



MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Nefropatia diabética não-albuminúrica: uma via alternativa de lesão?

Catarina Nogueira Brito Cidade Rodrigues

(catarinaciderodrigues@gmail.com)

M

2018

Orientador – Doutora Anabela Rodrigues

Categoria – Professor Auxiliar Convidado de Medicina 1, com Agregação

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade
do Porto



05/2018

Resumo

As proporções epidémicas que a prevalência da diabetes mellitus tem vindo a adquirir ao longo dos anos tornou a nefropatia diabética um problema clínico major de saúde pública. É a principal causa de morbilidade e mortalidade em doentes diabéticos e a primeira causa de doença renal e necessidade de terapêutica de substituição renal no mundo ocidental.

A nefropatia diabética é tipicamente definida como a presença de microalbuminúria progredindo invariável e posteriormente para macroalbuminúria e/ou redução da taxa de filtração glomerular num doente diabético. Contudo, nos últimos anos, o paradigma da história natural desta patologia renal tem vindo a ser desafiado devido à acumulação de evidência comprovando que a regressão da microalbuminúria é uma característica frequente, quer na diabetes mellitus tipo 1, quer na diabetes mellitus tipo 2, e que a diminuição da taxa de filtração glomerular pode ocorrer independentemente da albuminúria ou mesmo na sua ausência, tornando-se evidente que a albuminúria será um marcador potencialmente falível de deteção de nefropatia diabética e progressão da mesma em todos os doentes.

Como tal, tem vindo a ser sugerida a existência de um fenótipo não-albuminúrico na nefropatia diabética, nomeadamente na diabetes mellitus tipo 2, dada a sua heterogeneidade relativamente a fatores imunes, genéticos e clínicos.

O objetivo desta revisão será procurar e discutir potenciais vias alternativas de lesão renal e progressão da nefropatia em doentes diabéticos. Pretende-se assim avaliar se este fenótipo não-albuminúrico constitui: uma via distinta (podendo ser simultânea, sobreposta ou complementar) à via albuminúrica, uma via precedente da albuminúria, ou apenas resultado de uma albuminúria mascarada/reduzida pela instituição de terapêutica modificadora do eixo renina-angiotensina-aldosterona. Em qualquer dos casos supracitados, haverá diferentes mecanismos patogénicos envolvidos para além dos classicamente descritos, implicações prognósticas distintas e possíveis novas intervenções terapêuticas a considerar.

Em termos metodológicos, será utilizado principalmente o motor de pesquisa PubMed, em formato eletrónico, sendo os artigos procurados entre os anos 2000 e 2017.

Abstract

The increasing prevalence of diabetes mellitus over the years has turned the diabetic nephropathy into a major public health issue. It is the main cause of morbidity and mortality in diabetic patients and the leading cause of renal disease and substitutive renal therapy in the western world.

Diabetic nephropathy is typically defined as the presence of microalbuminuria progressing unvariably and subsequently to macroalbuminuria and/or glomerular filtration rate reduction in a diabetic patient. However, in recent years, the paradigm of this renal pathology's natural history has been challenged. The accumulation of evidence suggests that the regression of microalbuminuria is a common feature in both type 1 and 2 diabetes mellitus. Furthermore, the glomerular filtration rate decline may occur independently of the presence or absence of albuminuria. It is evident that albuminuria might be a potentially fallible marker for the detection of diabetic nephropathy and its progression in every patient.

As such, the existence of a non-albuminuric phenotype for diabetic nephropathy has been suggested, notably in type 2 diabetes mellitus, given its heterogeneity related to immune, genetic and clinical factors.

The purpose of this review will be to search and discuss potential alternative pathways of renal impairment and progression of diabetic patients' nephropathy. Regarding non-albuminuric phenotype, the aim is to evaluate whether it constitutes: a distinct (simultaneous, overlapped or complementary) pathway, a precedent pathway or simply the result of the treatment of albuminuria with renin-angiotensin-aldosterone system modifying agents.

In either of these cases, there will be different pathogenic mechanisms involved, apart from the classically described pathway, different impacts on prognosis and new possible therapeutic interventions to consider.

In terms of methodology, the research will be done using PubMed, and the articles will be in electronic format, between the year 2000 and 2017.

Palavras chave

Albuminúria, Células do túbulo proximal, Diabetes mellitus, Doença renal crônica, Insuficiência renal, Nefropatia diabética, Normoalbuminúria, Taxa de filtração glomerular

Lista de abreviaturas

ADA - *American Diabetes Association*
AGEs - Produtos avançados da glicação
AGT II - Angiotensina II
AMPK - *AMPactivated kinase*
Ang-1 - Angiopietina-1
ARA II - Antagonistas dos recetores da angiotensina II
A1M - Microglobulina- α 1
CAMs - *cell adhesion molecules*
CNP - Péptido natriurético C
DAG/PKC - Diacilglicerol/proteína cinase C
DAMPs - *danger-associated molecular patterns*
DM – Diabetes Mellitus
DRC – Doença renal crónica
eNOS - sintetase endotelial do óxido nítrico
EPO - Eritropietina
ERAEDTA - *European Renal Association*
HADCs - Histona desacetilases
HATs - Histona acetiltransferases
HbA1c - Hemoglobina glicada
HIF-1 - *Hypoxia-inducible factor 1*
HTA – Hipertensão arterial
IECAs - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina II
IL-1 - Interleucina 1
IMC – Índice de massa corporal
KDIGO - *Kidney Disease Improving Global Outcomes*
KIM-1 - *Kidney injury molecule-1*
L-FABP - *Liver-type fatty acid-binding protein*
LRA - Lesão renal aguda
MBG – Membrana basal glomerular
MCP-1 - *Monocyte chemoattractant protein-1*
MDRD - *Modification of Diet in Renal Disease*
miRNAs - Micro-RNAs
mTORC1 - *Mammalian target of rapamycin complex1*
NAG - N-acetil- β -D-glucosaminidase
ND – Nefropatia diabética
NF- κ B - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NGAL - *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*
NO - Óxido nítrico
PDGFR β - *PDGF receptor- β*
R-A-A – Eixo renina-angiotensina-aldosterona

RAGEs – Recetores dos AGEs
RBP - *Retinal binding protein*
RE - Retículo endoplasmático
ROS - Espécies reativas do oxigénio
SGLT-2 - *Sodium-glucose co-transporter 2*
Sirt1 - Sirtuina 1
sTNFR-2 - *Soluble tumour necrosis factor receptor-2*
TFG – Taxa de filtração glomerular
TGF- β - *Transforming Growth Factor- β*
TNFR - *Tumor necrosis factor receptor*
VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule-1*
VDR - Recetores da vitamina D
VEGF-A - *Vascular Endothelial Growth Factor A*
8-OHdG - 8-Hidroxidesoxiguanosina

Índice

Introdução e objetivos.....	1
Metodologia.....	2
Nefropatia diabética.....	3
Epidemiologia.....	3
Relevância clínica.....	4
Nefropatia diabética albuminúrica.....	5
Estádios e história natural.....	5
Características histológicas.....	5
Mecanismos de lesão.....	7
Intervenções e <i>outcomes</i>	9
Nefropatia diabética não-albuminúrica.....	10
Expressão e relevância clínicas.....	10
Novas trajetórias e revisão de paradigmas.....	11
Correlação clínico-histológica.....	14
Possíveis mecanismos de lesão.....	16
Vias de investigação futura.....	20
Marcadores.....	20
Tratamentos.....	20
Discussão e Conclusões.....	22
Limitações.....	24
Anexos.....	25
Referências.....	36

Introdução e objetivos

A nefropatia diabética (ND) constitui uma das complicações microvasculares *major* da diabetes mellitus (DM) de ambos os tipos 1 e 2. Esta patologia tem sido classicamente definida através da presença e progressão de albuminúria, redução da taxa de filtração glomerular (TFG), ou ambas.

As armas terapêuticas atuais conseguem reduzir os sintomas e atrasar a progressão da doença renal para o estadió terminal, reduzindo a mortalidade dos doentes. Contudo, em muitos deles, não se consegue evitar a progressão inexorável para a necessidade de terapia de substituição renal. Apesar de, hoje em dia, se utilizarem maioritariamente fármacos que atuam no controlo eficaz da glicemia, do perfil lipídico e da pressão arterial, cerca de metade dos doentes diabéticos continuam a desenvolver complicações micro e macrovasculares, nomeadamente, doença renal (em cerca de 30% dos casos) e doença cardiovascular. Como tal, torna-se urgente encontrar novas formas de tratamento para estes doentes, uma vez que as armas terapêuticas das quais se dispõe atualmente demonstram ser insuficientes para prevenir a progressão da diabetes e das suas respetivas complicações. Relativamente à ND em particular, têm vindo a surgir notáveis avanços na compreensão dos mecanismos celulares responsáveis pelo início e progressão desta patologia, apesar de se manter ainda um grande mistério qual a sua terapêutica ideal.^[1]

Nesta revisão abordar-se-ão vias alternativas de lesão e progressão renal em doentes diabéticos. O objetivo será discutir a hipótese de um fenótipo não-albuminúrico, que poderá constituir uma via distinta de lesão face à via albuminúrica (podendo ser simultânea, sobreposta ou complementar a esta), uma via precedente da albuminúria, ou apenas resultado de uma albuminúria mascarada pela instituição de fármacos modificadores do eixo renina-angiotensina-aldosterona (R-A-A).

Metodologia

A metodologia utilizada consistiu na pesquisa de artigos a partir do motor de pesquisa PubMed, escritos em inglês, entre 2000 e 2017.

Os artigos selecionados consistiram em publicações de estudos experimentais bem como de revisões bibliográficas sobre o tema em foco. Foram incluídos artigos originais com delineamento experimental (ensaios clínicos, randomizados ou não) ou observacional (estudos de coorte e transversais), realizados principalmente em humanos. No total, para a presente revisão, foram selecionados 144 artigos.

As referências captadas foram incluídas numa única biblioteca no programa EndNote X8.

Nefropatia diabética

Epidemiologia

A nível mundial, em 2015, verificou-se a existência de 415 milhões de pessoas diabéticas, com uma tendência para a subida deste valor, prevendo-se em 2040 que atinja os 642 milhões (1 em cada 10 adultos). Denota-se que 75% dos doentes diabéticos vivem em países com baixos e médios recursos, apesar de se verificar que o número de pessoas com DM tipo 2 está a aumentar em todos os países.^[16]

Na população portuguesa, entre os 20 e os 79 anos, a percentagem de doentes diabéticos está também a aumentar, sendo a prevalência estimada, em 2015, de 13,3% (mais de 1 milhão de portugueses), com uma incidência crescente ao longo dos últimos quatro anos. Esta prevalência é cerca de quatro vezes superior nas pessoas obesas, relativamente às pessoas com um índice de massa corporal (IMC) normal. Existe, de facto, uma relação entre o IMC e a diabetes, sendo que 90% dos diabéticos apresentam excesso de peso (49,2%) ou obesidade (39,6%).^[16]

Atualmente, as complicações da diabetes lideram as causas de morbimortalidade dos doentes diabéticos, sendo que a nefropatia em específico é a causa major de doença renal terminal - responsável por cerca de 1/3 da incidência^[13] e a principal complicação microvascular crónica – afeta 20-40% dos doentes diabéticos de ambos os tipos^[13], bem como um fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.^[1, 17]

Dados da *European Renal Association* (ERAEDTA) mostram que dez países europeus tiveram um aumento de 11,9% por ano de doentes com DM tipo 2 que iniciaram terapia de substituição renal.^[18]

Apesar de, ao longo da última década, se ter vindo a verificar uma diminuição do número de anos potenciais de vida perdidos pela DM em Portugal, em 2014 esta patologia constituiu 8,5 anos de vida perdida por cada óbito pela doença, em pessoas com menos de 70 anos.^[16]

Dados atuais demonstram que, em Portugal, a prevalência e a incidência da diabetes nas pessoas com doença renal crónica (DRC) têm vindo a aumentar relativamente aos quatro anos anteriores, tendo atingido os valores de 28,1% e 33,9%, respetivamente. A mesma tendência se verificou nos dados relativos aos doentes renais crónicos em tratamento de substituição, quer por hemodiálise, quer por diálise peritoneal.^[16]

Relevância Clínica

A nefropatia associada à DM tipo 2, tal como será reforçado posteriormente, apresenta um padrão histológico e história natural bastante heterogêneos quando comparada com a DM tipo 1, na qual se verifica predominância da glomerulosclerose (lesão histológica típica da ND) em 95% dos casos.^[19]

A hiperglicemia afeta todos os tipos de células renais^[9] e tem demonstrado ser o fator que mais contribui para a patogênese das complicações da diabetes.^[17] Contudo, para além desta, existem muitos outros fatores envolvidos, ambientais e genéticos, conduzindo a alterações metabólicas, hemodinâmicas e bioquímicas diversas.^[9] Fenómenos que estão a ser cada vez mais reconhecidos como mecanismos contributores para o desenvolvimento de complicações diabéticas e doença renal terminal são o stress oxidativo e a inflamação devidos às elevações crónicas da glicemia em doentes diabéticos.^[1, 20]

