

Universidade Federal Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

QUEDA DOS NÍVEIS DE TGF- β_1 URINÁRIOS APÓS REDUÇÃO DA PRESSÃO
ARTERIAL EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 E
NEFROPATIA DIABÉTICA CLÍNICA

Autor: Fulvio Clemo Santos Thomazelli

Orientadora: Profa. Dra. Helena Schmid

Co-orientador: Prof. Dr. Marcello Casaccia Bertoluci

Dissertação de Mestrado

Ano 2003

T465q Thomazelli, Fulvio Clemo Santos

Queda dos níveis de TGF- β_1 urinários após redução da pressão arterial em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 e nefropatia diabética clínica / Fulvio Clemo Santos Thomazelli ; orient. Helena Schmid ; co-orient. Marcello Casaccia Bertoluci. -- 2003.

96 f. : il.

Diseertação (mestrado) -- Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2003.

1. Fator de crescimento transformador beta : Urina 2. Pressão arterial 3. Diabetes mellitus não insulino-dependente 4. Nefropatias diabéticas I. Schmid, Helena II. Bertoluci, Marcello Casaccia III. Título.

NLM: QU 107

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Helena Schmid, pela sua orientação, paciência e dedicação e por despertar em mim a curiosidade científica.

Ao Professor Doutor Marcelo Casaccia Bertolucci pela sua participação, orientação, constante apoio e dedicação.

Ao Bioquímico Fabio Ramos de Oliveira, pelo seu trabalho na realização dos ensaios laboratoriais

A estatística Vânia Hirakata pela sua orientação técnica e paciência.

A acadêmica de Medicina Deise Uebel, bolsista de pesquisa, pelo seu trabalho, dedicação, organização e iniciativa.

Ao acadêmico de Medicina Alexandre Schmidt, bolsista de pesquisa, pela sua iniciativa, participação e disponibilidade.

A minha família (Eloi, Gelly e Patrícia) pelo apoio constante e incondicional.

A todos os pacientes participantes do estudo, pela confiança em mim depositada, gratidão e enriquecimento humano transmitidos ao longo do estudo.

A CAPES, pelo suporte financeiro fornecido para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

Agradecimentos.....	4
Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	8
1.1 Dados epidemiológicos.....	8
1.2 Nefropatia diabética – microalbuminúria como marcador precoce da doença.....	9
1.3 Microalbuminúria: um fator preditivo do desenvolvimento da nefropatia diabética (proteinúria maciça) e da progressão para insuficiência renal crônica terminal.....	10
1.4 Importância do controle pressórico.....	11
1.5 Importância do controle glicêmico.....	12
1.6 Microalbuminúria: um marcador de mortalidade cardiovascular?.....	12
1.7 Microalbuminúria: associação com neuropatia diabética.....	14
1.8 Novos marcadores para nefropatia diabética.....	15
1.9 TGF- β_1 e patogênese da nefropatia diabética.....	17
1.10 TGF- β_1 – evidências de seu papel na nefropatia diabética em seres humanos.....	21
2. Objetivos.....	23
2.1 Referências bibliográficas.....	24
3. Artigo científico redigido em inglês.....	35
3.1 Abstract.....	37
3.2 Introduction.....	38
3.3 Research design and methods.....	39
3.4 Results.....	42
3.5 Discussion.....	44
3.6 Conclusions.....	46
3.7 References.....	48

4. Anexos em inglês (tabelas e figuras).....	52
5. Artigo científico redigido em português.....	63
Queda dos níveis de TGF- β_1 urinários após redução da pressão arterial.....	64
5.1 Resumo.....	65
5.2 Introdução.....	66
5.3 Delineamento do estudo e métodos.....	67
5.4 Resultados.....	71
5.5 Discussão.....	73
5.6 Conclusões.....	76
5.7 Referências bibliográficas.....	77
6. Anexos em português(tabelas e figuras).....	81

ABREVIATURAS

α 1Mg - α 1 microglobulina

AGES – produtos da glicolisação avançada

DM - diabetes mellitus

HbA1c – hemoglobina glicosilada

IECA – inibidores da enzima conversora da angiotensina

IMC – índice de massa corporal

IRC – insuficiência renal crônica

MEC – matriz extra celular

NAG – N-acetil - β - D - glucosaminidase

ND – nefropatia diabética

PA – pressão arterial

PAD – pressão arterial diastólica

PAS – pressão arterial sistólica

RBP – proteína ligadora do retinol

TGF- β ₁ – transforming growth factor beta 1

INTRODUÇÃO

1.1 Dados epidemiológicos

A nefropatia diabética (ND) é responsável por cerca de 36.04% dos casos de Insuficiência Renal Crônica (IRC) em pacientes que se encontram em programas de hemodiálise nos EUA (*USRDS 2000*). Dados brasileiros demonstraram uma prevalência de 17,8% de pacientes diabéticos em programas de hemodiálise, num estudo realizado em 86 de 585 centros de hemodiálise existentes no país. Sendo 3,2% portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 e 14,6% portadores de Diabetes Mellitus tipo 2. (*VIII Registro Brasileiro de Diálise e Transplante Renal, 1998*). Em estudo recente, realizado no Rio Grande do Sul, cerca de 26% dos pacientes em diálise apresentaram o diagnóstico de nefropatia diabética (*Bruno, 1999*).

A uremia se desenvolve em cerca de 50% dos pacientes com DM tipo 1 após 10 a 30 anos de doença (*Marks, 1965*). O estudo DCCT (1995) demonstrou claramente que um controle glicêmico rigoroso reduziu a incidência de albuminúria e progressão da doença renal diabética. Nos pacientes portadores de DM tipo 2 a progressão da nefropatia para o estágio de doença renal crônica terminal ocorre em 5 a 10% (*Mogensen et al. 1988. Diabetes Metab Rev 4:453-483*). No entanto, como a prevalência desse último grupo é maior, a nefropatia diabética em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 é a causa mais freqüente de Insuficiência Renal Crônica terminal.

Em estudo realizado pela Clínica Joslin, com 17654 pacientes portadores de Diabetes, estimou-se uma mortalidade relacionada a presença de doença renal 17 vezes maior em diabéticos do que em não diabéticos (*Entmacher et al, 1964*). O risco relativo de mortalidade em pacientes com nefropatia diabética diagnosticada após os 45 anos é estimado ser 2 vezes maior do que nos não diabéticos (*Geiss et al, 1985*).

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos do desenvolvimento dessa complicação crônica é importantíssimo e permitirá o desenvolvimento de estratégias adequadas para o seu manejo.

1.2 Nefropatia diabética – microalbuminúria como marcador precoce da doença

A detecção precoce da nefropatia diabética (ND) é extremamente importante devido a sua prevalência, a morbi-mortalidade cardiovascular e a progressão para insuficiência renal crônica (IRC) terminal associada (*Mattock et al, 1992; Messent et al, 1992*). Quando a ND é diagnosticada através de métodos clássicos, como a detecção de proteinúria no exame comum de urina ou a diminuição da depuração da creatinina endógena, pouco se pode fazer para impedir a progressão para a falência renal. Por outro lado, a microalbuminúria (excreção urinária de albumina entre 30 a 300 mg/24hs), demonstrada como sendo um marcador de uma fase pré-clínica da ND, refletindo uma anormalidade da membrana basal do glomérulo (*Parving et al, 1982; Viberti et al, 1982; Mogensen et al, 1984; Mogensen 1984; Nelson et al, 1991*), é potencialmente reversível com a utilização de medidas terapêuticas como o controle pressórico e o controle glicêmico. O reconhecimento precoce da presença de lesão renal é fundamental para impedir o avanço da glomeruloesclerose diabética, Tanto o manejo do controle glicêmico como dos níveis da pressão arterial são extremamente importantes, em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1 e tipo 2 (*DCCT, 1995; Krolewski et al, 1995; UKPDS, 1998, Levin et al, 2000; Tabei et al, 2001*).

A microalbuminúria tem sido descrita, classicamente, como um achado precoce, ocorrendo numa fase subclínica da doença renal diabética. Diversos fatores já foram implicados no aumento da excreção urinária de albumina, dentre eles: níveis de pressão arterial (*Cohen et al, 2001; Hoffmann et al, 2001; Ito et al, 2001; Liese et al, 2001; Martinez et al, 2001; Olsen et al, 2001*), mau controle glicêmico (*Krolewski et al, 1995;*

Gorman et al, 1999; Olsen et al, 2001; Tabaei et al, 2001) e exercício físico. Em relação a esse último, nosso grupo, em um estudo que envolveu 16 pacientes diabéticos normoalbuminúricos, não demonstrou diferença entre as taxas de albuminúria induzidas pelo esforço, em relação aos controles não diabéticos, embora tenha sido demonstrado que o exercício é um importante fator contribuinte para o aumento da excreção urinária de albumina (*Bertoluci et al, 1993*).

1.3 Microalbuminúria: um fator preditivo do desenvolvimento da nefropatia diabética (proteinúria maciça) e da progressão para insuficiência renal crônica terminal

Vários estudos prospectivos tem definido a microalbuminúria como fator preditivo para ocorrência de nefropatia diabética em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1. Messent et al (1992) demonstraram , num estudo prospectivo com seguimento de 23 anos, que a microalbuminúria é um importante fator preditivo tanto para progressão da doença renal diabética (risco relativo de 9,3; para o desenvolvimento de proteinúria clínica) como para mortalidade cardiovascular (risco relativo de 2,94); ($p < 0,05$). Em outro estudo prospectivo, com seguimento médio de 10 anos, a microalbuminúria foi demonstrada como um forte fator preditivo para o estabelecimento de nefropatia clínica (86%) e retinopatia proliferativa (70%) (Mogensen,1984). Os pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 microalbuminúricos apresentaram um risco relativo para o desenvolvimento de nefropatia diabética 24x maior que os pacientes normoalbuminúricos, num seguimento médio de 14 anos (Viberti et al,1982). A forte associação entre o desenvolvimento da nefropatia clínica e a presença de microalbuminúria em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 também foi demonstrada no estudo de Parving e cols (1982).

Em relação aos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2, o achado da microalbuminúria apresenta um valor preditivo para o desenvolvimento de nefropatia clínica e progressão para insuficiência renal crônica menos definido do que em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1.

Num estudo dinamarquês prospectivo, com seguimento médio de 10 anos, realizado com pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, a taxa de desenvolvimento de nefropatia clínica foi 4x maior nos pacientes com microalbuminúria (*Mogensen et al, 1984*). Numa população de índios PIMA, portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, durante um seguimento médio de 4 anos, a incidência de nefropatia clínica foi 9,2x maior entre os microalbuminúricos (*Nelson et al, 1991*).

1.4 Importância do controle pressórico

Em estudos nos quais houve tratamento com o objetivo de normalizar precoce e intensivamente a pressão arterial, demonstrou-se uma queda significativa na velocidade de perda da função renal em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 e tipo 2 (*Parving et al, 1983; Estacio et al, 2000; Parving et al, 2001*). O controle intensivo da pressão arterial em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 nefropatas reduziu o risco relativo de mortalidade e necessidade de diálise, em 79% e 73%, respectivamente, independentemente do fármaco anti-hipertensivo utilizado. (*Trocha et al, 1999*). Um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado demonstrou uma redução de 20% ($p= 0,053$) dos níveis de microalbuminúria em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 nefropatas iniciais normotensos (pelo critério PA <150/90mmHg), tratados com ramipril 5 mg, via oral, ao dia (ATLANTIS, 2000). Uma análise retrospectiva, realizada com pacientes idosos portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, demonstrou níveis de pressão arterial significativamente mais altos entre aqueles que apresentaram uma

progressão dos níveis de excreção urinária de albumina. Nesse mesmo estudo, não houve diferença entre os níveis de hemoglobina glicosilada dos dois grupos (Ito et al, 2001).

1.5 Importância do controle glicêmico

O estudo UKPDS, um estudo prospectivo realizado com pacientes portadores de DM tipo 2, no qual se comparou tratamentos intensivos com tratamentos convencionais em relação à hipertensão arterial, demonstrou uma redução de 24% em qualquer desfecho relacionado com o Diabetes, uma redução de 37% no risco de doença microvascular, 32% no risco de mortalidade relacionada ao Diabetes e 44% de redução do risco de acidente vascular cerebral nos pacientes do tratamento intensivo. Em comparação, o controle glicêmico intensivo reduziu o risco da doença microvascular em 25%. (*Ukpds, 1998*).

1.6 Microalbuminúria: um marcador de mortalidade cardiovascular?

Num estudo observacional realizado com 939 pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1, seguidos durante um tempo médio de 10 anos, a microalbuminúria, a nefropatia clínica estabelecida, a hipertensão arterial, o tabagismo e a idade estiveram associados a mortalidade cardiovascular. O efeito preditivo da microalbuminúria sobre a mortalidade cardiovascular, nesses pacientes, pode, em parte ser explicado pela progressão da microalbuminúria para a nefropatia estabelecida (*Rossing et al, 1996*).

Em relação aos pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1, também, foi observado que a microalbuminúria está relacionada a um aumento da prevalência de hipertensão arterial, retinopatia proliferativa, cegueira e neuropatia periférica. (*Parving et al, 1988; Rasmussen et al, 1985*).

No estudo de Mogensen et al (1984) já citado anteriormente, os pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 microalbuminúricos apresentaram um aumento na taxa de mortalidade de 148% quando comparados a mortalidade esperada para aquela população geral, na mesma faixa etária, sendo que as causas-mortis de origem cardiovascular foram predominantes. Mattock et al (1992) , em um estudo prospectivo com 141 pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, demonstraram que a microalbuminúria é um importante fator preditivo de mortalidade cardiovascular, independente de outras variáveis envolvidas, como hipertensão, dislipidemia e tabagismo. Os mecanismos envolvidos entre a microalbuminúria e a morte por doença cardiovascular são pouco conhecidos. Um estudo populacional demonstrou que a microalbuminúria está associada a fatores de risco e a morbidade cardiovascular, mesmo na ausência de hipertensão arterial e Diabetes (Hillege et al, 2001). A microalbuminúria está associada a vários outros potenciais fatores de risco cardiovasculares: pressão arterial elevada, dislipidemia, agregabilidade plaquetária aumentada, disfunção endotelial, insulino resistência e hiperinsulinemia. Dentre as diversas explicações propostas para a maior mortalidade cardiovascular relacionada a microalbuminúria, poderia estar relacionada a uma vasculopatia, ou melhor, a uma disfunção endotelial sistêmica. Essa disfunção endotelial promoveria o desenvolvimento de um estado de hipercoagulabilidade, que por sua vez estaria relacionada ao processo de aterogênese (*Jensen et al,1989; Jensen,1989*). Um perfil lipídico que favorece a aterotrombose, bem como uma hiperfibrinogenemia já foram descritos em pacientes diabéticos e microalbuminúricos (*Jones et al,1989; Kapelrud et al,1991*). Estudos realizados com pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 microalbuminúricos, demonstraram uma sensibilidade a insulina diminuída em relação aos normoalbuminúricos , avaliada através do método do compleamento euglicêmico. (*Yip et al,1993*).

1.7 Microalbuminúria: associação com a neuropatia diabética

Na década de 70, Ewing e cols publicaram um estudo prospectivo, com seguimento médio de cinco anos, realizado em 73 pacientes e demonstraram uma mortalidade aumentada entre os pacientes portadores de neuropatia autonômica (53%) em relação aos pacientes diabéticos sem neuropatia (15%). Em estudo citado anteriormente, a microalbuminúria, está associada a presença de neuropatia periférica (*Parving et al, 1988*)

Um estudo transversal realizado pelo nosso grupo, com 132 pacientes portadores de Diabetes Mellitus, demonstrou uma forte associação entre a presença e intensidade da neuropatia autonômica e a presença de retino e nefropatia diabéticas (*Neumann et al, 1995*). Na linha de pesquisa em complicações crônicas desenvolvida em nosso grupo, já foi também demonstrado, num estudo de casos e controles, uma associação entre a presença de retinopatia diabética proliferativa e neuropatia diabética autonômica cardiovascular, que após o ajuste para presença de nefropatia, hipertensão arterial e retinopatia não proliferativa, apresentou uma razão de chances de 7,1. (*Schmid et al, 1995*). Os pacientes diabéticos portadores de neuropatia autonômica cardiovascular também apresentaram episódios mais frequentes e prolongados de dessaturação noturna, quando comparados aos controles não diabéticos. Isto poderia contribuir para o desenvolvimento de arritmias cardíacas e, conseqüentemente, de morte súbita. (*Neumann, 1995; Schmid et al, 2000*).__O estudo HOORN demonstrou, através da utilização de um escore padronizado de avaliação da função autonômica cardiovascular, uma associação entre a disfunção autonômica cardiovascular e a presença de microalbuminúria nos pacientes portadores de intolerância a carboidratos ou Diabetes Mellitus tipo 2, independente da idade e da pressão arterial (*Smulders et al, 2000*). Nesse mesmo estudo, o subgrupo de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e disfunção autonômica apresentaram uma taxa de mortalidade duas vezes maior em

relação aos indivíduos não diabéticos, normotensos e sem antecedentes cardiovasculares (Gerritsen et al, 2001).

1.8 Novos marcadores para a nefropatia diabética

Deste modo, em termos prognósticos, poderia ser melhor a detecção da ND numa fase anterior à da microalbuminúria, objetivando ações terapêuticas mais precoces.

Nesse sentido outros marcadores para disfunção renal do diabetes tem sido buscados, tais como: transferrina urinária, a imunoglobulina G urinária, fibronectina plasmática e urinária, laminina P1 sérica e urinária e o colágeno tipo IV sérico e urinário, como marcadores glomerulares (*Hong et al, 1998*).

A concentração plasmática da fibronectina apresentou-se elevada num grupo de pacientes diabéticos tipo 1 em relação a indivíduos controles normais, porém a correlação com a albuminúria era fraca ($r = 0,35$; $p < 0,05$) (*Ozata et al, 1995*). Num estudo realizado com pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 a excreção urinária de colágeno tipo IV e de laminina P1 foi maior que em pacientes nefropatas não diabéticos, para os mesmos níveis de creatinina e albuminúria (*Banu et al, 1995*). O aumento da excreção urinária da transferrina após o exercício foi demonstrado em pacientes diabéticos tipo 1 em relação aos controles normais. Esse aumento foi maior do que a elevação da albuminúria após o exercício que também ocorre nos pacientes diabéticos (*O'Donnell et al, 1991*).

