

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

COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS SÉRICOS EM PACIENTES COM
DIABETE MELITO TIPO 2 E MICROALBUMINÚRIA

MAGDA SUSANA PERASSOLO

Porto Alegre, novembro de 2002

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

COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS SÉRICOS EM PACIENTES COM
DIABETE MELITO TIPO 2 E MICROALBUMINÚRIA

MAGDA SUSANA PERASSOLO

Dissertação apresentada à UFRGS –
Faculdade de Medicina – Programa de Pós-
graduação em Ciências Médicas:
Endocrinologia – Área de Concentração:
Metabolismo e Nutrição, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross

Porto Alegre, novembro de 2002

Aos meus pais, João e Ema, pela amizade e carinho. Mesmo longe fisicamente, sempre estiveram presentes com sua força e dedicação e souberam entender a minha ausência. Seu incentivo e suas palavras foram imprescindíveis em todos os momentos, até mesmo nos mais difíceis.

Ao Cláudio, meu noivo, pelo amor e dedicação neste tempo todo. Sempre acreditou em mim e me incentivou. Sua companhia e paciência foram decisivos em todos os momentos.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, pelas oportunidades, incentivo e pela confiança em mim depositada. Por ser um brilhante pesquisador e mestre, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou em tudo o que precisei. Nas horas de dificuldades nunca desanimou e me mostrou os caminhos a seguir. Seus ensinamentos e experiência são, para mim, exemplos de vida.

À Prof. Dra. Mirela Jobim de Azevedo, pela dedicação, amizade e cooperação em todas as etapas do trabalho, desde a confecção do projeto até à sua redação final. Sua disponibilidade foi indispensável na minha caminhada.

À Dra. Themis Zelmanovitz, sempre disposta e dedicada. Pelo cuidado com os pacientes no ambulatório, pelo convívio diário, e acima de tudo, pela disponibilidade e dedicação com que sempre me ajudou.

À Prof. Dra. Cileide Cunha Moulin, com quem dei os primeiros passos na pesquisa. Pelas oportunidades, ensinamentos e amizade. Pelo carinho e compreensão que sempre teve comigo e todos que trabalham com ela.

À Nut. Jussara Carnevale de Almeida, pelo companheirismo e amizade. Sua dedicação e seu empenho com os pacientes foram imprescindíveis na realização do trabalho. Me faltam palavras para agradecer por tudo o que fez durante estes 3 anos de convívio.

À Nut. Vanessa Mello, sempre presente e disposta a ajudar. Pela amizade de 6 anos, desde que éramos alunas de iniciação científica.

Aos alunos de iniciação científica, Fabiano Bitelo Woloski, Felipe Ibanes Marques e Ronivan Luiz dal Prá, que deram todo o suporte para que o trabalho fosse

realizado. À Nut. Juliana dos Santos Vaz, pela disponibilidade e cuidado com os pacientes.

À Bioq. Joíza Lins Camargo, pela ajuda na parte laboratorial do trabalho. Sempre atenciosa e disponível, foi de suma importância em algumas questões técnicas.

À Bioq. Juliane Incerti, pela amizade e pelas coletas de sangue no início do trabalho.

À Dra. Luciana Abarno da Costa, pelos pacientes enviados. Pela amizade, principalmente neste último ano de convívio.

Ao. Dr. Luís Henrique Canani, pela ajuda na parte estatística e genética do trabalho.

Às biólogas Clarissa Capp e Paula Eichelner, pela análise genética do trabalho e pela amizade e convívio no laboratório.

À Dra. Ana Luiza Maia, pela disponibilidade e incentivo, além da ajuda na análise genética do trabalho.

À Dra. Carmem Vargas e Serviço de Genética do HCPA, pela disponibilidade e uso das suas dependências no início do trabalho.

Às secretárias Rosângela Rodrigues, Rozelaine Hünning e Taís Quadros, pelo empenho e suporte em todos os momentos necessários.

À minha irmã Viviane Perassolo, pela amizade e carinho. À minha madrinha Terezinha Berti Antunes, pela dedicação e cuidado durante toda a minha vida.

Sumário

Lista de abreviaturas	7
RESUMO	8
INTRODUÇÃO.....	11
PERFIL LIPÍDICO E NEFROPATIA DIABÉTICA	12
Nefropatia diabética: importância e etapas evolutivas.....	12
Patogênese da nefropatia diabética	13
Lípideos como fator de risco para nefropatia diabética	13
Alterações lipídicas na doença renal.....	15
Ácidos graxos.....	15
Prováveis mecanismos envolvidos nas alterações lipídicas.....	16
Referências bibliográficas.....	20
OBJETIVO.....	25
FATTY ACID COMPOSITION OF SERUM LIPID FRACTIONS IN TYPE 2 DIABETIC PATIENTS WITH MICROALBUMINURIA.....	28
Abstract.....	29
Introduction.....	30
Research design and methods.....	31
Patients.....	31
Diet.....	32
Laboratory measurements.....	32
Genotype analysis.....	34
Statistical analysis.....	35
Results.....	35
Patients characteristics.....	35
Serum lipid levels.....	36
Fatty acid composition.....	36
Genotype analysis.....	38
Characteristics of the diet.....	38
Discussion.....	38
References.....	45
ANEXO.....	49

Lista de Abreviaturas

Apo B: apolipoproteína B

BMI: body mass index

DM: diabete melito

DM1: diabete melito tipo 1

DM2: diabete melito tipo 2

EUA: excreção urinária de albumina

FABP2: fatty acids binding proteins type 2

Ghb: glicated hemoglobin

HDL: “high-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de alta densidade

LDL: “low-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de baixa densidade

MUFA: “monounsaturated fatty acids”, ácidos graxos monoinsaturados

ND: nefropatia diabética

PCR: polymerase chain reaction

PUFA: “polyunsaturated fatty acids”, ácidos graxos poliinsaturados

SFA: “saturated fatty acids”, ácidos graxos saturados

TC: total cholesterol

TG: triglycerides

UAER: urinary albumin excretion rate

VLDL: “very low-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de densidade muito baixa

RESUMO

Resumo

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco para o desenvolvimento da nefropatia diabética em pacientes com diabetes melito tipo 2 (DM2). Têm sido descritas alterações na composição dos ácidos graxos (aumento na proporção de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e redução da família n-6) em pacientes com DM2 e hiperlipidemia. No entanto, a composição de ácidos graxos nas lipoproteínas de pacientes DM2, particularmente naqueles com microalbuminúria, não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi analisar a composição dos ácidos graxos séricos nas frações fosfolipídeos, triglicerídeos e ésteres de colesterol, e o perfil lipídico sérico de pacientes DM2 micro- e normoalbuminúricos. Foi realizado um estudo caso-controle com 72 pacientes DM2: 37 normoalbuminúricos (excreção urinária de albumina [EUA] < 20µg/min: imunoturbidimetria) e 35 microalbuminúricos (EUA entre 20 e 200µg/min). Os pacientes receberam orientação nutricional de acordo com as recomendações da Associação Americana de Diabetes e foram acompanhados por 4 semanas. Após este período foi analisada a composição dos ácidos graxos nas frações fosfolipídeo, triglicerídeo e ésteres de colesterol, determinada por cromatografia gasosa. O colesterol total e triglicerídeos séricos foram dosados por método enzimático colorimétrico; o colesterol HDL e frações HDL₂ e HDL₃ por dupla precipitação com heparina, MnCl₂ e sulfato de dextran; a apolipoproteína B por imunoturbidimetria; e o colesterol LDL foi calculado pela fórmula de Friedewald. A aderência à orientação da dieta foi avaliada por registro alimentar com pesagem de alimentos e dosagem de uréia urinária de 24h (método cinético) para cálculo da ingestão protéica. Nos pacientes microalbuminúricos, a proporção de ácidos graxos poliinsaturados na fração triglicerídeo ($24,8 \pm 11,0\%$) foi menor do que nos pacientes normoalbuminúricos ($34,1 \pm 11,3\%$; $P = 0,001$),

