TNFR2	Receptor do fator de necrose tumoral 2
TXN	Tiorredoxina
TXN1	Tiorredoxina clássica ou citosólica
TXN2	Tiorredoxina isoforma mitocontrial
TXNDC2	Tiorredoxina isoforma
TXNIP	Proteína de interação com a tiorredoxina (*Thioredoxin-interacting protein*)
VLF	Muito baixa frequência

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 31

Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 no início do seguimento

Tabela 2 32

Classes de medicamentos mais utilizadas pelos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 no início e ao final do seguimento

Tabela 3 33

Proporção de indivíduos com albuminúria A1, A2 ou A3, de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada, no início e ao final do seguimento

Tabela 4 41

Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal

Tabela 5 43

Características demográficas e clínicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal

Tabela 6 46

Distribuição da classificação da albuminúria nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 com e sem doença cardiovascular

Tabela 7 47

Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do seguimento do subgrupo de indivíduos incluídos na análise da expressão gênica das células do sedimento urinário

Tabela 8 48

Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do seguimento do subgrupo de indivíduos incluídos na análise da expressão gênica das células do sedimento urinário, classificados de acordo com a velocidade de declínio da taxa de filtração glomerular estimada

Tabela 9 50

Expressão dos genes *TXNIP*, *B2M* e *TXN* nos grupos de indivíduos com ou sem declínio da função renal

Tabela 10 51

Impacto da expressão dos genes *TXNIP, B2M* e *TXN* sobre o declínio da função renal

Tabela 11 52

Impacto da expressão dos genes *TXNIP, B2M* e *TXN* sobre o declínio da função renal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 33

Tempo de seguimento (em anos) dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo

Figura 2 34

Casos prevalentes e incidentes de doença renal diabética (DRD) e de doença renal terminal (DRT) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo

Figura 3 35

Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal diabética (DRD) nos indivíduos que não apresentavam DRD no início do seguimento

Figura 4 36

Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal terminal (DRT) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo

Figura 5 37

Distribuição das medidas de taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) inicial e final nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo

Figura 6 38

Distribuição do declínio da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo

Figura 7 39

Evolução da taxa de filtração glomerular estimada de cada um dos indivíduos classificados em cada um dos padrões de declínio da função renal

Figura 8 39

Evolução da média (intervalo de confiança de 95%) da taxa de filtração glomerular estimada de acordo com o padrão de declínio renal

Figura 9 45

Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal diabética (DRD) nos indivíduos que não apresentavam DRD no início do seguimento, de acordo com o padrão de declínio da função renal

Figura 10 49

Mediana e intervalo interquartílico da expressão dos genes *thioredoxin-interacting protein* (*TXNIP*), beta-2-microglobulina (*B2M*) e tioredoxina (*TXN*) normalizada pela expressão do gene *ELF1* no sedimento urinário dos indivíduos estudados

RESUMO

Pelaes TS. *Análise longitudinal de uma coorte de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 para caracterização da taxa de declínio da função renal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A doença renal diabética (DRD) é uma das principais causas de mortalidade em indivíduos com diabetes mellitus (DM), sendo a principal causa de doença renal terminal (DRT) no mundo. Estima-se que 20 a 30% dos indivíduos com DM desenvolvem DRD e acredita-se que, mesmo com o uso das terapias nefroprotetoras, a incidência de DRT não esteja diminuindo. A microalbuminúria é empregada como um marcador precoce de acometimento renal no DM. No entanto, devido a sua incapacidade de prever a evolução da DRD, novos biomarcadores de lesões glomerulares e/ou tubulares têm sido estudados. A expressão de alguns RNA mensageiros (mRNAs) no sedimento urinário tem sido investigada como potencial biomarcador da taxa de declínio da função renal e nosso grupo de pesquisa já propôs dois mRNAs-alvo, o do gene *TXNIP*, que codifica a proteína de interação com a tiorredoxina, e o do gene *B2M*, que codifica a beta-2 microglobulina. Considerando a escassez de dados acerca da progressão da DRD em nossa população e a importância de investigar marcadores preditivos da taxa de declínio da função renal, o presente trabalho realizou uma análise longitudinal da função renal de indivíduos com DM tipo 1 (DM1), acompanhados em um hospital terciário, para determinar (1) a taxa de declínio da função renal, identificando os fatores a ela associados e (2) se a expressão do mRNA dos genes *TXNIP*, *TXN* e *B2M* nas células do sedimento urinário de indivíduos com DM1 influencia a taxa de declínio da função renal. Um total de 465 indivíduos com DM1 foram incluídos (55,3% do sexo feminino; idade

média de 31,0 [± 11,3] anos; duração da doença de 18,0 [± 9,7] anos e HbA1c média de 8,8 [± 2,1] % no início do seguimento). Os tempos médio e mediano de seguimento clínico foram de 8,9 e 10 anos, respectivamente. No início do seguimento, 100 indivíduos (21,5%) apresentavam DRD. A incidência acumulada de DRD foi de 28,2% e a densidade de incidência foi de 2,47 por 100 pessoas-ano. O tempo médio até a ocorrência da DRD foi de 13,6 anos. A incidência acumulada de DRT foi de 15,6% e a densidade de incidência do evento foi de 1,82 por 100 pessoas-ano; o tempo médio até a ocorrência de DRT foi de 14 anos. O declínio médio anual observado na taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foi de - 6,15 mL/min/1,73m^2 e o declínio mediano foi de -2,43 mL/min/1,73m^2. Um declínio anual > -7,0 mL/min/1,73m^2 foi caracterizado como declínio renal rápido (DRR) e foi observado em 26,9% dos indivíduos; um declínio entre - 6,9 e - 2,43 mL/min/1,73m^2 foi caracterizado como declínio renal moderado (DRM), observado em 23,2% dos indivíduos e um declínio acima da mediana foi caracterizado como declínio renal lento ou ausente (DRLA) e foi observado em 49,9% dos indivíduos. Os fatores associados ao DRR em relação ao DRLA foram: pior controle glicêmico, maior albuminúria, maior frequência de hipertensão arterial, dislipidemia, neuropatia autonômica cardiovascular, hiperfiltração e DRD no início do seguimento e menor duração do DM. As expressões dos mRNA de *TXNIP* e de *B2M* foram avaliadas em um modelo de regressão linear misto em um subgrupo de 46 indivíduos e modificaram significantemente a evolução da TFGe ao longo do tempo (β = -2,4 e P=0,010 para *TXNIP* e β = -27,1 e P=0,001 para a *B2M*). Em conclusão, na população de indivíduos com DM tipo 1 avaliada, 50% apresentaram um padrão de declínio renal rápido ou moderado, que se associou a um pior controle glicêmico e à

presença de outras comorbidades. Os mRNAs de *TXNIP* e de *B2M* no sedimento urinário são candidatos a biomarcadores para predizer a progressão da DRD e requerem avaliação em coortes independentes.

Descritores: Diabetes mellitus tipo 1; Taxa de filtração glomerular; Doença renal crônica; Incidência; Prevalência; Tiorredoxina; Microglobulina beta-2.

SUMMARY

Pelaes TS. *Longitudinal analysis of a cohort of type 1 diabetes Mellitus individuals for characterization of renal function decline rate* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Diabetic kidney disease (DKD) is one of the leading causes of mortality in individuals with diabetes mellitus (DM), being the leading cause of end-stage renal disease (ESRD) worldwide. It is estimated that 20 to 30% of individuals with DM develop DKD and even with the use of nephroprotective therapies, the incidence of ESRD is not decreasing. Microalbuminuria is used as an early marker of renal impairment in DM. However, due to its inability to predict the evolution of DKD, new biomarkers of glomerular and/or tubular lesions have been studied. The expression of some messenger RNAs (mRNAs) in the urinary sediment has been investigated as potential biomarkers of the rate of renal function decline and our research group has already proposed two target mRNAs, *TXNIP*, which encodes thioredoxin interacting protein, and *B2M*, which encodes beta-2 microglobulin. Considering the scarcity of data on the progression of DKD in our population and the importance of investigating predictive markers of the rate of renal function decline, the present study performed a longitudinal analysis of the renal function of individuals with type 1 DM (T1D) followed at a tertiary hospital to determine (1) the rate of renal function decline, identifying the factors associated with it, and (2) whether the mRNA expression of *TXNIP*, *TXN* and *B2M* genes in cells of the urinary sediment of individuals with T1D influences the rate of renal function decline. A total of 465 individuals with T1D were included (55.3% female; mean age of 31.0 [± 11.3] years; disease duration of 18.0 [± 9.7] years and mean HbA1c of 8.8 [± 2.1] % at beginning of follow-up). The mean and

median times of clinical follow-up were 8.9 and 10 years, respectively. At the beginning of the follow-up, 100 individuals (21.5%) had DKD. The cumulative incidence of DKD was 28.2% and the incidence density was 2.47 per 100 person-years. The mean time until the occurrence of DKD was 13.6 years. The cumulative incidence of ESRD was 15.6% and the incidence density of the event was 1.82 per 100 person-years; the mean time to the occurrence of ESRD was 14 years. The mean annual decline observed in estimated glomerular filtration rate (eGFR) was -6.15 mL/min/1.73m^2 and the median decline was -2.43 mL/min/1.73m^2. An annual decline > -7.0 mL/min/1.73m^2 was characterized as rapid renal decline (RRD) and was observed in 26.9% of the individuals; a decline between -6.9 and - 2.43 mL/min/1.73m^2 was characterized as moderate renal decline (MRD) and was observed in 23.2% of the individuals, and a decline above the median was characterized as slow or absent renal decline (SARD) and was observed in 49.9% of the individuals. The factors associated with RRD in relation to SARD were: worse glycemic control, higher albuminuria; higher frequency of arterial hypertension, dyslipidemia, cardiovascular autonomic neuropathy, hyperfiltration and DKD at the beginning of the follow-up and shorter DM duration. *TXNIP* and *B2M* mRNA expressions were evaluated in a mixed linear regression model in a subgroup of 46 individuals and significantly modified eGFR evolution over time (β = -2.4 and P=0.010 for *TXNIP* and β = - 27.1 and P=0.001 for *B2M*). In conclusion, in the evaluated population of individuals with T1D, 50% had a pattern of rapid or moderate renal decline, which was associated with worse glycemic control and the presence of other comorbidities. The expression of

TXNIP and *B2M* mRNAs in the urinary sediment are candidates for biomarkers to predict DKD progression and require evaluation in independent cohorts.

Descriptors: Diabetes mellitus Type 1; Glomerular filtration rate; Chronic Renal Insufficiency; Incidence; Prevalence; Thioredoxin; Beta-2 microglobulin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença renal diabética

A doença renal diabética (DRD) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos com diabetes mellitus (DM) tipo 1 e tipo 2. Devido a sua crescente incidência, o DM tornou-se a principal causa de doença renal terminal (DRT) no mundo e a principal causa de doença renal crônica (DRC) em indivíduos ingressando em programas de diálise (1). Diferentemente de outros países, no Brasil, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a principal causa-base de indicação de diálise, seguida pela DRD (1, 2). Embora a taxa de complicações crônicas relacionadas ao DM tenha diminuído nas duas últimas décadas, ainda é grande o número de indivíduos afetados (3). No entanto, sua taxa de progressão diminuiu devido à melhora do controle glicêmico e pressórico (4).

Cerca de 20 a 30% dos indivíduos com DM desenvolvem DRD (5). Apesar da implementação quase universal das terapias nefroprotetoras e do controle glicêmico intensivo nos últimos anos, o risco de DRT em indivíduos com diabetes tipo 1 (DM1) não está diminuindo. A DRT continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade prematura nestes indivíduos (6), sugerindo que o tratamento otimizado do DM1 não tenha reduzido o risco global de DRT, mas sim adiado seu surgimento para uma idade mais avançada (7). Um estudo recentemente publicado com mais de 5.000 indivíduos com DM1 diagnosticados antes dos 50 anos, na Escócia, e acompanhados por um período mediano de 10 anos, mostrou uma incidência de DRT de 2,5 (intervalo de confiança [IC] 95% de 1,9 a 3,2) por 1.000 pessoas-ano. Neste período de seguimento, a mediana anual de declínio renal foi de - 1,3 mL/min/1,73 m^2 (intervalo interquartílico de -

2,2 a - 0,4) (8). No Brasil, não encontramos dados avaliando a incidência de DRD e de DRT em indivíduos com DM1.

Os custos globais de cuidados com estes indivíduos são altos, em grande parte devido ao desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV) e da DRT (1).

A visão clássica da história natural da nefropatia diabética, com evolução em cinco estágios, modificou-se. Historicamente, era descrita como iniciando com a hiperfiltração glomerular, evoluindo para a segunda fase, denominada "nefropatia silenciosa", caracterizada pela normoalbuminúria ou episódios intermitentes de microalbuminúria. Cerca de um terço dos indivíduos poderia progredir para a terceira fase, denominada "nefropatia incipiente", caracterizada por microalbuminúria persistente, seguida pelo quarto estágio chamado "nefropatia franca", caracterizado pela macroalbuminúria, declínio da taxa de filtração glomerular (TFG) e elevação da pressão arterial. Finalmente, ocorria a queda da TFG com progressão para DRT, a quinta e última etapa. O aumento da albuminúria geralmente era acompanhado pela progressão da retinopatia diabética (9).

Nas últimas décadas, um número crescente de evidências mostrou que a remissão/regressão da microalbuminúria é uma característica comum nos indivíduos com DM1 e DM tipo 2 (DM2), superando a progressão para proteinúria (10-12). Além disso, foi observado que a queda da TFG ocorre independentemente da albuminúria ou mesmo na ausência dessa. Vários estudos já relataram esta dissociação entre a diminuição da TFG e o aumento da albuminúria em indivíduos com DM1 e DM2 (9, 13).

Um estudo realizado em indivíduos com DM1 acompanhados por 4 a 10 anos (mediana de 8 anos), mostrou que o declínio da função renal (perda

progressiva da TFG ≥ 3,3% por ano) ocorreu em 10% dos indivíduos com normoalbuminúria e em 35% dos indivíduos com microalbuminúria. Em ambos os grupos, os principais determinantes de declínio da função renal foram as concentrações séricas de ácido úrico e do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) 1 ou 2 (TNFR1 ou TNFR2, respectivamente) no início do seguimento. Outros fatores de risco significantes incluíram a hemoglobina glicada (HbA1c) basal, idade, tempo de DM e pressão arterial sistólica (14).

A prevalência exata da DRC progressiva não-proteinúrica varia de acordo com a população estudada. Grande parte dos indivíduos com DM2 e cerca de 20 a 30% dos indivíduos com DM1 e DRC progressiva não apresentam microalbuminúria ou proteinúria significativa. Todos estes novos achados levaram a uma alteração no conceito da nefropatia diabética, que passou a ser denominada DRD, reservando-se o termo nefropatia diabética para as situações nas quais existam alterações histológicas determinadas pelo DM (4).

Dessa forma, um novo fenótipo clínico tem sido identificado em indivíduos com DM1 e DM2, caracterizado pelo "declínio precoce da função renal" que ocorre logo após ou mesmo antes do surgimento da albuminúria (9).

Assim, a microalbuminúria deixa de ser um estado permanente, sendo mais provável sua reversão para normoalbuminúria na presença de um bom controle glicêmico, pressórico e lipídico. É pouco provável que a reversão da microalbuminúria represente uma mudança estrutural no rim, mas pode refletir uma melhora hemodinâmica e/ou da função endotelial. Embora a microalbuminúria continue sendo um importante marcador da DRD, ela é incapaz de prever a progressão para DRT em todos os indivíduos. Assim, houve um aumento na busca por novos biomarcadores clínicos, capazes de identificar

os indivíduos tanto com risco de desenvolvimento, quanto de progressão da DRD (4, 15).

A recomendação atual para a classificação da DRD deve ser baseada na avaliação de duas variáveis contínuas, a TFG estimada (TFGe) e a excreção urinária de albumina (EUA). Mudanças na EUA são dinâmicas, enquanto mudanças na TFG são, geralmente, mas nem sempre, progressivas. Embora representem medidas diferentes de gravidade da doença renal, desempenham funções complementares (16, 17).

As estratégias atuais para o tratamento da DRD buscam alcançar um controle glicêmico ótimo, redução da pressão arterial e bloqueio do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Já está bem estabelecido que o controle da pressão arterial e a redução da proteinúria, por meio do bloqueio do SRAA, são fundamentais na prevenção da progressão da DRD e da doença renal não diabética (17, 18).

1.2 Etiopatogenia da doença renal diabética

Classicamente, a DRD era considerada resultado da interação entre fatores metabólicos e hemodinâmicos. No entanto, sabe-se que tanto determinantes genéticos, quanto determinantes ambientais, contribuem para desencadear uma complexa rede de eventos fisiopatológicos (19).

1.2.1 Fatores metabólicos

A hiperglicemia é o principal fator etiopatogênico das complicações do DM. Os mecanismos pelos quais exerce danos celulares já foram descritos, como a ativação da via dos polióis, da via da hexosamina, da via da proteína cinase C (PKC) e a formação dos produtos finais de glicação avançada (*Advanced glycation end-products*, conhecidos por AGEs). Os AGEs resultam da ligação não enzimática da glicose ou de açucares dicarbonila com o grupamento amina das proteínas. O estresse oxidativo é considerado o elemento unificador de todas essas vias na instalação das complicações microvasculares (20).

No meio intracelular, os AGEs exercem vários efeitos, tais como ativação de fatores de transcrição, como o NFkB, que regula a expressão de diversas citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β1 (TGFβ1), um dos principais responsáveis pela esclerose glomerular e fibrose túbulo-intersticial (19).

As mudanças estruturais características da nefropatia diabética, como espessamento da membrana basal glomerular e expansão mesangial, são acompanhadas por acúmulo de AGEs, que estão envolvidos na glomeruloesclerose e na fibrose intersticial. Além disso, a glicação de proteoglicanos sulfatados reduz a sua eletronegatividade, diminuindo, assim, as propriedades de filtração carga-seletiva da membrana basal. Finalmente, outro aspecto importante dos AGEs está relacionado a sua interação com uma grande variedade de receptores da superfície celular, tais como os RAGEs, que ativam vias pró-oxidantes e pró-inflamatórias (19).