A excreção urinária de transferrina, albumina, N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) encontra-se aumentada em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 portadores de retinopatia. Nesse estudo a transferrinúria estava aumentada em 72% dos pacientes portadores de retinopatia, enquanto que a excreção aumentada de albumina estava presente em 35% (*Martin et al, 1992*). A excreção urinária aumentada de transferrina, numa fase mais precoce que a microalbuminúria, também já foi descrita em

pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, (Cheung et al, 1989; Konen et al, 1993). Além disso, como marcadores tubulares, a $\beta 2$ microglobulina urinária, a proteína ligadora do retinol urinária (RBP) e os antígenos da borda em escova (os antígenos tubulares) na urina estão aumentados em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1, numa fase pré-albuminúrica, em relação à controles normais (Ginevri et al, 1993). Shimizu et al (1992) demonstraram uma excreção urinária da RBP aumentada em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2. Em outro estudo foi demonstrada uma correlação positiva entre a excreção urinária da RBP e a albuminúria (Holm et al, 1993). Neri et al (1995) encontrou níveis plasmáticos aumentados de $\beta 2$ microglobulina em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 microalbuminúricos em relação aos normoalbuminúricos e aos controles normais. A NAG e a $\alpha 1$ microglobulina ($\alpha 1$ MG) urinárias, bem com os marcadores glomerulares transferrina e imunoglobulina G urinários estavam aumentados em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1, em relação aos controles normais (Kordonouri et al, 1992). O aumento da excreção da NAG também já foi encontrado em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, mesmo naqueles sem evidência clínica de nefropatia (normoalbuminúricos). Nesse mesmo estudo foi encontrada uma correlação positiva entre a excreção urinária day -glutamil transpeptidase e a taxa de filtração glomerular. As alterações da excreção urinária da NAG e da γ -glutamil transpeptidase foram reduzidas com a melhora do controle metabólico naqueles pacientes sem nefropatia clínica (Ikenaga et al, 1993). A enzima colinesterase também já foi descrita como tendo sua excreção aumentada em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 (Matteucci et al, 1992). A monitorização da excreção urinária da proteína de Tamm-Horsfall, um marcador de lesão tubular distal, e a $\alpha 1$ MG (marcador de lesão tubular proximal) já foi sugerida para o seguimento da evolução da nefropatia diabética em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 (Pfleiderer et al, 1993).

Dentre todos os possíveis novos marcadores da nefropatia diabética, o Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- β_1) tem recebido grande enfoque da literatura.

1.9 TGF- β_1 e patogênese da nefropatia diabética

A ND consiste num conjunto de modificações estruturais e funcionais que ocorrem no rim do paciente diabético. As alterações estruturais incluem a hipertrofia renal, o aumento da espessura da membrana basal glomerular, o acúmulo de matriz extracelular no glomérulo (glomeruloesclerose), a atrofia tubular e fibrose túbulo-intersticial. As alterações funcionais incluem o aumento da taxa de filtração glomerular, a hipertensão glomerular, a proteinúria e a hipertensão arterial sistêmica. Essas alterações, em conjunto, levam a uma queda progressiva da função renal, que, por último, determina o estabelecimento da insuficiência renal crônica (IRC). A expansão mesangial, a hialinose arteriolar, a esclerose glomerular global e a expansão intersticial foram descritas como lesões inter-relacionadas na patogênese da nefropatia diabética, através da realização de biópsias percutâneas em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1 (*Lane et al, 1993*).

Vários fatores têm sido implicados na progressão da doença renal, dentre eles encontram-se: predisposição genética, características raciais (*Earle et al, 2001*), controle dos níveis de pressão arterial, níveis de ingestão diária de sal e proteínas, controle glicêmico e intervenção terapêutica precoce.

O TGF- β_1 é um peptídeo pertencente a uma família de citocinas (TGF β_1 , TGF β_2 , TGF β_3), com um peso molecular de 25kDa na sua forma ativa composto por duas subunidades idênticas unidas por uma ponte dissulfeto (*Border et al, 1996*). Essa citocina possui uma capacidade especial de indução da fibrinogênese. O TGF- β , em estudo realizado com células epiteliais glomerulares, foi o único fator de crescimento capaz de

modular a produção de matriz extracelular bem como o aumento simultâneo da produção pelas células glomerulares mesangiais e epiteliais das proteínas componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, fibronectina, colágeno tipo IV e laminina) (*Nakamura et al, 1992*). Em outro estudo, realizado com células mesangiais provenientes de camundongos, *in vitro*, foi demonstrado um aumento da síntese de colágeno tipo I e IV, induzido pela hiperglicemia e mediado pela ação do TGF- β (*Ziyadeh et al, 1994*). Através de suas ações simultâneas: (1) promoção da síntese de matriz extracelular, através do estímulo dos genes responsáveis pelas proteínas da matriz (2) inibição da degradação da matriz, através da inibição da produção das proteases e aumento da síntese dos inibidores dessas mesmas proteases, (3) modulação da expressão do receptor da matriz (integrinas na superfície celular) para facilitar as interações célula-matriz e (4) autoindução da produção do TGF- β , o que amplifica sua ação (*Border et al, 1994*).

O TGF β é um potente regenerador tissular, com um sistema de auto-regulação. Um desequilíbrio nesse sistema poderia ser o responsável pelo desenvolvimento da fibrose renal progressiva que ocorre na ND (hipótese do ciclo vicioso). (*Border et al, 1997*). Reforçando a hipótese do ciclo vicioso, Yamamoto et al (1994) demonstraram expressão sustentada a longo prazo do TGF- β_1 mRNA em ratos após a segunda injeção com anticorpos reativos contra as células mesangiais, que induziram um processo progressivo de fibrose renal .

Num estudo realizado com ratos Sprague-Dawley com diabetes induzido pela injeção de estreptozotocina, houve um aumento de duas vezes da expressão do TGF- β_1 mRNA a nível glomerular e cortical renal em relação aos ratos não diabéticos, após a instalação da hiperglicemia, durante a fase de hipertrofia renal. O tratamento intensivo com insulina reduziu a hiperexpressão do TGF- β_1 mRNA (*Shankland et al, 1994*). A ação pró-esclerótica do TGF- β induzida por meios hiperglicêmicos em células corticais e mesangiais glomerulares também já foi demonstrada por vários autores em "in vitro" (

Nakamura et al, 1992; Bollineni et al, 1993; Zyadeh et al, 1994; Hoffman et al; 1998; Oh et al; 1998; Han et al; 1999).

Um estudo em ratos com Diabetes induzida pela injeção de estreptozotocina demonstrou um aumento da expressão do TGF- β_1 mRNA a nível glomerular, poucas semanas após o estabelecimento da hiperglicemia (*Nakamura et al,1993*). Estudo realizado pelo nosso grupo, no mesmo modelo experimental, mostrou que o mRNA-TGF β_1 , além de aumentar precocemente no glomérulo durante a evolução da ND, é acompanhado pela deposição da proteína TGF- β_1 e de colágeno tipo I a nível de mesângio e de alças capilares glomerulares. Nesse mesmo estudo, num seguimento de 40 semanas, foi observada uma correlação positiva significativa entre a deposição glomerular do TGF- β_1 e a carga excretada de albumina (*Bertoluci et al,1996*). Os níveis de TGF- β_1 urinários também foram relacionados aos níveis de esclerose glomerular e com a presença de crescentes em coelhos. (*Noh et al,1993*).

A atividade de transcrição do gene do TGF- β_1 e, conseqüentemente, a produção da proteína TGF- β_1 e sua bioatividade foram estimuladas em células mesangiais de camundongo cultivadas num ambiente rico em glicose (*Hoffman et al,1998*). Quando cultivadas em ambientes com altas concentrações de glicose, células corticais renais de camundongo apresentaram um aumento de 83% na expressão do TGF- β_1 mRNA e de 69% na produção de colágeno tipo 1 em relação as mesmas células quando cultivadas em ambiente normoglicêmico. O efeito da hiperglicemia foi atenuado pela adição de anticorpo anti-TGF- β neutralizante pan-seletivo (*Han et al,1999*). Células mesangiais provenientes de ratos, quando cultivadas em meio com concentrações elevadas de glicose, apresentam um aumento da expressão do TGF- β_1 mRNA, que precede o aumento da síntese de fibronectina. O efeito das altas concentrações de glicose, nesse estudo, foi abolido pela adição de anticorpo anti-TGF- β (*Oh et al,1998*).

Isono e cols (2000) demonstraram um aumento da expressão dos receptores de

TGF- β_1 (T β IIIR) nas células mesangiais de camundongos diabéticos estreptozotocina induzidos. Um aumento da expressão do TGF- β_1 mRNA e da ativação do seu receptor (T β IIIR) também já foi demonstrado em células glomerulares e tubulares em ratos db/db (modelo animal experimental do Diabetes Mellitus tipo 2) (Hong et al, 2001).

Em outro estudo realizado em modelo animal, as células glomerulares de ratos não diabéticos, "in vitro", apresentaram um aumento da produção de colágeno através da adição do TGF- β_1 . A adição de anticorpo anti-TGF- β_1 inibiu esse efeito. Os níveis circulantes e a expressão glomerular do TGF- β_1 mRNA encontravam-se aumentados nas células glomerulares de ratos diabéticos em relação às células normais (Bollineni et al, 1993). Sharma et al também demonstraram que a adição do anticorpo monoclonal anti-TGF- β_1 , β_2 e β_3 reduziu a hipertrofia renal e a expressão dos genes da matriz extracelular em ratos com Diabetes estreptozotocina-induzido, sem promover nenhum efeito nos níveis sanguíneos de glicose. (Sharma et al, 1996).

Todas as evidências apontadas anteriormente sugerem que o TGF- β_1 tenha um papel importante na indução da glomeruloesclerose diabética. Os mecanismos responsáveis pelo aumento dos níveis renais de TGF- β_1 , no entanto, ainda não são completamente conhecidos. Ziyadeh e cols (1998) demonstraram, num estudo realizado com células mesangiais de camundongo "in vitro", que a albumina glicada estimulou a expressão do gene do TGF- β , mesmo na presença de condições de normoglicemia. Os produtos da glicosilação avançada (AGES), através da ação da proteína quinase C, aumentaram a síntese do TGF- β bioativo em células mesangiais humanas (Kim et al, 2001). Recentemente, nosso grupo demonstrou um aumento da albuminúria, do TGF- β_1 urinário e do transportador de glicose GLUT-1 a nível cortical. Os resultados permitiram especular sobre a possibilidade de que o aumento dos níveis da proteína GLUT-1 a nível cortical ampliaria os efeitos hiperglicêmicos a nível de células mesangiais para o desenvolvimento da glomerulo-esclerose diabética. (Schaan et al, 2001).

Em estudos com células mesangiais e glomerulares em meio de cultura foi demonstrado que o estiramento mecânico das paredes celulares (modelo experimental para simulação do efeito da hipertensão) e a hiperglicemia possuem ação sinérgica na promoção de síntese de produtos da matriz extracelular. (*Riser et al, 1998*) e (*Cortes et al, 1997*). O sistema renina-angiotensina também pode estar envolvido no estímulo da produção do TGF- β . O losartan (droga bloqueadora dos receptores AT-1 da angiotensina) normalizou, *in vitro*, a secreção mesangial de TGF- β_1 induzida por um meio rico em glicose. Demonstrou-se, também, que a angiotensina II possui uma ação estimuladora da secreção de TGF- β_1 (*Singh et al, 1999*). Hill e cols (2001) demonstraram um efeito inibitório do enalapril sobre a expressão glomerular do receptor do TGF- β (T β IIIR) em ratos Wistar portadores de Diabetes induzida por injeção intravenosa de estreptozotocina.

1.10 TGF- β_1 – evidências do seu papel na nefropatia diabética em seres humanos

É provável que o TGF- β_1 seja um importante mediador da glomeruloesclerose diabética humana. Como ele está relacionado ao acúmulo de matriz extracelular na região mesangial, o TGF- β_1 seria um marcador mais precoce que a microalbuminúria, que, por sua vez refletiria a lesão ocasionada pelo diabetes a nível glomerular (filtração).

Suthanthiran et al (1998) demonstraram uma hiperexpressão do TGF β_1 em 56 pacientes negros comparados com 42 brancos em programa de hemodiálise, o que poderia justificar a prevalência aumentada de IRC terminal nos primeiros.

A expressão de TGF- β_1 mRNA estava aumentada nos glomérulos de pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 com nefropatia em relação aos controles (dados obtidos através de biópsia renal percutânea). Os controles eram constituídos pela porção normal de rins que haviam sido extraídos por carcinoma renal. (*Iwano et al, 1996*)

Em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 1, células mononucleares periféricas apresentaram secreção aumentada de TGF- β_1 (*Korpinen et al, 2001*). A

elevação dos níveis plasmáticos de TGF- β_1 também já foi demonstrada em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2. (Pfeiffer et al, 1996).

O TGF- β_1 está aumentado ou porque, assim como a albumina, estaria sendo filtrado em maior quantidade ou estaria sendo produzido em maior quantidade pelo rim diabético. Sharma e cols através da cateterização da artéria e veia renais realizadas em pacientes diabéticos que eram submetidos a investigação para cardiopatia isquêmica, mostraram que há um aumento real na produção renal de TGF- β_1 nestes pacientes. (Sharma et al, 1997)

Considerando as evidências da produção renal de TGF- β_1 , a hipótese de que sua medida na urina possa refletir a presença de glomeruloesclerose deve ser considerada. Sua medida poderia ser útil como marcador de progressão da glomeruloesclerose diabética.

O estudo das complicações crônicas do Diabetes Mellitus constitui uma linha de pesquisa que já vem sendo desenvolvida, por nosso grupo sob a coordenação da Professora Dra Helena Schmid, há vários anos. (Bertoluci et al, 1992; Neumann et al, 1995; Schmid et al, 1995; Bertoluci et al, 1996; Schaan et al, 2001). Dando continuidade a essa linha, realizamos a determinação dos valores urinários do TGF- β_1 em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, hipertensos e portadores de nefropatia clínica estabelecida (duas dosagens de proteinúria de 24hs > 500mg), bem como a influência do controle dos níveis de pressão arterial sobre os mesmos.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi determinar a influência da redução da pressão arterial sobre os níveis de TGF- β_1 urinário em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, com nefropatia diabética clínica estabelecida. Nós também avaliamos se os níveis plasmáticos de TGF- β_1 são influenciados pelo grau de intensidade do controle da pressão arterial e se há correlação entre os níveis tensionais e o TGF- β_1 urinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. ATLANTIS Study Group. Low-dose ramipril reduces microalbuminuria in type 1 diabetic patients without hypertension. *Diabetes Care* 2000; 23: 1823-1829.
2. Banu N, Hara H, Okamura M, Egusa G, Yamakido M. Urinary excretion of type IV collagen and laminin in the evaluation of nephropathy in NIDDM: comparison with urinary albumin and markers of tubular dysfunction and/or damage. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29: 57-67.
3. Bertoluci MC, Friedman G, Schaan BD, Ribeiro JP, Schmid H. Intensity-related exercise albuminuria in insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1993; 19: 217-225.
4. Bertoluci MC, Schmid H, Lachat JJ, Coimbra TM. Transforming Growth Factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. *Nephron* 1996; 74: 189-196
5. Bollineni JS, Reddi AS. Transforming growth factor- β_1 enhances glomerular collagen synthesis in diabetic rats. *Diabetes* 1993; 42: 1673-1677.
6. Border WA, Noble NA. TGF- β in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kid Int* 1997; 51: 1388-1396.
7. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.
8. Border WA, Yamamoto T, Noble NA. Transforming growth factor β in diabetic nephropathy. *Diabetes/Metabolism Reviews* 1996; 12(4): 309-339.
9. Bruno R. Pacientes diabéticos em diálise. Características clínicas, sobrevida e fatores prognósticos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica: Endocrinologia, março de 1999.
10. Cheung CK, Cockram CS, Yeung VTF, Swaminathan R. Urinary excretion of transferrin by non-insulin-dependent diabetics: a marker for early complications? *Clin Chem* 1989;

35(8): 1672-1674.

11. Cohen CN, Albanesi FM, Gonçalves MF, Gomes MB. Microalbuminuria, high blood pressure burden, and nondipper phenomenon. *Diabetes Care* 2001; 24 (4): 790-791.
12. Cortes P, Zhao X, Riser BL, Narins RG. Role of glomerular mechanical strain in pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kid Int* 1997; 51: 57-68.
13. Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Kid Int* 1995; 47: 1703-1720.
14. Earle KA, Porter KK, Ostberg J, Yudkin JS. Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 286-290.
15. Entmacher PS, Root HF, Marks HH. Longevity of diabetic patients in recent years. *Diabetes* 1964; 13: 373-377.
16. Estacio RO, Jeffers BW, Gifford N, Schrier RW. Effect of blood pressure control on diabetic microvascular complications in patients with hypertension and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000 23 (suppl 2): B54-B64.
17. Ewing DJ, Campbell IW, Clarke BF. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. *Quarterly J Med* 1980; 193: 95-108.
18. Geiss LS, Hermann WH, Teutsch SM. Diabetes and renal mortality in the United States. *Am J Public Health* 1985; 75 (11): 1325-1326.
19. Gerritsen J, Dekker JM, Tenforde BJ, Kostense PJ, Heine RJ, Bouter LM, Heethaar RM, Stehouwer CDA. Impaired autonomic function is associated with increased mortality, especially in subjects with diabetes, hypertension, or a history of cardiovascular disease. The Hoorn Study. *Diabetes Care* 2001; 24: 1793-1798.
20. Ginevri F, Piccotti E, Alinovi R, Detoni T, Biagini C, Chiggeri GM, Gusmano R. Reversible tubular proteinuria precedes microalbuminuria and correlates with the metabolic status in diabetic children. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 23-26.