principalmente na família n-6 ($21,7 \pm 10,5$ vs. $31,4 \pm 11,5\%$; $P < 0,001$). Pacientes com microalbuminúria também apresentaram níveis maiores de ácidos graxos saturados na fração triglicérido ($43,4 \pm 18,0\%$, vs. $34,7 \pm 13,1\%$; $P = 0,022$). Feita a regressão logística múltipla, somente a proporção de ácidos graxos poliinsaturados na fração triglicérido permaneceu significativa quando associada com microalbuminúria (OR = 0,92; 95% IC = 0,85-0,98; $P = 0,019$). Na fração ésteres de colesterol, os pacientes microalbuminúricos apresentaram menor proporção de ácidos graxos poliinsaturados n-3 ($3,44 \pm 3,39\%$ vs. $5,98 \pm 6,56\%$; $P = 0,044$). Não se observou diferença na composição de ácidos graxos na fração fosfolípideo entre os dois grupos de pacientes. Os níveis de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos e apolipoproteína B não foram diferentes entre os pacientes normo- e microalbuminúricos. Pacientes com DM2 e microalbuminúria apresentam níveis menores de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente na família n-6 na fração triglicérido. Esta associação pode representar um fator de risco para a doença cardiovascular e pode contribuir para a progressão da nefropatia diabética.

INTRODUÇÃO

Perfil lipídico e nefropatia diabética

Nefropatia diabética: importância e etapas evolutivas

A nefropatia diabética (ND) acomete cerca de 36% dos pacientes com diabetes melito (DM) tipo 1 (DM1) (1) e 10 a 40% dos pacientes com DM tipo 2 (DM2) (2, 3) sendo a principal causa de ingresso em programas de substituição renal. Dos pacientes diabéticos que ingressam em programas de diálise, a maioria é constituída de pacientes com DM2 (4). Paralelamente, a ND está associada com o aumento da morbi-mortalidade cardiovascular em pacientes com DM2 (5, 6, 7, 8).

A ND apresenta três fases evolutivas: a fase de nefropatia incipiente, a fase de nefropatia clínica e a fase de insuficiência renal terminal (9). Supõe-se que os pacientes progridam continuamente através destes estágios.

Na fase de nefropatia incipiente ocorre a presença de microalbuminúria, onde os níveis de excreção urinária de albumina (EUA) encontram-se entre 20 e 200 $\mu\text{g}/\text{min}$. Nesta fase, os pacientes já apresentam maior mortalidade cardiovascular. Os pacientes microalbuminúricos apresentam níveis pressóricos mais elevados do que pacientes normoalbuminúricos ($\text{EUA} < 20 \mu\text{g}/\text{min}$) e alterações lipídicas semelhantes às dos pacientes com nefropatia clínica. Na nefropatia clínica os valores de EUA são $> 200 \mu\text{g}/\text{min}$ (ou proteinúria de 24 horas $> 500 \text{ mg}$). Sem adoção de medidas terapêuticas específicas, a perda de função renal é progressiva com evolução para fase de insuficiência renal terminal (com uremia e necessidade de diálise ou transplante renal) em cerca de 7 a 10 anos (9).

Patogênese da nefropatia diabética

Os mecanismos implicados na lesão renal progressiva envolvem um número considerável de alterações hemodinâmicas, metabólicas e morfológicas que estão, de algum modo, interrelacionadas. Os principais fatores relacionados à lesão glomerular, além da hiperglicemia, são dislipidemia, predisposição genética, hipertensão arterial e disfunção endotelial, que levam à hipertensão glomerular, aumento da permeabilidade vascular, aumento da matriz extracelular, deposição lipídica e infiltração glomerular de macrófagos e monócitos (10).

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares, além de ser o principal componente do cérebro e células nervosas. Também é um elemento chave intermediário para a biossíntese de uma série de esteróides importantes, incluindo ácidos biliares, hormônios adrenocorticais, estrógenos, andrógenos e progesterona (11). Entretanto, níveis elevados de colesterol no sangue são um dos principais fatores de risco para doença arterial coronariana (12). Além disto, em pacientes com DM, o colesterol sérico tem sido considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de ND (9). De fato, na presença de doença renal, com ou sem DM associado, são freqüentes as anormalidades nos lipídeos séricos. Existe uma associação entre proteinúria, alterações do perfil lipídico e aterosclerose (13).

Lípídeos como fator de risco para ND

Estudos experimentais demonstraram que a obesidade e hiperlipidemia estão associados a lesões renais progressivas e alto grau de lesão glomerular (10, 13, 14). Com base nestas evidências, alguns autores sugerem que a glomerulosclerose encontrada na doença renal tem semelhanças importantes com a doença arterial (aterosclerose) e que a dislipidemia seria um fator de risco para ambas (15).

Ratos com colesterol plasmático elevado têm uma importante redução na função renal e alto grau de lesão glomerular (16). Ratos Zucker obesos têm sido estudados como modelo de lesão renal induzida por lipídeos. Estes ratos têm muitas das características do DM2, como resistência à insulina nos tecidos muscular e adiposo, moderada tolerância diminuída à glicose, células β pancreáticas hipertróficas, obesidade e hiperlipidemia. Após seis meses de idade, ocorre aumento moderado dos níveis glicêmicos (17). Albuminúria e expansão mesangial progressiva surgem depois de dez semanas de idade, quando a hiperlipidemia torna-se evidente (18, 19).

A fração lipídica específica responsável pela progressiva destruição do néfron na ND não está totalmente elucidada (16). Existem diversos estudos que sugerem que o aumento dos níveis séricos de colesterol pode ter um efeito deletério sobre a função renal. Schmitz PG *et al.*, (13) sugerem que a lesão renal ocorre devido à deposição glomerular de lipídeos e que as mudanças nas lipoproteínas séricas podem estar relacionadas com a proteinúria dos pacientes com doença renal. Em um estudo conduzido por Mulec H *et al.* (16), onde foram acompanhados 30 pacientes com DM1 por 2,5 anos, foi observada correlação entre colesterol total, triglicerídeos e apolipoproteína B (apo B) com o declínio da filtração glomerular. Kasiske BL *et al.* (14) sugerem que alterações no colesterol sérico podem estar mais intimamente associados à lesão glomerular do que alterações nos triglicerídios séricos. Ravid M *et al.* (20), demonstraram que os níveis elevados de colesterol plasmático foram os fatores de risco mais importantes para o aparecimento da ND em um estudo prospectivo de pacientes com DM2.

Alterações lipídicas na doença renal

Estudos em pacientes com DM1 microalbuminúricos mostram aumento nos níveis de triglicerídeos séricos, colesterol VLDL (VLDL; “very low-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de densidade muito baixa), colesterol LDL (LDL; “low-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de baixa densidade) e apo B e diminuição nos níveis de colesterol HDL (HDL; “high-density lipoprotein cholesterol”, lipoproteína de alta densidade), em particular na HDL₂ (21). Em pacientes com DM2 e microalbuminúria, há também aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos (20). Há dúvidas se as alterações lipídicas precedem o desenvolvimento da micro ou macroalbuminúria ou ocorrem em função da doença renal. Em um estudo prospectivo de 133 pacientes diabéticos tipo 2 acompanhados por 5 anos, a presença de microalbuminúria foi associada a aumento de triglicerídeos e diminuição de HDL colesterol (22).

Ácidos graxos

Os ácidos graxos são uma classe de compostos que contém uma cadeia hidrocarbonada (4 a 26 C) e um grupamento carboxila terminal (ácidos carboxílicos). Ocorrem naturalmente em gorduras, óleos e compostos relacionados. São solúveis em solventes orgânicos (acetona, éter, clorofórmio, hexano, metanol...). São capazes de gerar mediadores ativos e modular a resposta a hormônios. Também influenciam as respostas imunitária e inflamatória e na secreção de insulina e de outros hormônios (11).

A presença de duplas ligações (insaturações) nas cadeias hidrocarbonadas dos ácidos graxos classifica-os como saturados - SFA; “saturated fatty acids” - (não possuem insaturações) ou insaturados (presença de uma – monoinsaturados - MUFA;

“monounsaturated fatty acids” - ou mais – poliinsaturados - PUFA; “polyunsaturated fatty acids” – insaturações) (11, 12).