1.2.2 Fatores hemodinâmicos

Estudos demonstraram que o estado hiperglicêmico prejudica o mecanismo fisiológico responsável pela regulação da pressão capilar glomerular que protege as estruturas intraglomerulares de alterações na pressão arterial sistêmica. O resultado final é a transmissão da pressão sistêmica ao capilar glomerular, com a consequente elevação da pressão hidrostática transcapilar e o desenvolvimento de hiperfiltração, que está associada com as alterações estruturais mais graves (19).

Um dos elementos mais importantes que participam na disfunção hemodinâmica no diabetes e na DRD é o SRAA, que está diretamente envolvido com a regulação da pressão arterial e do volume plasmático, e participa da lesão vascular e inflamação. Embora a aldosterona, a renina e vários produtos de degradação da angiotensina I estejam envolvidos na ativação do SRAA, a maioria dos efeitos em tecidos-alvo são mediados pela angiotensina II. A hiperglicemia induz a ativação do SRAA intrarrenal (por exemplo, nas células epiteliais tubulares, células mesangiais e podócitos) e aumenta a produção de angiotensina II, que exerce um efeito constritor preferencial na arteríola eferente glomerular, resultando em uma maior pressão capilar intraglomerular. Além disso, a angiotensina II, produzida localmente, ativa múltiplas vias de sinalização intracelular e induz a inflamação, crescimento de células renais, mitogênese, apoptose e diferenciação (19).

Recentemente, foi demonstrado que a hiperfiltração glomerular também resulta do aumento da reabsorção de sódio no túbulo contorcido proximal, em consequência da maior expressão do cotransportador sódio – glicose tipo 2

(SGLT2) que se estabelece no DM. O aumento da reabsorção proximal de sódio diminuiria a quantidade deste íon que chega na mácula densa, uma alteração que é interpretada como uma redução na volemia ao nível do aparelho justaglomerular. Como consequência, ocorre uma resposta de vasodilatação da arteríola aferente e consequente aumento da TFG (mecanismo que envolve, portanto, o *feedback* túbulo-glomerular) (21).

1.2.3 Fatores inflamatórios

Nos últimos anos, evidências crescentes têm enfatizado a importância da inflamação tanto na patogênese quanto na progressão da DRD. Já foi identificada infiltração de monócitos e expressão aumentada de moléculas de adesão celular, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias nos tecidos renais de indivíduos com DM e em animais com DM experimental. Estratégias direcionadas para a redução dos processos inflamatórios atenuaram ou preveniram o desenvolvimento da lesão renal em animais diabéticos, estabelecendo uma relação causal entre inflamação e o desenvolvimento da DRD. O sistema TNF/TNFR, o sistema proteína quimiotática de monócitos-1/receptor de quimiocina CC2 (MCP1/CCR2) e o sistema endocanabinoide desempenham um papel relevante nesse cenário (22).

1.2.4 Fatores genéticos

A hiperglicemia crônica e demais fatores de risco, como HAS e dislipidemia, têm sua participação bem estabelecida na etiopatogenia das complicações crônicas. No entanto, o surgimento das complicações crônicas em um dado indivíduo também é influenciado por sua susceptibilidade genética à injúria tecidual induzida pelas vias metabólicas desencadeadas pela hiperglicemia. Na prática clínica, pode-se observar indivíduos com grau de controle glicêmico e duração do DM similares que apresentam frequências diferentes de complicações (23).

Durante as últimas décadas, evidências crescentes confirmaram a participação de fatores genéticos no risco de desenvolvimento e na progressão da DRD, como a agregação familial da DRD e a concordância da gravidade da lesão glomerular em indivíduos de uma mesma família (24-26).

Variantes em inúmeros genes candidatos que participam de vias implicadas na etiopatogenia das complicações já foram investigados, como os genes relacionados à via dos AGEs, ao SRAA, à vias pró e antioxidantes, aos transportadores de glicose, entre muitos outros (23).

Considerando as dificuldades de adesão contínua ao tratamento intensivo, encontrar marcadores genéticos para o surgimento das complicações pode ajudar na identificação de indivíduos com DM1 que necessitam de um controle glicêmico mais (ou menos) rigoroso (23).

1.3 Marcadores de risco para o declínio da função renal

Historicamente, a microalbuminúria tem sido empregada como um marcador precoce de DRD, indicando maior risco de evolução para a DRC. No entanto, devido à incapacidade desta de prever adequadamente esta evolução, novos biomarcadores de lesões glomerulares e/ou tubulares têm sido estudados (27).

A utilização desses novos biomarcadores nos estágios iniciais da DRD oferece uma janela de oportunidade para intervenções preventivas e/ou terapêuticas que podem retardar o aparecimento de complicações irreversíveis no longo prazo (27).

Nos últimos 20 anos, observou-se um aumento na procura por biomarcadores capazes de identificar os estágios iniciais e o desenvolvimento das complicações vasculares (28). Técnicas laboratoriais avançadas que permitem a análise concomitante de múltiplos potenciais biomarcadores têm sido utilizadas, como a proteômica, a metabolômica, a transcriptômica e a avaliação do perfil de micro-RNAs, dentre outras. Apesar de seu potencial promissor, tais tecnologias ainda apresentam custo elevado e não estão amplamente disponíveis (29). Assim, a procura por novos biomarcadores validados pode trazer importantes benefícios na investigação e/ou tratamento das doenças renais (27, 30).

O biomarcador ideal deve ser quantificável em amostras biológicas de fácil acesso, como sangue e urina, deve ser sensível e específico; mostrar boa correlação com a progressão da doença de interesse, estratificação de risco e

informações de prognóstico; identificar possíveis mecanismos patogênicos para novas intervenções e apresentar uma boa relação custo-benefício (28).

É pouco provável que um único biomarcador possa prever a progressão da DRD e identificar todos os processos etiopatogênicos envolvidos. Portanto, um painel avaliando vários biomarcadores séricos e urinários parece ser uma abordagem mais adequada para melhor prever o desenvolvimento da doença renal (31).

A avaliação histopatológica dos rins é o padrão-ouro para detectar o desenvolvimento e progressão da DRD, no entanto, devido à natureza invasiva do procedimento e possíveis complicações associadas, não é realizada de rotina. Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular não invasivas tem ampliado a utilização da urina no estudo das doenças renais. Além de ser uma amostra órgão-específica, a urina é um material de fácil obtenção, que não requer preparo prévio do paciente nem qualquer intervenção para a sua coleta. O desenvolvimento de técnicas confiáveis para extração e avaliação de RNA mensageiro (mRNA) de células do sedimento urinário tem permitido o uso desse material na investigação de genes-alvo potencialmente envolvidos na patogênese de doenças renais de várias etiologias, que poderiam ser usados como biomarcadores (30, 32).

1.4 Sistema tiorredoxina (TXN) e a proteína de interação com a TXN (TXNIP)

O equilíbrio celular redox (redução/oxidação) é fortemente controlado pela atividade de vários sistemas antioxidantes, incluindo o da tiorredoxina (TXN), um

sistema tiol oxirredutase que compreende a TXN, a TXN redutase e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). A TXN é expressa em quase todas as espécies e desempenha um papel vital na regulação do status redox celular. Proteínas oxidadas pela interação com espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas a partir do metabolismo aeróbico são reduzidas pela atividade oxirredutase da TXN. A TXN oxidada neste processo é então reduzida pela NADPH (molécula doadora de elétron) pela ação da TXN redutase (33).

Existem três formas distintas de TXN, codificadas por genes distintos: a TXN clássica ou citosólica (TXN1), a isoforma mitocontrial (TXN2) e a isoforma TXNDC2, altamente expressa nos espermatozoides. Alterações deste sistema estão implicadas em diversas doenças, inclusive no DM (34).

A TXN é capaz de interagir com um grande número de fatores de transcrição e proteínas, como a proteína de interação com a TXN (*Thioredoxin-interacting protein*, TXNIP), importante na modulação dos seus efeitos biológicos. A TXNIP pode se ligar ao sítio catalítico da TXN reduzida, inibindo sua atividade e funcionando, assim, como um inibidor endógeno da TXN (35).

Nos últimos anos, entretanto, vários outros efeitos fisiológicos e patológicos foram atribuídos a TXNIP, que emergiu como um importante regulador do metabolismo da glicose e dos lípides, influenciando a liberação de insulina pelas células β pancreáticas, a produção hepática de glicose e a captação de glicose pelos tecidos periféricos, como o músculo e tecido adiposo. Já foi demonstrada também sua ação em algumas regiões do cérebro, regulando a utilização e o gasto energético. Além disso, variantes genéticas e alterações

epigenéticas no gene que codifica a TXNIP estão associadas a distúrbios metabólicos crônicos, como DM e HAS (33).

No contexto das complicações crônicas do DM, já se mostrou um aumento da expressão da TXNIP na retina (36), em neurônios sensoriais (37), em células mesangiais (38) e em podócitos (39), onde ela exacerba o estresse oxidativo existente. Adicionalmente, um aumento na expressão do mRNA do gene que codifica a TXNIP foi mostrado na nefropatia diabética de roedores (40, 41) e em biópsia renal de indivíduos com DM (41).

Esses achados motivaram a realização de um estudo para avaliar a expressão do mRNA dos genes que codificam a TXNIP (e a TXN) no sedimento urinário de indivíduos com DM1 com e sem DRD. Esse estudo evidenciou o aumento da expressão desses genes em indivíduos com DRD; maior expressão do mRNA de *TXNIP* foi encontrado em indivíduos que apresentaram um declínio da TFGe $\geq$ 5 mL/min/1,73m^2 após uma mediana de seguimento de dois anos (declinantes) em comparação aos indivíduos que apresentaram queda da TFGe < 5 mL/min/1,73m^2 (não declinantes) (35).

Além da participação de alterações metabólicas e hemodinâmicas no desenvolvimento da DRD, já se mostrou o envolvimento de vias inflamatórias e apoptóticas na progressão dessa condição clínica. A TXNIP está implicada nessas duas vias, pois é capaz de modular a via inflamatória (via produção de EROs e ativação do inflamassoma NLRP3) e a via apoptótica (via mTOR). E, de fato, a importância do sistema TXR-TXNIP tem sido reconhecida na progressão da DRD. O melhor entendimento desse mecanismo tem o potencial de resultar na utilização de moduladores da TXNIP como uma opção terapêutica no tratamento do DM e suas complicações (42).

A TXNIP atraiu considerável atenção devido às suas múltiplas funções no metabolismo energético e a modulação de sua atividade pode ser benéfica na prevenção ou tratamento do DM e de suas complicações. Agentes antidiabéticos como a insulina, a metformina e análogos do *glucagon like peptide* 1 (GLP1) inibem sua expressão (33, 42).

1.5 Beta-2 microglobulina

A beta-2 microglobulina (B2M) é uma proteína de baixo peso molecular produzida por todas as células que expressam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I (43). Ela é considerada um marcador substituto da TFG, uma vez que é filtrada livremente pelo glomérulo e quase completamente reabsorvida pelo túbulo proximal (44).

A avaliação da função renal baseia-se principalmente na estimativa da TFG calculada com o uso da creatinina sérica. Devido às limitações já conhecidas, vários marcadores começaram a ser estudados, como a B2M. Como sua excreção urinária é residual, a B2M tem sido considerada como um marcador de dano tubular quando sua excreção urinária se encontra elevada. Tal fato sugere que a doença tubular geralmente ocorre antes da queda da TFG (45).

Evidências crescentes têm mostrado a participação da tubulopatia diabética no desenvolvimento da DRD progressiva (43). Estudos já mostraram que as concentrações séricas e urinárias da B2M aumentam com a progressão da DRC e são particularmente elevadas em indivíduos com DRT (29).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa mostrou que a expressão do mRNA do gene que codifica a B2M nas células do sedimento urinário de indivíduos com DM1 e micro ou macroalbuminúria foi maior em comparação com indivíduos com DM1 com normoalbuminúria. Ademais, a expressão da B2M se correlacionou positivamente com a albuminúria (população geral de indivíduos) e negativamente com a TFGe (apenas nos indivíduos do sexo masculino). Neste mesmo estudo, células tubulares renais em cultura expostas a altas concentrações de glicose e/ou à albumina apresentaram aumento da expressão do mRNA de *B2M*, sugerindo que o aumento observado no sedimento urinário dos indivíduos com DM1 e albuminúria poderia refletir uma injúria túbulo-intersticial promovida pela albumina. Considerando a natureza pró-inflamatória da B2M, tal achado sugere que essa proteína contribui para a tubulopatia diabética (46).

Tendo em vista (1) a importância da DRD na morbidade e na mortalidade dos indivíduos com DM1, (2) a escassez de dados acerca da progressão da DRD na nossa população e (3) a importância de investigar marcadores que possam ter valor na predição da taxa de declínio da função renal, nos propusemos a realizar uma análise longitudinal da função renal de indivíduos com DM1 acompanhados em um hospital terciário, para contemplar os objetivos descritos a seguir.

2 OBJETIVOS

2.1 Avaliar as características demográficas, clínicas e laboratoriais de uma coorte de indivíduos com DM1 acompanhados em um hospital terciário, para determinar a taxa de declínio da função renal e identificar os fatores a ela associados.

2.2 Avaliar se a expressão do mRNA dos genes *TXNIP, TXN* e *B2M* nas células do sedimento urinário de indivíduos com DM1 influencia a taxa de declínio da função renal.

3 MÉTODOS

3.1 População estudada

Uma amostra de conveniência de 465 indivíduos com diagnóstico de DM1 acompanhados no Ambulatório de Diabetes do HCFMUSP, no período entre 2004 e 2021, foi incluída no presente estudo. Foram incluídos indivíduos com história de DM após os seis meses de vida, que precisaram de tratamento com insulina em menos de um ano após o diagnóstico, na presença de autoanticorpos positivos (anti-descarboxilase do ácido glutâmico) e/ou peptídeo C em valores baixos, de acordo com os valores de referência do laboratório, ou que apresentaram episódios de cetoacidose diabética. Não foram incluídos indivíduos com suspeita de DM monogênico ou portadores de doença renal de etiologia não diabética.

Para a avaliação da expressão dos genes-alvo estudados no sedimento urinário, foram selecionados indivíduos com diagnóstico de DM1 com idade entre 18 e 65 anos acompanhados no mesmo Ambulatório, no período entre 2005 e 2015. Foram excluídos indivíduos transplantados renais, anúricos, gestantes ou aqueles sem interesse em participar do estudo. Não foram incluídos indivíduos cujo mRNA do sedimento urinário apresentou baixa concentração ou má qualidade (degradação). Foram coletadas amostras de urina de 254 indivíduos com DM1 e, destas, apenas 46 amostras apresentaram qualidade e quantidade suficientes para utilização no estudo (47).

3.2 Características clínicas

Os seguintes dados foram coletados por meio da revisão dos prontuários médicos:

- Sexo;
- Idade;
- Idade ao diagnóstico;
- Tempo de DM;
- Peso;
- Estatura;
- Índice de massa corpórea (IMC);
- Hábitos (tabagismo).

As presenças de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e de dislipidemia foram registradas. A primeira foi definida como uma pressão arterial maior que 140 x 90 mmHg em pelo menos três medidas ou pelo uso de medicamentos anti-hipertensivos. A segunda foi definida como uso de estatina e/ou colesterol LDL superior a 100 mg/dL (48).

Também foram registrados o uso de medicamentos anti-hipertensivos (inibidores da enzima conversora da angiotensina [iECA], bloqueadores do receptor de angiotensina II [BRA], bloqueadores dos canais de cálcio, beta-bloquadores e diuréticos) e drogas hipolipemiantes (estatina ou fibrato).

3.3 Exames laboratoriais

Foram registrados os resultados dos seguintes exames laboratoriais:

- Glicemia de jejum;
- Média de dois valores de hemoglobina glicada (HbA1c);
- Creatinina sérica;
- Colesterol total;
- Conteúdo de colesterol na lipoproteína de alta densidade (HDL-c);
- Conteúdo de colesterol na lipoproteína de baixa densidade (LDL-c);
- Triglicérides;
- Microalbuminúria em amostra isolada de urina.

As metodologias utilizadas nas análises laboratoriais estão descritas a seguir:

- Glicemia de jejum – método enzimático hexoquinase.
- HbA1c - mensurada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e certificada pela NGSP-Estados Unidos da América (*National Glyco Hemoglobin Standardization Program*)
- Colesterol total e HDL-c: método enzimático colorimétrico automatizado.
- LDL-c: método cinético automatizado.
- Triglicérides: método enzimático colorimétrico automatizado.
- Creatinina sérica: método colorimétrico automatizado.

3.4 Diagnóstico das complicações crônicas do diabetes

As seguintes complicações crônicas do DM foram avaliadas: retinopatia diabética (RD), neuropatia periférica (NP), neuropatia autonômica cardiovascular (NAC), DRD e doença cardiovascular.

A avaliação da RD foi realizada com o uso de um retinógrafo (TOPCOM TRC-NW8), após a dilatação da pupila com colírio de tropicamida. Sete planos foram registrados (disco ótico, mácula, lateral temporal à mácula, súpero-nasal, temporal ao disco ótico, ínfero-temporal e nasal ao disco ótico), cujas imagens foram armazenadas e posteriormente avaliadas por um único oftalmologista, especialista em retina, que classificou as imagens utilizando os critérios da *International Clinical Classification of Diabetic Retinopathy* (49):

- RD não proliferativa (RDNP) leve: apenas presença de microaneurismas;
- RDNP moderada: presença de microaneurismas, exudatos e/ou micro hemorragias em menor número que a RDNP grave;
- RDNP grave: Presença de mais de 20 hemorragias intrarretinianas em cada um dos quatro quadrantes; “ensalsichamento” venoso em pelo menos dois quadrantes; anormalidades microvasculares intrarretinianas em pelo menos um quadrante;
- RD proliferativa (RDP): Presença de neovascularização, hemorragia vítrea ou hemorragia pré-retiniana.

O prontuário oftalmológico foi revisado naqueles indivíduos nos quais a retinografia não pôde ser realizada. Esta análise foi realizada uma única vez, no âmbito da tese de Doutorado do Dr. Ricardo Vessoni Perez (50).