De facto, a associação da DM tipo 2 com outros fatores de risco, nomeadamente obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial (HTA), pode explicar a heterogeneidade referida, dado contribuírem de forma independente para a deterioração da TFG, adicionalmente à proteinúria. Isto poderá justificar o facto de poder ocorrer insuficiência renal mesmo antes de se indiciar uma nefropatia franca.^[21] A obesidade, em particular, tem vindo a aumentar de incidência globalmente e tem sido detetada em idades cada vez mais jovens, contribuindo para uma grande carga de aparecimento de outras patologias com grande impacto socioeconómico na saúde, em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como a própria diabetes, a DRC e doenças cardiovasculares.^[18]

Para além disso, a reversão farmacológica da proteinúria através da administração de inibidores do eixo R-A-A não é tão renoprotetora (eficaz na prevenção ou atraso da progressão renal) na DM tipo 2 ^[22, 23], quando comparada à DM tipo 1. Isto poderá sugerir que a proteinúria será o fator predominante na progressão da nefropatia em doentes diabéticos de tipo 1, mas não em doentes diabéticos de tipo 2, nos quais haverão vias adicionais de lesão que desencadeiam e sustentam a disfunção renal.^[21]

Nefropatia diabética albuminúrica

Estádios e História natural

A ND apresenta-se por estádios que são objetivados, desde os anos 80, pelo grau de albuminúria (normo-micro-macro) – sendo este o paradigma de progressão clássica^[18, 19], no qual a microalbuminúria precede a macroalbuminúria.^[24] A doença renal de estágio V geralmente é atingida após 10 anos de doença em 20% dos doentes microalbuminúricos e em 60% dos doentes macroalbuminúricos.^[24]

Tipicamente, há cinco etapas no desenvolvimento da patologia renal associada à diabetes. Precocemente, decorrem hipertrofia e hiperfiltração glomerulares, seguidas de alterações estruturais no rim sem detecção de microalbuminúria, aparecimento desta com função renal preservada, macroalbuminúria ou proteinúria franca persistente e, por fim, dano renal progressivo com progressão para doença renal de estágio terminal.^[25, 26]

Ainda hoje, a maioria dos profissionais considera que o início da macroalbuminúria ou proteinúria franca marcam o início do declínio mais acentuado e irreversível da TFG.^[19, 26] Este fenómeno, sendo a via final comum de progressão de todas as patologias renais, marca o ponto a partir do qual a progressão renal e a doença cardiovascular ocorrem, apesar da instituição de tratamento.^[26]

A presença de albuminúria e a TFG contribuem independente e aditivamente para o risco renal e cardiovascular.^[18] O risco de eventos cardiovasculares e as taxas de mortalidade aumentam a cada estágio^[18] de progressão da ND.^[1]

O grau de proteinúria e o tempo de resposta após o início do tratamento com fármacos modificadores do eixo R-A-A serão os fatores mais fortemente preditores da progressão renal.^[27-29]

Caracterização Histológica

O glomérulo constitui uma barreira complexa de filtração, constituída por vários componentes. Os capilares glomerulares caracterizam-se por três camadas: endotélio fenestrado, membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos. As células mesangiais encontram-se no interstício entre os endoteliócitos glomerulares. Na ND, participam podócitos, células mesangiais, endoteliócitos glomerulares, células tubulares epiteliais, fibroblastos intersticiais e endoteliócitos vasculares.^[9, 30, 31]

As alterações hemodinâmicas mais precoces na DM são a vasodilatação renal e a hiperfiltração glomerular^[4, 32], antes de qualquer dano renal; a alteração estrutural mais precoce é o espessamento da MBG.^[26] Poderá surgir arteriosclerose hialina dos vasos

renais^[26], nomeadamente nas arteríolas aferente e eferente (sendo esta última mais específica da ND, dado que o espessamento medial aferente pode também estar associado à HTA).^[33]

Seguidamente, as anormalidades progridem com o avançar da doença, sendo que as lesões morfológicas existem antes dos sinais clínicos. De seguida, durante uma fase incipiente da doença, há expansão mesangial com esclerose difusa, formação de nódulos de Kimmelstiel-Wilson e oclusão capilar glomerular, perdendo-se área de superfície para filtração, levando ao declínio funcional. Esta fase caracteriza-se pela microalbuminúria, resultando esta de dano endotelial, bem como de perda de podócitos.^[26] De facto, tem-se vindo a verificar a separação dos podócitos da MBG em biópsias renais de diabéticos de tipo 2.^[34]

A nefropatia franca, caracterizada por proteinúria persistente e redução da TFG, associa-se às lesões renais típicas da diabetes.^[26]

A classificação de biópsias pode ser feita da seguinte forma:

- Classe I → espessamento da MBG: espessamento isolado e alterações apenas ligeiras e não específicas, que não cumprem critérios das restantes classes;
- Classe II → expansão mesangial, ligeira (IIa) ou severa (IIb), sem lesões nodulares ou glomerulosclerose global em mais de 50% dos glomérulos;
- Classe III → esclerose nodular (nódulos de Kimmelstiel-Wilson): pelo menos um glomérulo com crescimento nodular da matriz mesangial, sem as alterações descritas para a classe IV;
- Classe IV → glomerulosclerose diabética avançada: mais de 50% de glomerulosclerose global com outros sinais clínicos ou patológicos de ND.^[35]

A fibrose renal, quer glomerular quer tubulointersticial, resulta do excesso de deposição de tecido conjuntivo e constitui um sinal de doença avançada.^[4]

Das três principais lesões glomerulares que podem ser encontradas na diabetes (espessamento da MBG, expansão mesangial e hialinose arteriolar)^[36], a expansão mesangial é a que mais se relaciona com a progressão da doença renal. No entanto, existem outras alterações que contribuem para esta: destacamento podocitário da MBG e perda subsequente de podócitos, anormalidades juncionais glomerulotubulares, número baixo de glomérulos, hipertrofia glomerular, atrofia tubular e fibrose intersticial.^[36]

Por um lado, a perda podocitária está mais relacionada com a progressão da albuminúria, na DM tipo 2, e, por outro lado, a fibrose intersticial relaciona-se mais com a diminuição da TFG.^[37]

Mecanismos de lesão

São múltiplas as vias de lesão renal na DM já documentadas. O principal estímulo indutor de lesão comum a todas elas é a hiperglicemia, como já apontado.

Contributores para a albuminúria são a resistência à insulina, a síndrome metabólica, dislipidemia, disfunção endotelial e inflamação crônica subclínica.^[21, 38] Também são importantes fatores promotores de lesão o tabagismo^[39] e dieta rica em gorduras.^[40]

A tabela I resume alguns dos eixos de lesão envolvidos na ND, traduzindo a complexidade da patologia, sendo que todos potenciam efeitos hemodinâmicos, pró-inflamatórios e pró-fibróticos no rim diabético.^[9, 41, 42]

A atividade inicialmente aumentada da angiotensina II (AGT II) leva à hiperfiltração e hipertensão glomerulares que decorrem nos estádios precoces da doença, com stress da parede e estiramento mecânico^[9, 42], e desencadeia também hipertrofia mesangial e tubular epitelial subsequentes.^[13, 43]

A podocitopatia tem vindo a destacar-se na patogénese da proteinúria diabética, de acordo com diversos estudos recentes.^[36, 44-46] Destaca-se a redução do número podocitário, por apoptose, e alteração da sua citoarquitectura^[17], resultando no seu destacamento da MBG. Para além disso, os podócitos são influenciados e influenciam de forma complexa os endoteliócitos e a ação dos produtos avançados da glicação (AGEs), como será ainda discriminado.

Seguidamente, discutem-se dois eixos fisiopatológicos que têm revelado importância em estudos clínicos: a disfunção endotelial e os AGEs.

Disfunção endotelial

As células endoteliais são heterogéneas estrutural e funcionalmente, sendo as suas principais funções renais a entrega de oxigénio e/ou nutrientes e a filtração.^[4] A figura 1 esquematiza e descreve os mecanismos de disfunção endotelial inerentes à ND. A disfunção endotelial constitui uma grande característica da ND, podendo surgir devido à hiperglicemia, HTA, dislipidemia, obesidade, inflamação, resistência à insulina^[31] e alterações hemodinâmicas envolvendo o eixo R-A-A.^[4]

O *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A) permite interação entre podócitos e endoteliócitos e é protetor dos microvasos glomerulares na diabetes.^[47] A sua sobre-expressão glomerular inicial na doença^[4] aumenta a permeabilidade do glomérulo e leva à incapacidade de reparo capilar eficaz com a progressão da doença.^[48] A angiopoietina-1 (Ang-1) ajuda a manter a integridade da barreira de filtração glomerular^[49],

enquanto que a suprarregulação da angiopoietina-2 (Ang-2) estimula a permeabilidade vascular na ND.^[50] O desequilíbrio entre Ang-1/2 pode produzir uma comunicação disfuncional entre podócitos e endoteliócitos glomerulares, na DM.^[4]

Os capilares peritubulares do espaço tubulointersticial renal contêm pericitos na membrana basal da parede vascular. A perda de pericitos é precoce e seguida de aumento da permeabilidade vascular.^[4] A relevância disto prende-se com o facto destas células serem precursores major de miofibroblastos renais.^[4] No glomérulo, as células mesangiais são consideradas pericitos especializados que, ao interagir com os endoteliócitos através de fatores de crescimento, regulam alterações da estrutura vascular.^[4] O fator chave para o recrutamento e proliferação periciticos é o *PDGF receptor-β* (PDGFRβ).^[4] A perda do fator ou do seu recetor gera deformidades nas células mesangiais, ocasionando glomerulosclerose.^[51]

AGEs

A severidade da nefropatia relaciona-se com a extensão da formação de AGEs e a expressão dos seus recetores (RAGEs) glomerulares e tubulointersticiais.^[14] Os AGEs são formados pela reação de glicação, ou glicosilação não-enzimática, entre produtos da glicoxidação e lipoxidação, processos aumentados na diabetes, e grupos amina livres de proteínas ou lípidos, numa reação não catalizada por enzimas. As moléculas susceptíveis à glicação são o colagénio, histonas^[13] e várias proteínas plasmáticas (hemoglobina, LDL^[54], imunoglobulinas^[52], albumina, proteína C3 do complemento, fibrinogénio, transferrina, haptoglobina e anti-tripsina^[13]).

Os RAGEs do tipo 1 e 3 promovem a endocitose e degradação dos mesmos. Por outro lado, os RAGEs do tipo 2 desencadeiam ativação celular e processos pró-oxidantes, pró-inflamatórios e pró-coagulantes.^[53] No rim, os RAGEs localizam-se nas células tubulares epiteliais, podócitos e células mesangiais, sendo suprarregulados quando há stress e inflamação, como na ND.^[13]

Há uma relação inversa entre os níveis séricos de AGEs e a função renal, pois estes podem sofrer reabsorção tubular renal ou catabolismo no túbulo proximal seguido de excreção urinária, o que não acontece na presença de doença renal.^[13]

Nas figuras 2 e 3 esquematizam-se os efeitos e interações que os AGEs desencadeiam a nível geral e renal, respetivamente.

Intervenção e *outcomes*

Os fármacos mais utilizados atualmente para a ND são os frenadores do eixo R-A-A (inibidores da enzima de conversão da angiotensina - IECAs, antagonistas dos recetores da angiotensina II – ARA II ou inibidores dos mineralocorticóides), que mostram ser eficazes quando existe já albuminúria, com ou sem redução da TFG. Contudo, apesar das reduções significativas da proteinúria, a incidência da doença continua a ser preocupante e a progressão renal continua a ocorrer, razão pela qual se torna imperativo rever a abordagem a adotar face a esta patologia, que se pensava já ser totalmente compreendida.^[18]

Nefropatia diabética não-albuminúrica

Expressão e relevância clínicas

Até há poucos anos, a proteinúria constituía o principal critério de diagnóstico para a ND.^[34] Atualmente, sabe-se que fenótipo não-albuminúrico é bastante prevalente em doentes diabéticos^[26, 54-56], tanto de tipo 1^[57, 58] como de tipo 2^[19, 25, 54, 55, 59-61], sendo maior neste segundo grupo de doentes.^[62] Estudos recentes documentam-no, tal como apresentado na tabela II, implicando a necessidade de investigação adicional para uma intervenção eficaz além do eixo antiproteinúrico.

Os dados sugerem que, na DM tipo 2, é frequente a apresentação clínica de normo ou microalbuminúria já com função renal comprometida.^[63] Na verdade, tanto estudos de coorte^[54, 59], como estudos de rastreio populacional^[55, 60, 61, 64] reportaram estes achados.

Poderia propor-se que este grupo de doentes normoalbuminúricos fosse artificial, devido ao sobrediagnóstico de DRC obtido com a subestimação da TFG através do uso da equação *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD). Contudo, efetuaram-se estudos com determinação isotópica da mesma, que contradizem esta hipótese, dado que a diferença encontrada nessa subestimação não foi significativa.^[59]

Interessantemente, alguns estudos confirmaram que os doentes normoalbuminúricos, com TFG reduzida, exibem características clínicas diferentes dos albuminúricos, principalmente para os diabéticos de tipo 2.^[65-67] A tabela III discrimina algumas das correlações já descritas em estudos recentes.