Dependendo da localização da ligação dupla em relação ao carbono mais distante do grupamento carboxila, os PUFA são classificados em n-3, n-6 e n-9. O número indica em qual carbono está inserida a ligação mais distante do grupamento carboxila (12).

Prováveis mecanismos envolvidos nas alterações lipídicas

Em pacientes não diabéticos com síndrome nefrótica aumento da produção de apo B determina um aumento de LDL colesterol e a redução da atividade da lipase lipoprotéica está associada a níveis maiores de VLDL colesterol (23). Em pacientes não diabéticos com insuficiência renal crônica, a redução da atividade da lipase lipoprotéica parece ser o mecanismo predominante na hipertrigliceridemia e nos baixos níveis de HDL colesterol (14).

Nos pacientes com DM2, associa-se ainda a estes fatores a síndrome da resistência à insulina. A diminuição do efeito da insulina no tecido adiposo favorece um aumento da mobilização dos ácidos graxos. O maior aporte de ácidos graxos livres circulantes ao fígado estimula a produção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos. Devido a estas características, as partículas ricas em triglicerídeos apresentam modificações no seu metabolismo que levam a diminuição do HDL colesterol (15). Outra explicação seria a presença de hábitos alimentares que favoreceriam um perfil lipídico desfavorável. Neste sentido, existe a observação de que pacientes com DM1 que não apresentam ND e que têm uma maior ingestão de proteína e SFA há um maior risco de desenvolvimento de microalbuminúria (24). Existem evidências de que o aumento de SFA plasmáticos está correlacionado com hiperinsulinemia. Em

indivíduos normais, observou-se que o aumento de 1,9% de SFA nos fosfolípidos causava níveis 2,4 vezes maiores na secreção de insulina no jejum (25). Em pacientes com DM2 e microalbuminúria, quando substituiu-se a carne vermelha por carne de galinha, observou-se a diminuição da taxa de filtração glomerular, dos níveis de microalbuminúria juntamente com a diminuição dos níveis de colesterol e apo B séricos nestes pacientes (26). Borkman M *et al.* (27) demonstrou que altas concentrações de PUFA nos fosfolípidos das células do músculo esquelético estão associadas com uma maior sensibilidade à ação da insulina.

Uma hipótese provável dos mecanismos envolvidos na gênese das alterações lipídicas observadas em pacientes com ND, refere-se a uma alteração na composição de ácidos graxos séricos. Uma significativa redução no conteúdo de ácido araquidônico e um aumento de ácido linoléico foram encontrados na fração fosfolipídica das células da córtex renal em ratos com doença renal diabética e não diabética. Esta deficiência em ácido araquidônico é compatível com o conhecido efeito inibidor da hipercolesterolemia na atividade da n-6 dessaturase, enzima marca-passo na formação de ácido araquidônico a partir de ácido linoléico (14). Portanto, uma alteração nos PUFA n-6, com deficiência relativa de ácido araquidônico parece estar relacionada com a evolução da lesão renal diabética e não diabética (28, 29). Estas mudanças no conteúdo tecidual de ésteres de colesterol ou ácidos graxos podem alterar a estrutura e a função da membrana glomerular (30 - 32), bem como a proporção da síntese de eicosanóides (33 - 36) mudanças estas que parecem participar da lesão glomerular.

Os PUFA têm importante papel no metabolismo celular, incluindo a fluidez das membranas e produção de eicosanóides, sendo portanto, fundamentais no metabolismo das prostaglandinas (37), sintetizadas a partir do ácido araquidônico

(figura 1). As prostaglandinas têm um importante papel fisiológico, pois participam de diversos processos: broncoconstrição, vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, adesão de células brancas, promoção de agregação plaquetária, mobilização de cálcio intracelular, vasodilatação, estimulação de contrações uterinas, entre outros (38, 39). Desta forma, a alteração na sua produção e metabolismo pode estar vinculada às alterações endoteliais, hemodinâmicas e renais, comumente encontradas na ND.

Alterações do metabolismo de ácidos graxos podem estar relacionadas à própria alteração renal. Há poucos estudos relacionando a composição sérica de ácidos graxos e o desenvolvimento de DM e/ou suas complicações. Ácidos graxos não esterificados aumentados foram encontrados em pacientes japoneses com DM2, não obesos e microalbuminúria (40). Em um estudo com pacientes com DM2 e hiperlipidemia, Bohov *et al.* (41) encontraram os seguintes resultados: maiores quantidades de ácidos palmítico e oléico, assim como o total de SFA e MUFA nestes pacientes. Porém, neste estudo, determinou-se os ácidos graxos nos lipídeos totais, não esclarecendo quais as frações que estão mais alteradas e não houve classificação dos pacientes quanto à função renal.

Moulin (42) demonstrou que em pacientes com ND (micro- e macroalbuminúricos), o percentual de PUFA na fração triglicerídeos é menor do que em pacientes normoalbuminúricos. Além disso, nos ésteres de colesterol, observou-se uma maior percentagem de ácido oléico nos pacientes nefropatas.

Estas evidências sugerem que os lipídeos séricos têm importante participação na doença renal diabética. O que ainda necessita ser elucidado é seu papel nesta complicação, se como fator de risco ou como consequência da nefropatia diabética.

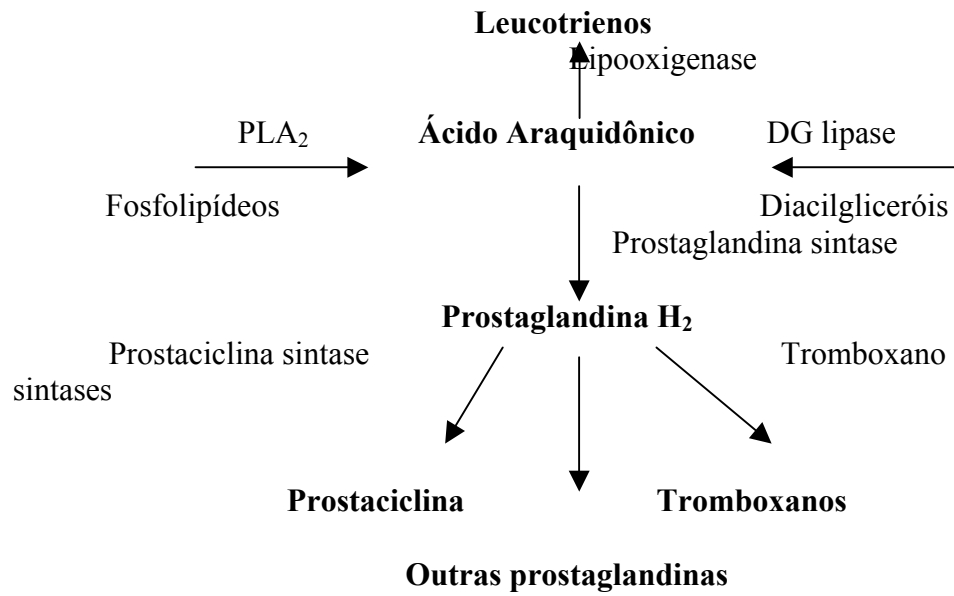


Figura 1: Metabolismo das prostaglandinas (37)

Referências bibliográficas

1. Gross JL, Eizirik DL, Kruter RHE. Duração do diabete melito e complicações microangiopáticas. Rev da Ass Med Bras 28: 140 - 142, 1982.
2. Haffner SM, Mitchell BD, Pugh JA, Stern MP, Kolzowski MK, Hazuda HP, Patterson JK, Klein R. Proteinuria in mexican americans non-hispanics whites NIDDM. Diabetes Care 12: 530 - 536, 1989.
3. Miki E, Kasuka T, Ide T, Nakao K. Frequency, degree and progression with time of proteinuria in diabetic patients. Lancet 1: 922 - 924, 1972.
4. American Diabetes Association. Diabetes Complications in Diabetes 2001: Vital Statistics. American Diabetes Association®, Inc Alexandria, VA, USA.
5. Dinnen SF, Gershein HC. The Association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Arch Intern Med 157: 1413 - 1418, 1997.
6. Klein R, Klein BEK, Moss SE. The incidence of gross proteinuria in people with insulin-dependent diabetes mellitus. Arch Intern Med 151: 1344 - 1348, 1991.
7. Koch M, Gradaus F, Schoebel FC, Leschke M, Grabensee B. Relevance of conventional cardiovascular risk factors for the prediction of coronary artery disease in diabetic patients on renal replacement therapy. Nephrol Dial Transplant 12: 1187 - 1191, 1997.
8. Mogensen CE. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity onset diabetes. N Engl J Med 310: 356 - 360, 1984.
9. Krolewski AS, Warram JH. Clinical features and epidemiology of diabetic nephropathy. In: Textbook of Diabetes. John Pickup and Gareth Williams eds. Blackwell Science – 2nd edition, Oxford, 53.1-53.13, 1997.