O diagnóstico da NP foi definido pela associação do Escore de Comprometimento Neuropático - NDS *(Neuropathy Disability Score)* modificado e simplificado, com o Escore de Sintomas Neuropáticos - NSS *(Neuropathy Symptoms Score)* modificado (51). A neuropatia autonômica cardiovascular (NAC) foi diagnosticada por meio dos testes de Ewing (quatro) associados ao exame da análise espectral (programa Poly-Spectrum, índice HF [alta frequência]; índice VLF [muito baixa frequência] e índice LF [baixa frequência]). Para o diagnóstico de NAC instalada, os indivíduos deveriam apresentar pelo menos três dos sete testes alterados, enquanto os indivíduos com dois testes alterados foram considerados como portadores de NAC incipiente (52, 53). Estas análises foram realizadas uma única vez, no âmbito da tese de Doutorado da Dra. Sharon Nina Admoni (54) e da tese de Mestrado da Dra. Danielle Pereira Santos-Bezerra (55).

Foram considerados eventos cardiovasculares prévios: infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquêmico, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca (56).

3.5 Doença renal diabética

A DRD foi definida pelo aumento persistente da EUA (≥ 300 mg/g creatinina) e/ou pela queda da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe < 60 mL/min/1,73 m^2), de acordo com as diretrizes atuais da *Kidney Disease Improving Global Outomes* - KDIGO (57).

A TFGe foi calculada pelo uso da fórmula CKD-EPI *(Chronic Kidney Disease Collaboration)* (58). A EUA foi medida pela relação albumina/creatinina

(mg/g), pela metodologia de nefelometria, em pelo menos duas amostras isoladas de urina coletadas em um período de seis meses, ou em ao menos uma dosagem de proteinúria de 24 horas.

A excreção urinária de albumina foi definida como:

A1: < 30 mg/g (normal)

A2: 30-299 mg/g (microalbuminúria)

A3: ≥ 300 mg/g (macroalbuminúria) (57).

DRT foi definida como necessidade de terapia dialítica ou transplante de rim (17). Hiperfiltração foi definida como uma TFGe > 120 mL/min/1,73 m^2 nas mulheres e > 130 mL/min/1,73 m^2 nos homens (59).

3.6 Avaliação longitudinal da função renal

A avaliação longitudinal da função renal foi realizada pelo registro dos valores da creatinina sérica, para cálculo da TFGe, nas datas do primeiro e do último exame disponíveis para cada paciente, por meio da avaliação do prontuário eletrônico.

Para o cálculo da taxa de declínio da função renal, a diferença entre a TFGe mais recente e a TFGe mais antiga foi dividida pelo número de anos de seguimento (tempo mínimo de seguimento de um ano). Para algumas análises, foram considerados declinantes aqueles indivíduos com queda da TFGe ≥ 3,5 mL/min/1,73m^2 por ano (7).

3.7 Expressão de mRNA alvos no sedimento urinário

Amostras de urina foram coletadas em recipientes plásticos de 200 mL, estéreis, livres de RNases (Nunc Thermo Fisher). Uma alíquota de cada amostra foi submetida a um exame de urina 1 para detectar a presença de leucocitúria. As amostras com> 10 leucócitos por campo foram descartadas.

Logo após a coleta, cada recipiente foi mantido no gelo, submetido à centrifugação por 10 min, a 3.000 g, a 4ºC, para remoção de células e debris. O sobrenadante foi descartado e 1 mL do reagente Trizol (Thermo Fischer Scientific) e 1 mL de glicogênio (20 mg/mL) foram adicionados. A solução foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, agitada no vórtex por 15 s e deixada em repouso por 5 min em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio, a solução foi agitada em vórtex por mais 15 s e deixada em repouso por 5 min, em temperatura ambiente. Após centrifugação (10.000 Å ~ g, 15 min, 4 ° C), a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e um volume de isopropanol e 100 µL de acetado de sódio (3 M, pH 5,2) foram adicionados. Os tubos foram invertidos manualmente 4 vezes, mantidos no gelo por 30 min e depois centrifugados (10.000 Å ~ g, 20 min, 4 ° C). O sobrenadante foi descartado e os tubos foram lavados duas vezes com 1 mL de etanol 70% e centrifugados (10.000 Â ~ g, 10 min, 4 ° C). O sedimento de RNA foi seco manualmente por inversão de tubo e aspiração dos reagentes restantes por pipetagem cautelosa. O RNA total foi ressuspenso em 35 µL de água livre de RNase e transferido para um novo tubo de 1,5 mL (47).

A integridade e a quantidade do RNA total foram analisadas no equipamento BioAnalyzer Agilent 2100 com os estojos comerciais Agilent RNA

6000 Nano (Waldbronn, Alemanha). Os ensaios de expressão gênica no sedimento urinário foram feitos a partir de 100 ng de RNA total, convertidos para DNA complementar (cDNA) com o uso do estojo comercial *High Capacity RNA-to-cDNA* (Life Technologies). As reações de qPCR em tempo real foram realizadas em duplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies) com 10 ng de cDNA por reação, com o uso de sondas adquiridas no formato *Taqman Gene Expression Assays* (Life Technologies). Os valores de expressão dos genes *TXNIP*, *TXN* e *B2M* foram normalizados pela média de expressão do gene *housekeeping ELF1*. Foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e a média do grupo controle como amostra referência. Os valores foram transformados em log_{10} (47).

Para avaliar se a expressão do mRNA dos genes *TXNIP, TXN* e *B2M* nas células do sedimento urinário de indivíduos com DM1 influencia a taxa de declínio da função renal, foi realizado o registro de todos os valores de creatinina sérica disponíveis ao longo de todo o período de seguimento, a partir do primeiro exame disponível até o último exame (realizado em 2020 ou 2021), por meio da avaliação do prontuário eletrônico.

3.8 Aspectos éticos

O protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sob o número (CAAE 65391317.6.0000.0068), respeitando as diretrizes científicas vigentes. Os dados de expressão dos genes *TXNIP*, *TXN* e *B2M* no sedimento urinário foram obtidos no projeto de Doutorado da Dra. Maria

Beatriz Camargo Monteiro Caillaud, também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAAE 04027912.6.0000.0068). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.9 Análise estatística

O processo de análise de dados iniciou-se com uma exploração descritiva, incluindo frequência absoluta e relativa para os atributos qualitativos. A sumarização das medidas quantitativas discretas ou contínuas foi realizada com média, desvio padrão (DP), mediana, percentil 25 e percentil 75 para as medidas quantitativas. O teste de Kolmogorov–Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição de probabilidade dos atributos quantitativos.

Para estudar a distribuição das variáveis qualitativas de acordo com os grupos, foi empregado o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fischer quando necessário. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para a comparação de três grupos independentes. As comparações *post-hoc* foram ajustadas pelo método de Bonferroni. No caso de dependência entre as medidas, o teste de Wilcoxon, foi empregado.

O tempo livre de doença renal terminal foi calculado utilizando-se o método de Kaplan-Mayer. Para avaliar o declínio médio entre a primeira e a última medida da TFGe, um modelo de ANOVA de medidas repetidas de duas vias foi usado. Para avaliar o efeito dos fatores em estudo na taxa de declínio da função renal, modelos de regressão logística binária foram utilizados. Uma regressão de Cox univariada foi usada para avaliar a incidência acumulada e a densidade da DRD para os diferentes padrões de declínio da função renal. Para

avaliar o efeito dos fatores independentes, incluindo a expressão dos genes de interesse na evolução da TFGe, um modelo de regressão linear misto foi realizado.

Todos os testes realizados levaram em consideração um α bidirecional de 0,05 e um IC de 95%; as análises foram realizadas com apoio computacional dos *softwares* R (R Core Team), IBM SPSS 26 (*Statistical Package for the Social Sciences*) e Excel 2010® (Microsoft Office).

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

Um total de 465 indivíduos com DM1 foram incluídos no estudo. As características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do seguimento estão mostradas na Tabela 1. A maioria dos indivíduos incluídos (55,3%) era do sexo feminino; a média de idade no início do seguimento era de 31,0 (± 11,3) anos e o IMC médio de 23,4 (±3,6) kg/m^2. A HAS estava presente em 20,9%, a dislipidemia em 25,4% e tabagismo prévio e no momento do início do seguimento em 9,0 e 6,7% dos indivíduos, respectivamente. A idade ao diagnóstico de DM foi de 13,0 (± 8,7) anos, a duração da doença era de 18,0 (± 9,7) anos e a HbA1c média era de 8,8 (± 2,1) %. Em relação às complicações crônicas, 21,5% apresentavam DRD; 67,5% dos indivíduos foram classificados com albuminúria A1, 18,3% como A2 e 14,2% como A3. RD não proliferativa e proliferativa foram observadas em 37,5% e 29,7% dos indivíduos, respectivamente. A prevalência de NP foi de 40,1%, enquanto a prevalência de NAC incipiente foi de 11,3% e a da NAC instalada foi de 29,5%.

A média do colesterol total foi de 178,0 (± 47,0) mg/dL, sendo as médias de HDL-c e de LDL-c de 62,0 (± 18,0) mg/dL e de 98,0 (± 39,0) mg/dL, respectivamente e a média dos triglicérides de 89,0 (± 49,0) mg/dL.

A creatinina sérica apresentou uma média de 1,2 (± 1,4) mg/dL e mediana de 0,8 mg/dL, sendo o percentil 25 de 0,7 mg/dL e o percentil 75 de 1,0 mg/dL.

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 no início do seguimento.

Características clínicas e bioquímicas	**Média ± DP ou %**
Sexo feminino (%)	55,3
Idade no início do seguimento (anos)	31,0 ± 11,3
Peso (Kg)	63,5 ± 12,1
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	23,4 ± 3,6
Hipertensão arterial sistêmica (%)	20,9
Pressão arterial sistólica (mmHg)	123,0 ± 16,8
Pressão arterial diastólica (mmHg)	77,1 ± 11,3
Dislipidemia (%)	25,4
Tabagismo (prévio / início do seguimento) (%)	9,0 / 6,7
Colesterol total (mg/dL)	178,0 ± 47,0
HDL-c (mg/dL)	62,0 ±18,0
LDL-c (mg/dL)	98,0 ± 39,0
Triglicérides (mg/dL)	89,0 ± 49,0
Creatinina (mg/dL)	1,2 ±1,4
Status do diabetes	
Idade ao diagnóstico (anos)	13,0 ± 8,7
Duração do Diabetes (anos)	18,0 ± 9,7
HbA1c (%)	8,8 ± 2,1
Albuminúria (mg/g de creatinina)	292,0 ± 962,0
Albuminúria	
A1	67,5%
A2	18,3%
A3	14,2%
Doença renal diabética (%)	21,5%
Retinopatia diabética	
Ausente (%)	32,8
Não proliferativa (%)	37,5
Proliferativa (%)	29,7
Neuropatia periférica	40,1
Ausente (%)	59,9
Presente (%)	40,1
Neuropatia autonômica cardiovascular	
Ausente (%)	59,2
Incipiente (%)	11,3
Instalada (%)	29,5

HDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de alta densidade; LDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de baixa densidade; TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada.

Entre as classes de medicamentos mais utilizadas pelos indivíduos incluídos no estudo no início do seguimento, as estatinas (35,7%) e os iECA

(27,3%), foram os mais comumente usados, seguidos pelos diuréticos (13,8%) e pelos BRA (11,2%) (Tabela 2). Ao final do seguimento, o uso de estatinas ainda era o mais frequente, seguido pelos iECA, embora o percentual de uso de iECA em relação ao início do seguimento tenha caído quase 10%. No início do seguimento, 129 indivíduos (27,7%) estavam utilizando três ou mais medicações, enquanto no final do seguimento, 27,5% estavam nessa situação.

Tabela 2. Classes de medicamentos mais utilizadas pelos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 no início e ao final do seguimento.

Medicamento	Início do seguimento	Final do seguimento
Estatina	35,7%	33,8%
iECA	27,3%	19,4%
Diuréticos	13,8%	14,0%
BRA	11,2%	9,5%
Beta-bloqueadores	10,1%	9,0%

iECA: Inibidores da enzima conversora da angiotensina; BRA: bloqueadores do receptor de angiotensina II.

A proporção de indivíduos com albuminúria A1, A2 e A3 no início e ao final do seguimento, nos indivíduos com TFGe > 60 mL/min/1,73 m^2 ou $\leq$ 60 mL/min/1,73 m^2 está mostrada na Tabela 3.

Nos indivíduos que apresentaram TFGe > 60 mL/min/1,73 m^2 no início do seguimento, 71,8% apresentaram albuminúria A1, 18,5% apresentaram albuminúria A2 e 9,7% albuminúria A3. Nos indivíduos com TFGe $\leq$ 60 mL/min/1,73 m^2 no início do seguimento, 22,2% apresentaram albuminúria A1, 16,7% A2 e 61,1% apresentaram albuminúria A3.

Tabela 3. Proporção de indivíduos com albuminúria A1, A2 ou A3, de acordo com a taxa de filtração glomerular estimada, no início e ao final do seguimento.

TFGe	A1	A2	A3	Valor de *P*

Início do seguimento				
≤ 60 mL/min/1,73 m^2 (%)	2,9	8,0	37,9	**<0,001**
> 60 mL/min/1,73 m^2 (%)	97,1	92,0	62,1	
Final do seguimento				
≤ 60 mL/min/1,73 m^2 (%)	2,7	15,3	28,8	**<0,001**
> 60 mL/min/1,73 m^2 (%)	97,3	84,7	71,2	

TFGe: Taxa de filtração glomerular estimada.

4.2 Desfechos da doença renal e tempo de seguimento

Ao final do seguimento, a duração do DM era de 30,2 (± 9,9) anos. O tempo médio total de seguimento clínico foi de 8,9 (± 5,0) anos. A mediana do tempo de seguimento foi de 10 anos, com um percentil 25 de 5 anos e um percentil 75 de 14 anos. Nesse período de acompanhamento, a coorte acumulou um total de 4.158 anos. O histograma representado na Figura 1 mostra elevada densidade de indivíduos com tempo de seguimento variando entre 12,5 e 15 anos, com cerca de 200 indivíduos neste intervalo.

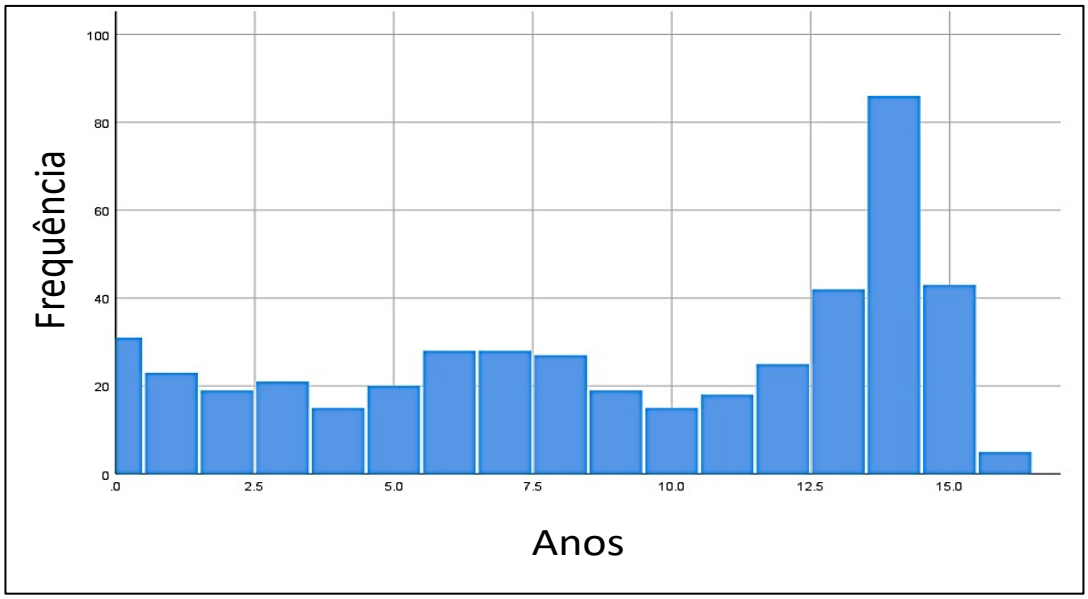


Figura 1. Tempo de seguimento (em anos) dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo.

No início do seguimento, 100 indivíduos (21,5%) apresentavam DRD (TFGe < 60 mL/min/1,73 m^2 e/ou albuminúria A3). Deste conjunto, 56 indivíduos

(56%) evoluíram para DRT (diálise ou transplante) nos anos seguintes. Dos 44 indivíduos com DRD que continuaram em seguimento, 5 (11,3%) progrediram para DRT ao final do seguimento. Entre os 365 indivíduos sem DRD no início do seguimento, 103 (28,2%) desenvolveram DRD nos anos seguintes, e destes, 12 (11,6%) evoluíram para DRT. A incidência acumulada de DRD no estudo foi de 28,2% e a densidade de incidência foi de 2,47 por 100 pessoas-ano (IC95% 2,03 - 2,99) (Figura 2). O tempo médio até a ocorrência da DRD foi de 13,6 anos (IC95% 13,1 anos – 14,0 anos). O tempo livre (anos) até a ocorrência de DRD nos indivíduos que não apresentavam DRD no início do seguimento está mostrado na Figura 3.