21. Gorman D, Sochett E, Daneman D. The natural history of microalbuminuria in adolescents with type 1 diabetes. *J Pediatr* 1999; 134: 333-337.
22. Han DC, Isono M, Hoffman BB, Ziyadeh FN. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF- β . *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1891-1899.
23. Hill C, Logan A, Smith C, Gronbaek H, Flyvbjerg A . Angiotensin converting enzyme inhibitor suppresses glomerular transforming growth factor β receptor expression in experimental diabetes in rats. *Diabetologia* 2001; 44: 495-500.
24. Hillege HL, Janssen WMT, Bak AAA, Diercks GFH, Grobbee DE, Crijns HJGM, Van Gilst WH, De Zeeuw D, De Jong PE. PREVEND Study Group. *J Inter Med* 2001; 249: 519-526.
25. Hoffman BB, Sharma K, Zhu Y, Ziyadeh FN. Transcriptional activation of transforming growth factor- β 1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kid Int* 1998; 54: 1107-1116.
26. Hoffmann IS, Jimenez E, Cubeddu LX. Urinary albumin excretion in lean, overweight and obese glucose tolerant individuals: its relationship with dyslipidemia, hyperinsulinemia and blood pressure. *J Human Hypert* 2001; 15: 407-412.
27. Holm J, Hemmingsen L, Nielsen NV. Low-molecular-mass proteinuria as a marker of proximal renal tubular dysfunction in normo and microalbuminuric non-insulin-dependent diabetics subjects. *Clin Chem* 1993; 39(3): 517-519.
28. Hong CY, Chia KS. Markers of diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 1998;12: 43-60.
29. Hong SW, Isono M, Chen S, Cruz MCI, Han DC, Ziyadeh FN. Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor- β 1, its type II receptor, and activation of the smad signaling pathway in the db/db mouse. *Am J Pathol* 2001; 158: 1653-1663.
30. Ikenaga H, Suzuki H, Ishii N, Itoh H, Saruta T. Enzymuria in non-insulin-dependent

- diabetic patients: sign of tubular cell dysfunction. *Clin Sci Colch* 1993; 84: 469-475.
31. Isono M, Mogyrosi A, Han DC, Hoffman BB, Ziyadeh FN. Stimulation of TGF- β type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F830-F838.
 32. Ito Y, Utsugi T, Ohyama Y, Ohno T, Uchiyama T, Tomono S, Kawazu S, Kurabayashi M. Role of blood pressure in the progression of microalbuminuria in elderly japanese type 2 diabetic patients: a 7 year follow-up study. *J Int Med Res* 2001; 29: 280-286.
 33. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K. Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kid Int* 1996; 49: 1120-1126.
 34. Jensen T, Rasmussen BF, Knudsen JB, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; i: 461-463.
 35. Jensen T. Increased plasma concentration of von Willebrand factor in insulin dependent diabetics with incipient nephropathy. *Brit Med J* 1989; 298 : 27-28.
 36. Jones SL, Close CF, Mattock MB, Jarrett RJ, Keen H, Viberti GC. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetics with microalbuminuria. *Brit Med J* 1989; 298: 487-490.
 37. Kapelrud H, Bangstad HJ, Jorgensen KD, Berg K, Hanssen KF. Serum Lp(a) lipoprotein concentrations in insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Brit Med J* 1991; 303: 675-678.
 38. Kim YS, Kim BC, Song CY, Hong HK, Moon KC, Lee HS. Advanced glycosilation end products stimulate collagen mRNA synthesis in mesangial cells mediated by protein kinase C and transforming growth factor-beta. *J Lab Clin Med* 2001;138:59-68.
 39. Konen J, Shihabi Z, Newman J. The association of non-insulin-dependent diabetes mellitus and hypertension with urinary excretion of albumin and transferrin. *Am J Kid Dis* 1993; 22(6): 791-797.

40. Kordonouri O, Jörres A, Müller C, Enders I, Gahl GM, Weber B. Quantitative assessment of urinary protein and enzyme excretion- a diagnostic programme for the detection of renal involvement in type I diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: 781-790.
41. Korpinen E, Groop PH, Fagerudd JÁ, Teppo AM, Akerblom HK, Vaarala O . Increased secretion of TGF- β 1 by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 1 diabetes mellitus with diabetic nephropathy. *Diabetic Medicine* 2001; 18: 121-125.
42. Krolewski AS, Laffel LMB, Krolewski M, Quinn M, Warram JH. Glycosilated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 332: 1251-1255.
43. Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, Mauer SM. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kid Int* 1993; 43: 661-667.
44. Levin SR, Coburn JW, Abaira C, Henderson WG, Colwell JÁ, Emanuele NV, Nuttall FQ, Sawin CT, Comstock JP, Silbert CK. Effect of intensive glycemic control on microalbuminuria in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23 (10): 1478-1485.
45. Liese AD, Hense HW, Döring A, Stieber J, Keil U. Microalbuminuria, central adiposity and hypertension in the non-diabetic urban population of the MONICA Augsburg survey 1994/95. *J Human Hypert* 2001; 15: 799-804.
46. Marks HH. Longevity and mortality of diabetics. *Am J Public Health* 1965; 55 (3): 416-423.
47. Martin P, Tindall H, Harvey JN, Handley TM, Chapman C, Davies JÁ. Glomerular and tubular proteinuria in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without retinopathy. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 265-270.
48. Martinez MA, Moreno A, Cárcer AA, Cabrera R, Rocha R, Torre A, Nevado A, Ramos T, Neri J, Antón G, Miranda I, Fernández P, Rodríguez E, Miquel A, Martínez JL, Rodríguez M, Eisman C, Puig JG. MAPA-Madrid Working Group. Frequency and determinants of

microalbuminuria in mild hypertension: a primary-care-based study. *J Hypertens* 2001; 19: 319-326.

49. Matteucci E, Pellegrini L, Uncini-Manganelli C, Cecere M, Saviozzi M, Giampietro °
Urinary cholinesterase activity is increased in insulin-dependent diabetics: further evidence of diabetic tubular dysfunction. *Enzyme* 1992; 46: 315-318.
50. Mattock MB, Morrish NJ, Viberti G, Keen H, Fitzgerald AP, Jackson G. Prospective Study of Microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 736-741.
51. Messent JWC, Elliott TG, Hill RD, Jarrett RJ, Keen H, Viberti G. Prognostic significance of microalbuminuria in insulin-dependent diabetes mellitus: A twenty-three year follow-up study. *Kidney Int* 1992; 41: 836-839.
52. Mogensen CE, Christensen. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984; 311 (2) : 89-93.
53. Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* 1984; 310 (6) : 356-360.
54. Nakamura T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Nagaoka I, Tomino Y, Koide H. mRNA expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Diabetes* 1993;42:450-456.
55. Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor- β 1. *Kid Int* 1992; 41: 1213-1221.
56. Nelson RG, Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Charles MA, Bennett PH. Assessment of risk of overt nephropathy in diabetic patients from albumin excretion in untimed urine specimens. *Arch Intern Med* 1991; 151 : 1761-1765.
57. Neri S, Bruno CM. Beta2-microglobulina plasmatica in soggetti com diabete mellito non insulino-dependente. *Minerva Med* 1995; 86: 11-5.
58. Neumann C, Martinez D, Schmid H. Nocturnal oxygen desaturation in diabetic patients with severe autonomic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28: 97-102.

59. Neumann C, Schmid H. Relationship between the degree of cardiovascular autonomic dysfunction and symptoms of neuropathy and other complications of diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 751-757.
60. Noh JW, Wiggins R, Phan SH. Urine transforming growth factor- β activity is related to the degree of scarring in crescentic nephritis in the rabbit. *Nephron* 1993; 63: 73-78.
61. O'Donnell MJ, Martin P, Cavan D, Parkes A, Chapman J, Chapman C, Barnett AH. Increased urinary transferrin excretion in exercising normoalbuminuric insulin-dependent diabetic patients. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 456-460.
62. Oh JH, Ha H, Yu MR, Lee HB. Sequential effects of high glucose on mesangial cell transforming growth factor- β 1 and fibronectin synthesis. *Kid Int* 1998; 54: 1872-1878.
63. Olsen BS, Johannesen J, Sjolie AK, Borch-Johnsen K, Hougaard P, Thorsteinsson B, Pramming S, Marinelli K, Mortensen HB and the Danish Study Group of Diabetes in childhood. Metabolic control and prevalence of microvascular complications in young Danish patients with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999; 16: 79-85
64. Ozata M, Kurt I, Azal O, Bolu E, Corakci A, Beyhan Z, Karaca L, Gündogan MA. Can we use plasma fibronectin levels as a marker for early diabetic nephropathy. *Endocrine Journal* 1995; 42(2): 301-305.
65. Parving HH, Hommel E, Jensen BR, Hansen HP. Long-term beneficial effect of ACE inhibition on diabetic nephropathy in normotensive type 1 diabetic patients. *Kid Int* 2001; 60: 228-234.
66. Parving HH, Hommel E, Mathiesen E, Skott P, Edsberg B, Bahnsen M, Lauritzen M, Hougaard P, Lauritzen E. Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *Brit Med J* 1988; 296: 156-160.
67. Parving HH, Oxenboll B, Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR. Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary

- albumin excretion. *Acta Endocrinologica* 1982; 100: 550-555.
68. Parving HH, Smidt UM, Andersen AR, Svendsen PA. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet* 1983; i: 1175-1178.
69. Pfeiffer A, Bisping KM, Drewes C, Schatz H. Elevated plasma levels of transforming growth factor- β 1 in NIDDM. *Diabetes Care* 1996; 19(10): 1113-1117.
70. Pfeleiderer S, Zimmerhackl LB, Kinne R, Manz F, Schuler G, Brandis M. Renal proximal and distal tubular function is attenuated in diabetes mellitus type 1 as determined by the renal excretion of α 1-microglobulin and Tamm-Horsfall protein. *Clin Investig* 1993; 71: 972-977.
71. Rasmussen BF, Johnsen KB, Mathiesen ER. Hypertension in diabetes as related to nephropathy. Early blood pressure changes. *Hypertension* 1985; suppl II, v 7 (6): 18-21.
72. Riser BL, Cortes P, Yee J, Sharba AK, Asano K, Barbero AR, Narins RG. Mechanical strain and high glucose induced alterations in mesangial cell collagen metabolism: role of TGF- β . *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 827-836.
73. Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes: 10 year observational follow up study. *Brit Med J* 1996; 313: 779-784.
74. Schaan BD, Lacchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased renal GLUT1 abundance and urinary TGF- β 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res*, 2001; 33: 664-669.
75. Schmid H, Bertoluci MC, Schaan B, Golbert A, Neumann C. Nerve growth factor and transforming growth factor- β -1: role in the pathogenesis and progression of diabetic complications. *Ciencia e Cultura J Braz Assoc Adv Science* 2000; 52 (6): 358-366.
76. Schmid H, Schaan B, Cecconello F, Maestri T, Neumann C. Proliferative diabetic retinopathy is related to cardiovascular autonomic neuropathy in non-insulin-dependent

- diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 29: 163-168.
77. Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor- β 1 during diabetic renal hipertrophy. *Kid Int* 1994; 46: 430-442.
 78. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- β by anti-TGF- β antibody attenuates kidney hipertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-530.
 79. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BRC, Kurnik PB, Weisberg LS. Increased renal production of transforming growth factor- β ₁ in patients with type II diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 854-859.
 80. Shimizu H, Negishi M, Shimomura Y, Mori M. Changes in urinary retinol binding protein excretion and other indices of renal tubular damage in patients with non-insulin dependent diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1992; 18: 207-210.
 81. Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 1999; 48: 2066-2073.
 82. Smulders YM, Jager A, Gerritsen J, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CDA. Cardiovascular autonomic function is associated with (micro-) albuminuria in elderly caucasian subjects with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes. The HOORN Study. *Diabetes Care* 2000; 23: 1369-1374.
 83. Suthanthiran M, Khanna A, Cukran D, Adhikarla R, Sharma VK, Singh T, August P. Transforming growth factor- β 1 hyperexpression in African american end-stage renal disease patients. *Kid Int* 1998; 53: 639-644.
 84. Tabaei BP, Al-Kassab AS, Ilag LL, Zawacki CM, Herman WH. Does microalbuminuria predict nephropathy? *Diabetes Care* 2001; 24: 1560-1566.
 85. Trocha AK, Schmidtke C, Didjurgeit U, Muhlhauser I, Bender R, Berger M, Sawicki PT. Effects of intensified antihypertensive treatment in diabetic nephropathy: mortality and morbidity results of a prospective controlled 10-year study. *J Hypertens* 1999; 17: 1497-

1503.

86. UK Prospective Diabetes Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *British Med J* 1998; 317: 703-726.
87. US Renal Data System, USRDS 2000 Annual Data Report. The National Institute of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesda, MD, March 2000.
88. Viberti GC, Jarrett RJ, Mahmud U, Hill RD, Argyropoulos A, Keen H. Microalbuminuria is a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1982; (1): 1430-1432.
89. VIII Registro Brasileiro de Diálise e Transplante Renal. Apresentado no XIX Congresso Brasileiro de Nefrologia, em Porto Alegre, out 1998. Sociedade Brasileira de Nefrologia – Centro de Informática da Escola Paulista de Medicina. www.sbn.org.br
90. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kid Int* 1994; 45: 916-927.
91. Yip J, Mattock MB, Morocutti A, Sethi M, Trevisan R, Viberti G. Insulin resistance in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Lancet* 1993; 342: 883-887.
92. Ziyadeh FN, Han DC, Cohen JA, Guo J, Cohen MP. Glycated albumin stimulates fibronectin gene expression in glomerular mesangial cells: involvement of the transforming growth factor- β system. *Kid Inter* 1998; 53: 631-638.
93. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1994; 93: 536-542.

3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

Decrease of the Levels of Urinary TGF- β 1 After Reduction of Systolic Blood Pressure Control in Patients with Type2 Diabetes and Clinical Diabetic Nephropathy.

Marcello Casaccia Bertoluci, MD, PhD¹

Fulvio Clemo Santos Thomazelli MD² (Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Deise Uebel³

Alexandre Schmidt⁴

Fábio Ramos Oliveira, Bpharm⁵

Helena Schmid, MD, PhD⁶

Institutions:

Internal Medicine Department of Federal University of Rio Grande do Sul – Porto Alegre - Brazil. Internal Medicine Service of Clinical Hospital of Porto Alegre.

Fundação Faculdade Católica de Ciências Médicas de Porto Alegre

Corresponding author:

Marcello C Bertoluci. Av Palmeira 18 sala 602 – Porto Alegre -Brazil

ZIP 90470-300 – Phone: 55-51-33349925 Fax 55-51-33349925

e-mail: mbertoluci@uol.com.br

Word count: 3091

Tables: 4

Figures: 6

ABSTRACT:

OBJECTIVE:- To determine the influence of reducing systolic blood pressure in urinary TGF- β 1 of type 2 diabetes with diabetic nephropathy.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: Twenty-one patients with type 2 diabetes and proteinuria > 500mg/24h, were randomized to receive either ramipril 5mg/ daily or amlodipine 5mg/daily for 12 weeks. Urinary TGF- β 1 was determined at 0, 4, 8 and 12 weeks. In a post-hoc analysis, we re-grouped patients whose mean systolic blood pressure (SBP) during treatment were under 140 mmHg (responsive blood pressure control group n=11) and those with equal to or greater than 140 mHg in a unresponsive blood pressure control group (n=10). Plasma TGF- β 1 was determined at 0 and 12 weeks.

RESULTS: Urinary TGF- β 1 was reduced when SBP was decreased below 140 mmHg ($p < 0.05$) while it was unchanged when SBP was above these values. Patients in the responsive SBP control group presented lower levels of urinary TGF- β 1 compared to the unresponsive SBP control group ($p = 0.002$). Mean systolic blood pressure correlated significantly with urinary TGF- β 1 ($r = 0.458$, $p = 0.0357$), and this effect was independent of HbA1c ($p = 0.042$).

CONCLUSIONS: Controlling systolic blood pressure under 140mmHg decreases urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetes and clinical nephropathy. The magnitude of systolic blood pressure reduction seems to have a greater impact on urinary TGF- β 1 than a direct effect of ACE inhibitors. We propose that the reduction is due to a decrease in renal TGF- β 1 production which could be related to attenuated diabetic nephropathy progression.

INTRODUCTION

Transforming factor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) is a multifunctional cytokine with prosclerotic properties which has been associated to the pathogenesis of diabetic nephropathy^{1,2,3}. Increased renal TGF- $\beta 1$ production is a feature of diabetes⁴, and urinary TGF- $\beta 1$ (UTGF- $\beta 1$) has been demonstrated to be increased in patients with clinical diabetic nephropathy^{5,6,7,8}. In patients with clinical diabetic nephropathy, urinary TGF- $\beta 1$ correlates to the degree of histopathological findings of glomerulosclerosis, suggesting that, more than a pathogenetic mechanism, it also could be a marker for the disease⁹.

Diabetic nephropathy has a multifactorial etiology where a combination of high glucose exposition^{10,11,12,13}, increased intra-glomerular pressure^{14,15} and genetic factors¹⁶ are involved. The relationship between hypertension and increased renal TGF- $\beta 1$ production has been related to both 1) increased tension in the capillary walls secondary to increased glomerular which may trigger TGF- $\beta 1$ -dependent pathways, leading to fibrosis^{17,18} and 2) the AT-1 receptor stimulation by angiotensin II, which may directly induce synthesis of TGF- $\beta 1$ ¹⁹. Although specific blockade of the renin-angiotensin system has been demonstrated to attenuate the progression of glomerulosclerosis^{20,21}, it was not yet demonstrated that a reduction of blood pressure, independently to A-II blockade, could decrease TGF- $\beta 1$ renal production.

Previous studies of our group and others^{5,6,8} have demonstrated increased urinary TGF- $\beta 1$ in patients with clinical diabetic nephropathy. We hypothesize that once blood pressure is normalized, renal TGF- $\beta 1$ production would be reduced in patients with diabetic nephropathy and, by this way, urinary TGF- $\beta 1$ excretion would also decrease. We postulate that the effect of systemic blood pressure reduction might have a greater impact in urinary TGF- $\beta 1$ reduction than the specific renin-angiotensin system blockade. The objective of the present study was to determine the influence of reducing the blood pressure in urinary TGF- $\beta 1$ of patients with type 2 diabetes and clinical diabetic

nephropathy. We also evaluate if plasma TGF- β 1 levels are influenced by the degree of blood pressure control and if there are correlations between blood pressure and urinary TGF- β 1.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Of the initial 38 outpatients consecutively screened from the Internal Medicine ambulatory unit of Hospital Clínicas Porto Alegre (HCPA), 28 patients with type 2 Diabetes Mellitus (DM) and 24h proteinuria above 500mg (2 times) with diabetic retinopathy and hypertension (blood pressure >140/90 mmHg at the sitting position) were selected initially. Exclusion criteria were serum creatinine above 2.0mg/dl, absence of diabetic retinopathy, serum potassium above 5,2mmol/l, medical history of repeated urinary tract infections, previous intolerance or contra-indication to ACE inhibitor and clinical heart failure. A term of consent was signed at the first visit. The protocol was approved by the Human Research and Ethics Committee at Hospital of Clínicas of Porto Alegre, Brazil.

Study Protocol

Twenty eight patients were initially included for a run-in period of 4 weeks before randomization. At this moment, ACE inhibitors, if used, were replaced by amlodipine 5mg a day, plus the remaining anti-hypertensive medications, which were adjusted progressively in order to lower blood pressure gradually to below 135/80 mmHg, which is recommended by the American Diabetes Association. At the end of the run-in period, 21 patients were considered to have good adherence to the treatment scheme. They were randomized in a double-blind fashion to receive either Ramipril 5mg daily plus their previous anti-hypertensive scheme (ACE group, n=11) or to continue on with Amlodipine 5mg/d in addition to their previous anti-hypertensive scheme (non-ACE group, n=10), for additional 12 weeks (Figure 1). Patients remained on their usual prescribed diet and the

anti-hyperglycemic drugs were re-adjusted, if necessary, during the 12-week period of observation.