10. Keane WF, Mulcah WS, Kasiske BL, KIM Y, O'Donnell MP. Hyperlipidemia and progressive renal disease. *Kidney Int* 39 (31): S41 - S48, 1991.
11. Marks DB, Marks Ad, Smith CM. *Basical Medical Biochemistry. A Clinical Approach*. Lippincott. Williams & Wilkias, pp. 525 – 544, 1996
12. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr* 75: 191 – 212, 2002.
13. Schmitz PG, Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. Lipids and progressive renal injury. *Sem in Nephrol* 9: 354-69, 1989.
14. Kasiske BL, O'Donnell MP, Schmitz PG, KIM Y, Keane WF. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney Int* 37: 880 - 891, 1990.
15. Diamond JR. Abalogous pathobiologic mechanisms in glomerulosclerosis and atherosclerosis. *Kidney* 39 (Suppl): S29 - S34, 1991.
16. Mulec H, Johnson AS, Wiklund O, Bjork S. Cholesterol: a renal risk factor in diabetic nephropathy? *Am J Kid Dis* 22: 196 - 201, 1993.
17. Raij L, Azar S, Keane WF. Role of hypertension in progressive glomerular immune injury. *Hypertension* 7: 398 - 404, 1985.
18. Kasiske BL, Cleary MP, O'Donnell MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. *J Lab Clin Med* 106: 598 - 604, 1985.
19. O'Donnell MP, Kasiske BL, Cleary MP, Keane WF. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat II: Micropuncture studies. *J Lab Clin Med* 106: 605 - 610, 1985.
20. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachamanai R. Main risk for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern med* 158: 998 – 1004, 1998

21. Janes SL, Close CE, Mattock MB, Jarret RJ, Keen H, Viberti GC. Plasma Lipid and Coagulation Factor Concentrations in Insulin Dependent Diabetic With Microalbuminuria. *Br Med Journal* 29:487-90, 1988.
22. Niskanen L, Uusitupa M, Sarlund H, Siitonen O, Voutilainen E, Penttilä I, Pyörälä K. Microalbuminuria predicts the development of serum lipoprotein abnormalities favoring atherogenesis in newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33: 237 – 243, 1990.
23. Garg A, Grundy SM. Management of Dyslipidemia in NIDDM. *Diabetes Care* 13: 153 - 167, 1990.
24. Möllsten AV, Dahlquist GG, Stattin EL, Rudberg S. Higher intakes of fish protein are related to a lower risk of microalbuminuria in young Swedish type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 24: 805 – 810, 2001.
25. Folsom AR, MA J, McGovern PG, Eckfeldt JH. Relation between plasma phospholipid saturated fatty acids and hyperinsulinemia. *Metabolism* 45: 223 - 228, 1996.
26. Gross JL, Zelmanovitz T, Moulin CC, Mello VD, Perassolo M, Leitão C, Hoefel A, Paggi A, Azevedo MJ. Effect of a chicken-based diet on renal function and lipid profile in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25: 645 – 651, 2002.
27. Borkman AR, Storlien LJ, Pan DA, Jenkins AB, Chisholim DJ, Campbell LB. The relationship between insulin sensitivity and the fatty acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med* 328: 238 - 244, 1993.
28. Huang YS, Horrobin DF. Metabolism of marine n-3 fatty acids in diabetic in cholesterol-fed essential fatty acid deficient rats: possible activation of delta-4-desaturase activity. *Mutr Rep Int* 36:21 - 26, 1987.

29. Garg ML, Sebokova E, Thompson ABR. Δ 6-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or ω -3 fatty acids. *Biochem J* 249: 351 - 356, 1988.
30. Mead JF. Membrane homeostasis: Is there an optimum level of membrane cholesterol? *Biosci Rep* 3: 337 - 344, 1983.
31. Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 779: 89 - 137, 1984.
32. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* 26: 1015 - 1035, 1985.
33. Higgs GA. The effects of dietary intake of essential fatty acids on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Proc Nutr Soc* 44: 181 - 187, 1985.
34. Kelley VE, Ferretti A, Izui S. A fish oil diet rich in eicosapentaenoic acid reduces cyclooxygenase metabolites and suppresses lupus in MRL-1 mice. *J Immunol* 134: 1914 - 1919, 1985.
35. Mathiar MM, Mauldin RE. Urinary excretion of prostanoids by rats and men fed varying amounts of linoleate. *Prog Lip Res* 25: 157 - 161, 1986.
36. Schettler G. Relevance of fatty acids and eicosanoids to clinical and preventive medicine. *Prog Lip Res* 25: 1 - 4, 1986.
37. Stryer L. *Bioquímica*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap. 24: pp 590 - 591.
38. Champe PC, Harvey RA. *Biochemistry*. 2nd edition. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1994. Cap. 17: pp 185 - 188.

39. Mayes PA. Metabolism of insaturated fatty acids & eicosanoids. In: Murray, RK (ed). Harper's Biochemistry. 33rd edition. Rio de Janeiro: Editora Prentice Hall do Brasil Ltda, 1993. Cap. 25: pp 238 - 240.
40. Taniguchi A, Fukushima M, Sakai M, Hama K, Sakaguchi K, Nezumi N, Kishimoto H, Watanabe T, Matsumoto K, Nagasaka S, Tokuyama K, Nakai Y. serum nonesterified fatty acids are increased in nonobese japanese type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 10: 1847 – 1849, 2001.
41. Bohov P, Balaz V, Segokova E, Klimes I. The effect of hyperlipidemia on serum fatty acid composition in type 2 diabetics. *Ann N Y Acad Sci* 827: 561 - 567, 1997.
42. Moulin CC. Perfil dos lipídeos séricos após dietas com diferentes tipos de carne em pacientes com diabete melito tipo 2 com e sem nefropatia diabética. Tese de doutorado. Porto Alegre: UFRGS – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 1999.

OBJETIVO

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi analisar a composição dos ácidos graxos séricos nas frações fosfolipídeos, triglicerídeos e ésteres de colesterol, e o perfil lipídico sérico de pacientes com diabetes melito tipo 2 micro- e normoalbuminúricos.

ARTIGO*

*Publicado em: Diabetes Care 26 (3): 613 – 618, 2003.

**FATTY ACID COMPOSITION OF SERUM LIPID FRACTIONS IN TYPE 2 DIABETIC
PATIENTS WITH MICROALBUMINURIA**

Running title: fatty acids in lipid fractions in microalbuminuria

Magda S. Perassolo, BC¹

Jussara C. Almeida, RD¹

Ronivan L. Prá, BC¹

Vanessa D. Mello, RD¹

Ana L. Maia, MD¹

Cileide C. Moulin, RD¹

Joíza L. Camargo, MsC¹

Themis Zelmanovitz, MD¹

Mirela J. Azevedo, MD¹

Jorge L. Gross, MD¹

¹From the Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Correspondence: Jorge L. Gross, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: gross@hotmail.net. Phone: 55 51 3332 5188. Fax: 55 51 3316 8777.

Abstract

Objective - To determine the fatty acid composition of serum phospholipid, triglyceride and cholesterol ester fractions and to analyze the lipid profile of microalbuminuric type 2 diabetic patients.

