

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Curso de Pós-Graduação em Medicina - Clínica Médica**

**Marcadores não-invasivos da disfunção endotelial em pacientes com
diabete melito tipo 2 e em dislipidêmicos - estudo transversal**

Dissertação de Mestrado

**Autora: Dra. Beatriz Graeff Santos Seligman
Professora Orientadora: Dra. Nadine Clausell**

Março, 1998

S465m Seligman, Beatriz Graeff Santos

Marcadores não invasivos da disfunção endotelial em pacientes com diabetes melito tipo 2 e em dislipidêmicos : estudo transversal / Beatriz Graeff Santos Seligman ; orient. Nadine Clausell. – Porto Alegre : UFRGS, 1998.

70 f. : 03 il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Diabetes mellitus não insulino-dependente. 2. Disfunção endotelial. 3. Hiperlipidemia. 4. Endotelina-1. 5. Fator de von Willebrand. I. Clausell, Nadine. II. Título.

NLM: WK 810

Catálogo na fonte Biblioteca FAMED/HCPA

Memória

**Aos meus queridos pais, Leda e
Glauco, por tudo.**

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste trabalho, eu tive muita sorte em contar com o auxílio de várias pessoas, a quem desejo neste momento agradecer.

Aos estudantes de Medicina Mariana Dagnino Araujo, Carlos Eduardo Niederauer e Leticia Perondi Luz, pelo auxílio na fase de entrevistas e coletas de sangue e urina. Ao Dr. André Luiz Souza e à coletadora Maria Luíza Rodrigues Moura, do Setor de Coleta do HCPA.

Ao Professor Arnaldo Zaha, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, agradeço a confiança e o empréstimo da centrífuga de evaporação, que possibilitou a extração da Endotelina-1 em Porto Alegre.

Em especial aos professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina-Clinica Médica Maria Inês Schmidt, Bruce Duncan, Carlos Fernando Francisconi e José Roberto Goldim, pelo aprendizado prazeroso.

À Dra. Sandra Silveiro e colegas do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio na fase de delineamento do projeto.

À minha orientadora, Professora Nadine Clausell, que em todas as fases deste trabalho esteve junto de forma entusiástica, agradeço por sua competência, pela grande capacidade profissional, pela confiança, pelo estímulo (e pressão) e, sobretudo, por ter permitido que este trabalho pudesse ser concluído em tempo hábil sem deixar de respeitar as fases em que o mesmo precisou ser relegado a um segundo plano. Com certeza saio enriquecida deste convívio, e aprendi o modelo de orientação por excelência de um trabalho científico.

Ao Dr. Jarbas Oliveira e aos colegas dos Setores de Bioquímica, Imunologia e Banco de Sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e ao Laboratório Weinmann pela execução da glicohemoglobina.

À estaticista Luciana Nucci, pela competência, profissionalismo e paciência durante as intermináveis análises dos resultados. Ao Dr. Murilo Foppa, pela amizade e auxílio na limpeza dos dados. À Lena, pela confiança serena, sempre.

Finalmente, o agradecimento especial à acadêmica de Medicina Andréia Biolo, que participou de todas as suas fases com maturidade, companheirismo e competência. Tenho certeza que sem ela, esse trabalho não teria saído.

Sobretudo, ao meu marido, Renato e ao nosso filho, Gustavo, por estarem ao meu lado no tempo compartilhado ou não, e pela sorte de ter com quem contar.

SINOPSE

Introdução

A disfunção endotelial é uma alteração presente no processo aterosclerótico. Entretanto, não está claro se a associação do diabetes com a dislipidemia configura um estado mais agressivo ao endotélio vascular do que cada um destes fatores de risco isoladamente. As investigações que têm sido realizadas avaliando esta questão em geral têm utilizado estudos invasivos comparando a resposta do endotélio à infusão de acetilcolina e nitratos, de difícil aplicabilidade clínica. Outros estudos têm envolvido o uso de marcadores não-invasivos de disfunção endotelial, como a dosagem da Endotelina-1 (Et-1) e do Fator de von Willebrand (FvW), em grupos isolados - diabéticos ou dislipidêmicos - sem compará-los, e em amostras com potenciais fatores de confusão, como a presença de hipertensão, obesidade, fumo e uso de insulina.