O sexo feminino tem sido considerado protetor contra a DRC em geral mas, na DM tipo 2, esta proteção parece desaparecer, nomeadamente se se tratar de um fenótipo não-albuminúrico.^[68] O sexo feminino é um fator de risco para doença renal (TFG \leq 60 mL/min), enquanto o sexo masculino se associa ao desenvolvimento de albuminúria. O sexo masculino foi até proposto ser um fator protetor contra o desenvolvimento de TFG reduzida em doentes diabéticos.^[21, 55]

Uma possível explicação para esta diferença entre os sexos é que os estrogénios se associam à aceleração e potenciação da lesão renal – a glomerulosclerose segmentar e focal e a expansão mesangial.^[21]

Os homens apresentam acumulação de gordura segundo um padrão de adiposidade central (andróide), ao qual se associam concentrações elevadas de ácidos gordos livres, proteína C reativa e citocinas pró-inflamatórias (como o fator de necrose tumoral e interleucina-6) que induzem insulinoresistência e doença cardiovascular. Nas mulheres, existe uma adiposidade mais periférica (glútea).^[21] Contudo, após a menopausa, a deposição de gordura nas mulheres altera-se para um fenótipo central, potenciando

riscos cardiovasculares. A dislipidemia associada à diabetes (hipertrigliceridemia e baixo colesterol-HDL) são, também, mais graves nas mulheres do que nos homens diabéticos.^[21]

Efetivamente, dois estudos reportaram que as mulheres peri ou pós-menopausadas com síndrome metabólica têm risco maior de DRC.^[21] Uma explicação poderá ser pelo facto de níveis elevados de triglicéridos (marcadores de insulinoresistência) preverem a prevalência de disfunção renal.^[66] Isto poderá relacionar-se com o maior risco cardiovascular observado em mulheres diabéticas comparativamente com homens diabéticos.^[69]

Os fatores da síndrome metabólica podem, então, desempenhar um papel no fenótipo não-albuminúrico. De facto, vários constituintes da síndrome (como a insulinoresistência e a obesidade) foram associados ao declínio da TFG na ausência de proteinúria.^[66] Sendo que estes fatores se expressam de forma diferente em homens e em mulheres, a diferença da doença renal entre os sexos poderá ser explicada nesta base.^[21]

O aumento da pressão arterial sistólica, da pressão de pulso e das concentrações de hemoglobina glicada (HbA1c) predizem, também, a incidência da DRC em doentes com normoalbuminúria.^[55, 66, 70]

Por um lado, a TFG diminuída é um fator de risco cardiovascular em todos os diabéticos de tipo 2, independentemente da albuminúria^[59, 62, 71-73], pelo que a própria nefropatia não-albuminúrica contribui para a morbidade e mortalidade cardiovasculares, nomeadamente em mulheres.^[21] Por outro lado, na faixa microalbuminúrica da ND, a albuminúria poderá servir de marcador de risco cardiovascular, mas o mesmo não acontece na previsão do risco renal.^[21, 67]

Desta forma, tanto a albuminúria elevada como a TFG baixa são fatores de risco independentes para eventos cardiovasculares em diabéticos de tipo 2.^[73]

Novas trajetórias e revisão de paradigmas

Na DM tipo 2, a progressão das variáveis envolvidas na patologia renal (albuminúria e TFG) é mais difícil de definir do que na DM tipo 1, devido à incerteza acerca do tempo de diagnóstico da doença e à influência do envelhecimento fisiológico sobre a TFG, a partir dos 40 anos de idade.^[74]

Na DM tipo 2, há fatores adicionais a considerar, que afetam a história natural da doença e que se podem associar a um declínio da TFG mais acentuado, aliado com um risco cardiovascular acrescido, sem envolvimento de albuminúria propriamente dita. Alguns

destes são a doença renovascular sobreposta, a nefrosclerose senil, êmbolos de colesterol, outras doenças renais simultâneas, episódios de lesão renal aguda e uso de fármacos frenadores do eixo R-A-A.^[68]

Fatores como a história familiar, tabagismo, valores absolutos da albuminúria, medições precisas da TFG, medições da pressão arterial em ambulatório, retinopatia e perfil lipídico foram apontados como sinalizadores, na prática clínica, de doentes com maior risco de queda progressiva da TFG.^[75]

Apesar do uso de fármacos controladores da glicemia, pressão arterial e perfil lipídico, praticamente metade dos diabéticos progridem para complicações tanto renais como cardiovasculares, pelo que o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas é essencial para estes doentes.^[1] Estudos sugerem percentagens de 20% nos diabéticos de tipo 2 normoalbuminúricos, de progressão para o estadio 3 da DRC, apesar do tratamento farmacológico.^[74]

Adicionalmente, são comuns^[62, 76-78] as regressões/remissões espontâneas da microalbuminúria em diabéticos (estudos recentes evidenciam percentagens de mais de 50%^[19, 74]), pelo que a presença desta não pode mais ser considerada incontornável e irreversível.^[71] Aliás, estudos recentes demonstram que diabéticos de tipo 1 ou 2 apresentam taxas de remissão da microalbuminúria de 21-64%^[76-83], comparativamente com estudos mais antigos, em que 60-80% dos doentes com microalbuminúria progrediam para macroalbuminúria.^[74] A tabela IV apresenta os resultados dos principais estudos realizados documentando a história natural e tendência evolutiva da ND, principalmente relativos ao fenótipo normoalbuminúrico. O uso de fármacos modificadores do eixo R-A-A levou a taxas de regressão a normoalbuminúria de 40%,^[84] demonstrando a possibilidade de reversão da microalbuminúria e, parcialmente, da proteinúria franca, com controlo rigoroso recorrendo a estes fármacos.^[85]

Quando existe nefropatia não-albuminúrica em doentes diabéticos, esta normalmente é atribuída a outras causas, como a aterosclerose e a HTA. Porém, durante as últimas décadas, várias fontes sugerem que muitos diabéticos de ambos os tipos (cerca de 50% se se considerarem diabéticos de tipo 2^[21]) apresentam declínio patológicos da sua função renal, medida pela TFG, enquanto normo ou microalbuminúricos^[21, 54, 55, 60-62, 68, 86-88], provando-se que os tratamentos atuais poderão atuar apenas tardiamente no curso desta patologia ou não atuar de todo.^[89, 90]

Uma análise recente do estudo DCCT/EDIC mostrou que 24% dos diabéticos de tipo 1 atinge o limiar de $<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$, enquanto normoalbuminúricos.^[74] Este declínio é denominado de progressão renal precoce (novo fenótipo), uma vez que se inicia antes do início da microalbuminúria e o seu carácter progressivo traduz uma evolução até ao

estadio V de DRC.^[62, 84, 89, 91-93] Este novo fenótipo pode ser identificado através de medições seriadas da cistatina C sérica^[87], que demonstrou ser mais eficaz na deteção de declínio da TFG em doentes não-albuminúricos.^[94]

Como tal, nos últimos anos, pelo menos dois paradigmas acerca dos passos evolutivos da ND têm sido postos em causa: a microalbuminúria invariavelmente progride para macroalbuminúria e apenas a macroalbuminúria pode dar início à redução da TFG.^[62]

Esta hipótese de que as duas variáveis envolvidas na doença (aumento da taxa de excreção urinária da albumina e queda da TFG) são independentes^[91] e complementares, e não obrigatoriamente manifestadas sequencialmente^[55, 57, 61, 74, 95], é suportada pelo facto de poder haver frequentemente um declínio da TFG antes do desenvolvimento de macroalbuminúria.^[64, 84]

Precocemente na doença, estas variáveis seguem um rumo independente^[62] constituindo duas vias diferentes de lesão, contudo, ao longo do avanço dos estadios da nefropatia, tornam-se mais acopladas, podendo convergir ou não no mesmo doente.^[21, 71, 96] Um fator a favor de estas serem duas vias de lesão interligadas é a remissão da microalbuminúria, que levanta a hipótese de que os doentes renais não-albuminúricos terem sido microalbuminúricos em algum ponto da história natural da sua nefropatia e se terem tornado normoalbuminúricos devido ao tratamento com frenadores do eixo R-A-A.^[62] O tratamento atual é mais eficaz na albuminúria do que na perda da TFG, o que pode favorecer o predomínio do fenótipo não-albuminúrico, o qual também resulta em queda contínua da TFG apesar da albuminúria estar suprimida, implicando que os fenótipos serão duas variantes da mesma via.^[62]

Já desde os anos 90 que se considera que a albuminúria é, não só um marcador de severidade da doença renal, mas também, por si só, causadora de lesão renal.^[19] Assim, a interpretação dos níveis de albuminúria deve ser tida em conta, desde que não isoladamente, aquando da estratificação individual do risco de progressão renal em doentes diabéticos. Isto devido ao facto deste marcador não apresentar, por si só, sensibilidade ou especificidade suficientes para significativamente prever prognósticos em todos os doentes.^[62, 71, 74, 84] Para além disso, tem uma variabilidade intra-individual significativa aliada à possibilidade de regressão^[19]. Contrariamente, a TFG tem baixa variabilidade intra-individual e raramente reverte para valores precedentes.^[19]

Assim, a nova classificação de DRC da *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), bem como as novas guidelines de rastreio da ND da *American Diabetes Association* (ADA), baseiam-se não só no cálculo da TFG mas também na medição da albuminúria.^[19, 62] A ausência de proteinúria não pode, portanto, ser considerada pelos clínicos como um sinal da ausência de nefropatia em diabéticos.

Todavia, continua a verificar-se ser mais comum um declínio para doença renal terminal quando há estabelecimento de macroalbuminúria.^[18, 62, 95] *Porrini et al.* destacou que, em diabéticos normoalbuminúricos, a progressão renal é 2-5 vezes mais rápida do que na população saudável, mas menos rápida do que em diabéticos albuminúricos.^[21]

A taxa de declínio da TFG é maior em doentes microalbuminúricos, quando comparada com doentes normoalbuminúricos, cuja perda de função renal independe das alterações albuminúricas.^[84, 89] Assim, no geral, a progressão renal de doentes normoalbuminúricos é considerada mais benigna do que a de doentes francamente proteinúricos.^[59, 71, 97] No entanto, mesmo os diabéticos normoalbuminúricos podem desenvolver uma progressão silenciosa para insuficiência renal.^[91] Adicionalmente, para aumentar a complexidade da patologia, mesmo entre os proteinúricos, há uns que desenvolvem progressão renal, e outros não.^[84, 89]

Um estudo realizado em ratinhos Cohen, tendo sido um marco importante no estabelecimento deste novo fenótipo de doença, postulou que o aparecimento de proteinúria seria independente da dieta ou da diabetes e avançou a hipótese de a ausência de proteinúria ser geneticamente determinada.^[91]

Correlação clinico-histológica

Em geral, a progressão de uma DRC, independentemente da etiologia, correlaciona-se mais com lesões tubulointersticiais crónicas (atrofia tubular e fibrose intersticial) do que glomerulares.^[11] Nos diabéticos de tipo 1 não-albuminúricos, verificou-se que a lesão dos túbulos proximais constitui um fator de risco independente para a progressão renal precoce.^[98] *Mauer et al.*, após comparação de biópsias renais de diabéticos de tipo 1 normoalbuminúricos, antes e após a terapêutica com enalapril, losartan e placebo, concluiu que a queda da TFG e o grau de expansão mesangial foram comparáveis em todos os grupos, pelo que a albuminúria parece estar dissociada destas alterações.^[99] Vários fatores podem estar implicados no dano tubular e vascular na DM tipo 2.^[21]

Como a proteinúria em diabéticos pode ser um marcador de lesão tubulointersticial precoce (devido a disfunção da reabsorção tubular), o dano tubular e lesões oxidativas podem ocorrer antes de qualquer dano da barreira glomerular, podendo ser assim desencadeantes da ND.^[11] Deste modo, num doente diabético, a inflamação renal é um fator crítico para determinar a progressão de uma lesão renal.^[37] De facto, os alvos iniciais deste tipo de lesões podem ser os capilares pós-glomerulares e a microcirculação

peritubular.^[11] A constatação de que a enzima tubular N-acetil-β-glucosaminidase (NAG) é excretada na urina numa taxa superior ao normal, na DM de ambos os tipos,^[100] é um dos exemplos que corrobora a hipótese de o tubulointerstício ter um papel central no desenvolvimento da ND.^[11]

As lesões histológicas clássicas da ND estão presentes em doentes normoalbuminúricos.^[26, 34] Algumas já descritas em biópsias incluem espessamento da parede capilar e hialinose arteriolar em todos os diabéticos não-albuminúricos, 20% destes com expansão mesangial difusa grave (classe IIb) mas sem nódulos e 80% com nódulos de Kimmelstiel-Wilson.^[34]