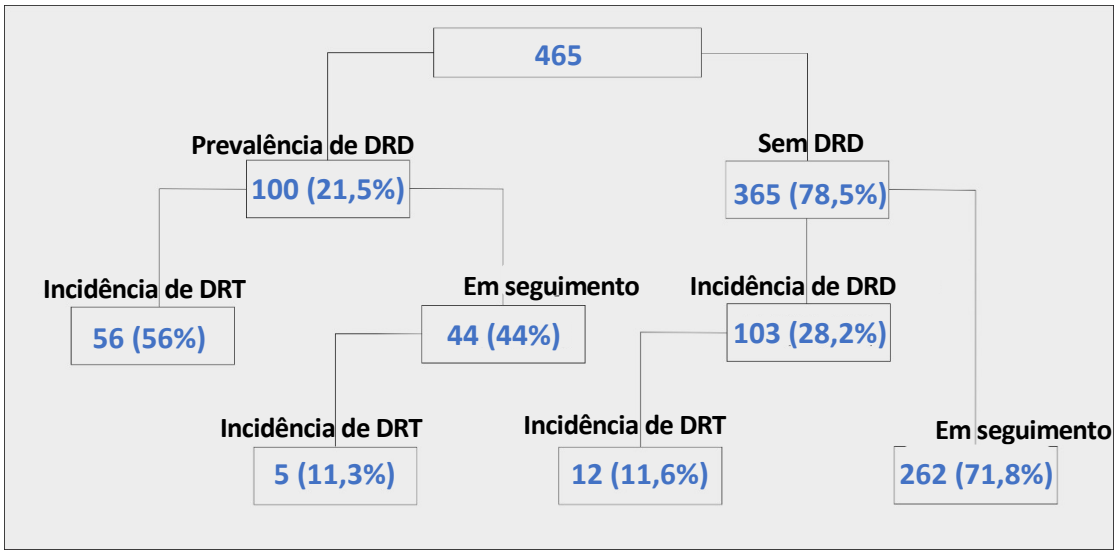


Figura 2. Casos prevalentes e incidentes de doença renal diabética (DRD) e de doença renal terminal (DRT) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo.

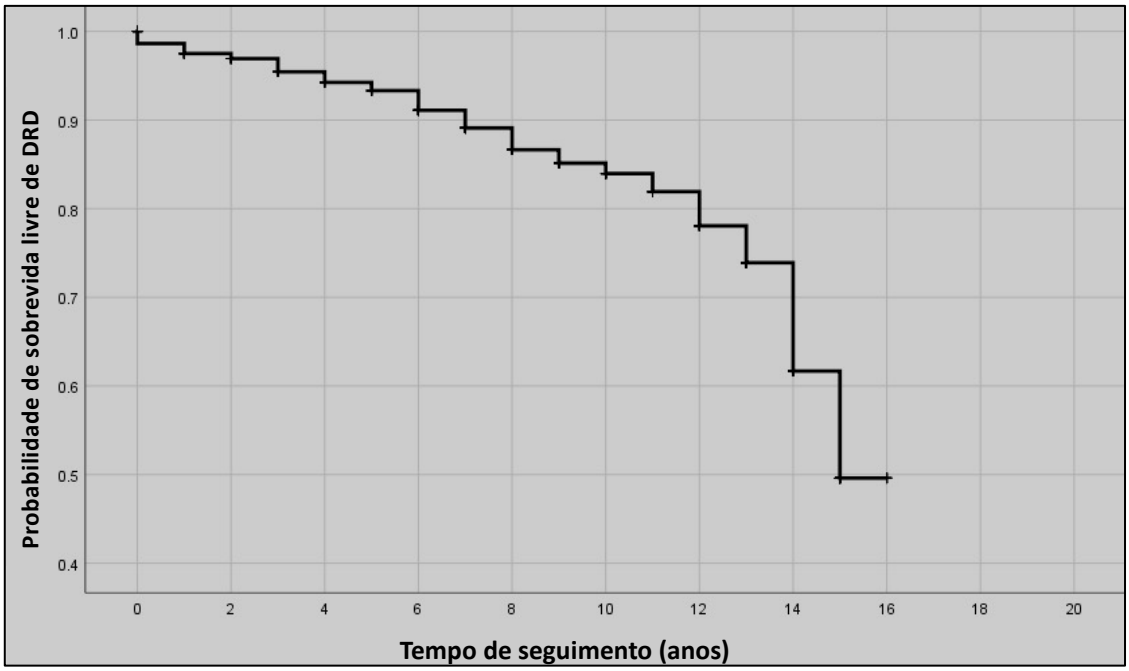


Figura 3. Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal diabética (DRD) nos indivíduos que não apresentavam DRD no início do seguimento.

Entre os indivíduos estudados, 73 (15,6%) evoluíram para DRT. O tempo médio até a ocorrência de DRT foi de 14 anos (IC95%13,6 anos - 14,4 anos). A incidência acumulada de DRT foi de 15,6% e a densidade de incidência do evento foi de 1,82 por 100 pessoas-ano (IC95%1,45 - 2,27). A Figura 4 apresenta a curvas de tempo livre até a ocorrência de DRT. Todos os casos de transplante ocorreram após início de diálise.

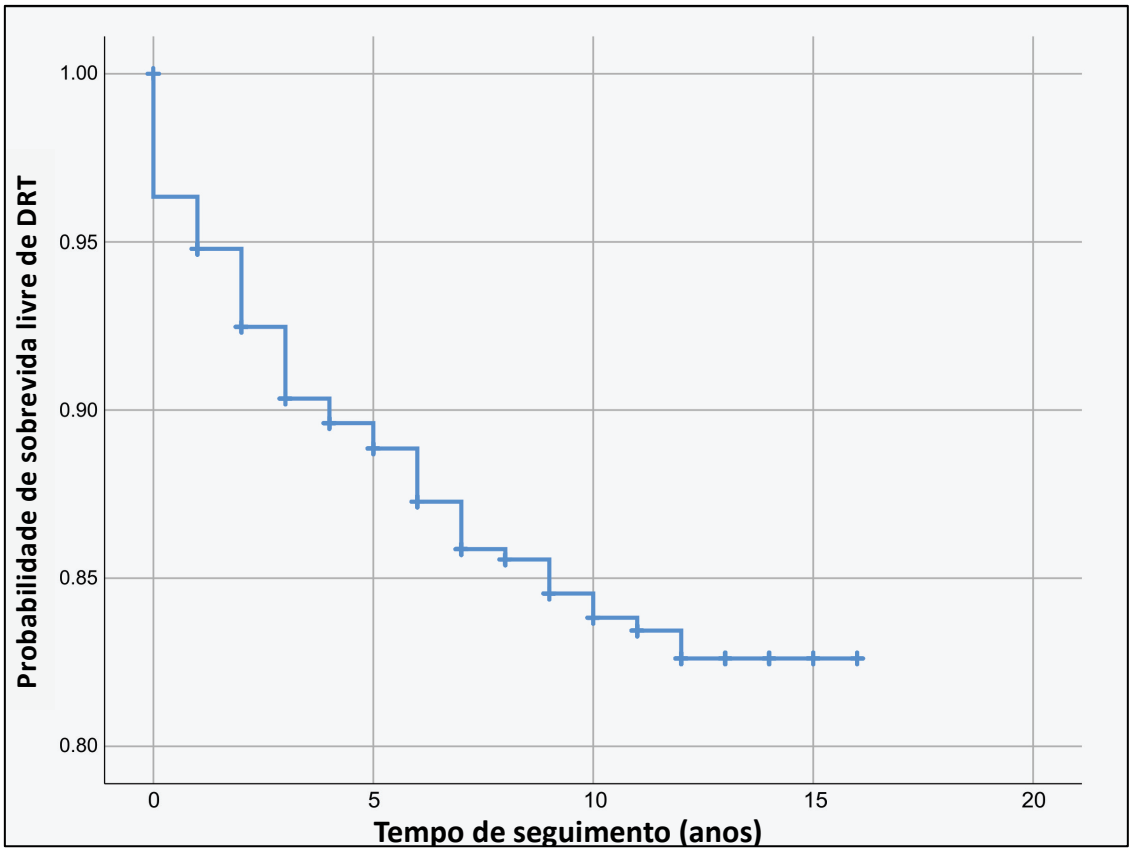
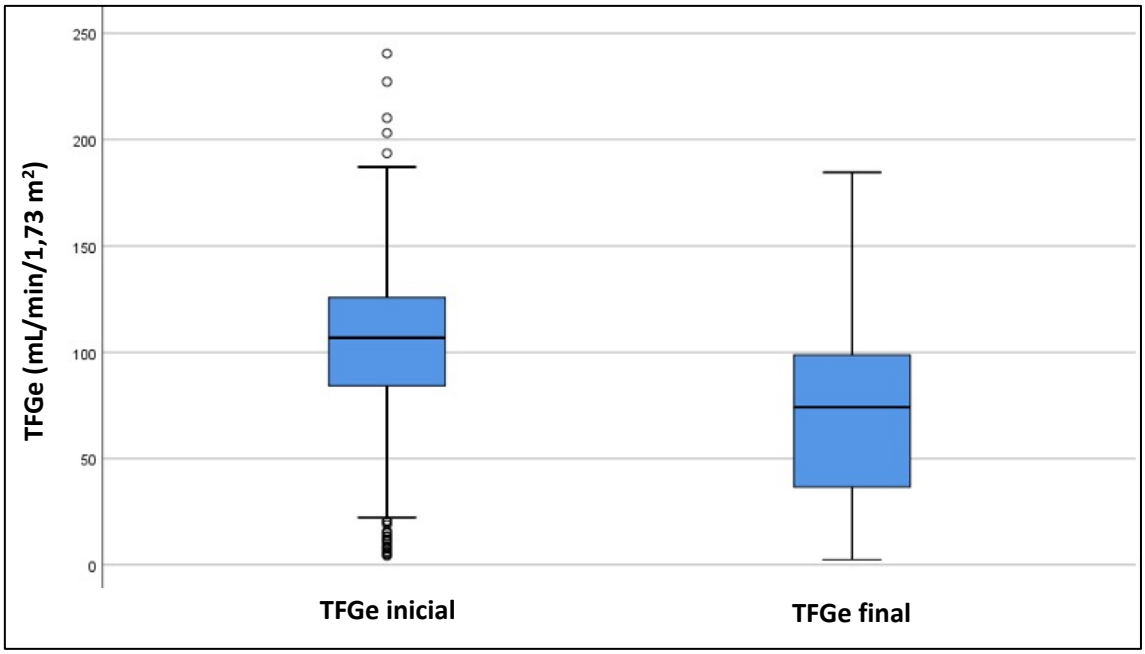


Figura 4. Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal terminal (DRT) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo.

4.3 Dinâmica da TFG

A primeira TFGe aferida nos indivíduos no início do seguimento apresentou média de 100 mL/min/1,73m^2 (± 37,5 mL/min/1,73m^2). A mediana foi de 106,8 mL/min/1,73m^2, com percentil 25 de 84 mL/min/1,73m^2 e percentil 75 de 126 mL/min/1,73m^2. A média da última TFGe foi de 100 mL/min/1,73m^2 (± 38,3 mL/min/1,73m^2) e a mediana foi de 74,1 mL/min/1,73m^2, com percentil 25 de 37 mL/min/1,73m^2 e percentil 75 de 99 mL/min/1,73m^2 (P< 0,001) (Figura 5).



A linha horizontal central representa a mediana, os limites da caixa representam os percentis 25 e 75 e as barras representam os percentis 10 e 90. Valor de *P* < 0,001 obtido no teste de Wilcoxon.

Figura 5. Distribuição das medidas de taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) inicial e final nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo.

O declínio médio anual observado na TFGe foi de - 6,15 mL/min/1,73m^2 (± 13,6 mL/min/1,73m^2). A mediana do declínio foi de -2,43 mL/min/1,73m^2, com percentil 25 de -7,0 mL/min/1,73m^2 e percentil 75 de -0,82 mL/min/1,73m^2. Na Figura 6 é possível verificar a distribuição da diferença entre a primeira e a última TFGe. Em vermelho, os valores abaixo do percentil 25, ou seja, aqueles que apresentaram declínio anual maior que -7,0 mL/min/1,73m^2, caracterizados aqui como indivíduos com declínio renal rápido (DRR), que corresponderam a 26,9% do total (n=125). Em seguida, em amarelo, estão aqueles com declínio anual entre - 6,9 e - 2,43 mL/min/1,73m^2, caracterizados como indivíduos com declínio renal moderado (DRM), que corresponderam a 23,2% do total (n=108). Em verde, aqueles que apresentaram declínio renal lento ou ausente (DRLA), onde estão classificados todos os indivíduos com declínio acima da mediana, que corresponderam a 49,9% do total (n=232).

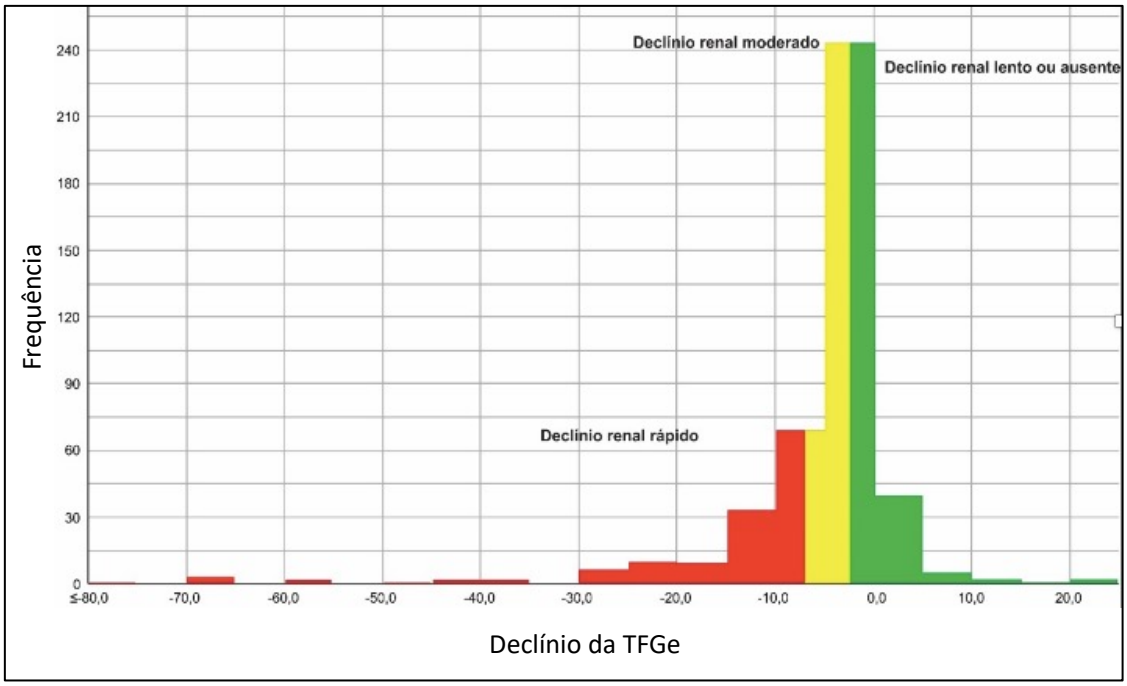


Figura 6. Distribuição do declínio da taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo.

A Figura 7 apresenta a evolução da TFGe de cada um dos indivíduos classificados em cada um dos padrões de declínio da função renal e a Figura 8 apresenta a média e o IC95% da TFGe inicial e final em cada um dos grupos de declínio da função renal. No grupo DRLA, a média inicial foi de 95 mL/min/1,73 m^2 (± 34 mL/min/1,73 m^2) e a média final foi de 87 mL/min (± 31 mL/min/1,73 m^2); no grupo DRM a média inicial foi de 105 mL/min (± 35 mL/min/1,73 m^2) e a média final foi de 61 mL/min (± 31 mL/min/1,73 m^2); no grupo DRR, a média inicial foi de 112 mL/min/1,73 m^2 (± 40 mL/min/1,73 m^2) e a média final foi de 42 mL/min/1,73 m^2 (± 37 mL/min/1,73 m^2).

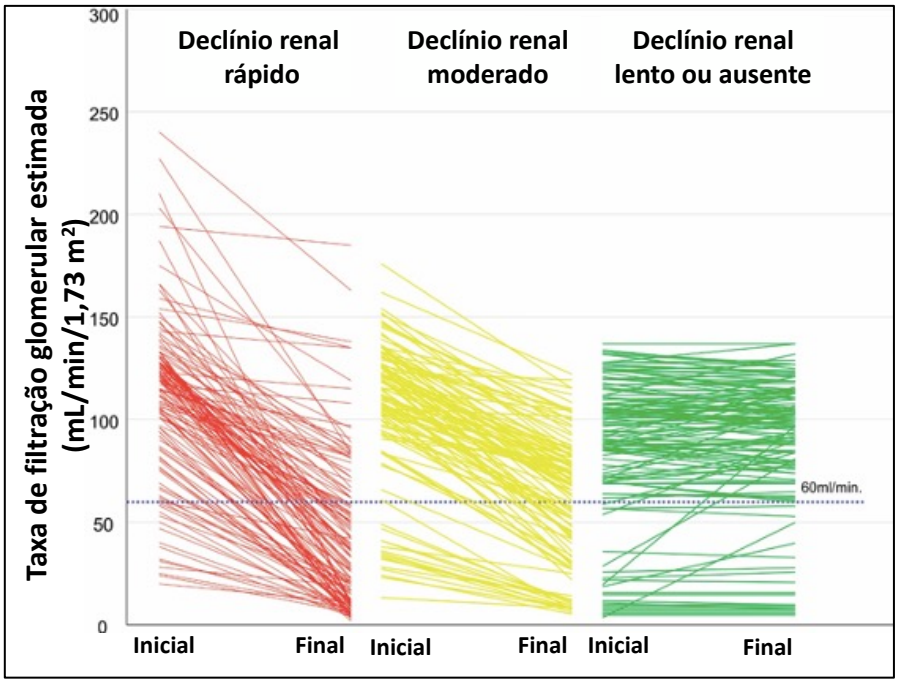
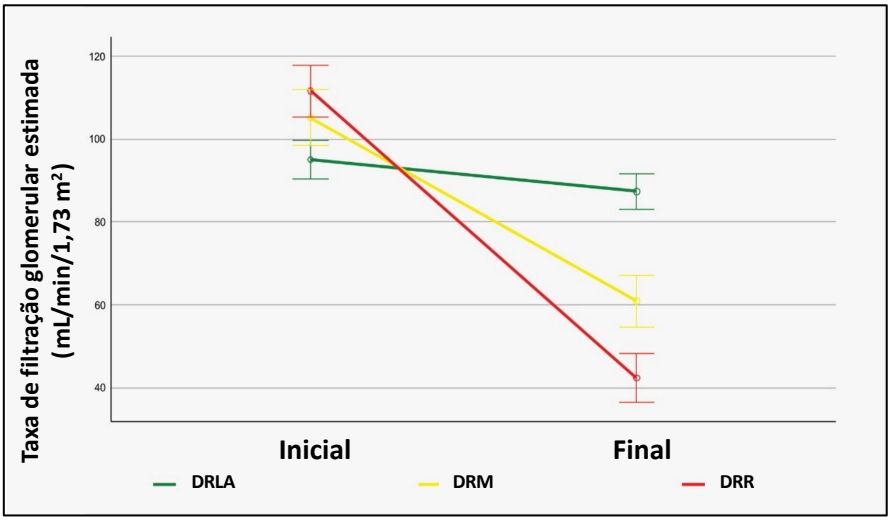


Figura 7. Evolução da taxa de filtração glomerular estimada de cada um dos indivíduos classificados em cada um dos padrões de declínio da função renal.