Objetivos

Este trabalho teve por objetivo avaliar se pacientes com diabetes tipo 2 portadores de dislipidemia apresentam maior disfunção endotelial, caracterizada por níveis mais elevados de Et-1 e FvW, quando comparados a pacientes dislipidêmicos e a controles normais.

Pacientes e Métodos

Realizamos um estudo transversal controlado, em que os fatores avaliados são o diabetes melito tipo 2 e a dislipidemia, sendo o desfecho a disfunção endotelial, representada por concentrações mais elevadas do FvW e da Et-1. Foram comparados três grupos: indivíduos dislipidêmicos com diabetes melito tipo 2 sem uso de insulina, pacientes não diabéticos com dislipidemia e indivíduos saudáveis. Todos eram não fumantes e normoalbuminúricos, com índice de massa corporal (IMC) inferior a 32. Aceitaram participar do trabalho através de consentimento informado por escrito, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os indivíduos foram submetidos a um questionário padrão avaliando fármacos em uso, tempo de duração do diabetes e história familiar, história de retinopatia, questionário Rose para avaliação de cardiopatia isquêmica e doença vascular periférica, questionário para avaliação de neuropatia e exame físico que avaliou peso, altura e cálculo do IMC, pressão arterial, pulsos, reflexos tendinosos e sensibilidade vibratória. Aqueles que não se sabiam diabéticos realizaram teste oral de tolerância à glicose, sendo excluídos os que apresentavam tolerância diminuída à glicose. Todos submeteram-se a avaliação laboratorial que constou de medida da glicemia, glicohemoglobina, colesterol e frações, triglicérides, uréia, creatinina, insulina, peptídeo C, fibrinogênio, e excreção urinária da albumina (EUA)/creatinina na urina, em urina estéril. Os indivíduos eram normotensos, sem perda de função renal, evento vascular recente ou doenças concomitantes, sem uso de fármacos hipolipemiantes, bloqueadores do cálcio ou da enzima de conversão da angiotensina. O sangue foi centrifugado e o plasma mantido estocado a -70 °C, com análise posterior, em tempo

único, da Endotelina-1 e do Fator de von Willebrand (ELISA) , com examinadores sob mascaramento.

Resultados

Foram incluídos 75 indivíduos, divididos nos três grupos: a)35 pacientes com dislipidemia e diabetes melito tipo 2 (idade 57 ± 7 anos, colesterol total (CT)225 mg/dl, LDL-colesterol (LDL-C) 150 ± 46 mg/dl; HDL colesterol (HDL-C) 44 mg/dl; triglicérides (TG) 179 mg/dl e IMC= $28,4\pm 3,6$) ; b)21 pacientes com dislipidemia (idade 52 ± 7 anos, CT 247 mg/dl; HDL-C 47 mg/dl, LDL-C 200 ± 43 mg/dl; TG 128 mg/dl e IMC= $27,2\pm 3,2$); c) 19 controles normais (idade 45 ± 4 anos; CT 167 mg/dl; LDL 98 ± 30 mg/dl; HDL-C 48 mg/dl; TG 75 mg/dl e IMC= $24,2\pm 2,2$).

Os pacientes com dislipidemia e diabetes melito tipo 2 apresentaram níveis de FvW de 185,9%, enquanto os dislipidêmicos apresentaram níveis de 169,2% e os controles de 129,6%. Esta diferença foi significativa (Kruskall-Wallis, $p=0,02$) entre diabéticos e controles. Não houve diferença entre os dislipidêmicos e controles normais, nem entre os diabéticos e os dislipidêmicos não diabéticos.