Patients were examined at first visit, 2 weeks later, at randomization (0) and at 4, 8 and 12 weeks after entering the study. At the moment of each visit, fresh random spot urinary samples were collected for TGF- β_1 , albumin and creatinine. Blood was drawn at weeks 0 and 12 for plasma TGF- β_1 , HbA1c, glucose, potassium and serum creatinine.

Post-Hoc analysis

As the main objective of the study was to evaluate the effect of blood pressure control, after the 12 week period of observation, patients were re-grouped in accordance to their mean systolic blood pressure control attained. Those with a mean systolic blood pressure under 140 mmHg after randomization were defined as the responsive blood pressure control (n=11) and those in whom mean systolic blood pressure levels, despite drug adjustments, remained equal or above 140mmHg were re-grouped into a unresponsive control group (n=10).

Blood pressure measurements

All measurements were done by the same member of the medical team, who was blind for laboratory results. Blood pressure (BP) was measured, after 5 minutes of rest, in the sitting position, in the right arm, which was placed at the level of right atrium, with a mercury sphygmomanometer. Systolic BP was considered as the first Korotkoff sound and diastolic BP, the moment of disappearance of beat sounds. Sequential measurements were done until stabilization was attained, which was a difference shorter than 10 mmHg between 2 measurements. The mean of the last 2 stable measurements was considered for analysis.

Laboratory methods

TGF- β 1

Plasma and urinary TGF- β 1 were assayed by solid phase ELISA (R&D Systems, Abingdon, UK) according to the manufacturer's instructions. Urine samples were placed on ice and immediately centrifuged at 10.000 rpm for 30 minutes at 4°C. Supernatant was removed and stored at -80°C. At the day of assay, urine samples (0.5 ml) were acidified to a pH of 2-3 with 100 μ l 1N HCL for 10 minutes and re-neutralized to pH 7-8 with 100 μ l 1.2N NaOH/0.5M HEPES. Values were presented as pg/mg of creatinine. We did not perform concentration of urinary samples because all measurements obtained were above the detection limit of the method.

For plasma TGF- β 1 assay, blood was collected in EDTA-containing tubes and placed on ice. In order to obtain platelet-poor plasma samples, a sequential centrifugation was started in less than 30 minutes after sample collection. Specimens were centrifuged at 800g for 10 minutes at 4°C, then re-centrifuged for 15 minutes at 2500g and then again at 3600g for 20 minutes. Complete removal of platelets was confirmed by an automatic cell counter. Plasma samples were stored at -80°C. On the day of the assay, 0.1ml of plasma was acidified to pH 2-3 with for 30 minutes with 100 μ l of 2.5N HCH₃COH/10M urea and than re-neutralized to pH 7-8 with 2100 μ l 2.7N NaOH/1M HEPES. Urine samples were assayed undiluted. The mean intra and inter-assay coefficients of variation were 2.0% and 13.1% respectively.

Other assays

Albumin was assayed by immunoturbidimetry, creatinine by Jaffè technique and HbA1c by HPLC.

Statistical analysis

Statistical analysis was done with the Statview software (SAS Institute, Cary, NC). Because of skewed distribution, plasma TGF- β , urinary TGF- β 1 and albumin were logarithmically transformed before statistical analysis and expressed as mean +/- standart error. Urinary TGF- β 1 was expressed in pg/mg of creatinine and plasma TGF- β 1 in pg/ml. ANOVA with multiple entries with Scheffe's post-test analysis was used for detecting if there were differences between groups in urinary TGF- β 1/creatinine and albumin/creatinine ratios. Unpaired T-test were used to compare baseline characteristics between groups. Paired T test was used to compare serum creatinine, HbA1c and plasma TGF- β 1 analysis at 0 and 12 weeks. Significant levels was determined as $p < 0.05$.

RESULTS

Prospective phase

Of the 28 patients selected, after the run-in period, 4 patients did not meet adequate adhesion criteria and 3 declined consent for the study. All 21 randomized patients completed the 12-week follow-up period (figure 1). At baseline, there was no significant statistical differences between age, BMI, duration of DM, systolic and diastolic blood pressure, 24h proteinuria, albumin/creatinine, serum creatinine, HbA1c, urinary and plasma TGF- β (table 1). Systolic blood pressure decreased similarly in both ACE and non-ACE groups and was not different between groups at the end of the study ($p=0.07$, figure 2). After 12 weeks, urinary TGF- β 1 levels were not different between both groups (figure 4a).

HbA1c decreased significantly from baseline to 12 weeks in both ACE and non-ACE groups but were not different between groups at the end of the study (table 3a). We did not observe significant statistical differences between baseline or follow up levels of plasma TGF-beta or urinary albumin to creatinine ratios in both groups.

Post-Hoc analysis

Eleven patients, whose mean systolic were under 140 mmHg were included in the responsive blood pressure (SBP) control group, and 10 patients whose mean SBP were equal or above 140mmHg were included in the unresponsive SBP control group. At baseline, there were no significant statistical differences between groups referring to age, duration of DM, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, 24h proteinuria, albumin/creatinine ratio, serum creatinine, HbA1c, log urinary TGF- β 1/creatinine ratio and plasma TGF- β 1 (table 2). Body mass index (BMI) was significantly higher in the unresponsive SBP control group ($p < 0.05$). Systolic and diastolic blood pressure did not overlap between groups at any time (figure 3).

As expected, systolic and diastolic blood pressure were significantly lower in the responsive SBP control group compared to unresponsive SBP group at 0, 4, 8 and 12 weeks. The decrease between mean basal systolic blood pressure and mean post-treatment systolic blood pressure was greater in responsive blood pressure control group than in unresponsive blood pressure control (-29.5 ± 6.6 mmHg vs. -8.7 ± 4.4 mmHg, respectively) ($p = 0.0190$) (figure 2b). There were no cases of hyperkalemia, (data not shown) or significant side-effects in either group

After treatment, log urinary TGF- β 1/creatinine ratios were significantly lower in strict SBP group compared to moderate SBP group ($p = 0.0002$) (Figure 4b). Compared to baseline, mean Log urinary TGF- β 1 at 4, 8 and 12 weeks decreased significantly (-0.22 ± 0.15 pg/mg, $p = 0.04$) in strict SBP control group but not in the moderate SBP control group (-0.12 ± 0.08 pg/mg, $p = 0.82$) (Figure 5). There was no significant difference in plasma TGF- β 1 between responsive SBP control and unresponsive SBP control groups (table 3b).

A significant positive linear correlation ($r = 0.458$; $p = 0.0357$) was observed between mean systolic blood pressure and mean log TGF- β 1 values obtained at 4, 8 and 12 weeks

(figure 6). A multiple linear regression analysis showed that the effect of systolic blood pressure reduction was independent of the HbA1c reduction ($r^2=0.536$; $p=0.042$)(table 4).

DISCUSSION

The present study demonstrates that urinary TGF- β 1 excretion can be reduced when systolic blood pressure is decreased to below 140 mmHg in hypertensive type 2 DM patients with clinical diabetic nephropathy independently of the type of drug used. The positive correlation between systolic blood pressure and urinary TGF- β 1 suggests that it is an independent determinant of TGF- β 1 production by the kidney of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy.

In mesangial cells, TGF- β 1 exerts its action by binding to three membrane receptors (β RI, β RII and β RIII). The active TGF- β 1 binds to β RI and β RII to form a ternary complex which activates intra-cellular signaling that promotes transcription of genes that regulates production of extra cellular matrix (ECM) components like fibronectin, while the β RIII receptor has a less clear role in fibrogenesis. Besides that, TGF- β 1 also inhibit ECM degradation by controlling the activity of metalloproteases. The net result is the progressive accumulation of ECM in mesangial space, specially if a sustained stimulus is present.

Many studies have shown that hyperglycemia and increased glomerular pressure are potent stimuli to induce increased synthesis of TGF- β 1 in mesangial cells. When exposed to high glucose concentration, there is an increase of about 50% in the production of TGF- β 1 protein as well as in its receptor number and binding to the receptor. On the other side *in vivo* models of diabetic nephropathy, show that controlling hyperglycemia with insulin promotes clear reduction in renal TGF- β 1 synthesis.

Hemodynamic forces can induce TGF- β 1 synthesis in renal cells as well. When mesangial cells, *in vitro*, are exposed to mechanical stretching, an increase in TGF- β 1 production and in the receptor binding is observed, which is qualitatively similar to that

induced by high-glucose exposition^{17,18}. An increase in the amount of ligand accompanied by a corresponding elevation of receptor mRNA and protein also occur. Riser et al suggested that stretching forces may operate through a different mechanism than renin-angiotensin system. While angiotensin II appears to stimulate ECM synthesis through an activation of TGF- β 1 pathway by a specific receptor, intra-cellular signaling following stretching is not yet completely understood.

In general, a reduction in urinary TGF- β 1 can be attributed to either a decrease in renal TGF- β 1 production, a reduction in TGF- β 1 filtration from the plasma or both. In the present study, once neither plasma TGF- β 1 levels nor renal function changed, it is likely that the decreased urinary TGF- β 1 excretion may be due to a reduction of renal TGF- β 1 production. These data are in accordance with Sharma et al⁴ who demonstrated that increased TGF- β 1 renal production is the main source of urinary TGF- β 1 in patients with type 2 diabetes, while in patients without diabetes, an increased extraction from plasma occurs. Besides that, Sato et al observed that, in patients with diabetes, urinary TGF- β 1 is greater in those with more severe mesangial expansion, as seen in renal biopsies samples, suggesting that urinary TGF- β 1 may represent one parameter that can be used to evaluate the progression of diabetic nephropathy. Finally, other studies also show that intra-glomerular TGF β 1 mRNA levels are elevated in early stages of patients with diabetic nephropathy²³. By this way, in type 2 diabetes, renal TGF- β 1 production is likely to be the main determinant of urinary TGF- β excretion.

There are some discrepancies in literature in respect of the levels of TGF- β 1 in the blood of patients with diabetes and the effect of lowering blood pressure. In one study, patients with diabetic nephropathy showed reduced serum TGF- β 1 after using captopril for 6 months²⁵. This effect however was not confirmed in another study where plasma TGF- β 1 levels did not change after using losartan. These differences could be ascribed to the differences in platelet concentrations once serum was used in the first study while plasma

was used in the latter. Differences in the type of the drug used might also be important. It is unlikely however, that reductions in plasma TGF- β 1 concentrations would be the main determinant in urinary TGF- β 1 levels in the present study.

Our findings are in agreement with those of Houlihan et al ²² who demonstrated a significant decrease in urinary TGF- β 1 when blood pressure is reduced using losartan for a period of 4 weeks in patients with microalbuminuria. In that study, however, changes in mean arterial pressure did not correlated with changes of urinary TGF- β 1. A possible reason might be that, in the present study, higher baseline levels of urinary TGF- β 1 were seen, and greater reductions in blood pressure might have been promoted and consequently, a more pronounced effect in urinary TGF- β 1 excretion.

In the present study, we did not observe significant differences of urinary TGF- β 1 between treatment with the ACE inhibitor, but there was a trend to observe lower levels in the group who used ACE inhibitors. Although the statistical power of the present study might be limited for a direct comparison between 2 drugs, it is important to consider that our main objective was the comparison of different degrees of systolic blood pressure. Once we found it would be unethical to randomize two groups for different degrees of blood pressure control, we decided to do it in a post-hoc analysis. As we observed, the effect of lowering blood pressure in urinary TGF- β 1 was relatively greater than the direct effect of using ACE inhibitor. The present study clearly suggests that the impact of lowering systolic blood pressure to below 140 mmHg is superior in reducing urinary TGF- β 1 than the type of drug used.

CONCLUSION

In conclusion, our findings demonstrate that, in hypertensive patients with type 2 diabetes and macroalbuminuria, systolic blood pressure reduction can decrease renal TGF- β 1 excretion and this effect seems to be independent of metabolic control. These

findings reinforce the need of target the best possible blood pressure control to attenuate the progression of diabetic nephropathy.

Acknowledgments

Fundings to this study came from grants of Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and FIPE. Dr. Thomazelli was supported by CAPES.

References:

1. Border WA, Yamamoto T, Noble NA: Transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Rev* 12:309-339, 1996.
2. Bertoluci MC, Schmid H, Lachat JJ, Coimbra TM: Transforming Growth Factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. *Nephron* 74:189-196, 1996.
3. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN: Neutralization by TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extra-cellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45:522-530, 1996.
4. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnick BR, Kurnik PB, Weisberg LS: Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 46:854-859, 1997.
5. Bertoluci MC, Schaan BD, Coimbra TM, Schmid H: Increased urinary TGF- β 1 in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes* 47 (Suppl. 1):0504, 1998.
6. Bertoluci MC, Machado MP, Lima KM, Thome F, Barros E, Veronese F, Schaan BD, Schmid H. Increased urinary TGF- β 1 in diabetic nephropathy in comparison to non-diabetic nephropathies. *Diabetes* 49 (Suppl. 1); 229-OR, 2000.
7. Ellis D, Forrest KY, Erbey J, Orchard TJ: Urinary measurement of Transforming growth factor beta and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 44: 950-956, 1998.
8. Rivarola EWR, Moyses-Neto M, Dantas M, da Silva CG, Volpini R, Coimbra TM. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res* 32 1525-1528, 1999.
9. Sato H, Iwano M, Akai Y, Kurioka H, Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M, Dohi K: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta-1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*: 18:490-494, 1988.

10. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 346(15): 1145-1151, 2002.
11. UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853, 1998.
12. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor β . *J Clin Invest* 74:93:536-542, 1994.
13. Schaan BD, Lachchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased Renal GLUT1 abundance and Urinary TGF- β 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res* 33:6664-669, 2001.
14. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:1925-1930, 1986.
15. Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LMB, Christlieb R, Knowler WC, Rand LI: Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318: 140-150, 1988.
16. Canani LH, Gerchman F, Gross JL: Familial clustering of diabetic nephropathy in brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48:909-913,1999.
17. Riser B, Ladson-Wofford S, Sharba A, Cortes P, Drake K, Guerin CJ, Yee J, Choi ME, Segarini PR, Narins RG. TGF- β receptor expression and binding in rat mesangial cells: Modulation by glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney Int*56:428-439, 1999.

18. Riser BL, Cortes P, Heilig C, Grondin J, Ladson -Wofford S, Patterson D, Narins RG: Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor- β isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 148:1915-1923, 1996.
19. Wolf G: Link between angiotensin II and TGF- β in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 24:174-180, 1998.
20. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J med* 345:861-869, 2001.
21. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I: Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345: 851-860, 2001.
22. Houlihan CA, Akdeniz A, Tsalamandris C, Cooper MA, Jerums G, Gilbert RE. Urinary transforming growth factor β excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate. *Diabetes Care* 25:1072-1077, 2002.
23. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K: Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49:1120-1126, 1996.
24. Sato H, Iwano M, Akai Y, Kurioka H, Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M, Dohi K: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 18:490-494, 1998.
25. Sharma, K, Eltayeb BO, McGowan TA, Dunn SR, Alzahabi B, Rohde R, Ziyadeh FN, Lewis EJ. Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta 1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 34:818-823, 1999.

26. Parving HH, Hommel E, Smidt UM: Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. *BMJ* 297(656):1086-91, 1988.
27. Ritz E, Rychlik I, Miltenberger-Miltenyi G: Optimizing antihypertensive therapy in patients with diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl* 16:S17-22, 1998.

4. LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Flow diagram of the prospective phase of the study. mSBP = mean systolic blood pressure.

Figure 2. (A) Mean systolic blood pressure at baseline (first visit) and during treatment between ACEI and non-ACEI groups. (B) Mean systolic blood pressure between responsive (empty bars) and unresponsive (dark bars) systolic blood pressure control at the post-hoc analysis. Data are mean \pm standart error.

Figure 3. Systolic and diastolic blood pressure in the first visit (B), at randomization (0) and after 4, 8 and 12 weeks of anti-hypertensive treatment with multiple drugs in responsive (dark bars) and unresponsive (empty bars) blood pressure control groups. Mean \pm standart error.* $p < 0.001$

Figure 4. Log urinary TGF- β 1 /creatinine ratio in patients randomized for ACE inhibitors or non-ACEI groups (A) and from responsive and unresponsive systolic blood pressure control groups (B).Data are mean \pm SE. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$ (between groups) and ‡ $p < 0.05$ vs. basal.

Figure 5. Mean Log urinary TGF- β 1/creatinine in patients with diabetic nephropathy responsive (empty bars) and unresponsive (gray bars) systolic blood pressure control groups. Data are mean \pm SE.

Figure 6- Pearsons correlation between mean log urinary TGF- β 1 and mean systolic blood pressure during intervention in all studied patients.

Figure 1. Flow diagram

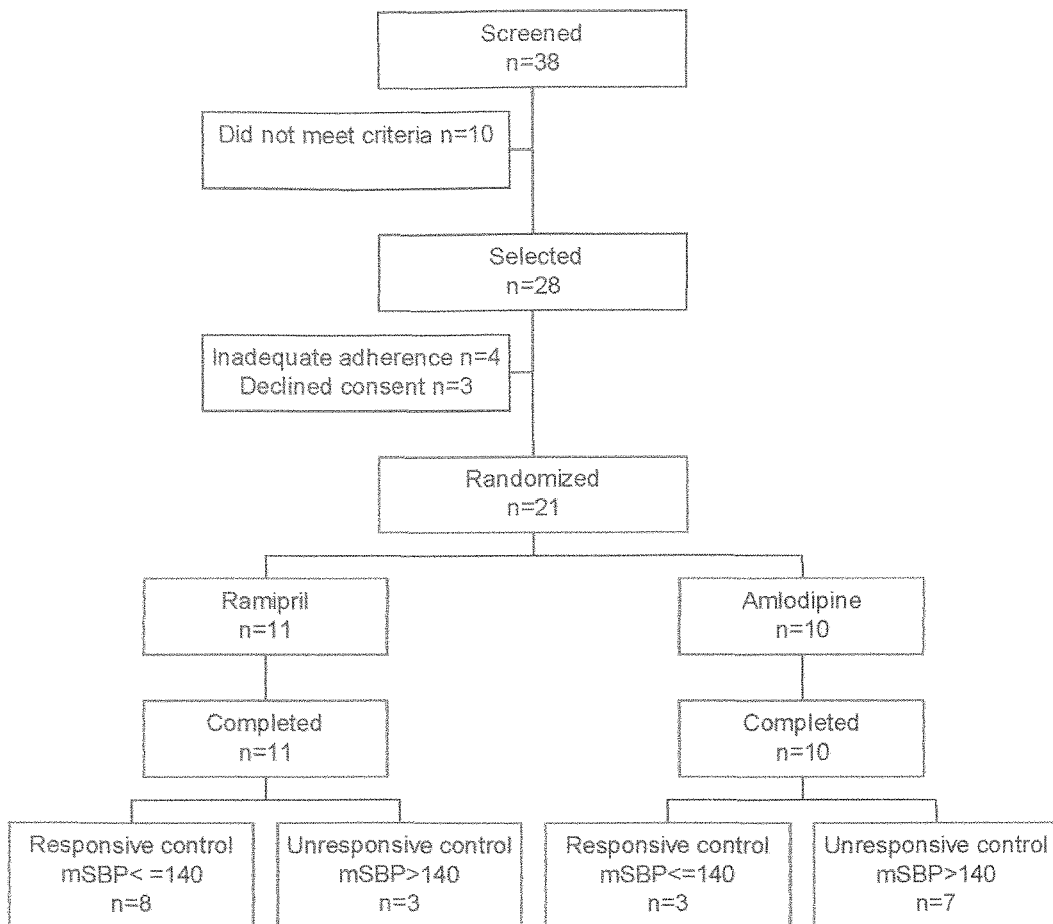


Figure 2.