Research design and methods - A case-control study was conducted with 72 patients: 37 normoalbuminuric (UAER <20 µg/min), and 35 microalbuminuric (UAER 20-200 µg/min). After four weeks of a standardized diet, the fatty acid composition of phospholipid, triglyceride and cholesterol ester fractions was determined by gas chromatography. Total cholesterol and triglycerides were measured by enzymatic-colorimetric methods; cholesterol HDL by double precipitation with heparin; MnCl₂, dextran sulphate, and apolipoprotein B by immunoturbidimetry.

Results - Microalbuminuric patients showed a lower proportion of polyunsaturated fatty acids (24.8±11.0%), especially of the n-6 family (21.7±10.5%), in triglyceride fraction than normoalbuminuric patients (34.1±11.3%, P = 0.001; and 31.4±11.5%, P < 0.001, respectively). Patients with microalbuminuria also presented higher levels of saturated fatty acids in triglyceride fraction (43.4±18.0%, vs. 34.7±13.1%, P = 0.022). In the logistic regression analysis, only the proportion of polyunsaturated fatty acids in triglyceride fraction remained significantly associated with microalbuminuria (OR = 0.92; 95%CI = 0.85-0.98; P = 0.019). Total cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride and apolipoprotein B levels were similar in normo- and microalbuminuric patients.

Conclusion - Microalbuminuria in type 2 diabetic patients is associated with low polyunsaturated fatty acid contents in serum triglyceride fraction. This association may represent a risk factor for cardiovascular disease and may contribute to the progression of renal disease.

Introduction

Microalbuminuria is known to be an independent risk factor for cardiovascular death in type 2 diabetic patients (1, 2), but the mechanisms underlying this association have not been clarified. It could be that other cardiovascular risk factors that are frequently associated with microalbuminuria, such as hyperglycemia, hypertension (3), and endothelial dysfunction (4) might also contribute to the increased cardiovascular mortality observed in these patients. In addition, dyslipidemia has also been described in type 2 diabetic patients with microalbuminuria (2, 5, 6). Although those studies did not specifically assess the effect of nutrient intake, the effect of dietary habits on the development of dyslipidemia in these microalbuminuric patients cannot be ruled out.

Dietary habits influence serum lipid levels and renal function in patients with diabetes. For example, higher intake of fish protein has been shown to be related to a lower risk for microalbuminuria in type 1 diabetic patients (7), and replacement of red meat with chicken reduces albumin excretion rate and serum cholesterol levels in microalbuminuric type 2 diabetic patients (8). These effects may result from the high content of polyunsaturated fatty acids in fish and chicken meat. An altered fatty acid composition of serum cholesterol esters has been observed to be a risk factor for the development of myocardial infarction in men (9). However, the fatty acid composition of plasma lipid fractions in type 2 diabetic patients with microalbuminuria is virtually unknown.

Therefore, the objective of this study was to determine the fatty acid composition of serum lipid fractions and to describe the lipid profile of type 2 diabetic patients with microalbuminuria following a standardized diet.

Research design and methods

Patients

A case-control study was conducted with 72 patients with type 2 diabetes mellitus (WHO criteria) (10) attending the Endocrine Division's outpatient clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Patients were selected on the basis of the following criteria: age < 75 years; body mass index (BMI) < 35 kg/m²; good compliance with diabetes treatment; triglyceride levels < 4.52 mmol/L; urinary albumin excretion rate (UAER) < 200 µg/min; normal liver and thyroid function; and absence of urinary tract infection, other renal disease, and cardiac failure. Treatment with antihypertensive and oral antidiabetic agents was maintained during the study. None of the patients were using hypolipidemic agents. Thirty-seven patients were classified as normoalbuminuric (UAER < 20 µg/min) and 35 as microalbuminuric (UAER = 20 - 200µg/min confirmed at least twice in a 6-month period). The Ethics Committee at Hospital de Clínicas approved the protocol and patients gave their written informed consent before entering the study. Eligible patients entered a run-in period of approximately 2 months, during which they were oriented to achieve the best possible metabolic control through dietary adjustments and use of oral antidiabetic agents or insulin.

At the end of the run-in period, patients underwent a clinical evaluation. BMI [weight (kg)/height² (m)] was calculated. Sitting blood pressure was measured twice to the nearest 2 mmHg, after a 10-minute rest, using a standard mercury sphygmomanometer (phases I and V of Korotkoff). Hypertension was defined as blood pressure ≥ 140/90 mmHg or use of antihypertensive drugs.

Diet

During the run-in period, each patient received standardized nutritional guidelines developed by a nutritionist following American Diabetes Association recommendations (11) as close as possible. The amount and source of protein from the patient's usual diet was not modified. Patients were also given corn oil [fatty acid composition as indicated by the manufacturer: palmitic acid (10%); stearic acid (2%); oleic acid (31%); linoleic acid (56%); other acids (1%)] to prepare their food during this period. Compliance was assessed by means of 2-day weighed diet records and 24-h urinary nitrogen output at the end of the second and the fourth weeks, as previously reported (12). Patients were assessed after a minimum of 4 weeks following the end of the run-in period.

Laboratory measurements

Blood samples were obtained after a 12-hour fast. Serum was separated after centrifugation at 1,500g for 15 min, and stored at -80°C for later laboratory measurements. Total HDL cholesterol and its HDL₂ and HDL₃ subfractions were separated by double precipitation with heparin, MnCl₂ and dextran sulphate. Then, total cholesterol, total HDL, HDL₂ and HDL₃ cholesterol and triglycerides were measured by enzymatic-colorimetric methods (Merck Diagnostica, Darmstadt, Germany; Boeringher Mannheim, Buenos Aires, Argentina). Non-HDL cholesterol was determined according to the difference between total cholesterol and HDL cholesterol. LDL cholesterol was calculated using Friedewald's formula ($\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG}/5$). Apolipoprotein B was determined by immunoturbidimetric assay (Kit Unimate 3, Roche Diagnostic System, Basel, Switzerland; intra-assay coefficient of variation 4.2%).

Fatty acids were determined in phospholipid, triglyceride and cholesterol ester fractions. Lipids were extracted from serum with chloroform-methanol (2:1; by volume) according to the method of Folch et al. (13). Fatty acid fractions were separated by thin-layer chromatography using a silica gel plate (Silica Gel F240, Merck) and mobile-phase development, using a mixture of hexane, diethyl ether, and acetic acid glacial (80:20:1, respectively; by volume) (14). Fractions were visualized by iodine vapor. Phospholipid, triglyceride and cholesterol ester bands were scraped into separate tubes; lipids were extracted from silica with chloroform-methanol and converted into fatty acid methyl esters by boron trifluoride catalysis (15). The methyl esters were then separated and measured by gas chromatography on a 60 m fused silica capillary column with an internal diameter of 0.20 μm (CP – Sil 88). Analysis was performed on a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector. Helium was used as carrier gas and nitrogen as make-up gas. The split-ratio was 5:1. The injection port temperature was 200°C and the detector temperature was 250°C. The column temperature was held at 160°C for 5 min and increased to 190°C at a rate of 2°C/min; it was then held at this temperature for 2 min, and increased again to 220°C at a rate of 1°C/min. The identity of each fatty acid peak was ascertained by comparison of peak retention time with a previously characterized mixture of 20 fatty acids. The relative amount of each fatty acid (% of total fatty acid) was quantified by integrating the area under the peak and dividing the result by the total area for all fatty acids.

Urinary albumin was measured in 24-h timed sterile urine samples by immunoturbidimetry (Sera-Pak immuno microalbuminuria; Bayer, Tarrytown, NY; mean intra-assay and interassay coefficients of variation 4.5 and 11.0 %, respectively). Microalbuminuria was considered to be present when UAER

measurement was 20–200 µg/min at least twice in a 6-month period. Plasma glucose level was determined by a glucose oxidase method, serum creatinine level by the Jaffé reaction, glycated hemoglobin (GhB) by an ion exchange high-performance liquid chromatography procedure (Merck-Hitachi L-9100 glycated hemoglobin analyzer, reference range 2.7 – 4.3%; Merck, Darmstadt, Germany), and fructosamine by a colorimetric method (normal range 1.87 – 2.87 mmol/l). Urinary urea was measured by an enzymatic ultraviolet method (mean intra-assay coefficient of variation 3.8%). The protein intake was calculated using 24-h urine by the following formula: protein intake (g/day) = nitrogen intake x 6.25. The nitrogen intake was estimated by urinary urea nitrogen + non-urea nitrogen, where urinary urea nitrogen = urinary urea / 2 and non-urea nitrogen = 0.031 g N /kg body weight /day, assuming patients presented nitrogen balance (16).