Quanto à Endotelina-1, os diabéticos apresentaram níveis de 1,61 pg/ml, enquanto os dislipidêmicos tiveram 0,91 pg/ml e os controles 0,68 pg/ml. Esta diferença foi significativa tanto comparada a dislipidêmicos como contra controles normais (Kruskall-Wallis, $p=0,00008$). Não houve diferença entre dislipidêmicos e controles normais na correção *post-hoc*.

Uma vez que houve diferença entre os grupos com relação ao índice de massa corporal, idade, pressão arterial sistólica, peptídeo C, triglicérides e fibrinogênio, foi

realizada regressão logística, para controle das variáveis de confusão. A análise multivariada mostrou que apenas o peptídeo C e os triglicérides representaram risco significativo ($p=0,01$ e $p=0,03$, respectivamente) para os níveis de Endotelina-1 entre os grupos. Já para os níveis do Fator de von Willebrand, nenhuma variável alcançou significância.

Conclusão

A avaliação não-invasiva da função endotelial através da medida do FvW, mostrou diferença apenas entre diabéticos e controles. Não houve diferença significativa entre os níveis da Et-1 e FvW dos dislipidêmicos em relação aos controles normais.

Nossos dados demonstram que os pacientes com diabetes melito tipo 2 associado à dislipidemia têm maior grau de disfunção endotelial, representada por níveis mais elevados de Et-1, quando comparados a dislipidêmicos e a controles normais. Estes resultados se mantêm mesmo quando controlados para a idade, índice de massa corporal e fibrinogênio. Os triglicérides e o peptídeo C representam fator de risco para a diferença nos níveis da Endotelina-1 entre os grupos, mas não para o Fator de von Willebrand.

ABSTRACT

Background

Endothelial dysfunction is an important feature of atherosclerosis. However, it is unclear whether the association of the diabetic state and dyslipidaemia configures a more aggressive threat to the vascular endothelium as compared to each state individually. There are no data using non-invasive studies assessing these different populations with comparable risk factors for atherosclerosis, without confounding factors, such as insulin use, smoking, obesity or high blood pressure.

Objectives

We undertook a cross-sectional study to address the question whether type 2 diabetics with dyslipidemia have more pronounced endothelial dysfunction, assessed by higher levels of Endothelin-1 (Et-1) and von Willebrand Factor (vWF), as compared to dyslipidemic non-diabetic patients and normal subjects.

Patients and methods

Seventy-five nonsmokers, normotensive and normoalbuminuric subjects, divided in three groups were studied: dyslipidemic type 2 diabetics, non-diabetics with dyslipidemia and normal controls. All gave informed written consent, and the study was approved by the Institutional Review Board of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All subjects filled a standard questionnaire to evaluate drugs in use, known

duration of diabetes and family history , a WHO questionnaire to assess cardiovascular status and a standard questionnaire to assess symptoms of neuropathy. All subjects underwent physical examination. Peripheral pulses and reflexes were evaluated. OGTT were done to exclude diabetes and impaired glucose tolerance. BMI ≥ 32 , insulin and vastatin users were excluded. Laboratory tests were performed, including fasting glucose, C-peptide, insulin, fibrinogen, total cholesterol and fractions, creatinin, HbA1c and urinary measurement of albumin excretion/urinary creatinine on a random sterile specimen. Blood was centrifugated and plasma frozen at -70°C to posterior simultaneous analysis by blinded examiners for Et-1 and vWF (ELISA).