Há uma grande heterogeneidade na estrutura renal de diabéticos de tipo 2^[21], nos quais apenas 30% dos microalbuminúricos têm glomerulopatia diabética típica, 40% têm lesões tubulo-intersticiais e/ou vasculares mais avançadas (ou apresenta mudanças glomerulares desproporcionalmente mínimas) e 30% têm estrutura renal normal.^[11, 26] Efetivamente, a estrutura glomerular normal está presente num número considerável de diabéticos de tipo 2, micro ou macroalbuminúricos.^[26, 35]

Em diabéticos de tipo 1, o declínio da TFG não foi associado a lesões glomerulares típicas nas biópsias^[99]. Contudo, *Caramori et al.* verificou que, em doentes diabéticos de tipo 1 normoalbuminúricos, as lesões típicas da ND se associaram, numa percentagem superior, a uma TFG mais reduzida (<90mL/min/1,73m²), comparativamente com uma TFG normal.^[88]

No estudo dos ratinhos Cohen, as biópsias renais apresentavam achados histopatológicos típicos da glomerulosclerose diabética, mas sem proteinúria.^[91]

Na DM tipo 1, as alterações estruturais mais relevantes envolvem o glomérulo, enquanto que, na DM tipo 2, estas desenvolvem-se mais vincadamente a nível tubulointersticial e vascular, apesar da semelhante função renal.^[26]

Com as mais recentes observações, Fioretto propôs uma nova classificação das lesões renais na ND, a qual inclui três categorias:

- I. Estrutura normal ou quase-normal (41%) – biópsias normais ou com expansão mesangial e/ou mudanças tubulointersticiais ou vasculares (hialinose arteriolar) ligeiras;
- II. Nefropatologia diabética típica (26%) – biópsias com lesões diabéticas típicas estabelecidas, com um equilíbrio aproximado entre alterações glomerulares (sendo estas algo mais predominantes), tubulointersticiais e arteriulares;

- III. Padrões atípicos de lesão renal (33%) – alterações glomerulares diabéticas ligeiras, apesar de alterações estruturais renais desproporcionalmente severas, em todas as combinações possíveis:
- a. Atrofia tubular, espessamento da membrana basal tubular e reduplicação e fibrose intersticial (lesões tubulo-intersticiais)
 - b. Hialinose arteriolar glomerular avançada, frequentemente associada com aterosclerose de grandes vasos
 - c. Esclerose glomerular global^[71, 101]

Foi colocada a hipótese de que a presença de glomerulopatia diabética avançada, na ausência de proteinúria, poderá dever-se à reabsorção de proteínas pelos túbulos, no caso de existir boa preservação tubulointersticial. Como tal, túbulos bem preservados podem prevenir o aparecimento de proteínas na urina.^[34]

Assim, é possível concluir que, por um lado, a normoalbuminúria não implica lesões estruturais clássicas da ND significativas e, por outro lado, a microalbuminúria não prediz também a presença dessas mesmas alterações.^[71, 88, 102]

Possíveis mecanismos de lesão

O fenótipo não-albuminúrico provavelmente advirá, então, de uma via diferente com mecanismos distintos de lesão renal, de prognóstico e de terapêutica comparativamente ao fenótipo albuminúrico.^[62]

Fatores que poderão levar a uma progressão renal em diabéticos, sem envolvimento de albuminúria, incluem fatores inflamatórios elevados, suprarregulação de *tumor necrosis factor receptor* (TNFR) 1 e 2, controlo glicémico precário, pressão arterial elevada e níveis séricos elevados de ácido úrico.^[61, 78, 89, 93, 103-106]

São descritos de seguida alguns mecanismos lesionais que poderão estar envolvidos na ND não-albuminúrica.

Inflamação

A diabetes é reconhecida como um estado inflamatório em si.^[41] A nível renal, as células inflamatórias estão presentes quer no glomérulo quer no interstício em todas as classes patológicas.^[107, 108]

Estudos têm mostrado que a acumulação de macrófagos no interstício (não no glomérulo) se correlaciona com a perda de função renal.^[18, 37, 71] Estabeleceu-se ainda uma correlação independente entre a redução da TFG e a presença de marcadores

inflamatórios (tais como o TNFR 1 e 2) e elevação dos níveis de ácido úrico^[89], níveis circulantes de *soluble tumour necrosis factor receptor-2* (sTNFR-2)^[103, 109] e níveis urinários de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1).^[110]

Dano mitocondrial

Admite-se que o estímulo central seja a hiperglicemia, provocando stress do retículo endoplasmático (RE) e mitocondrial, com formação de ROS e ativação anormal das vias de sinalização intracelulares, tal como ilustrado na figura 4. Esta disfunção celular é ainda mais acentuada pela HTA, hiperuricemia e hiperlipidemia coexistentes.^[37]

A formação de ROS pelas mitocôndrias tem vindo a ser cada vez mais reconhecido como fator fulcral na génese da ND. Houve, também, documentação de mudanças morfológicas mitocondriais dos túbulos proximais em modelos humanos e animais de ND precoce.^[1] Estabelece-se o stress oxidativo quando a formação de ROS ultrapassa as defesas antioxidantes, que devem estar intactas para a prevenção da lesão renal.^[111, 112] Quando isto acontece, há dano e morte celulares, particularmente nas células tubulares proximais e distais.^[1] Porém, o aumento do stress oxidativo ocorre nos três compartimentos renais: glomérulos, tubulointerstício e vasos^[113], tendo sido implicado também na expansão mesangial^[114, 115] e na fibrose tubulointersticial.^[113]

A senescência celular induzida pelo stress oxidativo foi já identificada como contribuinte para a ND em modelos animais e em doentes diabéticos de tipo 2.^[116-118]

Alterações tubulointersticiais

O grau de dano tubulointersticial é preditivo de declínio renal, sendo que a célula tubular renal pode ser afetada por diferentes mecanismos de stress celular (stress oxidativo, inflamação, hipoxia^[119]), bem como vários outros processos metabólicos dependentes da glicose, também observados na ND albuminúrica (AGEs, produção de polióis, ativação da proteína cinase C e AGTII, entre outros).^[11]

Há, portanto, a hipótese de que a normoalbuminúria nos doentes diabéticos com DRC se deva a glomérulos atubulares e fibrose intersticial, em detrimento da glomerulosclerose clássica.^[61] O desenvolvimento da hiperfiltração glomerular precoce, traduzindo uma dificuldade adaptativa do túbulo proximal, aumenta a sobrecarga nas restantes células tubulares, levando potencialmente a uma hipoxia tubular funcional,^[11] descrita na figura 5.

Distúrbios macrovasculares

O fenótipo não-albuminúrico pode estar relacionado com predomínio da macroangiopatia sobre a microangiopatia clássica^[11, 19, 21, 26, 62], principalmente na DM tipo 2.^[26] A doença vascular isquêmica^[120] e microêmbolos de colesterol podem exercer um papel essencial.^[19, 61, 63, 68, 71]

Um fator que apoia esta hipótese é a reduzida prevalência de retinopatia em diabéticos de tipo 2 normoalbuminúricos com TFG diminuída, o que pode excluir a microangiopatia como causa da progressão renal.^[21]

Imunidade

A resposta imune na ND é diferente da de outras patologias renais, havendo vários componentes da imunidade inata e adquirida envolvidos, tais como macrófagos, neutrófilos, mastócitos, linfócitos B e T, *danger-associated molecular patterns* (DAMPs), inflamassomas, imunoglobulinas, componentes do complemento, quimiocinas, citocinas e *cell adhesion molecules* (CAMs).^[37]

Apoptose

A apoptose pode ser potenciada por ROS e tem um papel relevante para a senescência e morte celulares no rim diabético, principalmente através da proteína anti-apoptótica Bcl-2.^[1]

Autofagia

A autofagia renal é ativada sob condições stress oxidativo e hipoxia das células tubulares proximais, inflamação e stress do RE. A diabetes pode danificar a normal ativação da autofagia, através de alterações nas vias sinalizadoras, tais como *mammalian target of rapamycin complex1* (mTORC1), *AMPactivated kinase* (AMPK) e sirtuina 1 (Sirt1), tornando as células renais vulneráveis a danos metabólicos.^[85]

Lesão renal aguda (LRA)

O fenótipo não-albuminúrico pode resultar de episódios repetidos ou não resolvidos de LRA, mesmo que ligeira.^[62, 120] Os diabéticos estão mais suscetíveis a estes episódios, sendo que o potencial regenerativo dos progenitores tubulares renais, após uma LRA, pode ser limitado nestes doentes, no sentido em que a hipertrofia predomina sobre a proliferação celular. Assim, poderá até haver recuperação da função renal mas com desenvolvimento de fibrose glomerular e tubulointersticial progressivas.^[62]

Genética

Este fenótipo pode ainda representar uma forma geneticamente diferente de doença.^[63]

Finalmente, não se pode excluir que a não-albuminúria seja efetivamente um artefacto, dado que foi proposto que a ausência de proteinúria, na presença de glomerulopatia avançada, se devesse à reabsorção de proteínas por túbulos relativamente preservados.^[34]

Adicionalmente, não se pode também excluir que a albuminúria se encontre apenas mascarada por diferentes variáveis, nomeadamente fármacos frenadores do eixo R-A-A, até porque a remissão da microalbuminúria e alteração da história natural da ND tem sido associada ao uso generalizado destes fármacos.^[19, 26, 62, 63, 68] Também o aumento da idade e dos fatores de risco cardiovasculares, previamente descritos^[26, 74, 88, 106], tal como a melhoria do controlo glicémico, tensional e lipídico nos doentes diabéticos pode ter um papel no enviesamento da deteção da albuminúria nestes doentes.^[26]

Vias de investigação futura

Marcadores

Como a glomerulosclerose diabética pode ocorrer na ausência de microalbuminúria e desenvolver-se antes de a proteinúria ser detetável, a albuminúria não é um bom marcador precoce de envolvimento renal quando se pretende diagnosticar a ND em progressão^[34], podendo mesmo atrasar o diagnóstico de uma proporção significativa dos doentes.^[19] São necessários melhores marcadores de lesão renal que possam ser utilizados na monitorização da função renal destes doentes^[18, 34], para prever precocemente o declínio da TFG, sem necessário envolvimento da albuminúria. Na tabela V, discriminam-se os marcadores mais recentemente investigados e promissores para a prática clínica, bem como os seus benefícios e algumas das suas limitações até agora delineadas.

Tratamentos

As terapêuticas atuais conseguem apenas atuar nos sintomas e atrasar a progressão da DRC para o estadió terminal, mas não a previnem nem a revertem.^[1]

Ainda é preciso esclarecer se o declínio de TFG é passível de ser revertido com o tratamento correto, tal como acontece na proteinúria com o uso de fármacos frenadores do eixo R-A-A. Estes agentes, ao restringirem o aumento da resistência arteriolar eferente, podem, contudo, aumentar a susceptibilidade a isquemia renal induzida por outros fatores (tais como: aterosclerose, anti-inflamatórios não esteróides, sépsis, hipercalcémia, síndrome hepatorenal, imunossupressores e agentes de contraste).^[62] Em ambos os tipos de diabetes, a diminuição inicial da albuminúria com este tratamento não prediz o declínio subsequente da TFG na nefropatia precoce, mas fá-lo na doença mais avançada.^[121]

O stress oxidativo e a disfunção celular mediada por ROS são fatores patogénicos relevantes nesta progressão e, por isso, representam um importante alvo terapêutico.^[1]

Para abordagem da hipoxia, na prática atual, recorre-se frequentemente, numa fase precoce da ND, à 1,25-dihidroxitamina D3 e à eritropoietina (EPO).^[11] Os ativadores dos recetores da vitamina D (VDR), como o calcitriol, tem efeitos antiproteinúricos e anti-inflamatórios. Como a deficiência de vitamina D se associa à inflamação, disfunção imune e vascular e doença cardiovascular, há benefício na sua suplementação.^[120] A EPO administrada precocemente atrasa a progressão renal, reduz a mortalidade e a

necessidade de substituição renal, devido às suas propriedades inibidoras da apoptose, antioxidantes, anti-inflamatórias e protetoras vasculares e tecidulares (nomeadamente renais).^[11]

A vitamina B6 e a pentoxifilina são opções terapêuticas que também já se encontram disponíveis e podem ser adicionadas a estratégias terapêuticas atuais.^[18] A dieta^[13] e restrição calórica^[85] também desempenham um papel importante na integração da abordagem a todos os doentes diabéticos.

Terapias a considerar serem adicionadas aos bloqueadores do R-A-A^[120, 122], e que exigem mais investigação futura, incluem: antagonistas dos recetores da endotelina^[123], inibidores de AGE/RAGE^[13], glicosaminoglicanos, antioxidantes^[1], vitamina B1, anti-inflamatórios^[123], inibidores da proteína cinase C, inibidores da xantina oxidase, inibidores do JAK1 e JAK2, antagonistas do recetor da dopamina, antagonistas da serotonina, inibidores dos fatores de crescimento epidérmicos, inibidores das HATs e HDACs^[9], agentes influenciadores do mTORC1, AMPK e Sirt1^[85].