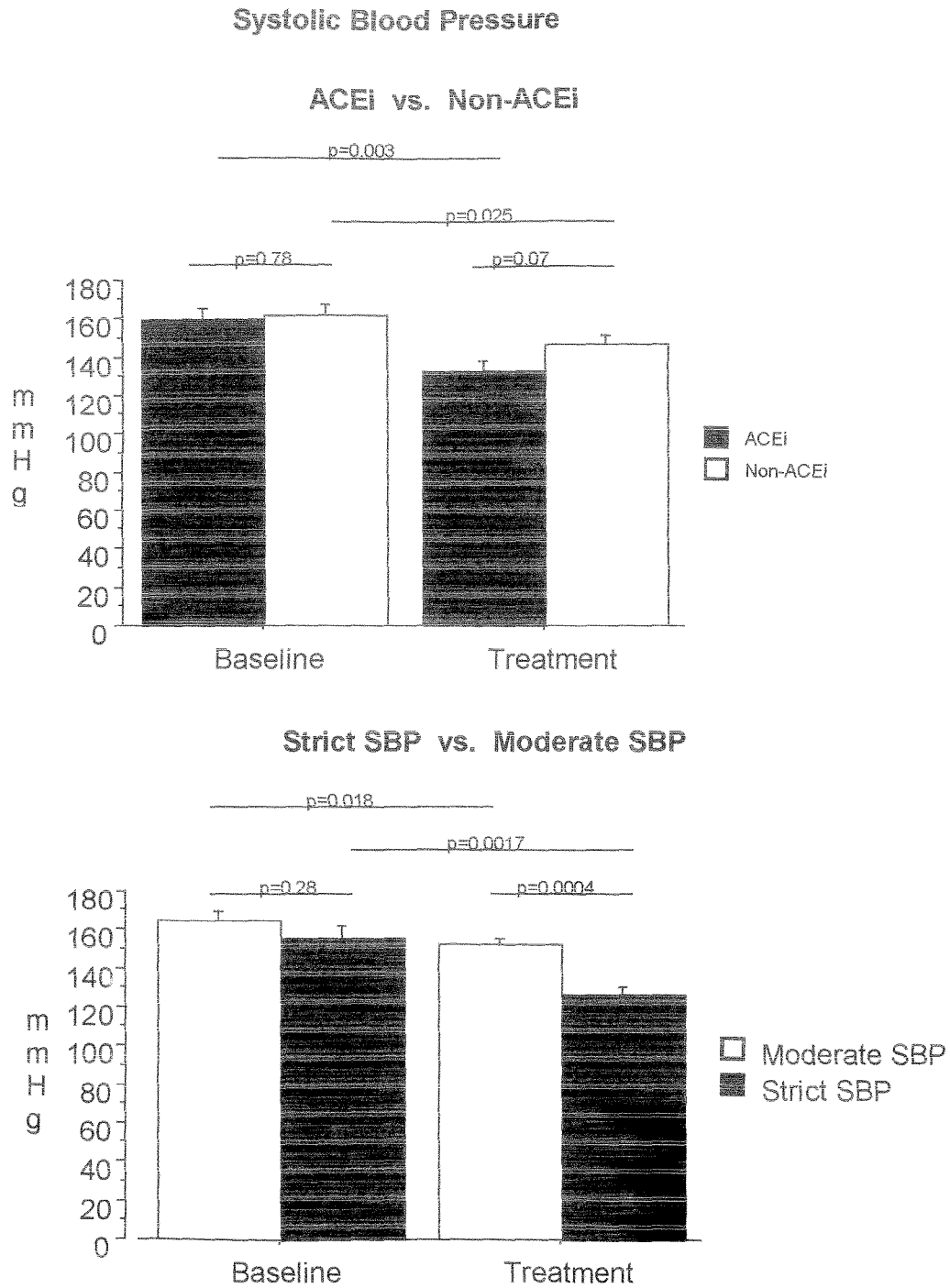


Figure 3.

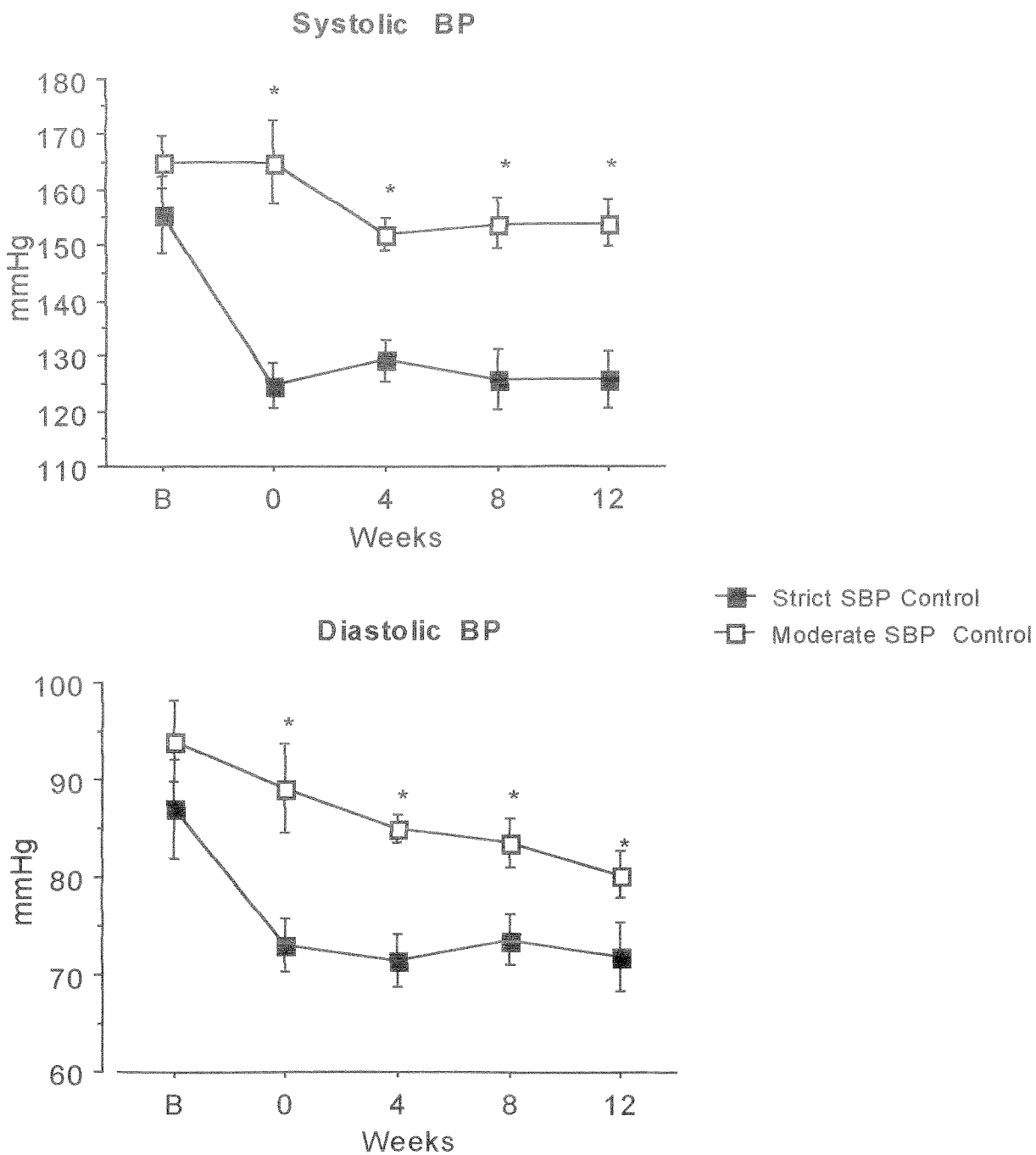
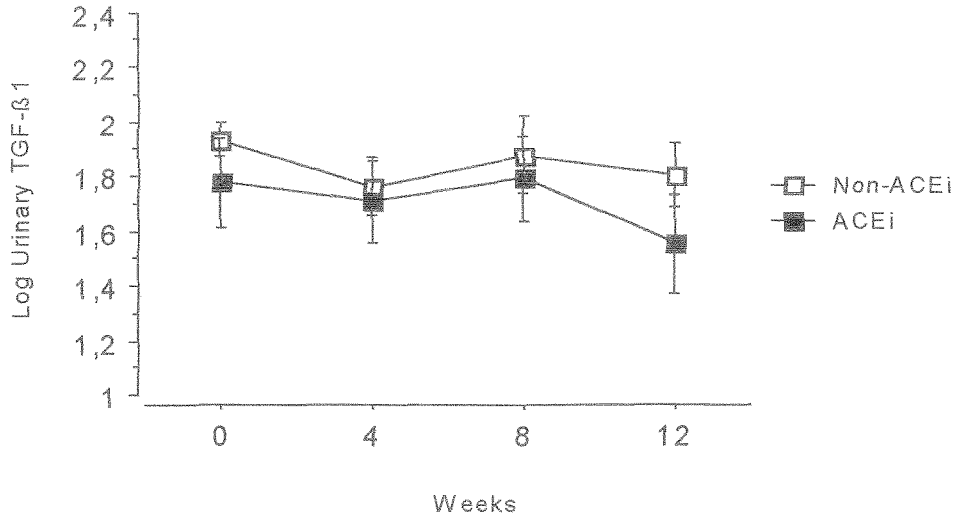


Figure 4.

Urinary TGF- β 1

ACEi vs. Non-ACEi



Strict SBP Control vs. Moderate SBP Control

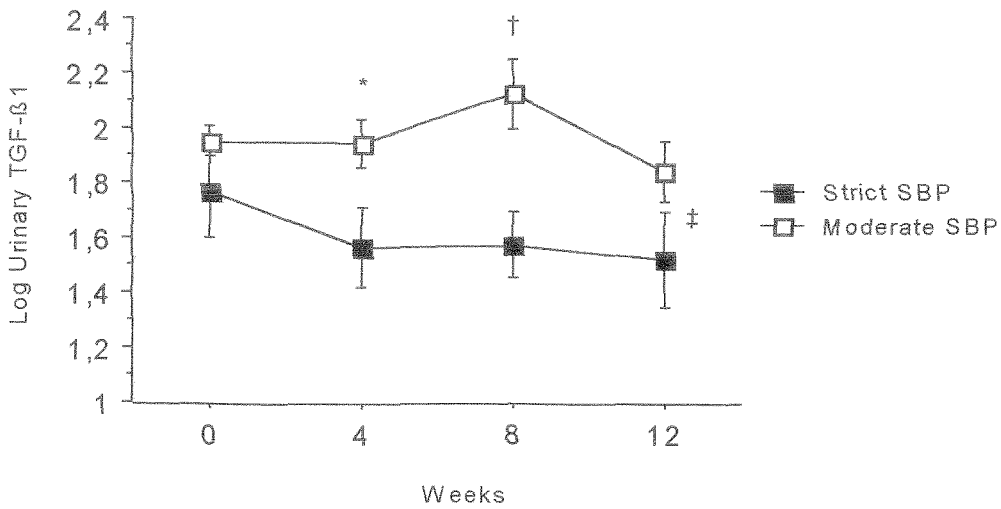


Figure 5.

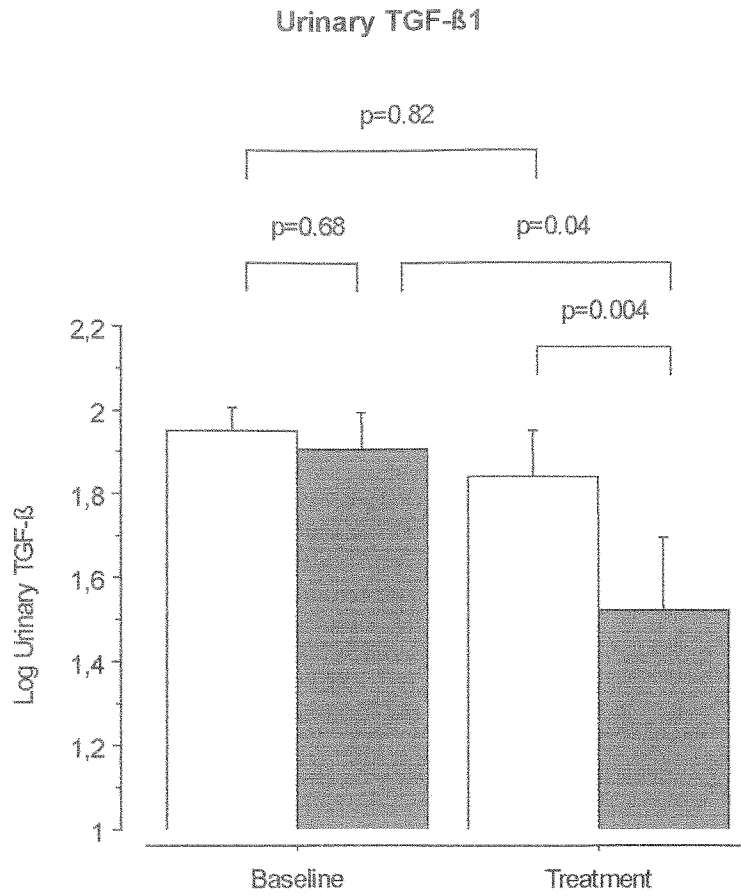


Figure 6.

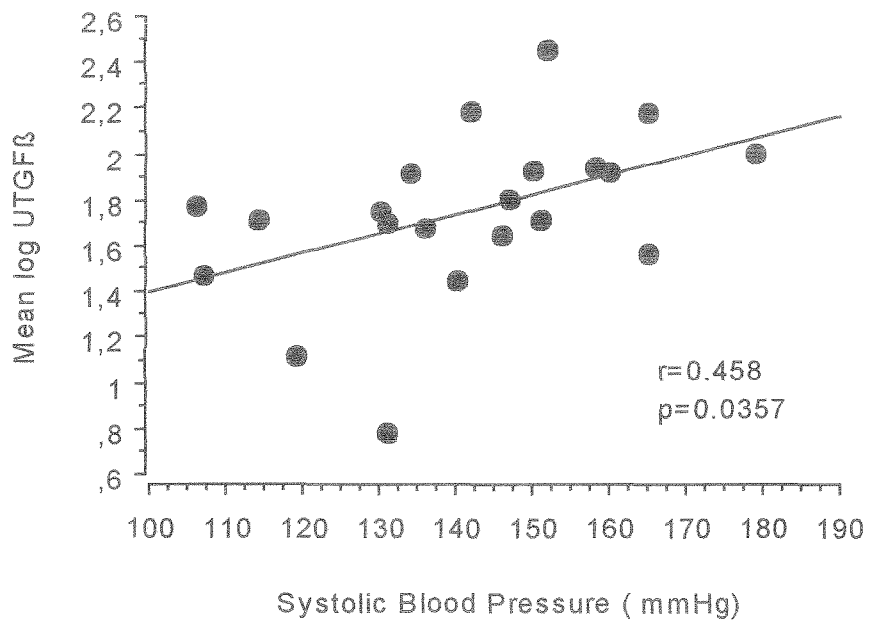


Table 1- Baseline characteristics of patients in the prospective phase of the study. ACEI (group using Ramipril) vs. non-ACEI (group not using ACE inhibitors). HbA1c (normal limit: <4.3%) ns=not-significant

	ACEI	non-ACEI	<i>p</i>
N	11	10	-
Sex (M/F)	6/5	6/4	-
Age (years)	57.0±7.0*	59.0±7.0	ns
Duration of Diabetes (years)	14.0±6.0	14.0±6.1	ns
BMI (kg/m ²)	27.0±5.2	30.0±4.6	ns
Systolic Blood Pressure (mmHg)	159.0±21.0	161.0±19.1	ns
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	88.1±16.0	93.2±15.0	ns
HbA1c (%)	6.7±1.3	6.7±1.9	ns
Serum Creatinine (µmol/L)	95.5±28.3	115.8±45.1	ns
24h Proteinuria (mg/24h)	1424±927	1439±904	ns
Albumin /Creatinine (µg/mg)	585.5±197	581.6±151	ns
Plasma TGF-β ₁ (ng/ml) [#]	3.4±1.3	2.0±1.1	ns
Urinary TGFβ ₁ (pg/mg) [#]	95.7±104.8	93.9±37.4	ns

* Data are mean±standart deviation.

Table 2- Baseline characteristics of patients in the Post-Hoc analysis. Responsive blood pressure control vs. unresponsive blood pressure control. HbA1c (N: <4.3%)

	Responsive SBP control	Unresponsive SBP control	<i>P</i>
N	11	10	-
Sex (M/F)	8/3	4/6	-
Age (years)	57.5±2.5*	58.5±1.7	0.76
Duration of Diabetes (years)	16.0±1.9	12.3±1.6	0.16
BMI (kg/m ²)	25.9±1.0	29.9±1.5	0.04
Systolic Blood Pressure (mmHg)	155.6±6.8	165.0±4.8	0.28
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	87.0±5.0	94.0±4.2	0.30
HbA1c (%)	6.7±0.4	6.7±0.5	0.98
S Creatinine (µmol/L)	104.3±11,5	106.3±13,3	0.92
24h Proteinuria (mg/24h)	1415.3±294	1449.2±266	0.93
Albumin /Cre (µg/mg)	585.5±197	581.6±151	0.99
Plasma TGF-β ₁ (ng/ml) [#]	3.35±1.4	2.09±0.3	0.44
Urinary TGFβ ₁ (pg/mg) [#]	93.9±31.8	95.8±11.4	0.96

* Data are Mean ±standart deviation

Table 3- Metabolic and renal parameters at baseline and after 12 weeks of anti-hypertensive treatment in the prospective phase of the study (3A) and in the post-hoc analysis (3B). S-creatinine=serum creatinine. Albumin/Cre= urinary albumin concentration/urinary creatinine ratio. P_1 value refers to comparison between 0 and 12 weeks. P_2 refers to comparison between groups at 12 weeks.