Results

Seventy-five subjects were included, and they were divided in three groups: a) type-2 diabetics with dyslipidemia (n=35, age 57 ± 7 , total cholesterol (T chol) 225 mg/dl, LDL 150 ± 46 mg/dl, HDL 44 mg/dl, tryglicerides 179 mg/dl, BMI= $28,4\pm 3,6$); b) dyslipidemic patients (n=21, age 52 ± 7 years, T chol 247 mg/dl, LDL 200 ± 43 mg/dl, HDL 47 mg/dl, tryglicerides 128 mg/dl, BMI= $27,2\pm 3,2$); c) normal controls (n=19, age 45 ± 4 years, T chol 167 mg/dl, LDL 98 ± 30 mg/dl, HDL 48 mg/dl tryglicerides 75 mg/dl, BMI= $24,2\pm 2,2$). All subjects were normotensive, non-smokers and normoalbuminurics.

Diabetics had higher levels of vWF (185.9%; 168.2%; 129.6%) as compared with controls($p=0.02$). On the other hand, they had also more pronounced differences assessed by levels of ET-1 (1.61; 0.91; 0.68 pg/ml) as compared to both other groups

($p=0,0008$). These values are maintained after multivariate analysis and control for age, BMI, and fibrinogen levels. However, C-peptide ($p=0,01$) and tryglicerides ($p=0,03$) were important for endothelin-1 values.

Conclusions

Diabetics had higher vWF levels as compared to normal controls. We found no difference on Et-1 and vWF levels between dyslipidemic and controls. Our data suggests that the association between the diabetic millieu and dyslipidaemia represents a higher threat to the vascular endothelium when compared to each state individually, as assessed by non-invasive evaluation measuring Et-1.

ABREVIATURAS

CI 95% - intervalo de confiança de 95%

CT - Colesterol total

DM 2 - Diabetes melito tipo 2

EDRF - “Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio”

ELISA - Enzima imuno-ensaio

Et-1 - Endotelina-1

EUA - Excreção urinária de albumina

FvW - Fator de von Willebrand

HbA1C - Glicohemoglobina

HDL-C - Colesterol HDL, ou lipoproteína de alta densidade

IMC - Índice de massa corporal

LDL-C - Colesterol LDL, ou lipoproteína de baixa densidade

LDL-Ox - Partículas LDL-oxidado

NO - Óxido nítrico

NS - Não-significativo ($p>0,05$)

OGTT- Oral glucose tolerance test: teste oral de tolerância à glicose

PAD - Pressão arterial diastólica

PAS - Pressão arterial sistólica

RC - Razão de chances

TG - Triglicérides

VLDL - Colesterol VLDL, ou Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela I. Características clínicas da amostra	27
Tabela II. Características laboratoriais da amostra	29
Tabela III. Descrição do perfil lipídico dos grupos	30
Tabela IV. Fator de von Willebrand ajustado para as variáveis de confusão	35
Tabela V. Endotelina-1 ajustada para as variáveis de confusão	36
Figura 1. Frequência das complicações crônicas nos grupos estudados	28
Figura 2. Níveis do Fator de von Willebrand nos três grupos	32
Figura 3. Níveis da Endotelina-1 nos três grupos	33

ÍNDICE

SINOPSE	i
ABSTRACT	v
ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	ix
INTRODUÇÃO	1
Diabete melito e aterosclerose	1
Endotélio e aterosclerose	3
Insulina e aterosclerose.....	5
Hipercolesterolemia e disfunção endotelial.....	8
Endotelina-1 e Fator de von Willebrand	10
Dislipidemia, diabete melito, insulina e aterogênese	13
HIPÓTESE	15
OBJETIVOS	16
Objetivo geral.....	16
Objetivos específicos.....	16
PACIENTES E MÉTODOS	17
Delineamento do estudo.....	17
Pacientes	17
Métodos.....	19
Análise estatística.....	23
Aspectos bioéticos	23
RESULTADOS	25
Características clínicas da amostra.....	25
Frequência das complicações crônicas da amostra.....	25
Características laboratoriais da população estudada	26