Genotype Analysis

The genotype analysis of the amino acid variant (A54T) of the fatty acid-binding protein type 2 (FAPB2) gene was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification using 100 ng of genomic DNA extracted from peripheral leukocytes and specific primers (5'- ACAGGTGTTAATATAGTGAAAAG-3 and 5'- TACCCTGAGTTCAGTTC CGTC-3') for exon 2 (22). Each PCR reaction contained 1 µM of each primer, 2 mmol/l MgCl₂, 50 mmol/l KCl, 20 mmol/l Tris-HCl pH 8.4, 0.2 mmol/l of dNTPs and 1 IU Taq polymerase in a final volume of 25-50 µl (GIBCO, BRL). Reactions were performed in a thermal cycler (PTC-100 apparatus, MJ Research, Watertown, MA, EUA) at 94°C (1 min), 64 °C (1min), and 72 °C (1min) for 35 cycles; a final extension was carried out for 5 min at 72°C. T alleles were displayed as an uncut 180 bp fragment and A alleles were shown as a doublet of 99

and 81 bp bands. Patients were classified in groups of AA or AT and TT according to the presence of the alleles. All amplification reactions were performed twice.

Statistical analysis

The characteristics of normoalbuminuric and microalbuminuric patients were analyzed using the unpaired Student's *t* test or Mann-Whitney's test, χ^2 tests or Fisher's exact test as appropriate. The Pearson correlation coefficient was used for testing the relationships among the different fatty acid fractions. P values < 0.05 were considered to be statistically significant. Multiple logistic regression analysis was performed with microalbuminuria as the dependent variable and possible associated factors were selected according to their significance (P < 0.10) in univariate analyses. Results were expressed as medians and 95% CI or means \pm SD unless otherwise stated. SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, IL) was used for the analyses.

Results

Patient characteristics

The main clinical and laboratory characteristics of normoalbuminuric and microalbuminuric patients are shown in Table 1. All women were postmenopausal and only 2 (one normoalbuminuric and one microalbuminuric) were using hormone replacement therapy (conjugated estrogens). The microalbuminuric patients were more often treated with insulin and presented higher levels of fructosamine and GHb than the normoalbuminuric patients. Anti-hypertensive treatment was calcium channel blockers, diuretics, direct vasodilators, ACE inhibitors, and beta-blockers. No difference was observed in the proportion of anti-hypertensive drugs used by normo- and microalbuminuric patients.

Serum lipid levels

Serum lipid levels are shown in Table 1. No difference was observed between normo and microalbuminuric patients regarding serum levels of apolipoprotein B, total cholesterol, HDL cholesterol and fractions, LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and triglycerides.

Fatty acid composition

The fatty acid composition of phospholipid, triglyceride and cholesterol ester fractions is described in Table 2. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) tended to be lower and saturated fatty acids (SFA) higher in all fractions of microalbuminuric diabetic patients, but statistical significance was observed only for triglyceride fractions.

In triglyceride fraction, a lower proportion of PUFA was observed in microalbuminuric than in normoalbuminuric patients. This reduction was mainly due to a decrease in the proportion of n-6 fatty acids in microalbuminuric patients as compared to normoalbuminuric patients. Analyzing individual n-6 family fatty acids in the triglyceride fraction, it was observed that the proportion of linoleic ($19.1 \pm 10.1\%$ vs. $23.7 \pm 10.6\%$; $P = 0.066$), γ -linolenic [0.23% ($0 - 0.39$) vs. 0.54% ($0.01 - 0.93$); $P = 0.054$], eicosadienoic ($0.69 \pm 0.82\%$ vs. $1.30 \pm 1.75\%$; $P = 0.067$) and arachidonic acids [1.09% ($0.61 - 2.21$) vs. 1.20% ($0.61 - 2.21$); $P = 0.069$] also tended to be lower in microalbuminuric patients, although without statistical significance.

On the other hand, the proportion of SFA in the triglyceride fraction was higher in microalbuminuric than normoalbuminuric patients. The proportion of monounsaturated fatty acids (MUFA) was similar in microalbuminuric patients and in normoalbuminuric patients. In a multiple logistic regression analysis, the

proportion of PUFA in triglyceride fraction (OR = 0.92; 95%CI = 0.85-0.98; P = 0.019) was the only factor associated with microalbuminuria. SFA (OR = 1.01; 95%CI = 0.96 – 1.06; P = 0.647), BMI (OR = 1.15; 95%CI = 0.97-1.37; P = 0.106), and GHb (OR = 1.60; 95%CI = 0.86 – 2.96; P = 0.137) were excluded from the model.

In cholesterol ester fraction, the proportion of total PUFA tended to be lower in microalbuminuric than in normoalbuminuric patients, although without statistical significance (P = 0.111). However, the level of n-3 fatty acids was lower in microalbuminuric than in normoalbuminuric patients. No difference was observed between normo- and microalbuminuric patients in terms of other groups of fatty acids (n-6 family, SFA, and MUFA). Analyzing individual fatty acid composition, it was observed that the proportion of γ -linolenic acid (C18:3 n-6) was lower in microalbuminuric patients [0.46% (0-0.75)] than in normoalbuminuric patients [0.57% (0.36-1.02); P = 0.028]. The proportion of long-chain n-3 fatty acids was similar in both groups of patients, although the median proportion of docohexaenoic acid (22:6n-3) tended to be lower (P = 0.112) in microalbuminuric [0.76% (95%CI: 0 – 5.40)] than in normoalbuminuric patients [1.03% (95%CI: 0.40 – 6.93)].

In phospholipid fraction, fatty acid composition (SFA, MUFA and PUFA) was similar in normo and microalbuminuric patients. The analysis of individual fatty acids revealed that the microalbuminuric patients did not present any detectable amount of n-3 α -linolenic acid (C18:3 n-3).

When the proportion of fatty acids was compared in different lipid fractions, we observed a significant positive correlation between triglyceride and phospholipid fractions regarding SFA ($r = 0.356$; P = 0.003) and PUFA content ($r = 0.566$; P < 0.001). A positive correlation was also observed between triglyceride and cholesterol

ester fractions concerning the proportion of SFA ($r = 0.351$; $P = 0.003$) and PUFA ($r = 0.215$). However, the significance of this correlation was marginal for the proportion of PUFA ($P = 0.07$).

Genotype analysis

FAPB2 polymorphism was determined in 69 patients, with the following distribution: AA, 29 patients (42.0%); AT, 37 patients (51.4%); and TT, 3 patients (4.2%). The frequency of allele A was 0.69. The frequency of allele T was 0.31. The observed genotype distribution was in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype distribution of FAPB2 gene polymorphism according to the presence of the T allele was similar in microalbuminuric patients (58.8%) and normoalbuminuric patients (57.1%; $P > 0.05$).

Characteristics of the diet

According to the weighed diet records, normoalbuminuric and microalbuminuric patients had a similar intake of total energy ($1,699 \pm 436$ vs. $1,660 \pm 427$ kcal); carbohydrate (50.03 ± 6.47 vs. $48.46 \pm 5.33\%$); protein (21.75 ± 3.59 vs. $22.95 \pm 3.62\%$); fat (28.63 ± 5.59 vs. $28.60 \pm 5.28\%$); SFA (8.32 ± 2.30 vs. $8.41 \pm 2.05\%$); MUFA (9.62 ± 2.42 vs. $9.92 \pm 2.41\%$); PUFA (7.89 ± 2.30 vs. $7.49 \pm 2.18\%$); and cholesterol [174 mg ($150 - 224$) vs. 186 mg ($1156 - 263$)].