3A. ACEI vs. non-ACEI groups

Week	ACEI group n=11			Non-ACEI group n=10			
	0	12	p	0	12	p	p_2
HbA1c (%)	6.7± 0.38*	5.6± 0.15	0.01	6.7±0.6	6.3±0.3	0.56	0.05
SCreat (µmol/l)	95.5±7.96	97.24±7.07	0.89	115.80±14.1	125.52±15.9	0.88	0.10
Plasma TGF-β1 (ng/ml)	3.40±1.37	2.20±0.67	0.44	2.04±0.35	2.55±0.56	0.45	0.70
AER/Cre (µg/mg)	670.3±08.8	623.9±230.2	0.97	497.2±142.5	525.5±152.6	0.97	0.99

* Data are mean±standart error

3B. Strict vs.moderate systolic blood pressure control (SBP)

Week	<i>Strict SBP control n=11</i>			<i>Moderate SBP control n=10</i>			
	0	12	<i>p</i>	0	12	<i>p</i>	<i>p₂</i>
HbA1c (%)	6.7±0.40*	5.8±0.17	0.05	6.6±0.51	6.1±0.35	0.41	0.38
S	104.3±10,6	104.3±12,4	1.00	106.1±13,3	114.9±14,4	0.56	0.47
Creatinine (µmol/l)							
Plasma	3.35±1.34	2.07±0.69	0.41	2.09±0.36	2.69±0.06	0.51	0.48
TGF-β1 (ng/ml)							
AER/Cre (µg/mg)	585.1±197.2	680.2±232.3	0.82	571.1±134.3	451.1±108.6	0.38	0.95

*Data are Mean ±standart deviation

Table 4. Multiple Linear Regression. Systolic blood pressure and HbA1c.

	Coefficient	SE	Std Coefficient	t	p
Intercept	0.178	0.773	0.178	0.230	0.822
Mean Systolic BP	0.012	0.005	0.536	2.241	0.042*
Mean HbA1c	-0.014	0.079	-0.042	-0.175	0.864

5. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM PORTUGUÊS

REDUÇÃO DOS NÍVEIS DE TGF- β_1 URINÁRIO APÓS CONTROLE INTENSIVO DA PRESSÃO ARTERIAL EM PACIENTES PORTADORES DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 E NEFROPATIA DIABÉTICA CLÍNICA

Marcello Casaccia Bertoluci, MD, PhD¹

Fulvio Clemo Santos Thomazelli, MD²

Deise Uebel³

Alexandre Schmidt⁴

Fábio Ramos Oliveira, Bpharm⁵

Helena Schmid, MD, PhD⁶

Departamento de Medicina Interna do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCPA – UFRGS) – Porto Alegre – Brasil

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre – Porto Alegre – Brasil (FFFCMPA)

1. Professor Doutor Adjunto de Medicina Interna – UFRGS
2. Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
3. Acadêmica de Medicina – FFFCMPA
4. Acadêmico de Medicina - UFRGS
5. Farmacêutico bioquímico – HCPA – UFRGS
6. Professora Doutora Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

OBJETIVO: - Determinar a influência da redução da pressão arterial sistólica nos níveis urinários de TGF- β_1 em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 com nefropatia diabética .

DELINEAMENTO DO ESTUDO E MÉTODOS: Vinte e um pacientes com Diabetes tipo 2 e proteinúria > 500mg/24hs, foram randomizados para receber ramipril 5mg/d ou amlodipina 5mg/d durante 12 semanas. O TGF- β_1 urinário foi determinado nas semanas 0, 4, 8 e 12. Numa análise post-hoc, nós reagrupamos os pacientes cuja pressão arterial sistólica média (PAS), durante o tratamento, permaneceu inferior a 140mmHg (melhor resposta, n =11) e noutro grupo, no qual a pressão arterial sistólica média permaneceu \geq 140mmHg (má resposta, n = 10). O TGF- β_1 plasmático foi determinado nas semanas 0 e 12.

RESULTADOS: TGF- β_1 urinário foi reduzido quando a PAS foi reduzida abaixo de 140mmHg ($p < 0,05$), enquanto o mesmo não se modificou quando a PAS se manteve acima desses valores. Os pacientes do grupo que apresentou melhor controle dos níveis tensionais apresentaram níveis menores de TGF- β_1 urinário comparados ao grupo de pior controle de PAS ($p = 0,002$). A pressão arterial sistólica média correlacionou-se significativamente com o TGF- β_1 urinário ($r = 0,458$, $p = 0,0357$); efeito independente dos níveis de hemoglobina glicosilada (HbA1c) ($p = 0,042$).

CONCLUSÕES: O controle da pressão arterial sistólica abaixo de 140mmHg reduz o TGF- β_1 urinário em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e nefropatia clínica. A magnitude da redução da pressão arterial sistólica parece ter um efeito maior nos níveis de TGF- β_1 urinário, do que um efeito direto dos inibidores da ECA.

INTRODUÇÃO

O *transforming factor $\beta 1$* (TGF- β_1) é uma citocina multifuncional com propriedades pró-escleróticas, que foram associadas a patogênese da nefropatia diabética^{1,2,3}. A produção renal aumentada de TGF- β_1 é uma característica do diabetes⁴, e os níveis de TGF- β_1 urinário já foram demonstrados como estando elevados em pacientes com nefropatia diabética clínica^{5,6,7,8}. Em pacientes portadores de nefropatia diabética clínica, o TGF- β_1 urinário se correlaciona com o grau dos achados histopatológicos de glomeruloesclerose, sugerindo que, além de um mecanismo patogênético, ele poderia ser um marcador da doença⁹.

A nefropatia diabética possui uma etiologia multifatorial, onde a combinação da exposição a altos níveis de glicose^{10,11,12,13}, pressão intraglomerular aumentada^{14,15} e fatores genéticos¹⁶ estão envolvidos. A relação entre hipertensão e produção renal aumentada de TGF- β_1 foi relacionada a ambas: 1) aumento da tensão nas paredes capilares secundária ao aumento glomerular, o que poderia desencadear as vias TGF- β_1 dependentes, levando a fibrose^{17,18} e 2) a estimulação dos receptores AT-1 pela angiotensina II, o que poderia induzir, diretamente a síntese de TGF- β_1 ¹⁹. Apesar de ter sido demonstrado que o bloqueio específico do sistema renina-angiotensina atenua a progressão da glomeruloesclerose^{20,21}, não se demonstrou, até agora, que a redução da pressão arterial, independente do bloqueio A-II, poderia diminuir a produção renal de TGF- β_1 .

Estudos anteriores de nosso grupo e outros^{5,6,8} demonstraram níveis urinários aumentados de TGF- β_1 em pacientes com nefropatia diabética clínica. Nós levantamos a hipótese de que, uma vez que a pressão arterial esteja normalizada, a produção renal de TGF- β_1 seria reduzida em pacientes com nefropatia diabética e, que através desse mecanismo, a excreção urinária de TGF- β_1 poderia, também, ser diminuída. Nós postulamos que o efeito da redução da pressão arterial sistêmica teria um impacto maior

na redução do TGF- β_1 urinário do que o bloqueio específico do sistema renina-angiotensina. O objetivo do presente estudo foi determinar a influência da redução da pressão arterial sobre os níveis de TGF- β_1 urinário em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, com nefropatia diabética clínica estabelecida. Nós também avaliamos se os níveis plasmáticos de TGF- β_1 são influenciados pelo grau de intensidade do controle da pressão arterial e se há correlação entre os níveis tensionais e o TGF- β_1 urinário.

DELINEAMENTO DO ESTUDO E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizado screening com 38 pacientes atendidos em no ambulatório de Medicina Interna do HCPA. Destes, foram selecionados 28 pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM) e com proteinúria acima de 500mg nas 24 horas (2 amostras), portadores de retinopatia diabética e hipertensão (pressão arterial > 140/90 mmHg na posição sentada). Os critérios de exclusão foram: creatinina sérica > 2,0mg/dl; ausência de retinopatia diabética, potássio sérico > 5,2 mmol/l, história médica de infecções urinárias de repetição, intolerância prévia ao uso de inibidores da ECA e insuficiência cardíaca. Um termo de consentimento era assinado na primeira visita. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Protocolo do Estudo

Vinte e oito pacientes foram, inicialmente, incluídos para um período de "run-in" de 4 semanas, antes da randomização. Nesse momento, os inibidores da ECA, se estivessem sendo usados, foram substituídos pela amlodipina 5mg ao dia, mais a manutenção das outras medicações anti-hipertensivas, as quais foram ajustadas progressivamente com o objetivo de reduzir gradualmente a pressão arterial a níveis inferiores a 135/80 mmHg, conforme recomendação da *American Diabetes Association*

(ADA). Ao final do período de "run-in", 21 pacientes preencheram os critérios de adesão, tendo comparecido a todas as consultas e tendo feito uso correto da medicação. Foram, então, randomizados de forma duplo-cega para receber Ramipril 5mg/d mais suas outras medicações anti-hipertensivas prévias (grupo IECA, n=11) ou para continuar recebendo amlodipine 5mg/d associada as outras medicações anti-hipertensivas de seu esquema de tratamento prévio (grupo não – IECA, n=10), durante 12 semanas (figura 1). Os pacientes foram mantidos com sua dieta prescrita habitual e as drogas hipoglicemiantes foram reajustadas, se necessário, durante o período de observação de 12 semanas.

Os pacientes foram examinados na primeira visita, duas semanas após, na randomização (0) e nas quarta, oitava e décima segunda semanas após entrarem no estudo. No momento de cada visita, uma amostra de urina era coletada para dosagem de TGF- β_1 , albumina e creatinina. Amostras de sangue foram coletadas nas semanas 0 e 12 para dosagem de TGF- β_1 plasmático, hemoglobina glicosilada, glicose, potássio e creatinina séricos.

Análise Post-Hoc

Como o objetivo principal do estudo era avaliar o efeito da controle da pressão arterial, após um período de 12 semanas de observação, os pacientes foram reagrupados de acordo com os valores médios obtidos de pressão arterial. Aqueles com pressão arterial sistólica média abaixo de 140mmHg, após randomização, foram definidos como melhor resposta (grupo 1; n=11) e aqueles nos quais a pressão arterial sistólica média, apesar dos ajustes das drogas, permaneceu maior ou igual a 140mmHg foram reagrupados como sendo o grupo com má resposta (grupo 2; n=10).

Aferições da pressão arterial

Todas as aferições foram realizadas pelo mesmo examinador da equipe médica (FCST), que desconhecia os resultados de laboratório. A pressão arterial (PA) foi aferida,

após 5 minutos de repouso, na posição sentada, no braço direito, o qual era elevado ao nível do átrio direito, com o uso de um esfigmomanômetro de mercúrio. A PA sistólica foi considerada como sendo no momento do 1º som de Korotkoff e a PA diastólica, no momento do desaparecimento do som das bulhas. Aferições seriadas foram feitas até que a estabilização dos valores fosse atingida, a qual foi determinada como sendo uma diferença menor que 10 mmHg entre duas medidas. A média das duas últimas medidas estáveis foi considerada para a análise.

Métodos laboratoriais

TGF- β_1

O TGF- β_1 plasmático e urinário foram dosados pelo método de Elisa fase sólida (R&D Systems, Abingdon, UK) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de urina eram colocadas no gelo e imediatamente centrifugadas a 10000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante era removido e estocado a -80°C. No dia do ensaio, as amostras de urina (0,5ml) eram acidificadas até um pH de 2-3, com o uso de 100 μ l 1N HCL durante dez minutos e re-neutralizadas até um pH 7-8, com o uso de 100 μ l de 1,2N NaOH/0,5M HEPES. Os valores foram apresentados em pg/mg de creatinina. Nós não realizamos a concentração das amostras de urina porque todas as medidas obtidas estavam acima do limite de detecção do método.

Para as amostras de TGF- β_1 plasmático, o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e colocados no gelo. Para se obter amostras de plasma pobre em plaquetas, uma centrifugação seqüencial foi iniciada em menos de 30 minutos após a coleta das amostras. As mesmas foram centrifugadas a 800g durante 10 minutos a 4°C, e , então, re-centrifugadas, durante 15 minutos, a 2500g e , novamente, a 3600g durante 20 minutos. A remoção completa das plaquetas foi confirmada através de um contador

automático de células. As amostras de plasma foram estocadas a -80° C. No dia do ensaio, 0,1ml de plasma foi acidificado a um pH de 2-3, durante 30 minutos, com a adição de 100 μ l de 2,5N HCH₃COH/10M uréia e ,então, re-neutralizado a um pH de 7-8, com a adição de 100 μ l de 2,7N NaOH/1M HEPES. As amostras de urina foram analisadas sem serem diluídas. Os coeficientes intra e inter-ensaios de variação foram 2,0% e 13,1%, respectivamente.

Outros ensaios

A albumina foi dosada por imunoturbidimetria, a creatinina pela técnica de Jaffé e a HbA1c através de HPLC (High performance liquid cromathography).

Análise estatística

A análise estatística foi feita pelo software Statview (SAS Institute, Cary,NC). Devido a sua distribuição anormal, o TGF- β_1 plasmático, o TGF- β_1 urinário e a albumina foram transformados em logaritmo, antes da análise estatística e foram expressos como +/- erro padrão médio. O TGF- β_1 urinário foi expresso em pg/mg de creatinina e o TGF- β_1 plasmático em pg/ml. Para se detectar se havia diferenças entre os grupos nas taxas de TGF- β_1 urinário/creatinina e albumina/creatinina foi utilizado o teste de ANOVA com múltiplas entradas, e o pós-teste de Scheffe. O teste T não pareado foi usado para a comparação de características basais entre os grupos. O teste T pareado foi usado para comparar a creatinina sérica, HbA1c e o TGF- β_1 plasmático nas semanas 0 e 12. O nível de significância foi determinado como sendo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Fase prospectiva

Dos 28 pacientes selecionados, após o período de “run-in”, 4 pacientes não apresentaram critérios de adesão adequados ao estudo e 3 abandonaram o estudo. Todos os 21 pacientes randomizados completaram o período de follow-up de 12 semanas (figura 1). No tempo basal, não havia diferença estatística significativa entre a idade, índice de massa corporal (IMC), duração do DM, pressão arterial sistólica e diastólica, proteinúria de 24hs, relação albumina/creatinina, creatinina sérica, HbA1c, TGF- β_1 urinário e plasmático (tabela 1). A pressão arterial sistólica foi reduzida de forma similar em ambos os grupos IECA e não-IECA e não houve diferença entre os grupos ao final do estudo ($p=0,07$, figura 2). Após 12 semanas, os níveis do TGF- β_1 urinário não foram diferentes entre os dois grupos (figura 4 a).

A HbA1c diminuiu significativamente entre o nível basal e a semana 12 em ambos os grupos IECA e não – IECA, mas não houve diferença entre os dois grupos ao final do estudo (tabela 3 a). Nós não observamos diferenças estatísticas significativas entre os níveis de TGF- β_1 plasmático ou nas taxas urinárias de albumina/creatinina basais ou durante o follow-up, em ambos os grupos.

Análise Post-Hoc

Onze pacientes, cuja pressão arterial sistólica média estava abaixo de 140 mmHg, foram incluídas no grupo de melhor resposta no controle da pressão arterial, e 10 pacientes, nos quais a pressão arterial sistólica estava igual ou maior que 140 mmHg, foram incluídos no grupo de pior resposta ao controle da pressão arterial. No tempo basal, não havia diferença estatística significativa entre os grupo em relação a idade, duração do DM, pressão sistólica arterial, pressão arterial diastólica, proteinúria de 24hs, relação albumina/creatinina, creatinina sérica, HbA1c, log TGF- β_1 urinário/creatinina e TGF- β_1

plasmático (tabela 2). O índice de massa corporal (IMC) foi significativamente mais alto no grupo que apresentou pior resposta ao controle da PA ($p < 0,05$). As pressões arteriais sistólicas e diastólicas não se sobrepuseram entre os grupos, em nenhum momento (figura 3).

Conforme esperado, as pressões arteriais sistólica e diastólica foram significativamente menores no grupo 1 (melhor resposta) quando comparado ao grupo 2 (má resposta) nas semanas 0, 4, 8 e 12. A redução entre os valores médios de pressão arterial sistólica basal e pós- tratamento foi maior no grupo 1 do que no grupo 2 ($-29,5 \pm 6,6$ mmHg vs $-8,7 \pm 4,4$ mmHg), respectivamente) ($p = 0,0190$) (figura 2b). Não houve casos de hipercalemia (dados não mostrados) ou efeitos colaterais significativos em qualquer um dos grupos.

Após o tratamento, as taxas do log TGF- β_1 urinário/creatinina foram significativamente inferiores no grupo que apresentou melhor controle da PA, comparado ao grupo que apresentou pior controle da PA ($p = 0,0002$) (figura 4b). Comparando-se ao tempo basal, o log TGF- β_1 urinário médio nas semanas 4, 8 e 12 foi reduzido significativamente ($-0,22 \pm 0,15$ pg/mg, $p = 0,04$) no grupo com melhor controle da pressão arterial (grupo 1), mas não no grupo com pior controle (grupo 2) ($-0,12 \pm 0,08$ pg/mg, $p = 0,82$) (figura 5). Não houve diferença significativa no TGF- β_1 plasmático entre os grupos, apesar das diferentes respostas em relação a redução dos níveis de pressão arterial (tabela 3b).

Uma correlação linear positiva ($r = 0,458$; $p = 0,0357$) foi observada entre a pressão arterial sistólica média e os valores médios de log TGF- β_1 obtidos nas semanas 4, 8 e 12 (figura 6). A análise de regressão linear múltipla demonstrou que o efeito da redução da pressão arterial sistólica foi independente da redução da HbA1c ($r^2 = 0,536$; $p = 0,042$) (tabela 4).

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a excreção urinária de TGF- β_1 pode ser diminuída quando a pressão arterial sistólica é reduzida para valores inferiores a 140 mmHg em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, hipertensos e com nefropatia diabética estabelecida, independentemente do tipo de droga usada. A correlação positiva entre a pressão arterial sistólica e o TGF- β_1 urinário sugere que a mesma é um fator independente na determinação da produção de TGF- β_1 pelo rim dos pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e nefropatia diabética.