Os candidatos atualmente mais promissores são os agentes que atuam sobre o VEGF e o *hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1)^[11], os antagonistas dos recetores de endotelina, inibidores do *sodium-glucose co-transporter 2* (SGLT-2), incretinas e anti-inflamatórios/anti-fibróticos.^[124, 125]

A investigação progride, mas ainda não se traduziu na prática clínica, sendo que a categorização dos diferentes fenótipos pode ajudar a desenhar os estudos com vista a definir qual o benefício de intervenções dirigidas para fenótipos específicos.

Discussão e conclusões

Nos últimos anos têm vindo a surgir cada vez mais evidências que suportam a hipótese de um fenótipo não-albuminúrico para a ND, provando-se que o paradigma da história natural da doença, com albuminúria levando à redução da TFG, poderá não ser tão simples e linear como se pensava até então, principalmente na DM tipo 2, onde existem muitas outras variáveis e fenómenos patofisiológicos envolvidos com capacidade para modificar a progressão da doença.^[18, 62] Daí que a doença renal na DM tipo 2 apresente uma heterogeneidade considerável.^[120]

A descoberta recente da ligação entre a atividade aumentada de ROS e a disfunção mitocondrial, stress do RE, inflamação, senescência e morte celulares leva a um maior investimento no estudo da abordagem terapêutica antioxidante nestes doentes.^[1] Falta definir qual dos eventos discutidos anteriormente será o mais precoce, para que novas terapêuticas sejam melhor direcionadas e, se possível, mais individualizadas. Para tal, a utilização de biomarcadores mais sensíveis de lesão renal deve ser instituída paralelamente à análise diferenciada de vias moleculares distintas em fenótipos de doença distintos. A avaliação de polimorfismos genéticos poderá ser útil nesta etapa, na medida em que a sua determinação pode definir os indivíduos mais ou menos susceptíveis ao tratamento com certos fármacos. Um fator importante a ter em conta é a diferença de progressão renal entre cada doente, o que pode parcialmente ser explicado pelo tipo de diabetes que apresenta. Isto porque, apesar de a via final comum a ambos ser a fibrose renal, sabe-se que o terreno auto-imune do tipo 1 é distinto do fenótipo metabólico do tipo 2.^[18]

Adicionalmente, haverá um papel crucial desempenhado pelas vias genéticas em resposta a lesões renais agudas? E será isto afetado pela diabetes em si? Por um lado, a reativação de genes desenvolvimentais é crítica para a regeneração renal e estes genes são, eles próprios, alvo de controlo epigenético. Por outro lado, algumas intervenções epigenéticas podem acelerar a lesão tubular.^[126]

Uma das maiores dúvidas que restam esclarecer é se a nefropatia causadora de diminuição da TFG em doentes normoalbuminúricos é causada pela diabetes em si, ou por outras patologias distintas que afetem a função renal.^[91]

O presente trabalho consegue responder a algumas perguntas, sabendo-se agora que não existem até ao momento sinais confiáveis o suficiente para prever o início da ND não-albuminúrica; a história natural deste fenótipo não é inequivocamente semelhante à

do fenótipo albuminúrico clássico; as armas terapêuticas de que se dispõe atualmente não são eficazes na prevenção da progressão desta outra via de doença e continuar-se-á à espera de investigação futura neste campo.

Limitações

Um dos fatores atualmente limitantes da investigação mais aprofundada da ND é a ausência de indicação para biópsia renal na grande maioria dos doentes diabéticos^[34], exceto nos casos em que se suspeita de outro tipo de nefropatia concomitante ou como diagnóstico diferencial.^[26] Há, portanto, uma limitação a nível da correlação histológica-fenotípica. Adicionalmente, esta dificuldade torna-se mais ampla, não só pelo envolvimento de causas genéticas, ambientais, estruturais, imunes e metabólicas interligadas, mas também pelas comorbilidades e polimedicação associadas clinicamente.

Apesar da patofisiologia ser complexa, um princípio para lidar com estas limitações é reconhecer que a abordagem prévia está ultrapassada e novos caminhos se impõem para evitar a progressão inexorável da DRC em muitos doentes que não têm ainda uma intervenção dirigida.

Anexos

Tabela I - Eixos de lesão na ND albuminúrica

Eixos de lesão na ND albuminúrica
Ativação precoce do sistema R-A-A
Ativação das vias TGF- β -Smad-MAPK, JAK-STAT e proteína G. ^[127]
Suprarregulação da via do diacilglicerol/proteína cinase C (DAG/PKC) ^[4, 9] e via do polio ^[4, 9]
Ativação do <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (NF- κ B) ^[128] e <i>Transforming Growth Factor-β</i> (TGF- β) ^[4, 18]
Desregulação de fatores de crescimento vasculares: <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> (VEGF-A) e angiopoietina ^[129]
Produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) ^[9]
Aumento de stress do retículo endoplasmático (RE) ^[9]
Expressão aberrante de proteínas da matriz extracelular ^[9]
Desregulação da expressão das ciclina-cinases e seus inibidores ^[9, 128]
Libertação de citocinas pró-inflamatórias, tais como o <i>Tumor Necrosis Factor</i> (TNF) e Interleucina 1 (IL-1) ^[9]
Supreregulação da <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> (VCAM-1) ^[4]
Formação de produtos avançados da glicação (AGEs) ^[14]
Desregulação da acetilação ^[9] - histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HADCs)

*As HATs e os inibidores das HDACs serão renoprotetores em modelos animais e humanos diabéticos.^[9]

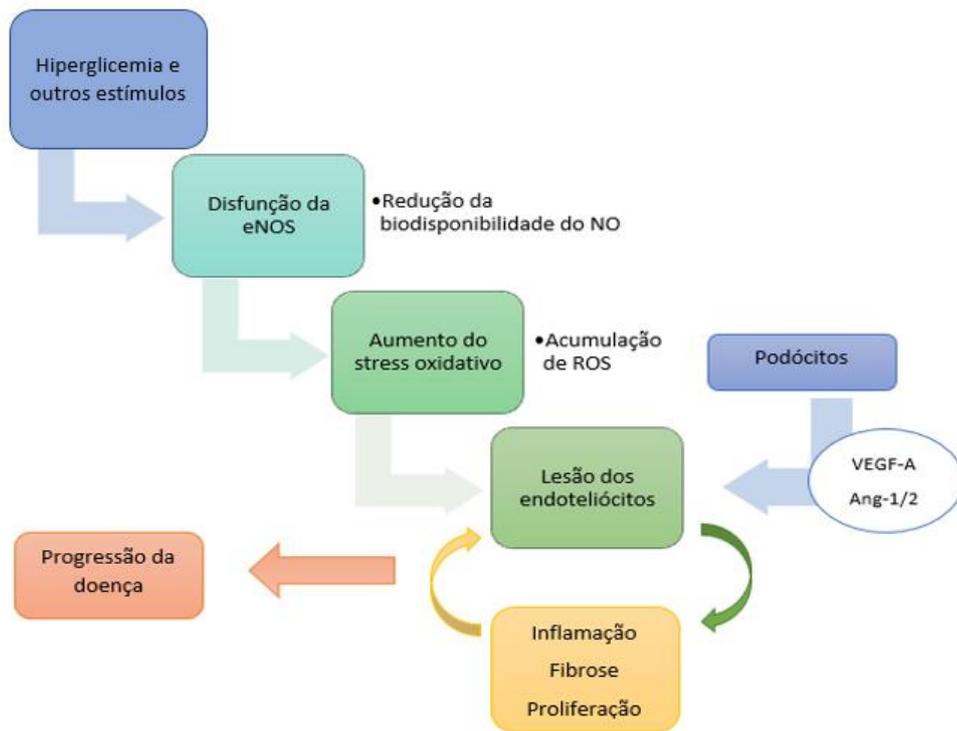


Figura 1- Vias de lesão endotelial na ND

A hiperglicemia compromete a sintetase endotelial do óxido nítrico (eNOS), pelo que a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) é reduzida, aumentando-se o stress oxidativo e promovendo-se a lesão endotelial.^[5-7] Os endoteliócitos lesionados têm a capacidade de traduzir sinais inflamatórios, hemodinâmicos e metabólicos, que irão alterar a função e a morfologia da parede do vaso, desencadeando respostas inflamatórias pró-fibróticas e proliferativas na ND progressiva.^[4] Os podócitos contribuem para a disfunção endotelial pois libertam fatores de crescimento angiogénicos, tais como o VEGF-A e a angiopoietina-1 (Ang-1)^[4], com recetores nos endoteliócitos.

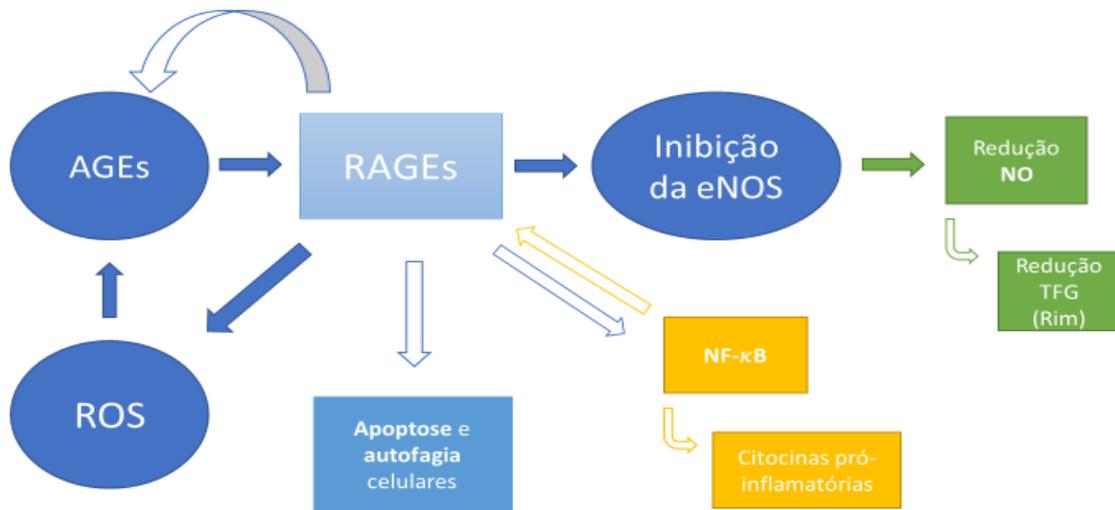


Figura 2 - Efeitos gerais dos AGEs e sua relação com ROS.

Quando os RAGEs são ativados pelos AGEs, há ativação do NF-κB, o que vai aumentar a expressão de mais RAGEs (a expressão de RAGEs é maior em tecidos que acumulam mais AGEs). Os AGEs levam à inibição da eNOS^[2-4], impedindo a produção de NO, estando implicados na diminuição da TFG.^[8, 9] Adicionalmente, haverá maior produção de AGEs, secreção de citocinas inflamatórias que recrutam células inflamatórias, disfunção celular por apoptose ou autofagia e geração de ROS, através da ativação da NADPH oxidase.^[13] Os ROS estimulam ainda a formação dos AGEs.^[14]

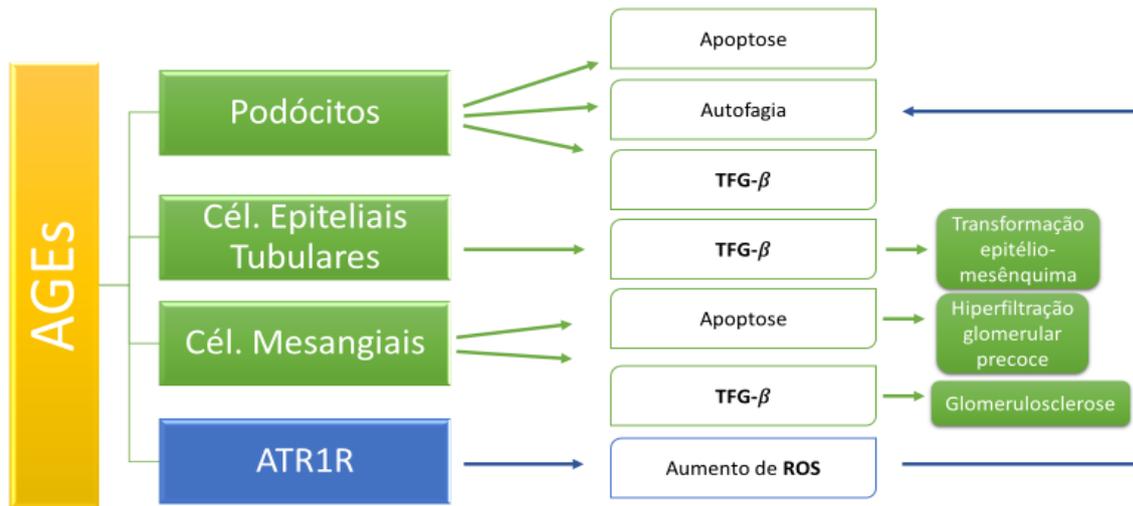


Figura 3 - Efeitos renais dos AGEs.