Total protein intake (g/kg body weight) assessed by nitrogen output and by weighed diet records was similar in normoalbuminuric (1.25 ± 0.3 vs. 1.31 ± 0.3 ; $P > 0.05$) and microalbuminuric patients (1.31 ± 0.4 vs. 1.25 ± 0.3 ; $P > 0.05$).

Discussion

In this sample of microalbuminuric type 2 diabetic patients, a lower proportion of PUFA, especially from the n-6 family, and a higher proportion of SFA were

observed in triglyceride fraction. As far as we know, this is the first study to address fatty acid composition in type 2 diabetic patients with microalbuminuria.

Abnormal fatty acid composition has been described in type 2 diabetic patients in general. The most consistent findings of previous studies are changes in the n-6 family of fatty acids: lower proportion of PUFA – linolenic acid – in cholesterol ester (17) and in phospholipid fractions (18, 19), and higher content of highly unsaturated fatty acids derived from linoleic acid. This has been attributed to an increase in the elongation and desaturation process (18) or to a higher intake of SFA (17). Other studies have reported a decreased level of total PUFA, mainly of the n-6 family, in type 2 diabetic patients with dyslipidemia (20). However, renal status, and especially albuminuria, was not evaluated in those studies (17-20); in addition, alterations in fatty acid composition were described in cholesterol ester and phospholipid fractions, but not in triglyceride fraction. As shown in the present study, the fatty acid alterations in microalbuminuric patients were only significant in triglyceride fraction, although a similar non-significant pattern was also observed in cholesterol ester and phospholipid fractions. Moreover, a positive correlation was observed between triglyceride and phospholipid fractions in terms of the proportion of SFA and PUFA, and between triglyceride and cholesterol ester fractions in terms of the proportion of SFA, as also demonstrated by others (17). These observations suggest that the fatty acid composition of different lipid fractions behaves similarly.

The composition of fatty acids in triglyceride fraction depends on the diet and on the metabolic process of fatty acid synthesis and elongation, desaturation and oxidation (21). The lower proportion of PUFA and n-6 family fatty acids in microalbuminuric type 2 diabetic patients was not associated with different fatty acid composition of the diet, since both normo- and microalbuminuric patients followed a

similar standardized diet. According to the weighed dietary records, the intake of different fatty acids was similar in normo- and microalbuminuric patients. Therefore, the lower proportion of PUFA in the triglyceride fraction of microalbuminuric patients was probably related to a shift in metabolism, or, alternatively, could have been related to a decrease in the intestinal absorption of these fatty acids.

Absorption of fatty acids across the intestinal mucosa is carried out by FABP2. This intracellular protein is only expressed in the intestine, and it binds to fatty acids in a non-covalent reaction with saturable kinetics. The G to A polymorphism of codon 54 of the FABP2 gene (A54T) results in the substitution of an alanine (A) for a threonine (T) in FABP2. The presence of the T-54 allele of FABP2 has been associated with increased affinity of FABP2 for long-chain fatty acids (22) and with elevated fasting plasma triglyceride levels in patients with type 2 diabetes (23). In the present study, the proportion of normo- and microalbuminuric patients presenting the codon 54 polymorphism was not different. Therefore, it is very unlikely that our results were influenced by different absorption of fatty acids.

The changes in fatty acid composition observed in this study were mainly related to n-6 fatty acids. Linoleic acid is the precursor of this family of fatty acids (21). The proportion of linoleic acid was similar in normo- and microalbuminuric patients; therefore, the lower content of other n-6 fatty acids was probably due to alterations in the metabolic pathways involved in the synthesis and metabolism of the n-6 family of fatty acids (24).

Microalbuminuric patients had higher levels of fructosamine and GHb, indicating a less well-controlled metabolic state. However, these differences were minimal and probably did not affect the results, since the significance of the association between GHb and microalbuminuria was lost in the multiple regression

analysis. Furthermore, other authors have also reported that metabolic control did not influence the fatty acid composition of plasma lipid fractions in diabetic patients (20, 25).

The lower proportion of n-6 family PUFA in these microalbuminuric patients might affect renal function through the arachidonic acid cascade. A reduced production of prostacyclin, an arachidonic acid derivative with vasodilatory and platelet inhibition properties, has been described in microalbuminuric patients (26). Furthermore, lower levels of n-6 acids are also associated with altered blood viscosity, decreased membrane fluidity, and endothelial dysfunction (27). In fact, we have previously reported that endothelin 1, a marker of endothelial function, was increased in dyslipidemic type 2 diabetic patients and related to higher levels of albuminuria (28). Prospective studies should be conducted to analyze the possible role of lipid fraction fatty acid composition as a risk factor for the development of cardiovascular events and/or microalbuminuria in type 2 diabetic patients.

The lipid profile of our microalbuminuric type 2 diabetic patients was not different from that of normoalbuminuric patients. Other studies have reported the presence of dyslipidemia in microalbuminuric type 2 diabetic patients (2,5,6). However, there is no information about the dietary intake in some of those studies (2,6). The increased level of triglycerides and low levels of HDL reported in lean microalbuminuric Japanese patients (5) could be explained (29) in part by a higher carbohydrate intake (60 vs. 50%) as compared to the present study.

In conclusion, type 2 diabetic patients with microalbuminuria presented lower levels of PUFA, especially of the n-6 family, in triglyceride fraction. Lower levels of PUFA in triglyceride fraction may represent a risk factor for cardiovascular disease

and may contribute to the progression of renal disease in type 2 diabetic patients with microalbuminuria.

Acknowledgments: This study was partially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Projeto de Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia, and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. TZ, VM, MP, JA were recipients of scholarships from Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior. We thank Clarissa Capp and Paula Eichler for the genotype analyses of the FABP2 gene.

Table 1: Clinical, laboratory characteristics and lipid profile of type 2 diabetic patients

	Normoalbuminuric	Microalbuminuric	P
	(n = 37)	(n = 35)	
Age (years)	58.9 ± 10.1	56.0 ± 9.3	0.207
Gender (male)	18 (48.6%)	20 (57.1%)	0.490
Diabetes duration (years)	10.6 ± 7.5	11.5 ± 7.7	0.650
Hypertension	21 (56.8%)	22 (62.9%)	0.637
Diabetes treatment (D/OA/I/I+OA)	5/28/0/4	2/16/7/10	0.003
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 3.5	27.9 ± 2.7	0.052
Fasting plasma glucose (mg/dl)	121 ± 34	124 ± 32	0.698
Fructosamine (mmol/l)	3.07 ± 0.54	3.39 ± 0.54	0.015
Glycohemoglobin (%)	4.97 ± 0.78	5.50 ± 1.28	0.041
Serum creatinine (mg/dl)	0.87 ± 0.19	0.88 ± 0.18	0.587
24h – UAER (µg/min)	6.38 (3.78 – 7.66)	51.4 (31.9 – 81.4)	
Apolipoprotein B (mg/dl)	114 ± 31	124 ± 30	0.177
Cholesterol (mg/dl)	196 ± 39	203 ± 35	0.432
Triglycerides (mg/dl)	120 (92 – 195)	122 (88 – 175)	0.818
HDL (mg/dl)	52 ± 20	49 ± 16	0.572
HDL ₂ (mg/dl)	14 ± 13	11 ± 12	0.342
HDL ₃ (mg/dl)	37 ± 15	38 ± 13	0.740
LDL (mg/dl)	113 ± 32	124 ± 29	0.157
Non-HDL cholesterol (mg/dl)	144 ± 39	153 ± 35	0.305
Cholesterol/HDL ratio	4.22 ± 1.61	4.36 ± 1.05	0.672

Data are expressed as mean ± SD, median (95% CI) or number of patients (%) with the characteristic. BMI: body mass index; UAER: urinary albumin excretion rate; D/OA/I/I+OA: diet only/oral antidiabetic agents/insulin/insulin associated with oral antidiabetic agent.