Nas células mesangiais, o TGF- β_1 exerce sua ação através da ligação com 3 receptores de membrana (β RI, β RII e β RIII). O TGF- β_1 ativo se liga ao β RI e ao β RII para formar um complexo ternário que ativa os mecanismos intracelulares promotores da transcrição de genes que regulam a produção de componentes da matriz extra-celular (MEC), como a fibronectina, enquanto que o receptor β RIII possui um papel menos definido na fibrinogênese. Além disso, o TGF- β_1 também inibe a degradação da MEC através do controle da atividade das metaloproteases. O resultado final é o acúmulo progressivo de MEC no espaço mesangial, especialmente se um estímulo continuado está presente.

Muitos estudos demonstraram que a hiperglicemia e a pressão intraglomerular aumentadas são potentes estímulos para a indução do aumento da síntese de TGF- β_1 nas células mesangiais. Quando expostas a altas concentrações de glicose, há um aumento de cerca de 50% na produção da proteína TGF- β_1 bem como no número de seus receptores e na ligação com os mesmos. Por outro lado, nos modelos *in vivo* da nefropatia diabética, mostram que o controle da hiperglicemia com o uso de insulina promove uma nítida redução na síntese renal de TGF- β_1 .

Mecanismos hemodinâmicos podem induzir a síntese de TGF- β_1 nas células renais. Quando células mesangiais, *in vitro*, são expostas a um estiramento mecânico, observa-

se um aumento na produção de TGF- β_1 e na ligação com seu receptor, o qual é qualitativamente similar àquele induzido pela exposição a altos níveis de glicose^{17,18}. Um aumento na quantidade de ligantes acompanhada a uma elevação correspondente do RNA mensageiro do receptor e da proteína também ocorre. Riser e cols sugeriram que as forças de estiramento poderiam agir através de um mecanismo diferente do sistema renina-angiotensina. Enquanto que a angiotensina II parece estimular a síntese de MEC através da ativação da via TGF- β_1 por um receptor específico, o mecanismo de sinalização intracelular decorrente da ação do estiramento não é completamente compreendido.

De maneira geral, a redução nos níveis urinários de TGF- β_1 pode ser atribuída tanto a uma redução na produção renal de TGF- β_1 , a uma redução na filtração do TGF- β_1 do plasma ou ambos. No presente estudo, uma vez que nem os níveis plasmáticos de TGF- β_1 nem a função renal se modificaram, parece que a redução da excreção urinária de TGF- β_1 pode ser devida a uma redução da produção renal de TGF- β_1 . Esses dados estão de acordo com Sharma e cols⁴, que demonstrou que a produção renal aumentada de TGF- β_1 é a principal fonte de TGF- β_1 urinário em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, enquanto que em pacientes sem diabetes, uma extração aumentada do plasma ocorre. Além disso, Sato e cols observaram que, em pacientes portadores de Diabetes Mellitus, o TGF- β_1 urinário é maior naqueles com expansão mesangial mais severa, conforme demonstrado em amostras de biópsias renais, sugerindo que o TGF- β_1 urinário pode representar um parâmetro que pode ser usado para avaliar a progressão da nefropatia diabética. Finalmente, outros estudos também demonstraram que os níveis intraglomerulares de TGF- β_1 mRNA estão elevados nos estágios iniciais de pacientes com nefropatia diabética²³. Deste modo, no Diabetes Mellitus tipo 2, a produção renal de TGF- β_1 parece ser a principal determinante da excreção urinária de TGF- β_1 .

Há algumas controvérsias na literatura em relação aos níveis de TGF- β_1 no sangue dos pacientes portadores de Diabetes e o efeito da redução da pressão arterial. Num estudo, os pacientes com nefropatia diabética apresentaram redução dos níveis séricos de TGF- β_1 após o uso de captopril durante 6 meses. Esse efeito, de qualquer modo, não foi confirmado em outro estudo onde os níveis plasmáticos de TGF- β_1 não se alteraram após o uso de losartan. Essas discrepâncias poderiam ser associadas a diferença entre as concentrações de plaquetas, uma vez que o primeiro estudo utilizou soro enquanto que o segundo utilizou plasma. As diferenças entre as classes de droga também poderia ser importante. De qualquer modo, no presente estudo, as reduções nas concentrações plasmáticas de TGF- β_1 não parecem ser o principal determinante dos níveis de TGF- β_1 urinários.

Nossos achados estão de acordo com os de Houlihan e cols²² que demonstraram uma redução significativa no TGF- β_1 urinário, quando a pressão arterial foi reduzida através do uso do losartan por um período de 4 semanas, em pacientes com microalbuminúria. Neste estudo, de qualquer modo, as mudanças na pressão arterial média não se correlacionaram com as mudanças do TGF- β_1 urinário. Uma possível razão poderia ser que, no presente estudo, níveis basais mais elevados de TGF- β_1 urinário foram encontrados, e reduções maiores na pressão arterial poderiam ter sido promovidas e, conseqüentemente, um efeito mais pronunciado na excreção urinária de TGF- β_1 .

No presente estudo, nós não observamos diferenças significativas do TGF- β_1 urinário entre o tratamento com inibidores da ECA, porém houve uma tendência de se observar níveis mais baixos no grupo que usou essas drogas. Apesar do poder estatístico ser limitado para uma comparação direta entre as 2 classes de drogas, é importante salientar que o nosso principal objetivo era comparar o efeito de diferentes graus de controle da pressão arterial sistólica. Uma vez que nós achamos que poderia ser anti-ético randomizar dois grupos para diferentes níveis de controle da pressão arterial, nós

decidimos realizar isto numa análise post-hoc. Como nós observamos, o efeito da redução da pressão arterial nos níveis de TGF- β_1 urinário foi maior que o efeito direto do uso dos inibidores da ECA. O presente estudo claramente sugere que o impacto da redução da pressão arterial sistólica abaixo de 140mmHg é superior na diminuição dos níveis de TGF- β_1 urinário do que o tipo de droga usada.

CONCLUSÕES

Em conclusão, nossos achados demonstram que, em pacientes portadores de Diabetes Mellitus tipo 2, hipertensos e macroalbuminúricos, a redução da pressão arterial sistólica pode diminuir a excreção renal de TGF- β_1 e seu efeito parece ser independente do controle metabólico. Esses achados reforçam a necessidade de buscar o melhor controle possível da pressão arterial para a atenuação da progressão da nefropatia diabética.

Suporte Financeiro

Os recursos para a realização desse estudo foram provenientes da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e FIPE.

Dr Fulvio Clemo Santos Thomazelli recebeu bolsa de mestrado pela CAPES.

Referencias bibliográficas:

1. Border WA, Yamamoto T, Noble NA: Transforming growth factor beta in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Rev* 12:309-339.1996.
2. Bertoluci MC, Schmid H, Lachat JJ, Coimbra TM: Transforming Growth Factor-beta in the development of rat diabetic nephropathy. *Nephron* 74:189-196, 1996.
3. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN: Neutralization by TGF- β antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extra-cellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 45:522-530, 1996.
4. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnick BR, Kurnik PB, Weisberg LS: Increased renal production of transforming growth factor-beta 1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 46:854-859, 1997.
5. Bertoluci MC, Schaan BD, Coimbra TM, Schmid H: Increased urinary TGF- β 1 in type 2 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes* 47 (Suppl.1):0504, 1998.
6. Bertoluci MC, Machado MP, Lima KM, Thome F, Barros E, Veronese F, Schaan BD, Schmid H. Increased urinary TGF- β 1 in diabetic nephropathy in comparison to non-diabetic nephropathies. *Diabetes* 49 (Suppl.1); 229-OR, 2000.
7. Ellis D, Forrest KY, Erbey J, Orchard TJ: Urinary measurement of Transforming growth factor beta and type IV collagen as new markers of renal injury: application in diabetic nephropathy. *Clin Chem* 44: 950-956, 1998.
8. Rivarola EWR, Moyses-Neto M, Dantas M, da Silva CG, Volpini R, Coimbra TM. Transforming growth factor beta activity in urine of patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res* 32 1525-1528, 1999.

9. Sato H, Iwano M, Akai Y, Kurioka H, Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M, Dohi K: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta-1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*: 18:490-494, 1988.
10. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 346(15): 1145-1151, 2002.
11. UK Prospective Diabetes Study Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352:837-853, 1998.
12. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G: Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor β . *J Clin Invest* 74:93:536-542, 1994.
13. Schaan BD, Lachchini S, Bertoluci MC, Irigoyen MC, Machado UF, Schmid H. Increased Renal GLUT1 abundance and Urinary TGF- β 1 in streptozotocin-induced diabetic rats: implications for the development of nephropathy complicating diabetes. *Horm Metab Res* 33:6664-669, 2001.
14. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM: Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest* 77:1925-1930, 1986.
15. Krolewski AS, Canessa M, Warram JH, Laffel LMB, Christlieb R, Knowler WC, Rand LI: Predisposition to hypertension and susceptibility to renal disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318: 140-150, 1988.
16. Canani LH, Gerchman F, Gross JL: Familial clustering of diabetic nephropathy in brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 48:909-913, 1999.
17. Riser B, Ladson-Wofford S, Sharba A, Cortes P, Drake K, Guerin CJ, Yee J, Choi ME, Segarini PR, Narins RG. TGF- β receptor expression and binding in rat

- mesangial cells: Modulation by glucose and cyclic mechanical strain. *Kidney Int* 56:428-439, 1999.
18. Riser BL, Cortes P, Heilig C, Grondin J, Ladson -Wofford S, Patterson D, Narins RG: Cyclic stretching force selectively up-regulates transforming growth factor- β isoforms in cultured rat mesangial cells. *Am J Pathol* 148:1915-1923, 1996.
 19. Wolf G: Link between angiotensin II and TGF- β in the kidney. *Miner Electrolyte Metab* 24:174-180, 1998.
 20. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J med* 345:861-869, 2001.
 21. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, Berl T, Pohl MA, Lewis JB, Ritz E, Atkins RC, Rohde R, Raz I: Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345: 851-860, 2001.
 22. Houlihan CA, Akdeniz A, Tsalamandris C, Cooper MA, Jerums G, Gilbert RE. Urinary transforming growth factor β excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate. *Diabetes Care* 25:1072-1077, 2002.
 23. Iwano M, Kubo A, Nishino T, Sato H, Nishioka H, Akai Y, Kurioka H, Fujii Y, Kanauchi M, Shiiki H, Dohi K: Quantification of glomerular TGF- β 1 mRNA in patients with diabetes mellitus. *Kidney Int* 49:1120-1126, 1996.
 24. Sato H, Iwano M, Akai Y, Kurioka H, Kubo A, Yamaguchi T, Hirata E, Kanauchi M, Dohi K: Increased excretion of urinary transforming growth factor beta 1 in patients with diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 18:490-494, 1998.
 25. Sharma, K, Eltayeb BO, McGowan TA, Dunn SR, Alzahabi B, Rohde R, Ziyadeh FN, Lewis EJ. Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth

- factor-beta 1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 34:818-823, 1999.
26. Parving HH, Hommel E, Smidt UM: Protection of kidney function and decrease in albuminuria by captopril in insulin dependent diabetics with nephropathy. *BMJ* 297(656):1086-91, 1988.
27. Ritz E, Rychlik I, Miltenberger-Miltenyi G: Optimizing antihypertensive therapy in patients with diabetic nephropathy. *J Hypertens Suppl* 16:S17-22, 1998.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da fase prospectiva do estudo. PAsm = pressão arterial sistólica média

Figura 2. (A) Pressão arterial sistólica média basal (primeira consulta) e durante o tratamento entre os grupos IECA e não-IECA. (B) Pressão arterial sistólica média entre os grupos de melhor resposta (barras vazias) e má resposta (barras escuras) na análise post-hoc. Dados: média \pm erro padrão.

Figura 3. Pressão arterial sistólica e diastólica na primeira visita (B), na randomização (0) e após 4, 8 e 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo com múltiplas drogas no grupo 1 (melhor resposta) (barras escuras) e grupo 2 (má resposta) (barras vazias). Média \pm Erro padrão * $p < 0,001$.

Figura 4. Taxa de log TGF- β_1 urinário/creatinina em pacientes randomizados para os grupos de uso de inibidores da ECA ou não-IECA (A) e para a melhor ou pior resposta no controle da pressão arterial sistólica (B). Dados: média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; † $p < 0,01$ (entre grupos) e ‡ $p < 0,05$ vs basal.

Figura 5. Média de log TGF- β_1 urinário/creatinina em pacientes com nefropatia diabética que apresentaram níveis de pressão arterial sistólica média abaixo de 140 mmHg (barras vazias) e naqueles com níveis de PAS média maior ou igual a 140 mmHg (barras cinzas). Dados são média \pm erro padrão.

Figura 6 – Correlação de Pearson entre a média do log TGF- β_1 urinário e a pressão arterial sistólica média durante a intervenção clínica em todos os pacientes estudados.

Figura 1. Fluxograma do estudo

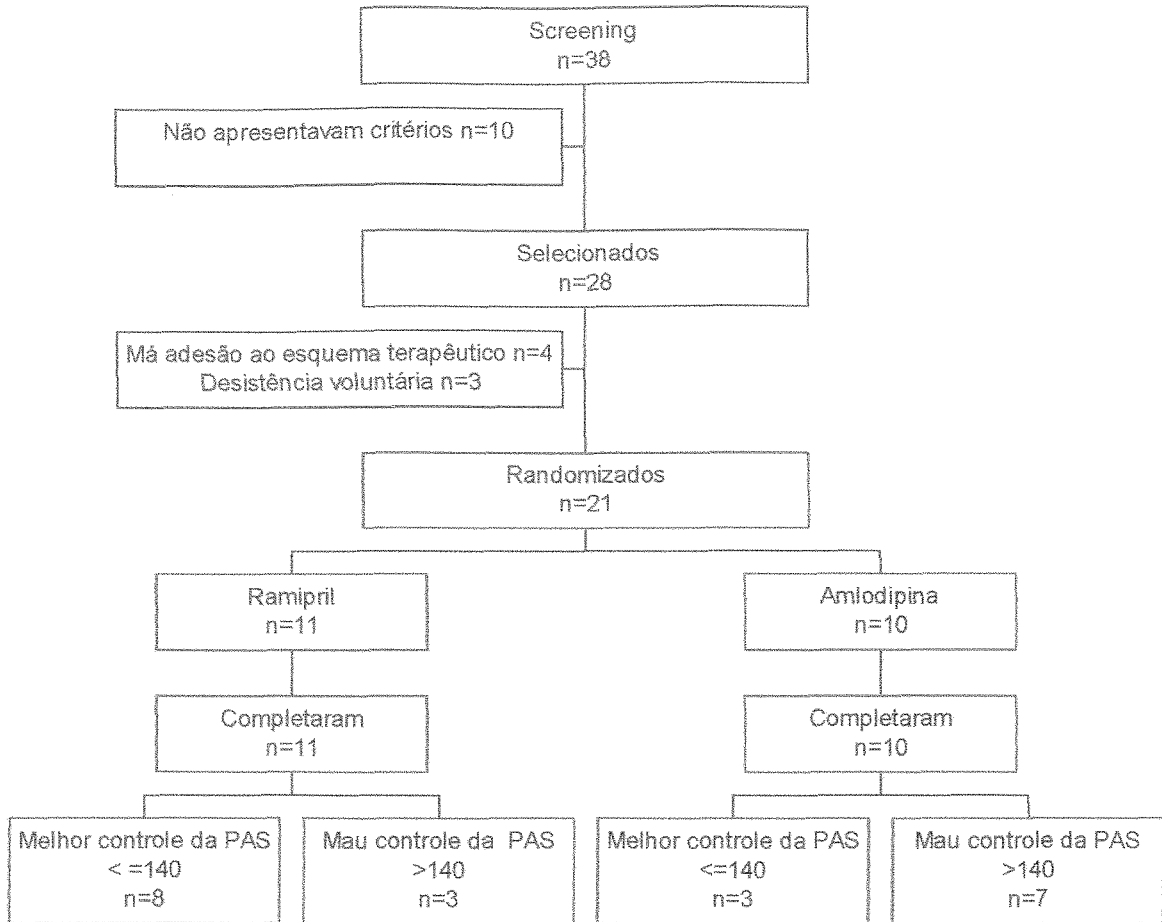
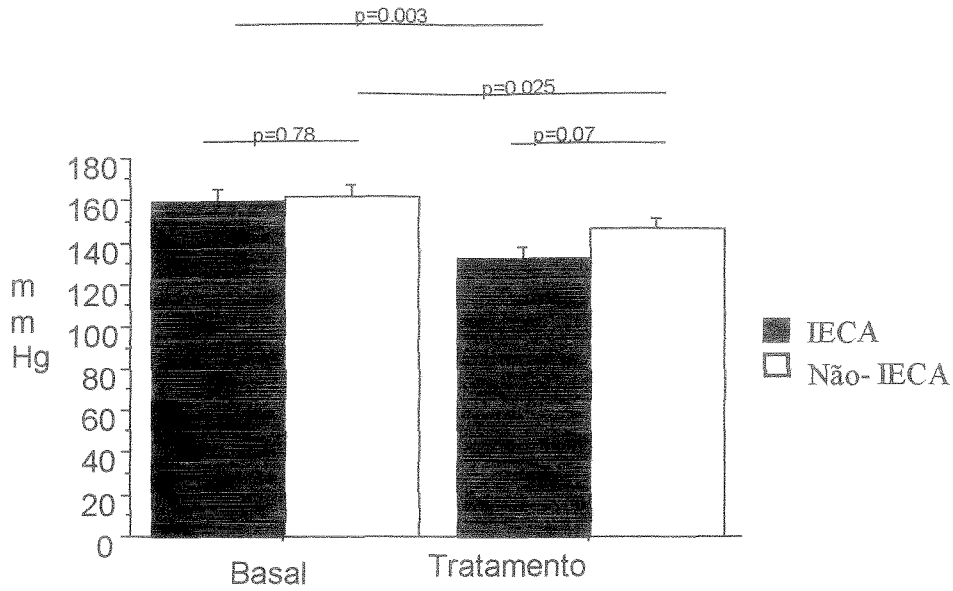


Figura 2.