DRLA: Declínio renal lento ou ausente; DRM: Declínio renal moderado; DRR: Declínio renal rápido. Valores de *P* grupo: <0,001; tempo: <0,001 e Grupo*tempo: <0,001.

Figura 8. Evolução da média (intervalo de confiança de 95%) da taxa de filtração glomerular estimada de acordo com o padrão de declínio renal.

4.4 Fatores associados ao declínio renal

Entre os indivíduos que apresentaram DRR (n=125), 2,4 % apresentavam TFGe < 30 mL/min/1,73 m^2 no início do seguimento; 31,2% foram caracterizados

como hiperfiltrantes no início do seguimento e 15,2% apresentavam EUA > 1.000 mg/g de creatinina no início do seguimento.

Na Tabela 4 estão apresentadas as características clínicas e laboratoriais associadas ao declínio da função renal tanto no início do seguimento quanto ao final do seguimento. No início do seguimento, o IMC, a pressão arterial, a HbA1c, o colesterol total, o LDL-c, os triglicérides, a TFGe e a albuminúria apresentaram distribuição significantemente diferente entre os grupos com padrão de declínio da função renal diferentes. Ao final do seguimento, a pressão arterial, a HbA1c, os triglicérides e a albuminúria apresentaram distribuição significantemente diferente entre os grupos com padrão de declínio da função renal diferentes, com destaque para a pressão arterial sistólica, que foi diferente entre os três grupos estudados. No início do seguimento, a duração do DM foi significantemente menor no grupo DRR em comparação ao grupo DRLA. Ao final do seguimento, a duração do DM foi significantemente menor no grupo DRR em comparação aos grupos DRLA e DRM.

Na Tabela 5 estão mostradas as características clínicas dos indivíduos no início e ao final do seguimento. No início do seguimento, HAS, dislipidemia, RD proliferativa, NP, NAC instalada e DRD foram significantemente mais frequentes entre os indivíduos com DRR. Ao final do seguimento, a frequência de DRD e de DRT foram maiores no grupo DRR. Nos dois momentos de avaliação, a albuminúria apresentou distribuição semelhante: A3 foi mais frequente entre os indivíduos DRR e, em seguida, entre os DRM. A albuminúria A1 foi mais comum entre os indivíduos DRLA e DRM.

Tabela 4. Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal.

	DRLA	DRM	DRR	Valor de *P*	Valor de *P* entre os grupos		
					DRLA *vs* DRM	DRLA *vs* DRR	DRM *vs* DRR
Início do seguimento							
IMC (kg/m^2)	23,2 (21,7-2,8)	22,8 (21-24,6)	22,8 (20,4-24,2)	0,005	0,669	0,004	0,286
Circunferência abdominal (cm)	90 (82-97)	86 (80-91)	88 (80-96)	0,187	-	-	-
PAS (mmHg)	122 (114-130)	120 (109-129)	125 (113-134)	0,038	0,276	0,592	0,032
PAD (mmHg)	75 (70-81)	72 (69-80)	80 (71-88)	0,016	0,996	0,062	0,019
HbA1c (%)	8,3 (7,2-9,8)	8,4 (7,3-10,1)	8,6 (7,8-11,1)	0,032	0,996	0,039	0,112
Colesterol total (mg/dL)	166 (146-187)	168 (141-194)	183 (154 - 222)	0,001	0,996	0,001	0,012
HDL-c (mg/dL)	60 (51-72)	59 (51-72)	61 (47-74)	0,942	-	-	-
LDL-c (mg/dL)	90 (70-106)	87 (66-110)	103 (80-133)	<0,001	0,998	<0,001	0,001
Triglicérides (mg/dL)	69 (53-104)	72 (48-102)	97 (62-134)	<0,001	0,907	<0,001	0,002
TFGe (mL/min.)	101 (75-120)	113 (94-127)	117 (92-130)	<0,001	0,003	<0,001	0,980
Albuminúria (mg/g)	9,5 (4,7-38,5)	11,0 (5,0-57,4)	23,7 (7,0-326,0)	<0,001	0,406	<0,001	0,200
Duração do DM (anos)	19 (12-25)	17 (10-22)	15,5 (10-22)	0,030	0,196	0,048	0,667

Tabela 4 (continuação). Características clínicas e laboratoriais dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal.

Final do seguimento	**DRLA**	**DRM**	**DRR**	**Valor de *P***	**Valor de *P* entre os grupos**		
					DRLA *vs* DRM	**DRLA *vs* DRR**	**DRM *vs* DRR**
IMC (kg/m2)	26 (22-24)	24 (21-26)	22 (20,9-26,3)	0,179	-	-	-
PAS (mmHg)	120 (110-138)	120 (110-126)	130 (120-150)	<0,001	0,040	0,049	<0,001
PAD (mmHg)	80 (70-80)	76 (70-80)	80 (70-90)	0,001	0,448	0,019	0,001
HbA1c (%)	8,2 (7,3-9,4)	8,0 (7,1-9,1)	8,9 (7,8-10,6)	<0,001	0,493	0,001	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	172 (145-189)	174 (148-201)	180 (154-211)	0,069	-	-	-
HDL-c (mg/dL)	60 (49-70)	58 (46,5-68,5)	57 (51-68)	0,547	-	-	-
LDL-c (mg/dL)	90 (73-108)	92 (79-105,5)	97 (79-118)	0,061	-	-	-
Triglicerídeos (mg/dL)	80 (62-118)	86 (63-134)	100 (69-143)	0,018	0,642	0,014	0,598
Albuminúria (mg/g)	15,7 (5,6-63,0)	10,9 (4,3-124,9)	40,3 (7,5-449,8)	0,006	0,683	0,016	0,015
Duração do diabetes (anos)	31 (25-39)	30 (24-35)	25 (19-32)	<0,001	0,207	<0,001	0,018

Dados expressos em mediana e intervalo interquartílico. HbA1c: Hemoglobina glicada; HDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de alta densidade; IMC: índice de massa corpórea; LDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de baixa densidade; PAD: Pressão arterial diastólica; PAS: Pressão arterial sistólica. Valores de *P* obtidos no Teste de Kruskal-Wallis; análises *post-hoc* ajustadas pelo método de Bonferroni.

Tabela 5. Características demográficas e clínicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal.

Início do seguimento		**DRLA**	**DRM**	**DRR**	**Valor de *P***
Sexo Feminino (%)		59,5	50,0	53,6	0,229
Hipertensão arterial (%)		24,2	17,8	36,4	0,017
Dislipidemia (%)		24,1	18,5	40,7	0,001
Albuminúria (%)					
	A1	72,4	72,3	53,3	
	A2	21,2	9,9	21,0	<0,001
	A3	6,4	17,8	25,7	
Tabagismo (%)					
	Prévio	8,8	6,6	12,0	0,467
	Atual	6,5	9,4	4,6	
Retinopatia diabética (RD) (%)					
	Sem RD	27,3	45,6	32,3	
	RD não proliferativa	45,5	37,8	20,4	<0,001
	RD proliferativa	27,3	16,7	47,3	
Neuropatia periférica (%)		36,3	27,4	59,4	<0,001
NAC (%)					
	Incipiente **(%)**	14,5	7,0	9,2	<0,001
	Instalada **(%)**	20,7	22,5	56,9	
Doença renal diabética (%)		17,2	21,3	29,6	0,025
Hiperfiltração (%)		18,1	32,4	31,2	0,003
Tratamento (%)					
	iECA	29,1	29,6	23,9	0,558
	BRA	13,3	9,3	7,8	0,278
	Estatina	39,6	37,4	28,4	0,123
	B-Bloqueador	10,8	10,2	8,8	0,863
	Diurético	11,6	12,1	19,8	0,109

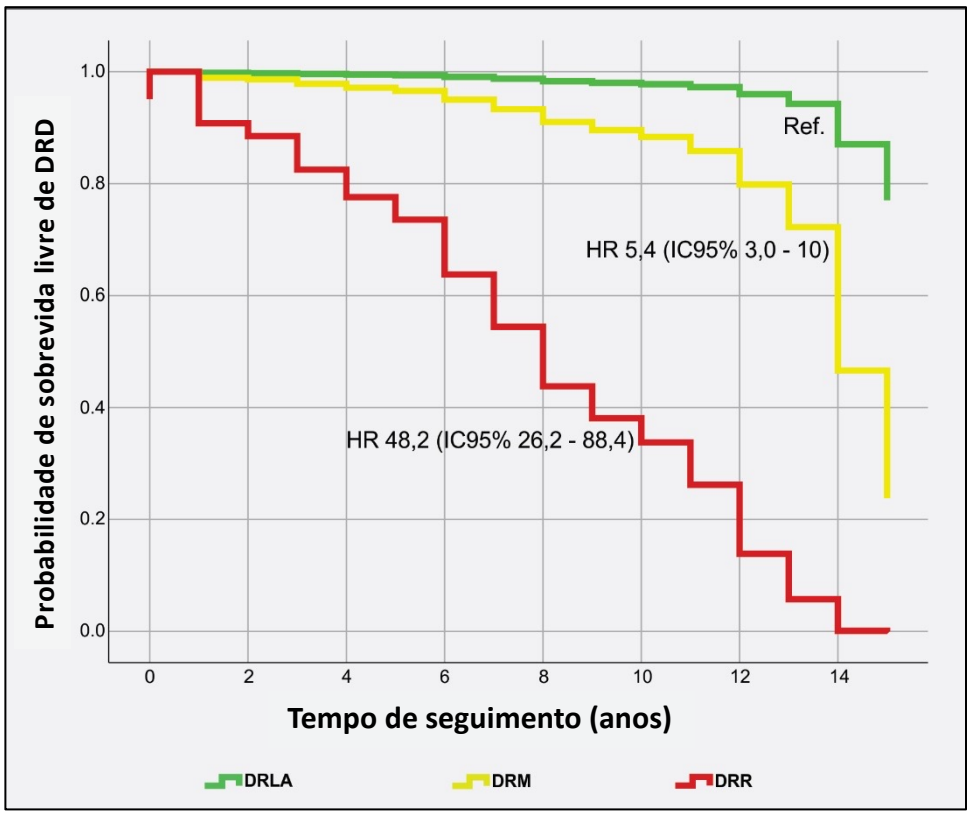
Tabela 5 (continuação). Características demográficas e clínicas dos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 avaliados no presente estudo, de acordo com o padrão de declínio da função renal.

Final do seguimento		DRLA	DRM	DRR	Valor de *P*
Hipertensão arterial (%)		29,1	27,8	34,4	0,478
Dislipidemia (%)		37,9	34,3	32,8	0,613
Albuminúria (%)					
	A1	73,7	68,1	49,5	
	A2	20,2	12,8	20,6	<0,001
	A3	6,1	19,1	29,9	
Doença renal diabética (%)		6,9	28,7	44,8	<0,001
Doença renal terminal (%)		9,5	12,0	30,4	<0,001
Doença cardiovascular (%)		4,0	6,5	5,6	0,547
Tratamento (%)					
	iECA	22,9	16,7	16,0	0,219
	BRA	10,1	9,3	8,0	0,834
	Estatina	7,0	7,4	12,8	0,175
	B-Bloqueador	11,0	10,2	21,6	0,016
	Diurético	34,8	33,3	31,2	0,797
	Fibrato	0,4	0,0	0,8	0,998

BRA: bloqueadores do receptor de angiotensina II; iECA: Inibidores da da enzima conversora da angiotensina. Valores de *P* obtidos no teste exato de Fischer.

Entre os 365 indivíduos sem DRD no início do seguimento, 103 desenvolveram DRD nos anos seguintes. A análise da frequência de DRD de acordo com o padrão de declínio da função renal evidenciou que a incidência acumulada foi maior no padrão DRR (63,3%), seguida do padrão DRM (36,4%). A incidência acumulada de DRD no padrão DRLA foi de 8,3% ($P < 0,001$ obtido pelo teste exato de Fischer).

Uma regressão de Cox foi utilizada para avaliar a incidência acumulada e a densidade de DRD de acordo com o padrão de declínio da função renal. A Figura 9 mostra os tempos até a ocorrência de DRD para cada um dos padrões de declínio. O risco de um indivíduo com DRM desenvolver DRD foi 5,4 vezes maior do que um indivíduo com DRLA e o risco de um indivíduo com DRR desenvolver DRD foi 48 vezes maior do que um indivíduo com DRLA ($P < 0,001$).



DRLA: Declínio renal lento ou ausente; DRM: Declínio renal moderado; DRR: Declínio renal rápido. HR: *Hazard ratio*; Ref: Referência.

Figura 9. Tempo livre (anos) até a ocorrência de doença renal diabética (DRD) nos indivíduos que não apresentavam DRD no início do seguimento, de acordo com o padrão de declínio da função renal.

4.5 Associação entre albuminúria e doença cardiovascular

Dezoito indivíduos haviam apresentado DCV no início do seguimento e 17 apresentaram DCV ao final do seguimento. A albuminúria aferida ao final do seguimento mostrou-se significantemente associada com a ocorrência de DCV. No grupo sem a ocorrência de DCV, a proporção de A3 foi de 14%, enquanto no grupo com DCV, esta proporção foi quase três vezes maior: 41,2% (*P* = 0,020). No início do seguimento, a proporção de A3 foi discretamente maior entre os indivíduos que tiveram DCV, no limite da significância estatística (*P* = 0,062) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição da classificação da albuminúria nos indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 com e sem doença cardiovascular.

	Doença cardiovascular	
	Não	**Sim**
Albuminúria no início do seguimento *P* = 0,062		
A1 (%)	68,5	44,4
A2 (%)	17,9	27,8
A3 (%)	13,6	27,8
Albuminúria no final do seguimento *P* = 0,012		
A1 (%)	67,2	47,1
A2 (%)	18,8	11,8
A3 (%)	14,0	41,2

Valores de *P* obtidos pelo Teste exato de Fischer.

4.6 Avaliação da expressão do mRNA dos genes *TXNIP*, *B2M* e *TXN*

A expressão normalizada dos genes *TXNIP, B2M* e *TXN* nas células do sedimento urinário foi avaliada em um subgrupo de 46 indivíduos. Ao final do seguimento, a duração do DM nesse subgrupo era de 32,4 (± 10,6) anos. O

tempo médio total de seguimento clínico foi de 10,9 (± 4,8) anos. A mediana do tempo de seguimento foi de 14 anos, com um percentil 25 de 7,75 anos e um percentil 75 de 14 anos. Nesse período de acompanhamento, a coorte acumulou um total de 500 anos. Esses 46 indivíduos realizaram um total de 1.560 medidas de creatinina plasmática, com uma média de 3,12 dosagens por ano. As características clínicas e laboratoriais desses indivíduos no início do seguimento estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do seguimento do subgrupo de indivíduos incluídos na análise da expressão gênica das células do sedimento urinário.

Características clínicas e bioquímicas	**Média ± DP ou %**
Sexo feminino (%)	65,2
Idade (anos)	31,3 ± 12,3
Peso (Kg)	63,8 ± 15,0
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	23,6 ± 3,8
Hipertensão arterial sistêmica (%)	43,5
Pressão arterial sistólica (mmHg)	131,0 ± 25,5
Pressão arterial diastólica (mmHg)	81,0 ± 15,5
Dislipidemia	28,9
Tabagismo (prévio / início do seguimento) (%)	8,7 / 8,7
Colesterol total (mg/dL)	177 ± 37
HDL-c (mg/dL)	63 ± 17
LDL-c (mg/dL)	97 ± 33
Triglicérides (mg/dL)	103 ± 48
Creatinina (mg/dL)	0,93 ± 0,49
Status do diabetes	
Idade ao diagnóstico (anos)	12,6 ± 11,0
Duração do diabetes (anos)	19,7 ± 13,7
HbA1c (%)	8,5 ± 2,0
Albuminúria (mg/g de creatinina)	218 ± 505
Albuminúria	
A1 (%)	63,6
A2 (%)	18,2
A3(%)	18,2
Doença renal diabética (%)	23,9
Retinopatia diabética (RD)	
Ausente (%)	31,8
RD não proliferativa (%)	34,8
RD proliferativa (%)	31,8
Neuropatia periférica	
Ausente (%)	52,2
Presente (%)	43,5
Neuropatia autonômica cardiovascular	
Ausente (%)	47,7
Incipiente (%)	13,6
Instalada (%)	38,6

HDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de alta densidade; LDL-c: conteúdo de colesterol na lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 8. Características demográficas, clínicas e laboratoriais no início do seguimento do subgrupo de indivíduos incluídos na análise da expressão gênica das células do sedimento urinário, classificados de acordo com a velocidade de declínio da taxa de filtração glomerular estimada.