Marcadores não invasivos de disfunção endotelial na amostra.....	31
Ajuste para as variáveis de confusão entre os grupos	34
DISCUSSÃO.....	37
Características clínicas da amostra e possíveis vieses	37
Endotelina-1 e Fator de von Willebrand	40
Insulina, triglicérides e fibrinogênio	41
Lípides e disfunção endotelial	42
Limitações do estudo	44
Considerações metodológicas e outros estudos.....	45
CONCLUSÕES.....	47
ESTUDOS FUTUROS.....	48
ANEXO 1	49
ANEXO 2	50
ANEXO 3	51
ANEXO 4	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

INTRODUÇÃO

Diabete melito e aterosclerose

O diabete melito é fator de risco para aterosclerose, aumentando em três a cinco vezes o risco para cardiopatia isquêmica(1). O diabete melito tipo 2 (DM 2) está associado a aumento da incidência de doença cardiovascular total em duas a três vezes, além de considerável redução na expectativa de vida, mesmo quando esta análise é controlada para outros fatores de risco(2-4). Entretanto, os mecanismos para uma presumível aceleração do processo aterosclerótico não são bem elucidados, e envolvem várias teorias. Atribui-se papel importante à hiperglicemia em si, à insulina e ao estado de resistência à insulina, bem como a alterações mais complexas nos lípidos, na oxidação do LDL colesterol e nos triglicérides, ou a alterações estruturais na parede dos vasos, e disfunção primária nas respostas do endotélio em pacientes com diabete (5,6).

Estudos clínicos demonstram que os grandes vasos de pacientes diabéticos são mais rígidos em relação a controles, sendo este achado correlacionado com a duração da doença. Da mesma forma, maior espessamento vascular foi demonstrado mesmo na ausência de placa aterosclerótica em diabéticos, assim como alterações *in vitro* mostrando mudanças na túnica média e na matriz dos vasos de diabéticos (7,8). Também são descritos outros possíveis mecanismos, desde um perfil lipídico aterogênico, alterações qualitativas nas lipoproteínas, maior agregabilidade plaquetária, liberação de tromboxane e PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio -1) - o que, em suma, promoveria um estado pró-coagulante acompanhando o meio

diabético (9-11). É possível que haja na realidade uma interação entre vários fatores de risco ao longo dos anos, além da presença do diabetes em si, para promover trombose e aterosclerose nestes pacientes.

A maior parte dos indivíduos com diabetes melito tipo 2 morre devido a complicações macrovasculares da doença, embora a patogênese de tal processo não esteja completamente elucidada. Pode-se crer que, além dos mecanismos anteriormente citados, uma doença vascular mais acelerada seja resultante de interações complexas entre distúrbios metabólicos como a hiperglicemia, mutações nos genes que controlam o metabolismo lipídico e mecanismos de defesa antioxidantes, além de respostas alteradas por parte do endotélio (12).

Um maior risco cardiovascular parece não depender apenas da presença do diabetes em si. A “Síndrome metabólica” ou “Síndrome X” - associação entre obesidade, hipertensão arterial, dislipidemia, alteração no metabolismo dos carboidratos e hiperinsulinismo - é uma condição que se acompanha por risco cardiovascular significativo mesmo antes de um diagnóstico clínico de DM 2. Deve-se mencionar também que hiperglicemia assintomática determina risco cardiovascular maior que o da população em geral, independente dos demais fatores de risco, e pacientes com diminuição da tolerância à glicose têm risco cardiovascular equivalente ao de diabéticos (13).

Uma forma de explorar um papel causal para a hiperglicemia seria correlacionar os níveis glicêmicos com o desenvolvimento de cardiopatia isquêmica em estudos observacionais a longo prazo. Embora esta observação possa apenas sugerir uma relação causa-efeito, permite estabelecer uma base para intervenção e para um possível papel da glicose elevada na promoção de eventos ateroscleróticos. No que tange a doença microvascular, no diabetes tipo 1, pode-se aceitar que a hiperglicemia é o fator de risco mais identificável, e inúmeros pequenos estudos

especulam o quanto um adequado controle glicêmico possa reduzir as complicações macrovasculares da doença(11).