O acúmulo dos AGEs na matriz extracelular compromete as interações celulares e promove o aprisionamento de proteínas plasmáticas, lipoproteínas e imunoglobulinas, afetando a função renal e agravando a glomerulosclerose.^[12] Nos podócitos, células tubulares e mesangiais, há aumento da expressão de TGF- β , que induz a transformação epitélio-mesenquimatosa das células tubulares.^[13] No glomérulo, a apoptose das células mesangiais contribui para a hiperfiltração glomerular precocemente na doença, sendo que os AGEs estimulam também a expressão de receptores da angiotensina II do tipo 1 (AT1R), potenciando a atividade da AGT II. Esta induzirá a produção de ROS, contribuindo para a autofagia podocitária.^[15]

Tabela II - Principais estudos que evidenciam a prevalência da ND não-albuminúrica

Estudos	Amostra (nº e tipo de doentes)	Percentagens	Comentários
NEFRON 11 ^[56] (National Evaluation of the Frequency of Renal impairment cOexisting with NIDDM)	3893 DM2	23,1% com TFG < 60 mL/min/1,73m ² Destes: - 55% normoalbuminúricos persistentemente	- ND não-albuminúrica predomina no estadio 3 de DRC
Laranjinha et al. ^[19]	146 DM2 TFG < 75 mL/min/1,73m ²	46,6% não-albuminúricos 53,4% albuminúricos	
Kramer et al. ^[61]	171 DM2	13% : TFG < 60 60 mL/min/1.73 m ² Destes: - 30% normoalbuminúricos	
MacIsaac et al. ^[54]	109 DM2 TFG < 60 mL/min/1,73m ²	- 39% normoalbuminúricos - 35% microalbuminúricos - 26% macroalbuminúricos	Quando excluída possível associação com frenadores do eixo R-A-A: 23% normoalbuminúricos
UPKDS-74 ^[55] (United Kingdom Prospective Diabetes Study)	5102 DM2	- 79% normoalbuminúricos - 98,6% TFG normal	
DEMAND ^[130] (Developing Education on Microalbuminuria for Awareness of reNal and cardiovascular risk in Diabetes)	11375 DM2	TFG < 60 mL/min/1,73m ² : - 20,5% normoalbuminúricos - 30,7% microalbuminúricos - 35% macroalbuminúricos	Estadio 3-5 de DRC detetado em: - 17% normoalbuminúricos - 27% microalbuminúricos - 31% proteinúricos
RIACE ^[131] (Renal Insufficiency And Cardiovascular Events)	15773 DM2	37,5% com disfunção renal, dos quais: - 18,8% albuminúricos	
Rigalleau et al. ^[59]	89 DM TFG < 60 mL/min/1,73m ²	- 17% normoalbuminúricos - 40% microalbuminúricos - 43% macroalbuminúricos	
Kramer et al. ^[132]	660 DM2 Normoalbuminúricos	12,7% com TFG < 60 mL/min/1,73m ²	

Tabela III - Estudos demonstrativos de correlações entre fatores clínicos e o fenótipo normoalbuminúrico e/ou a progressão renal

Estudos	Associação com variáveis clínicas	
Laranjinha et al. ^[19]	Normoalbuminúria	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino - Idade avançada - TFG inferior
Maclsaac et al. ^[54]	Normoalbuminúria	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino - Idade avançada
Rigalleau et al. ^[59]	Normoalbuminúria	<ul style="list-style-type: none"> - Prevalência inferior de retinopatia - Níveis elevados de colesterol-HDL - Níveis elevados de hemoglobina - Sexo feminino - Ausência de tabagismo - Duração curta da DM - Prevalência inferior de doença cardiovascular prévia - Níveis elevados de colesterol total
Caramori et al. ^[88]	Declínio da TFG em doentes DM1 normoalbuminúricos	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino - Concomitante retinopatia e/ou HTA
RIACE ^[131] (Renal Insufficiency And Cardiovascular Events)	Declínio da TFG em doentes com DM2 normoalbuminúricos	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino
NEFRON-11 ^[56] (National Evaluation of the Frequency of Renal impairment coexisting with NIDDM)	Declínio da TFG em diabéticos normoalbuminúricos	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino
Kramer et al. ^[132]	Declínio da TFG em doentes normoalbuminúricos	<ul style="list-style-type: none"> - Idade avançada - Níveis elevados de colesterol total, colesterol-LDL e triglicéridos - Elevada prevalência de Síndrome Metabólica - Sexo feminino - HTA
UKPDS-74 ^[55] (United Kingdom Prospective Diabetes Study)	Declínio da TFG	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo feminino - Reduzido perímetro abdominal - Idade avançada - Sensibilidade à insulina - Neuropatia sensorial prévia

<p>NDR^[66] (Swedish National Diabetes Register)</p>	<p>Declínio da TFG</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Creatinina sérica elevada - Sexo feminino
<p>Perkins et al.^[84]</p>	<p>Declínio precoce da TFG</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Idade superior a 35 anos - HbA1c > 9%
<p>RENAAL^[133] (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan)</p>	<p>Progressão renal em DM2</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Proteinúria - Creatinina sérica - Albumina sérica - Nível de hemoglobina
<p>FIELD^[134] (Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes)</p>	<p>Declínio da TFG e/ou albuminúria</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mais eventos e maiores taxas de mortalidade cardiovasculares
<p>DCCT/EDIC^[78] (Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications)</p>	<p>Declínio atenuado da TFG</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Níveis baixos de HbA1c - Níveis baixos de pressão arterial - Ausência de retinopatia

Tabela IV - Estudos que documentam as trajetórias da ND normoalbuminúrica

Estudos	Descrição breve do estudo	Observações na evolução da doença
DCCT/EDIC ^[78] (Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications)	1441 DM1 Microalbuminúricos Média de 13 anos de seguimento	Progressão para macroalbuminúria: 28% Regressão para normoalbuminúria: 40% Declínio da TFG: 15% Evolução para doença renal terminal: 4%
STENO-2 ^[135]	160 DM2 Microalbuminúricos 7,8 anos de seguimento	Declínio da TFG semelhante com terapia intensiva vs. convencional Terapia intensiva atrasou a progressão para macroalbuminúria
Perkins et al. ^[84]	DM1 267 normoalbuminúricos 301 microalbuminúricos 8-12 anos seguimento	Declínio precoce da TFG: - 9% dos normoalbuminúricos - 31% dos microalbuminúricos O risco dependeu da regressão (16%), progressão (68%) ou estabilização (32%) da microalbuminúria
Rigalleau et al. ^[59]	89 DM Normoalbuminúricos 38 meses de seguimento	Prognóstico mais benigno Taxa anual de declínio da TFG: - normoalbuminúricos: 0,3% - microalbuminúricos: 1,5% - macroalbuminúricos: 5,7% Menor risco de progressão para estadio 5 DRC Menor mortalidade por todas as causas
UKPDS-74 ^[55] (United Kingdom Prospective Diabetes Study)	DM2 4031: Normoalbuminúricos 5032: CrCl normal 15 anos de seguimento	38% dos normoalbuminúricos desenvolveram albuminúria 29% dos com CrCl normal tiveram progressão renal, nos quais 51% eram normoalbuminúricos
Laranjinha et al. ^[19]	146 DM2 TFG < 75 mL/min Estudo retrospectivo de 1 ano	Normoalbuminúria: - Prognóstico mais benigno - Menor mortalidade por todas as causas
RENNAL ^[133] (Reduction of Endpoints in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan)	1513 DM2 3,4 anos de seguimento	Associação entre controlo glicémico e tensional com frenadores do eixo R-A-A e prevenção da progressão renal
Mauer et al. ^[99]	285 DM1 5 anos de seguimento	A administração precoce de frenadores do eixo R-A-A não atrasou a progressão renal mas atrasou a retinopatia
NDR ^[66] (Swedish National Diabetes Register)	1667 DM2 Normoalbuminúricos e TFG > 60 mL/min/1,73m ² 5 anos de seguimento	20% desenvolveram albuminúria 11% com redução da TFG 6-7% com redução da TFG normoalbuminúrica

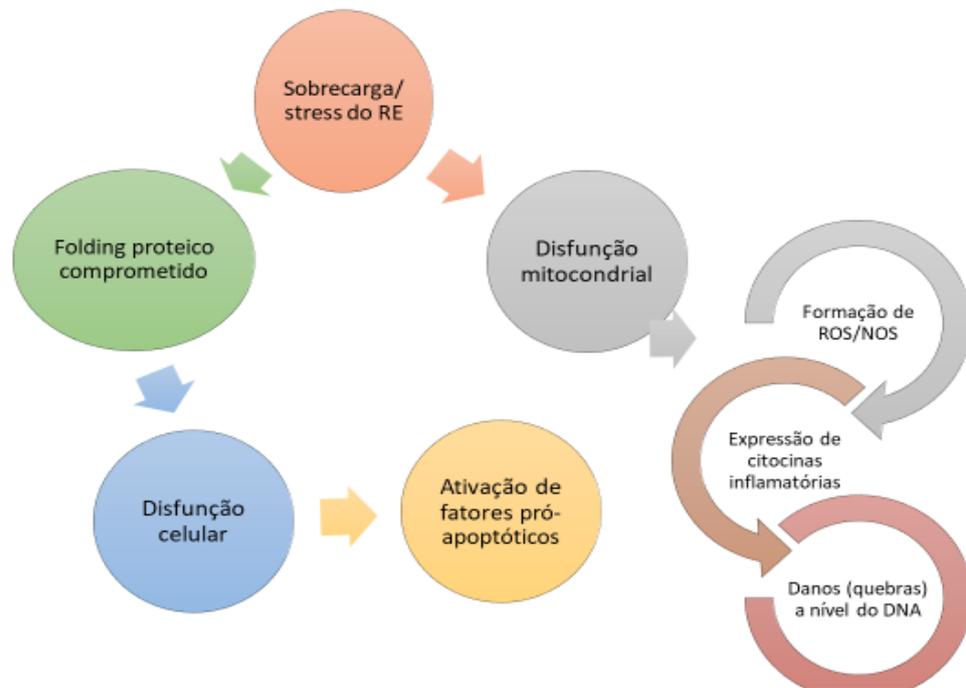


Figura 4 - Efeitos do stress do RE com envolvimento mitocondrial

A sobrecarga do RE quando do folding proteico causará disfunção celular e ativação de fatores pró-apoptóticos.^[1] O stress do RE leva, também, à disfunção mitocondrial, via libertação de cálcio para o citosol, à formação de ROS/NOS^[1] e a mudanças na expressão de citocinas inflamatórias.^[10] Outro efeito dos ROS é o dano a nível do DNA (nomeadamente quebras) que estes efetuam e que já foram apontados como estando mais elevados em rins diabéticos.^[1]

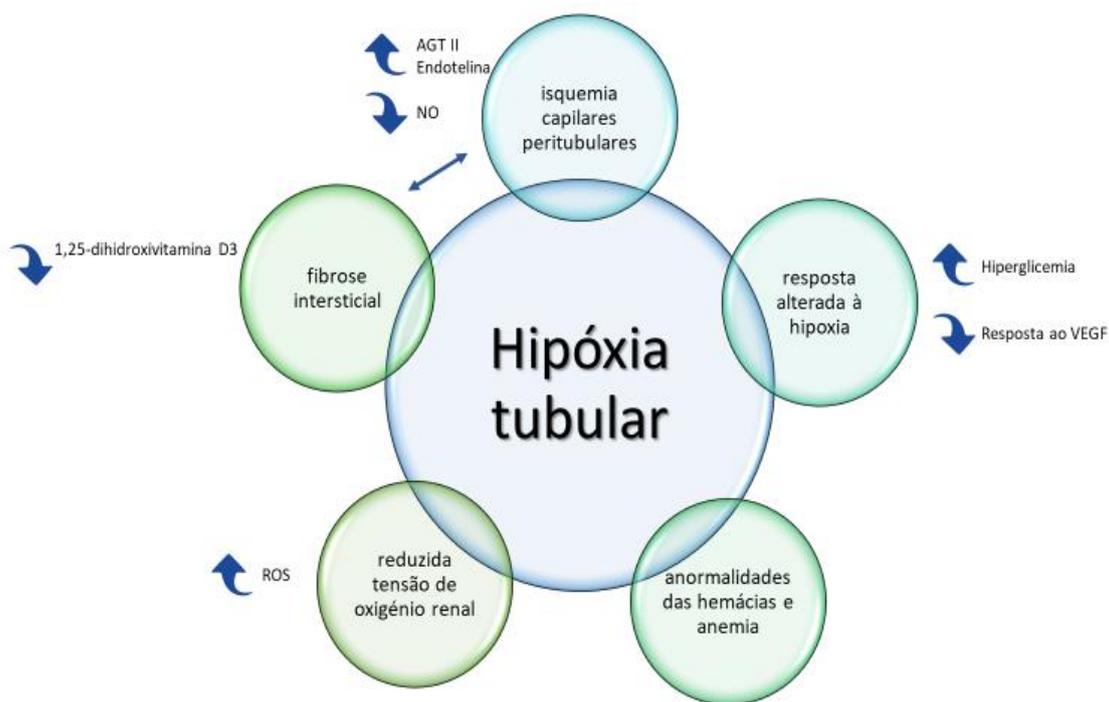


Figura 5 - Fatores agravantes da hipóxia tubular na ND

Destacam-se a isquemia dos capilares peritubulares, induzida por aumento de AGTII e endotelina e diminuição de NO; a reduzida tensão de oxigênio renal associada aos ROS libertados na diabetes; produção tubular diminuída de 1,25-dihidroxitamina D3 na doença renal, facilitando o aparecimento da fibrose intersticial, que pode, esta mesma, induzir isquemia local tubular; resposta alterada à hipoxia no contexto da diabetes (dado que a hiperglicemia reduz a resposta das células tubulares proximais a fatores como o VEGF); e anormalidades das hemácias e anemia.^[11]