	Não declinante	Declinante	Valor de *P*
Características clínicas e bioquímicas			
Sexo feminino (%)	77,8%	47,4	0,058
Idade (no início do seguimento)	35 ± 13	26 ±10	0,163
Peso (Kg)	68,8 ± 16,0	89,0 ± 46,7	0,800
Índice de massa corpórea (kg/m^2)	24,7 ±4,3	22,1 ± 2,7	0,352
Hipertensão arterial sistêmica (%)	22,2%	38,9	0,317
Pressão arterial sistólica (mmHg)	120,0 ± 19,7	145,9 ± 25,1	0,777
Pressão arterial diastólica (mmHg)	74,7 ±12,4	89,7 ±15,6	0,729
Dislipidemia	29,6%	27,8%	0,583
Tabagismo (prévio / início do seguimento) (%)	11,1 / 7,4	6,3 / 12,5	0,860
Colesterol total (mg/dL)	175 ± 28	180 ± 47	0,091
HDL-c (mg/dL)	70 ± 15	54 ±16	0,050
LDL-c (mg/dL)	90 ± 24	106 ± 40	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	77 ± 33	104 ± 54	0,114
Creatinina (mg/dL)	0,95 ± 0,50	0,90 ± 0,5	0,970
Status do diabetes			
Idade ao diagnóstico (anos)	14 ± 8	11 ± 8	0,224
Duração do diabetes (anos)	21,4 ± 14,3	17,5 ± 13,0	0,554
HbA1c (%)	8,1 ± 1,9	9,1 ± 2,1	<0,001
Albuminúria (mg/g de creatinina)	819 ± 1.261	6.849 ± 19.269	0,720
Albuminúria			
A1 (%)	76,9	44,4	
A2 (%)	15,4	22,2	0,054
A3(%)	7,7	33,3	
Doença renal diabética (%)	14,8%	36,8%	0,159
Retinopatia diabética (RD)			
Ausente (%)	33,3	29,4	
RD não proliferativa (%)	44,4	23,5%	0,200
RD proliferativa (%)	22,2	47,1%	
Neuropatia periférica			
Ausente (%)	66,7	35,3	0,063
Presente (%)	33,3	64,7	
N			
Ausente (%)	55,6	35,3	
Incipiente (%)	14,8	11,8	0,331
Instalada (%)	29,6	52,9	

HDL-c: Conteúdo de colesterol na lipoproteína de alta densidade; LDL-c: conteúdo de colesterol na lipoproteína de baixa densidade.

Para esta análise, os indivíduos também foram estratificados de acordo com a velocidade de declínio da TFGe em dois grupos: os Declinantes (queda ≥

3,5 mL/min/1,73 m^2/ano) e os Não-declinantes (queda < 3,5 mL/min/1,73 m^2/ano). O grupo Declinante apresentou valores de HDL-c menores e maior frequência de albuminúria A3 no limite da significância estatística. Os valores de LDL-c e de HbA1c foram significantemente maiores no grupo Declinante. O grupo Declinante apresentou menor idade e menor duração do DM em relação ao grupo Não-declinante, mas sem alcançar significância estatística (Tabela 8). Ao final do seguimento, a duração do DM era de 28,1 ± 11,2 anos no grupo Declinante e de 35,4 ± 11,2 anos no grupo Não-declinante (sem diferença estatisticamente significante). A distribuição da expressão dos genes estudados pode ser vista na Figura 10.

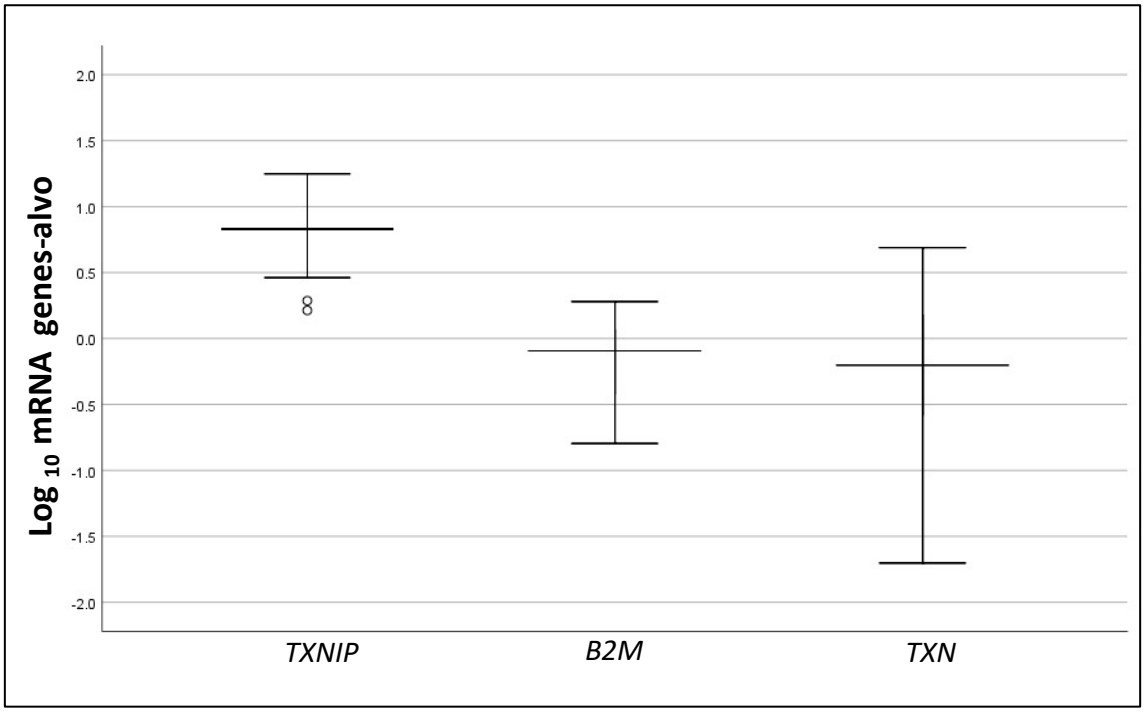


Figura 10. Mediana e intervalo interquartílico da expressão dos genes *thioredoxin-interacting protein* (*TXNIP*), beta-2-microglobulina (*B2M*) e tioredoxina (*TXN*) normalizada pela expressão do gene *ELF1* no sedimento urinário dos indivíduos estudados.

Na Tabela 9 é possível verificar que não houve diferença na expressão dos genes entre os indivíduos que foram classificados como com e sem declínio da função renal, tanto quando classificados pelo padrão DRR e/ou DRM quanto quando classificados como Declinantes e Não-declinantes. Na comparação entre os grupos que tiveram ou não DRR, a expressão do *B2M* apresentou uma diferença no limite da significância estatística (*P*=0,093).

Tabela 9. Expressão dos genes *TXNIP*, *B2M* e *TXN* nos grupos de indivíduos com ou sem declínio da função renal.

		Sem declínio		Com declínio		Valor de *P*
		Média (±DP)	Mediana (IIQ)	Média (±DP)	Mediana (IIQ)	
DRR						
	TXNIP	0,606 (± 0,573)	0,799 (0,484-0,9)	0,874 (± 0,195)	0,806 (0,738-0,938)	0,286
	B2M	-0,330 (± 0,342)	-0,358 (-0,623--0,004)	-0,067 (± 0,189)	-0,086 (-0,249-0,084)	0,093
	TXN	-0,197 (± 0,451)	-0,211 (-0,631-0,055)	-0,028 (± 0,209)	0,017 (-0,157-0,226)	0,142
DRM ou DRR						
	TXNIP	0,570 (± 0,586)	0,811 (0,374-0,929)	0,791 (± 0,200)	0,766 (0,646-0,9)	0,740
	B2M	-0,322 (± 0,343)	-0,444 (-0,557-0,07)	-0,175 (± 0,299)	-0,120 (-0,261-0,06)	0,331
	TXN	-0,236 (± 0,461)	-0,225 (-0,631-0,011)	-0,03 (± 0,322)	-0,016 (-0,199-0,215)	0,180
Declínio ≥ 3,5 mL/min/1,73 m²/ano						
	TXNIP	0,572 (± 0,651)	0,799 (0,461-0,924)	0,811 (± 0,199)	0,8 (0,721-0,9)	0,483
	B2M	-0,355 (± 0,346)	-0,47 (-0,623--0,051)	-0,130 (± 0,263)	-0,094 (-0,249-0,061)	0,128
	TXN	-0,234 (± 0,437)	-0,218 (-0,631-0,011)	-0,016 (± 0,343)	0,017 (-0,179-0,226)	0,116

DRM: Declínio renal moderado; DRR: Declínio renal rápido; IIQ: Intervalo interquartílico. Valores de *P* obtidos no teste de Mann-Whitney.

Para avaliar o impacto da expressão dos genes de interesse no declínio da função renal, um conjunto de modelos de regressão logística binária foi preparado. As variáveis de ajuste utilizadas nestes modelos foram TFGe no início do seguimento, sexo, duração do DM, HbA1c e uso de iECA. Nenhum dos

genes estudados associou-se significantemente com o declínio da função renal, embora a expressão do *B2M* tenha ficado no limite da significância estatística na análise que considerou o declínio ≥ 3,5 mL/min/1,73 m^2/ano (Tabela 10).

Tabela 10. Impacto da expressão dos genes *TXNIP, B2M* e *TXN* sobre o declínio da função renal.

		Beta (EP)	Valor *P*
DRR			
	TXNIP	6,475 (5,921)	0,274
	B2M	9,203 (6,672)	0,142
	TXN	2,949 (2,674)	0,270
DRM ou DRR			
	TXNIP	0,278 (2,286)	0,903
	B2M	3,468 (2,411)	0,150
	TXN	4,823 (3,655)	0,187
Declínio ≥ 3,5 mL/min/1,73 m^2/ano			
	TXNIP	4,280 (1,495)	0,181
	B2M	5,401 (3,102)	0,082
	TXN	4,285 (3,202)	0,160

DRM: Declínio renal moderado; DRR: Declínio renal rápido. Todos os modelos foram ajustados para taxa de filtração glomerular estimada no início do seguimento, sexo, duração do diabetes, HbA1c e uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina; interação foi avaliada entre os genes estudados e os fatores de ajuste. EP: erro-padrão.

Outra análise foi realizada para avaliar a influência da expressão dos genes no declínio da função renal, contudo de forma contínua. Esta análise considerou todo o histórico de TFGe dos 46 indivíduos avaliados. As expressões dos genes *TXNIP* (β= -2,400; *P*=0,010) e *B2M* (β= -27,108; *P*=0,001) influenciaram significantemente a evolução da TFGe, independentemente de sexo, idade e duração do DM. Nos modelos para os genes *TXNIP* e *B2M,* a não utilização de iECA e os valores de HbA1c também tiveram impacto sobre a TFGe (Tabela 11).

Tabela 11. Impacto da expressão dos genes *TXNIP, B2M* e *TXN* sobre o declínio da função renal.

	Beta	**Valor de *P***
Modelo *TXNIP*		
HbA1c	-6,540	0,005
Uso de iECA	11,323	0,030
TXNIP	-2,400	0,010
Modelo *B2M*		
HbA1c	-5,840	0,045
Uso de iECA	11,393	0,037
B2M	-27,108	0,001
Modelo *TXN*		
HbA1c	-5,684	0,080
Uso de iECA	13,521	0,001
TXN	-3,020	0,620

Cada gene foi estudado num modelo independente; todos os modelos foram ajustados para sexo, idade, tempo de diabetes e tempo de seguimento. iECA: inibidor da enzima conversora da angiotensina.

5 DISCUSSÃO

A DRD é a principal causa de DRC em indivíduos com DM1. Uma parcela dos indivíduos irá necessitar de terapia de substituição renal, no entanto, há uma grande variação na taxa de declínio da função renal, sendo alguns indivíduos mais suscetíveis que outros (60).

A escassez de dados locais acerca da progressão da DRD nos indivíduos com DM1 foi a principal motivação para a realização do presente estudo. Deng *et al.* mostraram um aumento da prevalência da DRD em indivíduos com DM1 em 204 países, em quatro diferentes regiões do mundo, no período entre 1990 e 2019 (61). Dados norte-americanos, no entanto, revelaram que a prevalência da DRD, definida como albuminúria persistente, TFGe reduzida persistente, ou ambos, não mudou significantemente ao longo do tempo; de 28,4% em 1988-1994 para 26,2% em 2009 –2014. Contudo, o percentual de indivíduos com DM1 representados nesta avaliação foi muito pequeno (62).

No presente estudo, a prevalência de DRD foi de 21,5%, em uma população com maioria de mulheres (55,3%), de idade média de 31 anos e duração média do DM de 18 anos. Em um estudo transversal, multicêntrico, realizado em 10 cidades brasileiras, com 1.760 indivíduos com DM1, 56,3% do sexo feminino, de idade média de 29,9 anos e duração média do DM de 15,5 anos, a prevalência de DRC foi de 33,7% (63). A maior prevalência observada neste estudo pode refletir a inclusão da albuminúria A2 no diagnóstico de DRD, enquanto no presente estudo, apenas albuminúria A3, associada ou não a uma TFGe < 60 mL/min/1,73 m^2, foi considerada.

No estudo previamente mencionado de Deng *et al.*, a incidência de DRD também aumentou ao longo de um seguimento médio de 29 anos (61). A incidência acumulada de DRD observada no presente estudo foi de 28,2% (ou

2,82% ao ano, em média, se considerado o tempo médio de seguimento); a densidade de incidência foi de 2,47 por 100 pessoas-ano. Uma revisão sistemática de estudos de DRD em indivíduos com DM1 mostrou uma taxa de incidência, por ano, de albuminúria (critério diferente do avaliado neste estudo) de 1,3 a 3,8% (64).

Dados epidemiológicos indicam que 25 a 30% das pessoas com DM1 irão evoluir para DRT, necessitando de diálise ou transplante (65). A ocorrência de DRT é menos frequente nas populações europeias do que na população dos Estados Unidos da América (63). Nas últimas duas décadas, apesar da melhora no controle glicêmico e dos avanços nas terapias nefroprotetoras, a redução nas taxas de DRT nos indivíduos com DM foi limitada (66).

Costacou e Orchard mostraram, em uma coorte de 932 indivíduos com DM1 avaliados no estudo *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications*, que a incidência de DRT foi de 14,5% naqueles com 30 anos de doença (67). Os dados deste estudo são semelhantes aos encontrados no presente estudo, no qual a incidência de DRT foi de 15,6% em uma população com média de 30 anos de doença.

Em países nórdicos, a incidência da DRT em indivíduos com DM1 tem se mantido estável ou diminuído nas últimas décadas (8, 68, 69). Gagnum *et al*. examinaram a incidência da DRC ao longo de um período de acompanhamento de 42 anos em indivíduos noruegueses com DM1 de início na infância (< 15 anos de idade); a incidência cumulativa de DRT foi de 0,7% após 20 anos e de 5,3% após 40 anos de T1D (70). Em um outro estudo que acompanhou coortes de pacientes com DM1, a incidência de DRT em 5.460 adultos dinamarqueses acompanhados por um período médio de 10,4 anos foi de 5,5%. Em uma

segunda coorte, composta por 3.150 indivíduos escoceses acompanhados por um período médio de 10,7 anos, a incidência de DRT foi de 4,7% (68).

Em um estudo que incluiu mais de 5.000 indivíduos com DM1 diagnosticados antes dos 50 anos na Escócia e acompanhados por um período mediano de 10 anos, a incidência de DRT foi de 2,5 por 1.000 pessoas-ano, pelo menos sete vezes menor do que a incidência observada no presente estudo, de 18,2 por 1.000 pessoas-ano (8).

Portanto, a incidência de DRT observada no presente estudo é elevada em comparação às coortes dinamarquesas, escocesas e norueguesas. Tais achados provavelmente refletem as dificuldades no acesso aos recursos para obtenção de um melhor controle glicêmico e pressórico, o menor grau de educação em DM, e as menores taxas de adesão ao tratamento em nosso meio, além de diferenças na suscetibilidade genética, que também podem estar implicadas.

Baseado em estudos realizados em indivíduos com DM1, Krolewski propôs um novo olhar sobre a DRD, focado principalmente no declínio progressivo da função renal e menos na albuminúria. O declínio progressivo (perda estimada da TFGe > 3,5 mL/min/1,73 m^2/ano) é geralmente um processo unidirecional que se desenvolve enquanto os pacientes apresentam função renal normal. A taxa de progressão é praticamente constante, até a evolução para DRT. Segundo esse modelo, o declínio renal progressivo precede o aparecimento da albuminúria e, à medida que evolui, aumenta o risco de proteinúria (7).

No presente estudo, observamos que 22,2% dos indivíduos com TFGe $\leq$ 60 mL/min/1,73 m^2 apresentavam albuminúria A1 no início do seguimento,

corroborando os achados descritos por Krolewski, de que o declínio da função renal pode preceder a albuminúria (7).

Krolevski avaliou a trajetória das mudanças da TFGe ao longo do tempo em indivíduos com DM1 e mostrou que 25% deles apresentaram DRR, ou seja, um declínio maior que - 7 mL/min/1,73 m^2/ano; esse grupo progrediu para DRT dentro de 2 a 10 anos. Outros 25% apresentaram um DRM, entre -7 a - 3 mL/min/1,73 m^2/ano), progredindo para DRT dentro de 10 a 30 anos. Os demais, 50%, apresentaram DRLA; esse grupo progrediu para DRT apenas após 30 anos de doença (7).

No presente estudo, a mediana do declínio foi de -2,43 mL/min/1,73m^2, com percentil 25 de -7,0 mL/min/1,73m^2, valores estes que estiveram próximos aos que foram observados no estudo de Krolewski (7). Da mesma forma, a distribuição dos indivíduos, de acordo com o declínio da TFGe, mostrou proporções semelhantes àquelas observadas por Krolewski: 26,9% apresentaram DRR, 23,2% apresentaram DRM e 49,9% apresentaram DRLA. Há que se notar, contudo, no histograma apresentado na Figura 6, uma calda mais alongada (área em vermelho), com cinco indivíduos abaixo do primeiro quartil, que representam perdas extremas de função renal (entre - 80,0 mL/min/1,73m^2 a -100,0 mL/min/1,73m^2). Estes poucos indivíduos são *outliers* na distribuição da coorte.

Vários estudos já mostraram os fatores de risco associados ao desenvolvimento e progressão da DRD: controle glicêmico inadequado, grau de albuminúria, HAS, dislipidemia, duração do DM, tabagismo, concentrações séricas elevadas de ácido úrico e a concomitância de outras complicações microvasculares (71). Vários desses fatores foram identificados no presente

estudo, no qual, em comparação ao grupo DRLA, o grupo com DRR apresentou pior controle glicêmico, maior albuminúria e maior frequência de HAS e de dislipidemia. Esse grupo também apresentou maior prevalência de NAC, de indivíduos com hiperfiltração e de DRD no início do seguimento. Um dado que chamou a atenção foi a menor duração do DM nesse grupo de indivíduos.