Pressão Arterial Sistólica

IECA vs não-IECA



Melhor resposta no controle da PAS vs Má resposta no controle da PAS

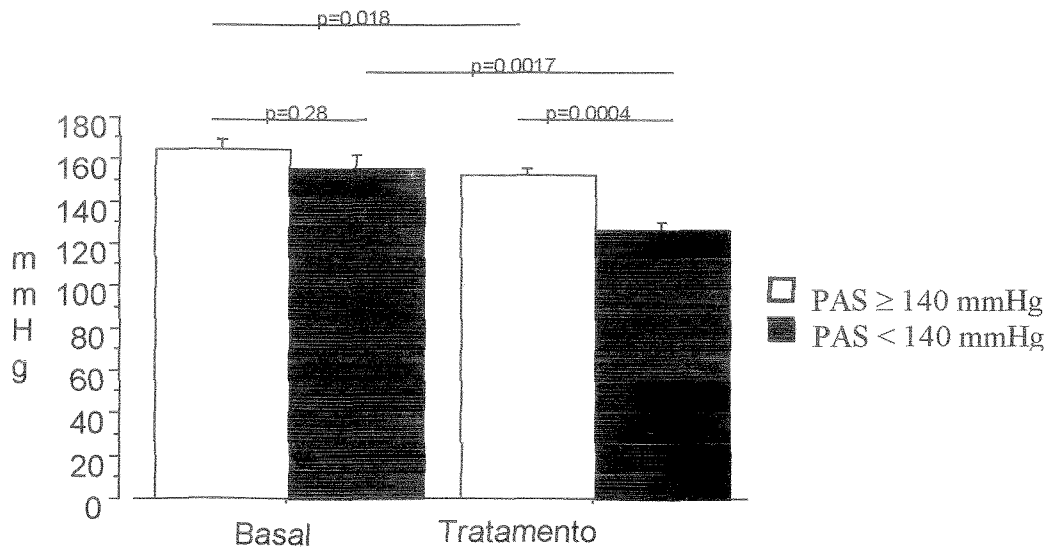
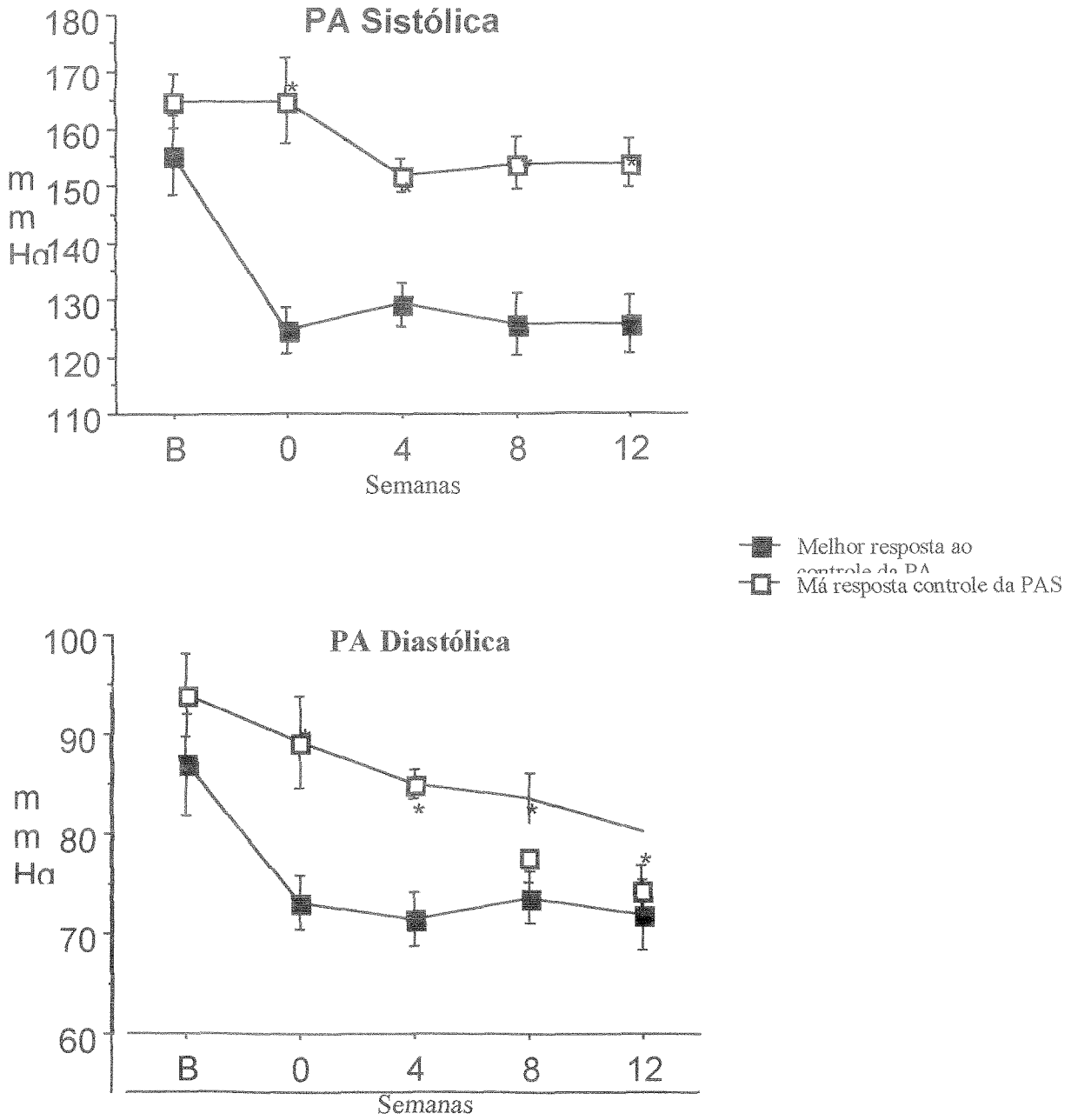
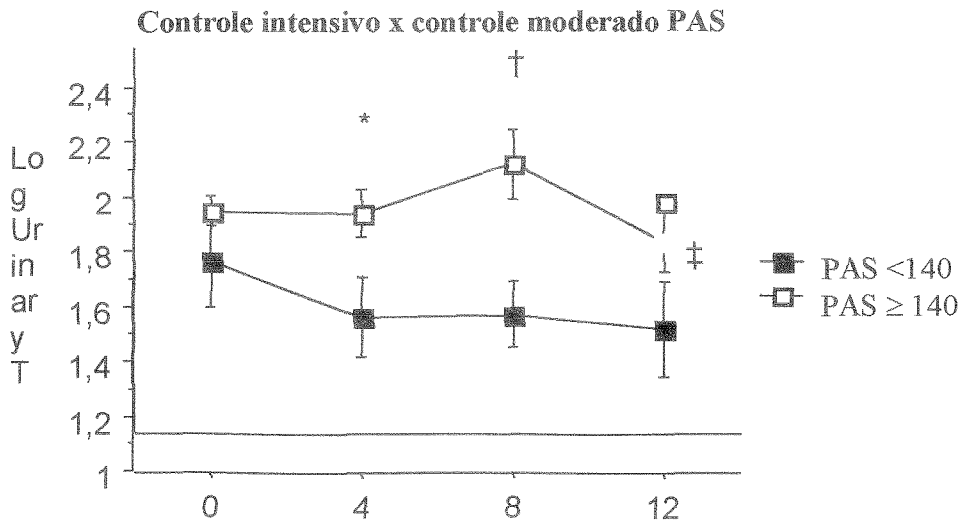
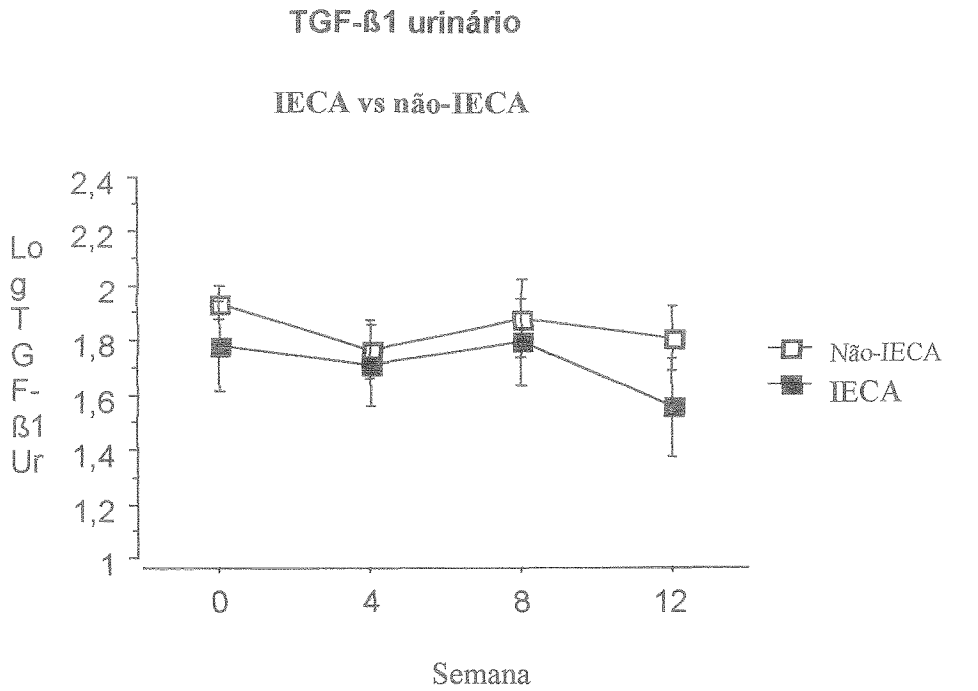


Figura 3.



* $p < 0,001$: relação entre os valores basais e 4, 8 e 12 semanas após

Figura 4.



- * $p < 0,05$, comparação entre os dois grupos
- † $P < 0,01$, comparação entre grupos
- ‡ $p < 0,05$, comparação entre os valores basais

Figura 5.

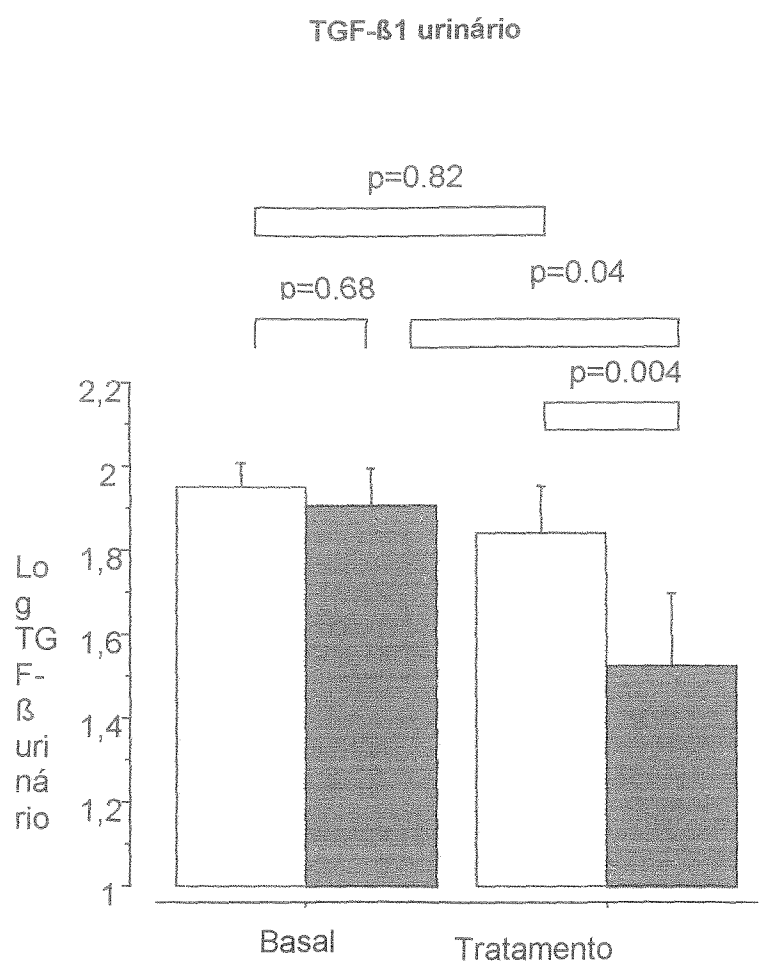


Figura 6.

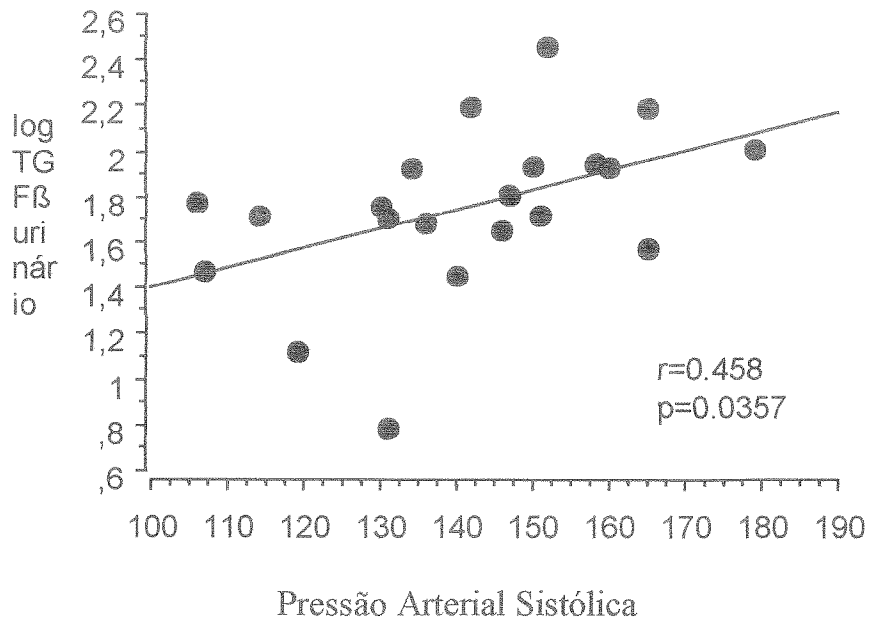


Tabela1- Características basais dos pacientes na fase prospectiva do estudo. IECA(grupo usando Ramipril) vs. não-IECA (grupo não usando inibidores da ECA). HbA1c (limite normal: <4.3%) ns=não significativo

	IECA	Não IECA	p
n	11	10	-
Sexo (M/F)	6/5	6/4	-
Idade (anos)	57.0±7.0 *	59.0±7.0	ns
Duração do Diabetes (anos)	14.0±6.0	14.0±6.1	ns
IMC (kg/m ²)	27.0±5.2	30.0±4.6	ns
Pressão arterial Sistólica (mmHg)	159.0±21.0	161.0±19.1	ns
Pressão arterial diastólica (mmHg)	88.1±16.0	93.2±15.0	ns
HbA1c (%)	6.7±1.3	6.7±1.9	ns
Creatinina sérica (µmol/L)	95.5±28.3	115.8±45.1	ns
Proteinúria (mg/24h)	1424±927	1439±904	ns
Albumina /Creatinina (µg/mg)	585.5±197	581.6±151	ns
TGF-β ₁ plasma (ng/ml) [#]	3.4±1.3	2.0±1.1	ns
TGFβ ₁ urinário (pg/mg) [#]	95.7±104.8	93.9±37.4	ns

*Os dados são média± desvio padrão.

Tabela 2- Características basais dos pacientes na análise Post -Hoc. Pacientes com melhor controle da Pressão Arterial (grupo 1) vs Má resposta ao controle da Pressão Arterial (grupo 2). HbA1c (N: <4.3%)

	Melhor controle da PA	Má resposta ao controle da PA	<i>P</i>
N	11	10	-
Sexo (M/F)	8/3	4/6	-
Idade (anos)	57.5±2.5*	58.5±1.7	0.76
Duração do Diabetes (anos)	16.0±1.9	12.3±1.6	0.16
IMC (kg/m ²)	25.9±1.0	29.9±1.5	0.04
Pressão arterial sistólica (mmHg)	155.6±6.8	165.0±4.8	0.28
Pressão arterial diastólica (mmHg)	87.0±5.0	94.0±4.2	0.30
HbA1c (%)	6.7±0.4	6.7±0.5	0.98
Creatinina sérica (µmol/L)	104.3±11,5	106.3±13,3	0.92
Proteinúria (mg/24h)	1415.3±294	1449.2±266	0.93
Albumina /Creatinina (µg/mg)	585.5±197	581.6±151	0.99
TGF-β ₁ plasmático (ng/ml) [#]	3.35±1.4	2.09±0.3	0.44
TGFβ ₁ -urinário (pg/mg) [#]	93.9±31.8	95.8±11.4	0.96

* Dados são média ± desvio padrão.

Tabela 3. Parâmetros metabólicos e renais nos tempos basal a após 12 semanas de tratamento anti-hipertensivo na fase prospectiva do estudo (3A) e na análise post-hoc (3B). Creatinina S = creatinina sérica. AER/Cre= relação concentração urinária de albumina/ creatinina urinária. Valores P_1 referentes a comparação entre 0 e 12 semanas. Valores P_2 referentes a comparação entre os grupos na semana 12.

3A. Grupos IECA vs. não - IECA

Semana	<i>Grupo IECA n=11</i>			<i>Grupo não-IECA n=10</i>			
	0	12	<i>p</i>	0	12	<i>p</i>	<i>p₂</i>
HbA1c (%)	6.7± 0.38*	5.6± 0.15	0.01	6.7±0.6	6.3±0.3	0.56	0.05
Creatinina S (µmol/l)	95.5±7.96	97.24±7.07	0.89	115.80±14.1	125.52±15.9	0.88	0.10
TGF-β1 plasma (ng/ml)	3.40±1.37	2.20±0.67	0.44	2.04±0.35	2.55±0.56	0.45	0.70
AER/Cre (µg/mg)	670.3± 208.8	623.9±230.2	0.97	497.2±142.5	525.5±152.6	0.97	0.99

* Dados são média ± erro padrão.

3B. Melhor controle vs.má resposta ao controle da pressão arterial sistólica (PAS)

Semana	<i>Melhor Controle PAS n=11</i>			<i>Má resposta controle PAS n=10</i>			
	0	12	<i>p</i>	0	12	<i>p</i>	<i>p₂</i>
HbA1c (%)	6.7±0.40*	5.8±0.17	0.05	6.6±0.51	6.1±0.35	0.41	0.38
Creatinina S (µmol/l)	104.3±10,6	104.3±12,4	1.00	106.1±13,3	114.9±14,4	0.56	0.47
TGF-β1 plasma (ng/ml)	3.35±1.34	2.07±0.69	0.41	2.09±0.36	2.69±0.06	0.51	0.48
AER/Cre (µg/mg)	585.1±197.2	680.2±232.3	0.82	571.1±134.3	451.1±108.6	0.38	0.95

* Dados são media ± erro padrão.

Tabela 4. Regressão Linear Múltipla. Pressão Arterial Sistólica e HbA1c.

	Coeficiente	EP	Coef padrão	t	<i>p</i>
Intercept	0.178	0.773	0.178	0.230	0.822
PA sistólica média	0.012	0.005	0.536	2.241	0.042*
HbA1c média	-0.014	0.079	-0.042	-0.175	0.864