Tabela V - Novos marcadores de lesão renal na ND

	Marcadores	Benefícios	Limitações
ROS e inflamação	Níveis urinários de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG)	- mede indiretamente o dano no DNA induzido por stress oxidativo e coincide com as complicações microvasculares da diabetes ^[1, 136] - foi validado e é relevante em diabéticos ^[1]	- excreção não específica de dano renal e afetada pelo exercício ou toxinas ambientais ^[1]
	Níveis plasmáticos de TNFR1 e 2	- correlacionam-se com o declínio da TFG na ND não-albuminúrica ^[18, 103] - biomarcador precoce e promissor de ND ^[18]	
	Níveis urinários de VEGF	- citocina angiogénica aumentada na ND não-albuminúrica ^[137]	
Disfunção endotelial	Níveis urinários e plasmáticos de endotelina	- vasoconstritor cujo aumento se correlaciona com progressão renal em modelos animais diabéticos ^[138] e também em diabéticos de tipo 2 ^[139]	
	Níveis urinários de <i>liver-type fatty acid-binding protein</i> (L-FABP)	- potencial preditor do declínio da função renal em diabéticos de tipo 2 não-albuminúricos ^[98]	
	Níveis plasmáticos de péptido natriurético C (CNP)	- advém de dano ao endotélio vascular - preditor do declínio de TFG ^[140]	
Lesão tubulopitelial*	Níveis urinários de NAG	- enzima tubular que aumenta na ND não-albuminúrica - aumento mais acentuado quando ocorre transição de micro para macroalbuminúria em diabéticos de tipo 2 ^[18]	
	Níveis urinários e plasmáticos de <i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i> (NGAL)	- aumentado durante a fase de hiperfiltração da ND com TFG descendente e cistatina C ascendente ^[141]	
	Níveis urinários e plasmáticos de <i>kidney injury molecule-1</i> (KIM-1)	- glicoproteína da membrana apical do túbulo proximal que aumenta com dano tubular na ND ^[18] - aumenta também durante a fase de hiperfiltração em diabéticos de tipo 2 - marcador específico de dano tubular proximal, com o risco precoce de progressão renal, independentemente do dano glomerular ^[98]	- diminuída com uso de fármacos bloqueadores do eixo R-A-A, limitando o seu uso como marcador de lesão tubular ativa ^[142]
	Níveis urinários de <i>retinal binding protein</i> (RBP)	- microproteína livremente filtrada que é quase totalmente reabsorvida nos túbulos proximais - marcador muito sensível de ND precoce: excreção reflete lesão na normoalbuminúria ^[18]	
	Níveis urinários de microglobulina- α 1 (A1M)	- microproteína indicadora de disfunção tubular na ND precoce ^[143] - semelhante ao RBP	
Marcadores genómicos, proteínómicos e metabolómicos	Níveis urinários e plasmáticos de micro-RNAs (miRNAs)	- poderão ser úteis como biomarcadores da doença ^[144]	- existem alterações a nível do metabolismo fosfolipídico e de aminoácidos em diabéticos não-albuminúricos ^[18] mas necessita-se de mais investigação para a sua determinação específica

Referências

1. Lindblom, R., et al., *Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy*. Rev Diabet Stud, 2015. **12**(1-2): p. 134-56.
2. Hanai, K., et al., *Asymmetric dimethylarginine is closely associated with the development and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(6): p. 1884-8.
3. Lajer, M., et al., *Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) predicts cardiovascular morbidity and mortality in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy*. Diabetes Care, 2008. **31**(4): p. 747-52.
4. Cheng, H. and R.C. Harris, *Renal endothelial dysfunction in diabetic nephropathy*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2014. **14**(1): p. 22-33.
5. Goligorsky, M.S., J. Chen, and S. Brodsky, *Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy : focus on nitric oxide*. Hypertension, 2001. **37**(2 Pt 2): p. 744-8.
6. Komers, R. and S. Anderson, *Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(6): p. F1121-37.
7. Cheng, H., et al., *Improvement of endothelial nitric oxide synthase activity retards the progression of diabetic nephropathy in db/db mice*. Kidney Int, 2012. **82**(11): p. 1176-83.
8. Prabhakar, S.S., *Role of nitric oxide in diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 2004. **24**(4): p. 333-44.
9. Li, X., C. Li, and G. Sun, *Histone Acetylation and Its Modifiers in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 4065382.
10. Baban, B., J.Y. Liu, and M.S. Mozaffari, *Endoplasmic reticulum stress response and inflammatory cytokines in type 2 diabetic nephropathy: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and programmed death-1*. Exp Mol Pathol, 2013. **94**(2): p. 343-51.
11. Singh, D.K., P. Winocour, and K. Farrington, *Mechanisms of disease: the hypoxic tubular hypothesis of diabetic nephropathy*. Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(4): p. 216-26.
12. Yamagishi, S. and T. Matsui, *Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy*. Oxid Med Cell Longev, 2010. **3**(2): p. 101-8.
13. Kumar Pasupulati, A., P.S. Chitra, and G.B. Reddy, *Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy*. Biomol Concepts, 2016. **7**(5-6): p. 293-309.
14. Anderson, M.M. and J.W. Heinecke, *Production of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine is impaired in mice deficient in NADPH oxidase: a role for phagocyte-derived oxidants in the formation of advanced glycation end products during inflammation*. Diabetes, 2003. **52**(8): p. 2137-43.
15. Yadav, A., et al., *ANG II promotes autophagy in podocytes*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **299**(2): p. C488-96.
16. Diabetes, O.N.d., *Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2015 in Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes*. 2016.
17. Kitada, M., et al., *Regulating Autophagy as a Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy*. Curr Diab Rep, 2017. **17**(7): p. 53.
18. Montero, R.M., et al., *Diabetic nephropathy: What does the future hold?* Int Urol Nephrol, 2016. **48**(1): p. 99-113.
19. Laranjinha, I., et al., *Diabetic kidney disease: Is there a non-albuminuric phenotype in type 2 diabetic patients?* Nefrologia, 2016. **36**(5): p. 503-509.
20. Jha, J.C., et al., *Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(6): p. 1237-54.
21. Porrini, E., et al., *Non-proteinuric pathways in loss of renal function in patients with type 2 diabetes*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(5): p. 382-91.
22. Brenner, B.M., et al., *Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 861-9.
23. Lewis, E.J., et al., *Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes*. N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 851-60.
24. Hovind, P., et al., *Progression of diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 702-9.
25. Adler, A.I., et al., *Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64)*. Kidney Int, 2003. **63**(1): p. 225-32.

26. Robles, N.R., J. Villa, and R.H. Gallego, *Non-Proteinuric Diabetic Nephropathy*. J Clin Med, 2015. **4**(9): p. 1761-73.
27. Atkins, R.C., et al., *Proteinuria reduction and progression to renal failure in patients with type 2 diabetes mellitus and overt nephropathy*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(2): p. 281-7.
28. de Zeeuw, D., et al., *Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2309-20.
29. de Zeeuw, D., et al., *Albuminuria, a therapeutic target for cardiovascular protection in type 2 diabetic patients with nephropathy*. Circulation, 2004. **110**(8): p. 921-7.
30. Kanwar, Y.S., et al., *Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 4-11.
31. Calles-Escandon, J. and M. Cipolla, *Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective*. Endocr Rev, 2001. **22**(1): p. 36-52.
32. Hadi, H.A. and J.A. Suwaidi, *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. Vasc Health Risk Manag, 2007. **3**(6): p. 853-76.
33. Alsaad, K.O. and A.M. Herzenberg, *Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update*. J Clin Pathol, 2007. **60**(1): p. 18-26.
34. Budhiraja, P., B. Thajudeen, and M. Popovtzer, *Absence of albuminuria in type 2 diabetics with classical diabetic nephropathy: Clinical pathological study*. Journal of Biomedical Science and Engineering, 2013. **Vol.06No.05**: p. 6.
35. Tervaert, T.W., et al., *Pathologic classification of diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 556-63.
36. Najafian, B., C.E. Alpers, and A.B. Fogo, *Pathology of human diabetic nephropathy*. Contrib Nephrol, 2011. **170**: p. 36-47.
37. Tesch, G.H., *Diabetic nephropathy - is this an immune disorder?* Clin Sci (Lond), 2017. **131**(16): p. 2183-2199.
38. Ruggenti, P. and G. Remuzzi, *Time to abandon microalbuminuria?* Kidney Int, 2006. **70**(7): p. 1214-22.
39. Orth, S.R., et al., *Effects of smoking on renal function in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(11): p. 2414-9.
40. Zhang, H.M., et al., *Geldanamycin derivative ameliorates high fat diet-induced renal failure in diabetes*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32746.
41. Galkina, E. and K. Ley, *Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(2): p. 368-77.
42. Chokhandre, M.K., et al., *Vitamin D & its analogues in type 2 diabetic nephropathy: a systematic review*. J Diabetes Metab Disord, 2015. **14**: p. 58.
43. Chawla, T., D. Sharma, and A. Singh, *Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy*. World J Diabetes, 2010. **1**(5): p. 141-5.
44. Ziyadeh, F.N. and G. Wolf, *Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 39-45.
45. Diez-Sampedro, A., O. Lenz, and A. Fornoni, *Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder*. Am J Kidney Dis, 2011. **58**(4): p. 637-46.
46. Weil, E.J., et al., *Podocyte detachment and reduced glomerular capillary endothelial fenestration promote kidney disease in type 2 diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2012. **82**(9): p. 1010-7.
47. Sivaskandarajah, G.A., et al., *Vegfa protects the glomerular microvasculature in diabetes*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2958-66.
48. Hohenstein, B., et al., *Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1654-61.
49. Satchell, S.C., et al., *Human podocytes express angiopoietin 1, a potential regulator of glomerular vascular endothelial growth factor*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(2): p. 544-50.
50. Lim, H.S., G.Y. Lip, and A.D. Blann, *Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2005. **180**(1): p. 113-8.
51. Richards, O.C., S.M. Raines, and A.D. Attie, *The role of blood vessels, endothelial cells, and vascular pericytes in insulin secretion and peripheral insulin action*. Endocr Rev, 2010. **31**(3): p. 343-63.
52. Kalia, K., S. Sharma, and K. Mistry, *Non-enzymatic glycosylation of immunoglobulins in diabetic nephropathy*. Clin Chim Acta, 2004. **347**(1-2): p. 169-76.