Um estudo realizado por Krolewski *et al*. mostrou que maiores valores de HbA1c e de albuminúria associaram-se com um declínio renal rápido e muito rápido (72). Na presente coorte, o valor médio da HbA1c no início do seguimento foi de 8,8%, sendo 8,6% no grupo DRR e 8,3% no grupo DRLA. No início do seguimento, 32,5% dos indivíduos foram classificados como albuminúria A2/A3, o que está de acordo com dados da literatura, que mostram que 20 a 30% dos indivíduos com DM1 apresentam algum grau de albuminúria após 15 a 20 anos de doença (73). O grupo com DRR apresentou maior frequência de albuminúria A3 em relação aos grupos DRM e DRLA. Esse achado está em concordância com estudos que mostram que a proteinúria é um fator de risco importante para a progressão da DRC, por determinar lesão no glomérulo e no compartimento túbulo-intersticial (74).

A frequência de HAS e de dislipidemia foram maiores nos indivíduos com DRR. No DM1, a hiperglicemia persistente promove disfunção endotelial nas artérias e arteríolas, levando ao comprometimento do tônus vasomotor e vasoconstrição pré-capilar sustentada. A disfunção endotelial e o aumento da rigidez arterial promovem um aumento do risco de elevação da pressão arterial, que contribui para a piora da função renal (75).

O efeito das dislipidemias na progressão da DRC não é ainda bem compreendido. No DM, as células dos túbulos renais são expostas a um aumento

dos ácidos graxos livres tanto do lado apical quanto do lado basal, devido à albuminúria presente nos indivíduos com DRD, uma vez que a hiperlipidemia aumenta o conteúdo de ácidos graxos da albumina. Vários estudos sugerem que os ácidos graxos saturados de cadeia longa ligados à albumina podem desempenhar um papel no dano tubular. Estudos já mostraram que a captação de ácidos graxos por seu transportador CD36 em células tubulares promove apoptose destas células e, em humanos, já se observou aumento da expressão do CD36 nos rins de indivíduos hiperglicêmicos (76).

A frequência de NP, de RDP e de NAC instalada foram maiores nos indivíduos com DRR, o que provavelmente reflete o pior controle glicêmico, pressórico e lipídico deste grupo de indivíduos. É importante ressaltar, no entanto, que já se mostrou que a NAC está fortemente associada a um declínio renal progressivo e precoce, aumentando em quatro vezes o risco de perda da TFG precoce e em três vezes o risco de DRD incidente. É possível que o aumento do tônus simpático secundário à denervação parassimpática que se estabelece no início da evolução da NAC possa piorar a disfunção renal (77).

Uma maior frequência de indivíduos com hiperfiltração foi observada nos grupos DRR e DRM. A hiperglicemia pode causar um aumento da TFG, como sugerido por Carmines. Em seus experimentos, a administração de glicose a indivíduos sadios aumentou tanto a glicemia quanto a TFG. É possível que tais efeitos possam ter ocorrido devida a uma ação vasodilatadora sobre a parede das arteríolas aferentes, aumentando assim, simultaneamente, o fluxo plasmático renal, a pressão hidráulica intraglomerular e, em consequência, a TFG. Efeitos hemodinâmicos indiretos também parecem estar implicados. A glicosúria pode aumentar a expressão do SGLT2 no túbulo contorcido proximal,

aumentando a reabsorção proximal de sódio e, em consequência, diminuindo o aporte do íon à mácula densa e deflagrando um sinal que provoca vasodilatação aferente e hiperfiltração (78).

Da mesma forma que observado por Krolewski *et al*. (72) e por Lovshin *et al*. (79), a hiperfiltração também se associou com um DRR no presente estudo. Molitch *et al*., no entanto, avaliaram participantes dos estudos *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT)/*Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) que realizaram a mensuração do *clearance* de iotalamato marcado com iodo radioativo no início do estudo e não encontraram uma maior incidência cumulativa de TFGe < 60 mL/min/1,73 m^2 nos indivíduos hiperfiltrantes, após um seguimento de 28 anos (80). Elucidar a importância da hiperfiltração como um fator de risco renal independente no DM é uma tarefa difícil, dada a etiologia multifatorial da DRD e a falta de estudos que avaliam a influência da hiperfiltração em desfechos de longo prazo. Portanto, estudos clínicos prospectivos devem ser realizados para confirmar a participação da hiperfiltração na progressão da DRD (80).

Finalmente, o achado de menor duração do DM no grupo que apresentou DRR talvez reflita a presença de indivíduos hiperfiltrantes com pouco tempo de doença que apresentaram declínio precoce muito rápido da função renal.

A DCV é a principal causa de mortalidade em indivíduos com DM1, sobretudo em decorrência da doença arterial coronariana, que reflete um processo aterosclerótico acelerado (81). Indivíduos com DM1 apresentam um risco de duas a oito vezes maior de desenvolverem DCV e insuficiência cardíaca. O controle glicêmico rígido no DM1 pode reduzir a incidência de DCV em 42% (82).

A albuminúria é um importante preditor de mortalidade cardiovascular e deterioração da função renal, não somente em indivíduos com DM, mas também na população geral (83, 84). Supõe-se que a EUA reflita não apenas dano glomerular, mas também disfunção endotelial sistêmica. A redução da albuminúria está associada a um melhor desfecho renal e cardiovascular (85, 86). No presente estudo, a frequência de albuminúria A3 foi maior nos indivíduos com DCV tanto no início quanto ao final do seguimento, atingindo significância estatística apenas no final do seguimento.

Atualmente, os dois principais marcadores bioquímicos utilizados na avaliação da função renal, a creatinina sérica e a EUA, apresentam importantes limitações na identificação precoce do desenvolvimento e da progressão da DRD. Assim, a utilização isolada destes marcadores deixa a desejar (87, 88), o que tem estimulado a procura por novos marcadores.

Um segundo objetivo deste estudo foi complementar análises previamente realizadas no sedimento urinário, abordando a expressão de três mRNAs candidatos a preditores do declínio da função renal, dos genes *TXNIP*, *B2M* e *TXN*. A expressão do mRNA do *TXN* não influenciou a taxa de declínio da função renal neste estudo.

A TXNIP, que tem sua expressão aumentada pela hiperglicemia (41) e pelos AGEs (89), está implicada no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (36-38). A participação da TXNIP na etiopatogenia da DRD já foi evidenciada em inúmeros estudos em modelos animais de DM, nos quais o aumento de sua expressão foi associado com geração de EROs (90), apoptose de células mesangiais (91), ativação do inflamassoma NLRP3 (39), disfunção na autofagia e na mitofagia (92), entre outros efeitos deletérios.

Para melhor investigar o potencial da expressão do mRNA da *TXNIP* no sedimento urinário com um fator preditivo de declínio da função renal, os 46 indivíduos com DM1 investigados no primeiro estudo transversal de Monteiro *et al*. (2016) tiveram suas medidas de creatinina sérica avaliadas longitudinalmente, desde os primeiros anos de seguimento até a última visita ambulatorial, nos anos de 2020 ou 2021. Os resultados mostraram que, se as demais variáveis fossem constantes, a cada incremento de uma unidade na expressão de mRNA da *TXNIP* no sedimento urinário, haveria um decremento de 2,4 mL/min/1,73 m^2 na TFGe. Embora essa análise tenha incluído um número pequeno de pacientes, ela abrangeu um período médio de mais de 10 anos e reforçou os achados prévios de que a expressão do mRNA de *TXNIP* no sedimento urinário está associada com a magnitude de declínio da TFGe em indivíduos com DM1, sendo um candidato a biomarcador urinário para a DRD que merece investigação adicional em coortes independentes.

A mesma avaliação longitudinal foi realizada para explorar a expressão do mRNA da *B2M* no sedimento urinário com um fator preditivo de declínio da função renal na coorte de 46 indivíduos com DM1. Os resultados do primeiro estudo transversal realizado nesta coorte de pacientes por Monteiro *et al*. (46) já haviam sido corroborados por Zhang *et al.*, que também encontraram que a expressão da *B2M* em amostras de rins de pacientes com DRD correlaciona-se negativamente com a TFGe (93). Os resultados ora apresentados adicionam mais uma evidência da participação da B2M na etiopatogenia da DRD; se as demais variáveis fossem constantes, a cada incremento de uma unidade na expressão de mRNA da *B2M* no sedimento urinário, haveria um decremento de 27 mL/min/1,73 m^2 na TFGe. Portanto, na análise longitudinal abrangendo um

seguimento médio de mais de 10 anos, a expressão deste mRNA também demonstrou potencial para ser um biomarcador de DRD.

Consideramos o ponto mais forte desta investigação o longo período de seguimento na avaliação de toda a coorte, que totalizou 4.158 anos, com média de 10 anos de acompanhamento. Deve-se considerar, no entanto, que as análises dos mRNAs-alvos no sedimento urinário, pelo reduzido número de indivíduos incluídos, podem ser afetadas pelo erro do tipo II.

Este estudo mostrou a incidência de DRC e de DRT em uma coorte acompanhada em um hospital terciário da cidade de São Paulo e pode não refletir a incidência desses desfechos na população brasileira. Ele possibilitou a identificação de variáveis presentes no início do seguimento associadas à maior velocidade do declínio da função renal. Essas variáveis são importantes marcadores da heterogeneidade da coorte e podem fornecer, além da perspectiva prognóstica, o melhor conhecimento de fatores que devem ser considerados nos ajustes dos modelos estatísticos, para controle de efeito de confusão.

A observação de que um indivíduo com DRR apresentou um risco 48 vezes maior de desenvolver DRD do que um indivíduo com DRLA evidencia a importância de se avaliar, na prática clínica, os valores de TFGe ao longo do seguimento ambulatorial, para identificar o padrão de declínio renal do indivíduo e os fatores que podem ser modificados com a intensificação da terapia, na tentativa de retardar a progressão para DRT.

6 CONCLUSÃO

Na população de indivíduos com DM1 avaliada, 50% apresentaram um padrão de declínio renal rápido ou moderado, que se associou a um pior controle glicêmico e à presença de outras comorbidades. Os mRNAs de *TXNIP* e de *B2M* no sedimento urinário são candidados a biomarcadores para predizer a progressão da DRD e requerem avaliação em coortes independentes.

7 ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Parte 1

1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA

Avaliação da participação do sistema arginina vasopressina na doença renal diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1

PESQUISADOR PRINCIPAL: Profa. Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica

Convite à participação

Convidamos o(a) Sr.(Sra.) a participar desta pesquisa que busca identificar em exames de sangue e urina um risco aumentado de apresentar doença nos rins relacionada ao diabetes mellitus.

Justificativa e objetivos do estudo

O diabetes melitus tipo 1 (DM1) é uma doença que se caracteriza por aumento da glicemia (açúcar no sangue) e necessidade de tratamento com insulina.
O descontrole do diabetes por tempo prolongado pode levar ao desenvolvimento de complicações como diminuição ou perda da visão, problemas nos rins e nos nervos.
O objetivo desta pesquisa é avaliar o papel do hormônio vasopressina, identificado em exame de sangue e urina, na doença nos rins em pacientes com DM1. A melhor compreensão da participação deste hormônio nesta complicação crônica pode ajudar a buscar novas formas de prevenção e tratamento da doença renal.

Procedimentos que serão realizados e métodos empregados

Caso o(a) Sr.(Sra.) concorde em participar deste estudo, vamos colher uma amostra de sua urina para fazer análises de células e proteínas referentes a função do seu rim. Este material será usado no estudo de marcadores de problemas nos rins que possam ser testados na urina. Será coletada ainda uma amostra de sangue para dosagem do exame copeptina, um marcador de secreção do hormônio vasopressina.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Parte 2

Coleta de urina em tubo plástico estéril

Será realizada a coleta de urina para obtenção de material genético. Será utilizada uma amostra de 10 ml, para realização de um exame de Urina tipo 1, para checar se o (a) Sr. (Sra.) está com infecção urinária. Caso esteja com infecção sua amostra será descartada e a sua infecção será tratada. Após a cura, colheremos uma nova amostra outro dia, caso o(a) Sr. (Sra.) concorde.

Coleta de amostra de sangue

Será realizada a coleta de uma amostra de sangue para extração de plasma, que será utilizado para dosagem da copeptina, um marcador de secreção do hormônio vasopressina.

Desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

O procedimento será exatamente como colher urina para qualquer outro tipo de exame e coletar uma amostra de sangue. O risco é mínimo, relativo à coleta de sangue. Os participantes do estudo poderão apresentar um possível desconforto e formação de hematoma no local da coleta de sangue por punção venosa.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Após a realização desse estudo existe a possibilidade de que a melhor compreensão do papel do hormônio vasopressina no aparecimento ou progressão da doença renal em pacientes com diabetes possa ajudar a identificar aqueles pacientes com maior risco de desenvolver essa complicação crônica e a buscar novas formas de prevenção e tratamento, como por exemplo aumentar a ingesta de água.

Acompanhamento e assistência no Ambulatório de Diabetes do Serviço de Endocrinologia

O(a) Sr. (Sra.) tem liberdade para recusar a participação no estudo ou para retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência médica que recebe no Hospital das Clínicas.

Todos os dados obtidos, tais como: resultados de exames e testes, bem como do prontuário, somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.), de forma a impedir qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva no caso de resultados indicativos de doença renal. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Despesas e compensações

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Parte 3

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas pois a coleta de urina será realizada no mesmo que dia que o(a) Sr.(Sra.) vier para a consulta médica. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Armazenamento de Material Biológico

O material biológico obtido sob a forma de amostras de urina e sangue será armazenado de acordo com a resolução 441/2001 no biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM-25), podendo ser utilizado em outros estudos que envolvam a avaliação de doença renal no diabetes tipo 1.
Novas pesquisas só serão realizadas com a aprovação do sistema da Comitê de Ética em Pesquisa.

Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o(a) Sr.(Sra.) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa-Giannella; Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a pesquisa poderá entrar com contato com a Dra. Maria Lúcia no Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia, na Av. Dr. Arnaldo, 455, sala 4305 e no Telefone(s) 3061-7467. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; – e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da participação do sistema arginina vasopressina na doença renal diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1".
Eu discuti com a Dra. Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella ou pessoas por ela delegadas, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Parte 4

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO: .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....) .....

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 1

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DIRETORIA CLÍNICA

COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA - CAPPesq

CADASTRO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Registro (uso reservado à Secretaria da CAPPesq)	
Nº do Protocolo:	Tipo: Humanos
Instituto: ICHC	
Registro on-line nº: 16175	Data de Entrada: 06/02/2017

Este projeto envolve:

Pacientes HC .....Sim

Médicos ou Funcionários HC (como sujeitos de pesquisa) .....Não

Documentos HC(Prontuários e Outros) .....Sim

Materiais estocados no HC .....Não

Peças anatômicas de cadáveres .....Não

Haverá necessidade de recrutamento de pacientes na mídia .....Não

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 2

1. Título do Protocolo de Pesquisa

Avaliação da participação do sistema arginina vasopressina na doença renal diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1

2. Palavras-chaves que caracterizam o assunto da Pesquisa

Vasopressina, diabetes mellitus, doença renal diabética

3. Resumo do Protocolo de Pesquisa:

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 3

Introdução. A doença renal diabética (DRD) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com diabetes mellitus (DM). Apesar da implementação quase universal das terapias nefroprotetoras e do controle glicêmico intensivo nos últimos anos, o risco de DRT em pacientes com DM tipo 1 (DM1) não está diminuindo. A DRT continua sendo a principal causa de morbidade e mortalidade prematura nestes pacientes. A fisiopatologia da DRD envolve fatores metabólicos, hemodinâmicos, inflamatórios e genéticos. Recentemente têm sido sugerido a participação do Sistema Arginina Vasopressia na patogênese dessa complicação. Estudos têm mostrado associação da copeptina, marcador da vasopressina, com o desenvolvimento de albuminúria, declínio da função renal e progressão da doença renal. Outros estudos sugerem que a maior ingestão hídrica diminui o risco de desenvolvimento de doença renal crônica. Objetivos. Neste trabalho será realizada avaliação clínica dos pacientes com DM tipo 1 em diferentes estágios de DRC, buscando avaliar a participação do sistema arginina vasopressina na DRD, através da expressão do mRNA dos genes AVP2R e AQP2 nas células do sedimento urinário, expressão de AQP2 em exossomas urinários e frequência de polimorfismos de um único nucleotídeo no gene AVP. Casuística e métodos. Serão incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de DM1 acompanhados no Ambulatório de Diabetes do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses pacientes serão classificados de acordo com a taxa de filtração glomerular (TFG) e excreção urinária de albumina. Serão coletados dados clínicos, laboratoriais (exames de sangue e urina) e será avaliada, através de questionário, a ingestão hídrica média diária. Será feita avaliação retrospectiva do declínio da TFG para definição dos pacientes evoluindo com progressão da doença renal. Para a realização da expressão de mRNA alvos no sedimento urinário serão coletadas amostras de urina em que será feita extração de RNA total, com posterior conversão para cDNA e realização dos ensaios de

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 4

4. Pesquisador Responsável:

Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

http://lattes.cnpq.br/5205676344593195

Graduação: Medicina

Vínculo: FMUSP

5. Pesquisador Executante:

Tatiana Souza Pelaes

http://lattes.cnpq.br/1924474907216662

6. Possui co-autores?

Sim

Nome dos co-autores: Márcia Silva Queiroz, Maria Beatriz Monteiro, Daniele Pereira Santos-Bezerra, Karina Thieme

7. Onde a Pesquisa será realizada?

Departamento: Clínica Médica

Disciplina: Endocrinologia e Metabologia

LIM: LIM/25 - Lab Endocrinologia Celular e Molecular

8. Existe entidade externa envolvida?

Não

9. Possui participação Estrangeira

Não

10. O projeto é multicêntrico

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 5

Não

11. Outros serviços/ divisões do HCFMUSP envolvidos na pesquisa

Não

12. Finalidade acadêmica da pesquisa e classificação

Doutorado

Outros:

Orientador: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella

13. Investigação

Retrospectiva

14. Materiais e métodos

Laboratorial

Entrevistas e questionários

Prontuários de pacientes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Experimental

16. Áreas temáticas previstas na Res. 466/12

Nenhuma das alternativas

17. Patrocínio

Não há patrocínio

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 6

Prontuários de pacientes

15. Gênero, classificação da Pesquisa

Experimental

16. Áreas temáticas previstas na Res. 466/12

Nenhuma das alternativas

17. Patrocínio

Não há patrocínio

18. Valor do financiamento

0,00

19. Cronograma de execução da pesquisa

Prazo: 24 meses

20. Assinaturas

Assinatura e carimbo do Pesquisador Aprovado em _____/_____/_____.