Table 2: Fatty acid composition (% of the total amount of fatty acids) in lipid fractions in type 2 diabetic patients with normoalbuminuria and microalbuminuria

	Nornoalbuminuric (n = 37)	Microalbuminuric (n = 35)	P
Triglyceride fraction			
SFA	34.70 ± 13.09	43.38 ± 18.04	0.022
MUFA	31.20 ± 13.21	31.83 ± 13.37	0.840
PUFA	34.10 ± 11.31	24.79 ± 11.01	0.001
PUFA n-6	31.36 ± 11.45	21.67 ± 10.55	<0.0001
PUFA n-3	2.09 ± 3.40	2.20 ± 5.50	0.920
Cholesterol ester fraction			
SFA	21.77 ± 9.83	26.15 ± 11.42	0.085
MUFA	17.25 ± 10.20	17.92 ± 12.08	0.799
PUFA	60.98 ± 13.15	55.62 ± 14.95	0.111
PUFA n-6	54.29 ± 14.76	51.72 ± 14.76	0.463
PUFA n-3	5.98 ± 6.56	3.44 ± 3.39	0.044
Phospholipid fraction			
SFA	54.23 ± 14.13	57.29 ± 16.48	0.406
MUFA	11.49 ± 11.01	11.63 ± 11.09	0.958
PUFA	34.28 ± 11.93	30.74 ± 12.85	0.236
PUFA n-6	31.94 ± 10.77	28.44 ± 11.79	0.199
PUFA n-3	1.93 ± 1.89	1.87 ± 1.44	0.876

Data are expressed as mean ± SD. SFA: Saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

References

1. Mogensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity onset diabetes. *N Engl J Med* 310: 356-60, 1984
2. Mattock MB, Morrish NJ, Viberti GC, Kenn H, Fitzgerald AP, Jackson G: Prospective study of microalbuminuria as predictor of mortality in NIDDM. *Diabetes* 41:736-41, 1992
3. Gall MA, Borch-Johnsen K, Hougaard P, Nielsen FS, Parving HH: Albuminuria and poor glycemic control predict mortality in NIDDM. *Diabetes* 44:1303-1309, 1995
4. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH: Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 51:1157-1165, 2002
5. Kasiwazaki K, Hirano, T, Yoshino G, Kurokawa M, Tajima H, Adachi M: Decreased release of lipoprotein lipase is associated with vascular endothelial damage in NIDDM patients with microalbuminuria. *Diabetes Care* 21:2016-2020, 1998
6. Niskanen, L, Uusitupa M, Sarlund H, Siitonen O, Voutilainen E, Penttilä I, Pyörälä K: Microalbuminuria predicts the development of serum lipoprotein abnormalities favouring atherogenesis in newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 33:237-243, 1990
7. Möllsten AV, Dahlquist GG, Stattin EL, Rudberg S: Higher intake of fish protein are related to a lower risk of microalbuminuria in young Swedish type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 24:805-810, 2001
8. Gross JL, Zelmanovitz T, Moulin CC, De Mello V, Perassolo M, Leitão C, Hoefel A, Paggi A, Azevedo ML: Effect of a chicken-based diet on renal function and lipid

profile in patients with type 2 diabetes: a randomized crossover trial. *Diabetes Care* 25:645-651, 2002

9. Ohrvall M, Berglund L, Salminen I, Lithel H, Aro A, Vessby B: The serum cholesterol ester fatty acid composition but not the serum concentration of alpha tocopherol predicts the development of myocardial infarction in 50-year-old men: 19 years follow-up. *Atherosclerosis* 127:65-71, 1996

10. American Diabetes Association: Medical management of type 2 diabetes. Fourth edition, *Clinical Educational Series*, 1998

11. American Diabetes Association: Nutrition recommendations and principles for people with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 21 (Suppl 1): S32-S35, 1998

12. Moulin CC, Tiskievicz F, Zelmanovitz, Oliveira J, Azevedo MJ, Gross JL: Use of weighed diet records in the evaluation of diets with different protein contents in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 67: 853-7, 1998

13. Folch J, Less M, Stanley S: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509, 1957

14. Skipski VP, Barclay M. Thin Layer Chromatography of Lipids, in Lowenstein JM (ed): *Methods in Enzymology* 14:530-98, 1969

15. Morrison MR, Smith LM: Preparation of fatty acids methyl esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res* 5:600-7, 1968

16. Maroni BJ, Steinman TI, Mitch WE: A method for estimating nitrogen intake of patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 27: 58-65, 1985

17. Salomaa V, Ahola I, Tuomilehto J, Aro A, Pietinen P, Korhonen HJ, Penttila I: Fatty acid composition of serum cholesterol esters in different degrees of glucose intolerance: a population-based study. *Metabolism* 39:1285-91, 1990

18. Pelikánová T, Kohout M, Válek J, Base J, Stefka Z: Fatty acid composition of serum lipids and erythrocyte membranes in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic men. *Metabolism* 40:175-180, 1991
- 19 Pelikánová T, Kazdová L, Chvojková S, Base J: Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 50: 1472–1478, 2001
20. Bohov P, Balaz V, Segokova E, Klimes I: The effect of hyperlipidemia on serum fatty acid composition in type 2 diabetics. *Ann NY Acad Sci* 827:561-7, 1997
21. Jones PJH, Kubow S: Lipids, sterols, and their metabolites, in Williams & Wilkins (ed): *Modern nutrition in health and disease*, 9th edition, Philadelphia. Lippincott, 1998, pp 67 - 94
22. Baier LJ, Sacchettini JC, Knowler WC, Eads J, Paolisso G, Tataranni PA, Mochizuki H, Bennett PH, Bogardus C, Prochazka M: An amino acid substitution in the human intestinal fatty acid binding, increased fat oxidation, and insulin resistance. *J Clin Invest* 95:1281-1287, 1995
23. Georgopoulos A, Aras O, Tsai M: Codon-54 polymorphism of the fatty acid-binding protein 2 gene is associated with elevation of fasting and postprandial triglycerides in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3155–3160, 2000
24. Horrobin DF. Fatty acid metabolism in health and disease: the role of Δ -6-desaturase. *Am J Clin Nutr* 57 (suppl):732S-737S, 1993
25. Faas FH, Dang AQ, Kemp K, Norman J, Carter WJ: Red blood cell and plasma fatty acid composition in diabetes. *Metabolism* 8:711-713, 1988
26. Antonipillai I, Nadler J, Vu EJ, Bughi S, Natarajan R, Horton R: A 12-lipoxygenase product, 12 hydroxyeicosatetraenoic acid, is increased in diabetics with incipient and early renal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1940-1945, 1996

27. Bruckner G: Fatty acid and cardiovascular diseases, in Chow CK (ed): *Fatty acids in foods and their health implications*, 2nd edition, New York. Food Science and Technology, 2000, pp. 843-863
28. Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N: Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 23:1395-1400, 2000
29. Garg A, Bonanome A, Grundy SM, Zhang ZJ, Unger RH: Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 319:829-34, 1988

ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO

O projeto de pesquisa intitulado "Perfil Lipídico de Pacientes com Diabetes Mellito tipo 2: Papel da Nefropatia Diabética e composição Lipídica da Dieta" será desenvolvido dentro do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O aumento da albumina na urina (microalbuminúria) é uma alteração que prevê o aparecimento de complicações renais do diabetes. As complicações renais do diabetes por sua vez, estão intimamente relacionadas aos níveis de gorduras no sangue, que também podem prever o aparecimento de complicações cardíacas ou cerebrais.

Este estudo visa analisar a composição da dieta e o perfil lipídico de pacientes com diabetes mellito tipo 2 com e sem nefropatia.

Para os exames complementares do protocolo, será necessário apenas coleta de sangue, que não envolve qualquer risco de vida para os paciente.

Para análise da composição da dieta, será necessário realizar uma coleta dos alimentos ingeridos durante 02 (dois) dias não consecutivos determinados previamente. Esta coleta ocorrerá na casa do paciente por um técnico habilitado e identificado para tal atividade.

Eu, fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou riscos previstos tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disto, sei que

novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa face à estas informações.

O profissional Dr/Dra.
certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Assinatura do paciente:-----

Assinatura do investigador:-----