53. Goldin, A., et al., *Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury*. *Circulation*, 2006. **114**(6): p. 597-605.
54. Maclsaac, R.J., et al., *Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(1): p. 195-200.
55. Retnakaran, R., et al., *Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74*. *Diabetes*, 2006. **55**(6): p. 1832-9.
56. Thomas, M.C., et al., *Nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetic patients and in the general population (national evaluation of the frequency of renal impairment co-existing with NIDDM [NEFRON] 11)*. *Diabetes Care*, 2009. **32**(8): p. 1497-502.
57. Halimi, J.M., *The emerging concept of chronic kidney disease without clinical proteinuria in diabetic patients*. *Diabetes Metab*, 2012. **38**(4): p. 291-7.
58. Costacou, T., et al., *Sex differences in the development of kidney disease in individuals with type 1 diabetes mellitus: a contemporary analysis*. *Am J Kidney Dis*, 2011. **58**(4): p. 565-73.
59. Rigalleau, V., et al., *Normoalbuminuric renal-insufficient diabetic patients: a lower-risk group*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(8): p. 2034-9.
60. Garg, A.X., et al., *Albuminuria and renal insufficiency prevalence guides population screening: results from the NHANES III*. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 2165-75.
61. Kramer, H.J., et al., *Renal insufficiency in the absence of albuminuria and retinopathy among adults with type 2 diabetes mellitus*. *Jama*, 2003. **289**(24): p. 3273-7.
62. Pugliese, G., *Updating the natural history of diabetic nephropathy*. *Acta Diabetol*, 2014. **51**(6): p. 905-15.
63. Dwyer, J.P. and J.B. Lewis, *Nonproteinuric diabetic nephropathy: when diabetics don't read the textbook*. *Med Clin North Am*, 2013. **97**(1): p. 53-8.
64. Perkins, B.A., et al., *In patients with type 1 diabetes and new-onset microalbuminuria the development of advanced chronic kidney disease may not require progression to proteinuria*. *Kidney Int*, 2010. **77**(1): p. 57-64.
65. Yokoyama, H., et al., *Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15)*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(4): p. 1212-9.
66. Afghahi, H., et al., *Risk factors for the development of albuminuria and renal impairment in type 2 diabetes--the Swedish National Diabetes Register (NDR)*. *Nephrol Dial Transplant*, 2011. **26**(4): p. 1236-43.
67. Penno, G., et al., *Clinical significance of nonalbuminuric renal impairment in type 2 diabetes*. *J Hypertens*, 2011. **29**(9): p. 1802-9.
68. Packham, D.K., et al., *Proteinuria in type 2 diabetic patients with renal impairment: the changing face of diabetic nephropathy*. *Nephron Clin Pract*, 2011. **118**(4): p. c331-8.
69. Lee, C., et al., *Mortality in diabetes compared with previous cardiovascular disease: a gender-specific meta-analysis*. *Diabetes Metab*, 2012. **38**(5): p. 420-7.
70. Bash, L.D., et al., *Poor glycemic control in diabetes and the risk of incident chronic kidney disease even in the absence of albuminuria and retinopathy: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study*. *Arch Intern Med*, 2008. **168**(22): p. 2440-7.
71. Maclsaac, R.J., E.I. Ekinci, and G. Jerums, *'Progressive diabetic nephropathy. How useful is microalbuminuria?: contra'*. *Kidney Int*, 2014. **86**(1): p. 50-7.
72. Jerums, G., et al., *New and old markers of progression of diabetic nephropathy*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. **82 Suppl 1**: p. S30-7.
73. Ninomiya, T., et al., *Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(8): p. 1813-21.
74. Macisaac, R.J. and G. Jerums, *Diabetic kidney disease with and without albuminuria*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2011. **20**(3): p. 246-57.
75. Caramori, M.L., P. Fioretto, and M. Mauer, *Enhancing the predictive value of urinary albumin for diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(2): p. 339-52.
76. Perkins, B.A., et al., *Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(23): p. 2285-93.
77. Araki, S., et al., *Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(10): p. 2983-7.

78. de Boer, I.H., et al., *Long-term renal outcomes of patients with type 1 diabetes mellitus and microalbuminuria: an analysis of the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications cohort*. Arch Intern Med, 2011. **171**(5): p. 412-20.
79. Hovind, P., et al., *Predictors for the development of microalbuminuria and macroalbuminuria in patients with type 1 diabetes: inception cohort study*. Bmj, 2004. **328**(7448): p. 1105.
80. Tabaei, B.P., et al., *Does microalbuminuria predict diabetic nephropathy?* Diabetes Care, 2001. **24**(9): p. 1560-6.
81. Steinke, J.M., et al., *The early natural history of nephropathy in Type 1 Diabetes: III. Predictors of 5-year urinary albumin excretion rate patterns in initially normoalbuminuric patients*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2164-71.
82. Gaede, P., et al., *Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(11): p. 2784-8.
83. Yamada, T., et al., *Development, progression, and regression of microalbuminuria in Japanese patients with type 2 diabetes under tight glycemic and blood pressure control: the Kashiwa study*. Diabetes Care, 2005. **28**(11): p. 2733-8.
84. Perkins, B.A., et al., *Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1353-61.
85. Kume, S. and D. Koya, *Autophagy: A Novel Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy*. Diabetes Metab J, 2015. **39**(6): p. 451-60.
86. Macisaac, R.J. and G. Jerums, *Albuminuric and non-albuminuric pathways to renal impairment in diabetes*. Minerva Endocrinol, 2005. **30**(3): p. 161-77.
87. Perkins, B.A. and A.S. Krolewski, *Early nephropathy in type 1 diabetes: the importance of early renal function decline*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(3): p. 233-40.
88. Caramori, M.L., P. Fioretto, and M. Mauer, *Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions*. Diabetes, 2003. **52**(4): p. 1036-40.
89. Krolewski, A.S., et al., *Early progressive renal decline precedes the onset of microalbuminuria and its progression to macroalbuminuria*. Diabetes Care, 2014. **37**(1): p. 226-34.
90. Levey, A.S., et al., *Proteinuria as a surrogate outcome in CKD: report of a scientific workshop sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration*. Am J Kidney Dis, 2009. **54**(2): p. 205-26.
91. Yagil, C., et al., *Nonproteinuric diabetes-associated nephropathy in the Cohen rat model of type 2 diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1487-96.
92. Krolewski, A.S., *Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2015. **38**(6): p. 954-62.
93. Skupien, J., et al., *The early decline in renal function in patients with type 1 diabetes and proteinuria predicts the risk of end-stage renal disease*. Kidney Int, 2012. **82**(5): p. 589-97.
94. Perkins, B.A., et al., *Detection of renal function decline in patients with diabetes and normal or elevated GFR by serial measurements of serum cystatin C concentration: results of a 4-year follow-up study*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(5): p. 1404-12.
95. Pavkov, M.E., et al., *Early renal function decline in type 2 diabetes*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(1): p. 78-84.
96. de Boer, I.H. and M.W. Steffes, *Glomerular filtration rate and albuminuria: twin manifestations of nephropathy in diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1036-7.
97. Solini, A., et al., *Diverging association of reduced glomerular filtration rate and albuminuria with coronary and noncoronary events in patients with type 2 diabetes: the renal insufficiency and cardiovascular events (RIACE) Italian multicenter study*. Diabetes Care, 2012. **35**(1): p. 143-9.
98. Nowak, N., et al., *Increased plasma kidney injury molecule-1 suggests early progressive renal decline in non-proteinuric patients with type 1 diabetes*. Kidney Int, 2016. **89**(2): p. 459-67.
99. Mauer, M., et al., *Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes*. N Engl J Med, 2009. **361**(1): p. 40-51.
100. Basturk, T., et al., *Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination*. Ren Fail, 2006. **28**(2): p. 125-8.
101. Fioretto, P. and M. Mauer, *Histopathology of diabetic nephropathy*. Semin Nephrol, 2007. **27**(2): p. 195-207.

102. Caramori, M.L., A. Parks, and M. Mauer, *Renal lesions predict progression of diabetic nephropathy in type 1 diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(7): p. 1175-81.
103. Niewczas, M.A., et al., *Serum concentrations of markers of TNFalpha and Fas-mediated pathways and renal function in nonproteinuric patients with type 1 diabetes*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(1): p. 62-70.
104. Rosolowsky, E.T., et al., *High-normal serum uric acid is associated with impaired glomerular filtration rate in nonproteinuric patients with type 1 diabetes*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(3): p. 706-13.
105. Ficociello, L.H., et al., *High-normal serum uric acid increases risk of early progressive renal function loss in type 1 diabetes: results of a 6-year follow-up*. Diabetes Care, 2010. **33**(6): p. 1337-43.
106. Molitch, M.E., et al., *Development and progression of renal insufficiency with and without albuminuria in adults with type 1 diabetes in the diabetes control and complications trial and the epidemiology of diabetes interventions and complications study*. Diabetes Care, 2010. **33**(7): p. 1536-43.
107. Nguyen, D., et al., *Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy*. Nephrology (Carlton), 2006. **11**(3): p. 226-31.
108. Klessens, C.Q.F., et al., *Macrophages in diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes*. Nephrol Dial Transplant, 2017. **32**(8): p. 1322-1329.
109. Lin, J., et al., *Lipid and inflammatory biomarkers and kidney function decline in type 2 diabetes*. Diabetologia, 2010. **53**(2): p. 263-7.
110. Shoukry, A., A. Bdeer Sel, and R.H. El-Sokkary, *Urinary monocyte chemoattractant protein-1 and vitamin D-binding protein as biomarkers for early detection of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus*. Mol Cell Biochem, 2015. **408**(1-2): p. 25-35.
111. Forbes, J.M., M.T. Coughlan, and M.E. Cooper, *Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1446-54.
112. Higgins, G.C. and M.T. Coughlan, *Mitochondrial dysfunction and mitophagy: the beginning and end to diabetic nephropathy?* Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 1917-42.
113. Obrosova, I.G., et al., *Early oxidative stress in the diabetic kidney: effect of DL-alpha-lipoic acid*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(2): p. 186-95.
114. Cooper, M.E., *Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy*. Diabetologia, 2001. **44**(11): p. 1957-72.
115. Melhem, M. F.; Craven, P. A.; Liachenko, J.; DeRubertis, F. R. *Alpa-lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial expansion in diabetes*. J. Am. Soc. Nephrol., 2002. **13**:108–116.
116. Small, D.M., et al., *Oxidative stress and cell senescence combine to cause maximal renal tubular epithelial cell dysfunction and loss in an in vitro model of kidney disease*. Nephron Exp Nephrol, 2012. **122**(3-4): p. 123-30.
117. Zhu, K., et al., *NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney*. Free Radic Biol Med, 2015. **83**: p. 21-30.
118. Verzola, D., et al., *Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(5): p. F1563-73.
119. Vallon, V., *The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(5): p. R1009-22.
120. Egido, J., et al., *Standard and novel therapeutic approaches to diabetic nephropathy*. Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension, 2015. **29**: p. 101-107.
121. Jerums, G., et al., *Lowering of proteinuria in response to antihypertensive therapy predicts improved renal function in late but not in early diabetic nephropathy: a pooled analysis*. Am J Nephrol, 2008. **28**(4): p. 614-27.
122. Quiroga, B., D. Arroyo, and G. de Arriba, *Present and future in the treatment of diabetic kidney disease*. J Diabetes Res, 2015. **2015**: p. 801348.
123. Bermejo, S., J. Pascual, and M.J. Soler, *The large spectrum of renal disease in diabetic patients*. Clin Kidney J, 2017. **10**(2): p. 255-256.
124. Lytvyn, Y., et al., *New and old agents in the management of diabetic nephropathy*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(3): p. 232-9.
125. Anguiano, L., et al., *Endothelin Blockade in Diabetic Kidney Disease*. J Clin Med, 2015. **4**(6): p. 1171-92.
126. Majumder, S. and A. Advani, *The epigenetic regulation of podocyte function in diabetes*. J Diabetes Complications, 2015. **29**(8): p. 1337-44.

127. Sun, G.D., et al., *Histone lysine methylation in diabetic nephropathy*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 654148.
128. Mezzano, S., et al., *NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(10): p. 2505-12.
129. Gnudi, L., *Cellular and molecular mechanisms of diabetic glomerulopathy*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(7): p. 2642-9.
130. Dwyer, J.P., et al., *Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study*. Cardiorenal Med, 2012. **2**(1): p. 1-10.
131. Penno, G., et al., *Hemoglobin A1c variability as an independent correlate of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes: a cross-sectional analysis of the renal insufficiency and cardiovascular events (RIACE) Italian multicenter study*. Cardiovasc Diabetol, 2013. **12**: p. 98.
132. Kramer, C.K., et al., *Clinical and laboratory profile of patients with type 2 diabetes with low glomerular filtration rate and normoalbuminuria*. Diabetes Care, 2007. **30**(8): p. 1998-2000.
133. Keane, W.F., et al., *The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study*. Kidney Int, 2003. **63**(4): p. 1499-507.
134. Drury, P.L., et al., *Estimated glomerular filtration rate and albuminuria are independent predictors of cardiovascular events and death in type 2 diabetes mellitus: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study*. Diabetologia, 2011. **54**(1): p. 32-43.
135. Scheen, A.J. and F. Estrella, *[Clinical trial of the month. The STENO-2 study: a plea for global and intensive management of the type 2 diabetic patient]*. Rev Med Liege, 2003. **58**(2): p. 109-11.
136. Xu, G.W., et al., *Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients*. J Pharm Biomed Anal, 2004. **36**(1): p. 101-4.
137. Kim, N.H., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF receptor FLT-1 in diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2005. **67**(1): p. 167-77.
138. Meli, S. and C.M. Bruno, *Endothelin and diabetic nephropathy: a new pathogenetic factor?* Panminerva Med, 2001. **43**(1): p. 45-8.
139. Zanatta, C.M., et al., *Endothelin-1 levels and albuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2008. **80**(2): p. 299-304.
140. Pena, M.J., et al., *A panel of novel biomarkers representing different disease pathways improves prediction of renal function decline in type 2 diabetes*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0120995.
141. Nielsen, S.E., et al., *Tubular markers are associated with decline in kidney function in proteinuric type 2 diabetic patients*. Diabetes Res Clin Pract, 2012. **97**(1): p. 71-6.
142. Nielsen, S.E., et al., *The effect of RAAS blockade on markers of renal tubular damage in diabetic nephropathy: u-NGAL, u-KIM1 and u-LFABP*. Scand J Clin Lab Invest, 2012. **72**(2): p. 137-42.
143. Hong, C.Y., et al., *Urinary alpha1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore*. Diabetes Care, 2003. **26**(2): p. 338-42.
144. Yang, Y., et al., *Urine miRNAs: potential biomarkers for monitoring progression of early stages of diabetic nephropathy*. Med Hypotheses, 2013. **81**(2): p. 274-8.