Profª Dra. Maria Lúcia C. C. Giannella
CRM 52926

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 7

Assinatura e carimbo da Chefia
com data de aprovação
pelo Conselho do Departamento
_____/_____/_____.

Aprovado em

Prof. Dr. Emmanuel de Almeida Burdmann
Vice Chefe do Departamento de Clínica Médica

ANEXO B – Cadastro e Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Parte 8

RECEBIDO N.º
07,02,16
Depto. Clínica Médica

MEDICINA
USP

FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Secretaria de Pos-Graduação Disciplina de Endocrinologia HC/FMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 - Pamb - 8°andar - Bloco 3 -
CEP: 05403-000 - São Paulo - SP – Tel/Fax (11) 2661-7694
e.mail: cpgendoc.ichc@hc.fm.usp.br

CPGE/006/17

São Paulo, 06 de fevereiro de 2017.

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira
Chefe do Departamento de Clínica Médica
da Faculdade de Medicina da USP

Prezada Professora,

Venho por meio desta encaminhar para aprovação 2(duas) vias da Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos e 2 (duas) vias do Cadastro de Protocolo de Pesquisa referente ao do Projeto de Pesquisa, ***"Avaliação da participação do sistema arginina vasopressina na doença renal diabética em portadores de diabetes mellitus tipo 1 "*** Pesquisador Responsável Orientador (a) **Prof.(a). Dr.(a). Maria Lucia Cardillo Correa Giannella** e Pesquisador Executante **aluno.(a) Tatiana Souza Pelaes** Curso de **Doutorado,** Programa de Pós-Graduação da – **Unidade Diabetes** – Disciplina de Endocrinologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Atenciosamente,

Prfª. Dra. Ana Claudia Latronico
Coordenadora do Programa de
Pós - Graduação em Endocrinologia HCFMUSP

8 REFERÊNCIAS

1. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, de Boer IH, Goldstein-Fuchs J, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(4):510-33.
2. Neves PDMM, Sesso RCC, Thomé FS, Lugon JR, Nasicmento MM. Brazilian Dialysis Census: analysis of data from the 2009-2018 decade. J *Bras Nefrol*. 2020;42(2):191-200.
3. Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med*. 2014;370(16):1514-23.
4. Marshall SM. Natural history and clinical characteristics of CKD in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2014;21(3):267-72.
5. Anders HJ, Huber TB, Isermann B, Schiffer M. CKD in diabetes: diabetic kidney disease versus nondiabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(6):361-77.
6. Rosolowsky ET, Skupien J, Smiles AM, Niewczas M, Roshan B, Stanton R, et al. Risk for ESRD in type 1 diabetes remains high despite renoprotection. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(3):545-53.
7. Krolewski AS. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(6):954-62.
8. Colombo M, McGurnaghan SJ, Bell S, MacKenzie F, Patrick AW, Petrie JR, et al. Predicting renal disease progression in a large contemporary cohort with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2020;63(3):636-47.
9. Pugliese G. Updating the natural history of diabetic nephropathy. *Acta Diabetol*. 2014;51(6):905-15.
10. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348(23):2285-93.
11. Giorgino F, Laviola L, Cavallo Perin P, Solnica B, Fuller J, Chaturvedi N. Factors associated with progression to macroalbuminuria in microalbuminuric Type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2004;47(6):1020-8.
12. Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A, et al. Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(10):2983-7.
13. Caramori ML, Fioretto P, Mauer M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes*. 2003;52(4):1036-40.
14. Krolewski AS, Niewczas MA, Skupien J, Gohda T, Smiles A, Eckfeldt JH, et al. Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria. *Diabetes Care*. 2014;37(1):226-34.
15. Ekinci EI, Jerums G, Skene A, Crammer P, Power D, Cheong KY, et al. Renal structure in normoalbuminuric and albuminuric patients with type 2 diabetes and impaired renal function. *Diabetes Care*. 2013;36(11):3620-6.
16. Jerums G, Panagiotopoulos S, Premaratne E, MacIsaac RJ. Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(7):397-406.

17. Lamb EJ, Levey AS, Stevens PE. The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guideline update for chronic kidney disease: evolution not revolution. *Clin Chem*. 2013;59(3):462-5.
18. Association AD. 4. Comprehensive Medical Evaluation and Assessment of Comorbidities. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S40-S52.
19. Mora-Fernández C, Domínguez-Pimentel V, de Fuentes MM, Górriz JL, Martínez-Castelao A, Navarro-González JF. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J Physiol*. 2014;592(18):3997-4012.
20. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(6865):813-20.
21. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A, et al. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation*. 2014;129(5):587-97.
22. Barutta F, Bruno G, Grimaldi S, Gruden G. Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment. Endocrine. 2015;48(3):730-42.
23. Corrêa-Giannella ML, Vieira SM. [Genetic susceptibility to microangiopathy development in Type 1 diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):375-86.
24. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. 1989;320(18):1161-5.
25. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia*. 1996;39(8):940-5.
26. Fioretto P, Steffes MW, Barbosa J, Rich SS, Miller ME, Mauer M. Is diabetic nephropathy inherited? Studies of glomerular structure in type 1 diabetic sibling pairs. *Diabetes*. 1999;48(4):865-9.
27. Papadopoulou-Marketou N, Kanaka-Gantenbein C, Marketos N, Chrousos GP, Papassotiriou I. Biomarkers of diabetic nephropathy: A 2017 update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2017;54(5):326-42.
28. Marcovecchio ML. Importance of Identifying Novel Biomarkers of Microvascular Damage in Type 1 Diabetes. *Mol Diagn Ther*. 2020;24(5):507-15.
29. Lousa I, Reis F, Beirão I, Alves R, Belo L, Santos-Silva A. New Potential Biomarkers for Chronic Kidney Disease Management-A Review of the Literature. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
30. Zheng M, Lv LL, Cao YH, Zhang JD, Wu M, Ma KL, et al. Urinary mRNA markers of epithelial-mesenchymal transition correlate with progression of diabetic nephropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(5):657-64.
31. Hsu CY, Ballard S, Batlle D, Bonventre JV, Böttinger EP, Feldman HI, et al. Cross-Disciplinary Biomarkers Research: Lessons Learned by the CKD Biomarkers Consortium. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(5):894-902.
32. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Passarelli M, Machado UF, Lin CJ, et al. Optimization of total RNA isolation from human urinary sediment. *Clin Chim Acta*. 2016;462:158-61.
33. Alhawiti NM, Al Mahri S, Aziz MA, Malik SS, Mohammad S. TXNIP in Metabolic Regulation: Physiological Role and Therapeutic Outlook. *Curr Drug Targets*. 2017;18(9):1095-103.

34. Maulik N, Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1368-82.
35. Monteiro MB, Santos-Bezerra DP, Thieme K, Admoni SN, Perez RV, Machado CG, et al. Thioredoxin interacting protein expression in the urinary sediment associates with renal function decline in type 1 diabetes. *Free Radic Res*. 2016;50(1):101-10.
36. Perrone L, Devi TS, Hosoya KI, Terasaki T, Singh LP. Inhibition of TXNIP expression in vivo blocks early pathologies of diabetic retinopathy. *Cell Death Dis*. 2010;1:e65.
37. Price SA, Gardiner NJ, Duran-Jimenez B, Zeef LA, Obrosova IG, Tomlinson DR. Thioredoxin interacting protein is increased in sensory neurons in experimental diabetes. *Brain Res*. 2006;1116(1):206-14.
38. Kobayashi T, Uehara S, Ikeda T, Itadani H, Kotani H. Vitamin D3 up-regulated protein-1 regulates collagen expression in mesangial cells. *Kidney Int*. 2003;64(5):1632-42.
39. Gao P, Meng XF, Su H, He FF, Chen S, Tang H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2448-60.
40. Hamada Y, Fukagawa M. A possible role of thioredoxin interacting protein in the pathogenesis of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Kobe J Med Sci*. 2007;53(1-2):53-61.
41. Advani A, Gilbert RE, Thai K, Gow RM, Langham RG, Cox AJ, et al. Expression, localization, and function of the thioredoxin system in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(4):730-41.
42. Kumar A, Mittal R. Mapping Txnip: Key connexions in progression of diabetic nephropathy. *Pharmacol Rep*. 2018;70(3):614-22.
43. Fiseha T, Tamir Z. Urinary Markers of Tubular Injury in Early Diabetic Nephropathy. *Int J Nephrol*. 2016;2016:4647685.
44. Marcovecchio ML, Colombo M, Dalton RN, McKeigue PM, Benitez-Aguirre P, Cameron FJ, et al. Biomarkers associated with early stages of kidney disease in adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2020;21(7):1322-32.
45. George JA, Gounden V. Novel glomerular filtration markers. A*dv Clin Chem*. 2019;88:91-119.
46. Monteiro MB, Thieme K, Santos-Bezerra DP, Queiroz MS, Woronik V, Passarelli M, et al. Beta-2-microglobulin (B2M) expression in the urinary sediment correlates with clinical markers of kidney disease in patients with type 1 diabetes. *Metabolism*. 2016;65(6):816-24.
47. Caillaud MBCM. A expressão dos genes codificantes da proteína de interação com tiorredoxina, da beta 2 microglobulina e do transportador de tiamina 1, correlaciona-se com marcadores clínicos da doença renal em pacientes com diabetes tipo 1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina 2015.
48. de Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, et al. Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*. 2014;130(13):1110-30.
49. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*. 2003;110(9):1677-82.

50. Perez RV. Os polimorfismos de um único nucleotídeo rs713041 no GPX4 e rs17883901 no GCLC modulam a susceptibilidade à retinopatia diabética em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina2017.
51. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*. 2005;28(4):956-62.
52. Ewing DJ, Clarke BF. Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1982;285(6346):916-8.
53. Ziegler D, Laux G, Dannehl K, Spüler M, Mühlen H, Mayer P, et al. Assessment of cardiovascular autonomic function: age-related normal ranges and reproducibility of spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses. *Diabet Med*. 1992;9(2):166-75.
54. Admoni SN. O polimorfismo de um único nucleotídeo rs713041 no gene GPX4 modula a susceptibilidade à neuropatia autonômica cardiovascular em portadores de diabetes mellitus tipo 1 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina 2017.
55. Santos DPd. A menor expressão do RNA mensageiro do receptor 1 de produtos finais de glicação avançada (AGER1) em células linfomononucleares de sangue periférico está associada à doença renal em portadores de diabetes mellitus tipo 1 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina 2015.
56. Vistisen D, Andersen GS, Hansen CS, Hulman A, Henriksen JE, Bech-Nielsen H, et al. Prediction of First Cardiovascular Disease Event in Type 1 Diabetes Mellitus: The Steno Type 1 Risk Engine. *Circulation*. 2016;133(11):1058-66.
57. Group KDIGOKDW. KDIGO 2020 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2020;98(4S):S1-S115.
58. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
59. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2473-83.
60. Colombo M, Valo E, McGurnaghan SJ, Sandholm N, Blackbourn LAK, Dalton RN, et al. Biomarker panels associated with progression of renal disease in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2019;62(9):1616-27.
61. Deng Y, Li N, Wu Y, Wang M, Yang S, Zheng Y, et al. Global, Regional, and National Burden of Diabetes-Related Chronic Kidney Disease From 1990 to 2019. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:672350.
62. Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, Heagerty PJ, Tuttle K, Weiss NS, et al. Clinical Manifestations of Kidney Disease Among US Adults With Diabetes, 1988-2014. *JAMA*. 2016;316(6):602-10.
63. Gomes MB, Pizarro MH, Muniz LH, Barros BSV, Melo LGN, Santos DC, et al. Prevalence of chronic kidney disease in an admixed population of patients with type 1 diabetes. A multicenter study in Brazil. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;170:108490.

64. Koye DN, Shaw JE, Reid CM, Atkins RC, Reutens AT, Magliano DJ. Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: a systematic review of observational studies. *Diabet Med*. 2017;34(7):887-901.
65. Bakris GL, Molitch M. Are All Patients With Type 1 Diabetes Destined for Dialysis if They Live Long Enough? Probably Not. *Diabetes Care*. 2018;41(3):389-90.
66. Niewczas MA, Pavkov ME, Skupien J, Smiles A, Md Dom ZI, Wilson JM, et al. A signature of circulating inflammatory proteins and development of end-stage renal disease in diabetes. *Nat Med*. 2019;25(5):805-13.
67. Costacou T, Orchard TJ. Cumulative Kidney Complication Risk by 50 Years of Type 1 Diabetes: The Effects of Sex, Age, and Calendar Year at Onset. *Diabetes Care*. 2018;41(3):426-33.
68. Vistisen D, Andersen GS, Hulman A, McGurnaghan SJ, Colhoun HM, Henriksen JE, et al. A Validated Prediction Model for End-Stage Kidney Disease in Type 1 Diabetes. Diabetes Care 2021;44:901-907. *Diabetes Care*. 2021.
69. Helve J, Sund R, Arffman M, Harjutsalo V, Groop PH, Grönhagen-Riska C, et al. Incidence of End-Stage Renal Disease in Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 2018;41(3):434-9.
70. Gagnum V, Saeed M, Stene LC, Leivestad T, Joner G, Skrivarhaug T. Low Incidence of End-Stage Renal Disease in Childhood-Onset Type 1 Diabetes Followed for Up to 42 Years. *Diabetes Care*. 2018;41(3):420-5.
71. Radcliffe NJ, Seah JM, Clarke M, MacIsaac RJ, Jerums G, Ekinci EI. Clinical predictive factors in diabetic kidney disease progression. J *Diabetes Investig*. 2017;8(1):6-18.
72. Krolewski AS, Skupien J, Rossing P, Warram JH. Fast renal decline to end-stage renal disease: an unrecognized feature of nephropathy in diabetes. *Kidney Int*. 2017;91(6):1300-11.
73. Papadopoulou-Marketou N, Paschou SA, Marketos N, Adamidi S, Adamidis S, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Minerva Med*. 2018;109(3):218-28.
74. Williams ME. Diabetic nephropathy: the proteinuria hypothesis. *Am J Nephrol*. 2005;25(2):77-94.
75. Berbari AE. Sodium-Glucose Cotransporter (SGLT2) inhibitors: A new Era in renovascular protection. *Int J Cardiol Hypertens*. 2020;7:100058.
76. Stadler K, Goldberg IJ, Susztak K. The evolving understanding of the contribution of lipid metabolism to diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep*. 2015;15(7):40.
77. Orlov S, Cherney DZ, Pop-Busui R, Lovblom LE, Ficociello LH, Smiles AM, et al. Cardiac autonomic neuropathy and early progressive renal decline in patients with nonmacroalbuminuric type 1 diabetes. *Clin J Am Soc Nephro*l. 2015;10(7):1136-44.
78. Carmines PK. The renal vascular response to diabetes. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(1):85-90.
79. Lovshin JA, Škrtić M, Bjornstad P, Moineddin R, Daneman D, Dunger D, et al. Hyperfiltration, urinary albumin excretion, and ambulatory blood pressure in adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;314(4):F667-F74.

80. Molitch ME, Gao X, Bebu I, de Boer IH, Lachin J, Paterson A, et al. Early Glomerular Hyperfiltration and Long-Term Kidney Outcomes in Type 1 Diabetes: The DCCT/EDIC Experience. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2019;14(6):854-61.
81. Sharma H, Lencioni M, Narendran P. Cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Cardiovasc Endocrinol Metab*. 2019;8(1):28-34.
82. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17016.
83. Arnlöv J, Evans JC, Meigs JB, Wang TJ, Fox CS, Levy D, et al. Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2005;112(7):969-75.
84. Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, Bakker SJ, De Zeeuw D, de Jong PE, et al. An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int Suppl*. 2004(92):S18-21.
85. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH, Landa M, Maschio G, de Jong PE, et al. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin-converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. Ann Intern Med. 2003;139(4):244-52.
86. de Zeeuw D, Remuzzi G, Parving HH, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, et al. Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Circulation*. 2004;110(8):921-7.
87. Zhang J, Liu J, Qin X. Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy. *Rev Assoc Med Bras*. 2018;64(1):85-92.
88. Cañadas-Garre M, Anderson K, McGoldrick J, Maxwell AP, McKnight AJ. Proteomic and metabolomic approaches in the search for biomarkers in chronic kidney disease. *J Proteomics*. 2019;193:93-122.
89. Thieme K, Pereira BMV, da Silva KS, Fabre NT, Catanozi S, Passarelli M, et al. Chronic advanced-glycation end products treatment induces TXNIP expression and epigenetic changes in glomerular podocytes in vivo and in vitro. *Life Sci.* 2021;270:118997.
90. Shah A, Xia L, Goldberg H, Lee KW, Quaggin SE, Fantus IG. Thioredoxin-interacting protein mediates high glucose-induced reactive oxygen species generation by mitochondria and the NADPH oxidase, Nox4, in mesangial cells. *J Biol Chem*. 2013;288(10):6835-48.
91. Shi Y, Ren Y, Zhao L, Du C, Wang Y, Zhang Y, et al. Knockdown of thioredoxin interacting protein attenuates high glucose-induced apoptosis and activation of ASK1 in mouse mesangial cells. *FEBS Lett*. 2011;585(12):1789-95.
92. Huang C, Zhang Y, Kelly DJ, Tan CY, Gill A, Cheng D, et al. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) regulates tubular autophagy and mitophagy in diabetic nephropathy through the mTOR signaling pathway. *Sci Rep*. 2016;6:29196.
93. Zhang Y, Li W, Zhou Y. Identification of hub genes in diabetic kidney disease via multiple-microarray analysis. *Ann Transl Med*. 2020;8(16):997.