São conhecidos vários trabalhos correlacionando hiperglicemia em jejum ou resistência à insulina com cardiopatia isquêmica em diferentes populações (11,12). As teorias que buscam avaliar os efeitos adversos da hiperglicemia no tecido vascular envolvem a glicação não-enzimática de proteínas intra e extra celulares, o aumento da oxidação dos lípidos e mudanças na concentração de sorbitol-mioinositol levando a alteração no metabolismo da glicose (14) .

Há diferença na evolução da doença aterosclerótica em indivíduos com diabetes em relação a não-diabéticos, mesmo após doença coronariana estabelecida e resposta a intervenção mecânica. Diabéticos tem maiores taxas de reestenose pós angioplastia, dobram a taxa de eventos recorrentes após aterectomia coronariana e apresentam mais reestenose também após colocação de prótese vascular endocoronariana ou angioplastia por laser (15-18).

Endotélio e aterosclerose

O endotélio pode ser entendido como uma estrutura vascular crucial, não apenas por se interpor entre o fluxo sangüíneo e a parede dos vasos, mas também pela produção de mediadores regulando função plaquetária, crescimento vascular e coagulação. O endotélio altera diretamente o tônus vasomotor, a partir da síntese e metabolismo de substâncias vasoativas como a prostaciclina, o “Fator de Hiperpolarização Derivado do Endotélio” e o “Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio” (EDRF), identificado como sendo o óxido nítrico (NO). O NO está

envolvido em eventos maiores do processo aterogênico: inibe a agregação e adesão plaquetária, modula a proliferação de células musculares lisas, atenua a produção de endotelina e modula a adesão de monócitos e leucócitos ao endotélio. Assim, pode se considerar que apresente funções antiateroscleróticas potentes, além de seus efeitos vasodilatadores, via produção de guanilato-ciclase para aumentar o GMP cíclico na musculatura lisa dos vasos (19).

Uma vez que o óxido nítrico é um potente vasodilatador liberado pelo endotélio, com papel pivotal na manutenção da homeostase vascular, diminuição da sua disponibilidade poderia contribuir para a doença vascular do diabetes melito. Múltiplas investigações, tanto em modelos experimentais como em pacientes, têm demonstrado alteração na vasodilatação endotélio-dependente acompanhando o diabetes melito embora o mecanismo exato destas disfunções vasculares ainda permaneça obscuro (20-26). No diabetes tipo 1 (em estudo com controle para níveis de glicose e insulina, potenciais fatores de confusão), a alteração das respostas endotélio-dependentes tem sua magnitude diretamente relacionada à disfunção autonômica e à presença de macroalbuminúria (27). Esse achado permite especular o papel do sistema nervoso autônomo na função endotelial (23).

O processo aterosclerótico é considerado atualmente como uma doença inflamatória, pelo menos parcialmente. A presença de fatores de risco determina estresse ao endotélio, levando à produção de radicais oxigenados e ao recrutamento de células inflamatórias para a parede vascular. Tal processo é mediado pela estimulação de genes redox-sensíveis (28,29). Assim, o endotélio não é apenas um alvo, como também um mediador da aterosclerose.

Dano ou ativação do endotélio altera suas funções regulatórias e resulta em disfunção endotelial. Podemos definir disfunção do endotélio como um descontrole no balanço entre fatores que promovem relaxamento e os que promovem contração, entre

mediadores pró ou anticoagulantes ou entre substâncias que induzem ou inibem crescimento celular. A disfunção endotelial pode ser considerada uma condição *sine qua non* para aterogênese, e tem sido estudada em muitos modelos animais, seja através de exposição a níveis elevados de colesterol, a dano direto nas camadas da parede vascular (com um catéter balão de angioplastia, por exemplo) ou manipulação perivascular (21,23-26,30-35).

Insulina e aterosclerose

Quando o papel da insulina é investigado na patogênese da aterosclerose, as evidências que fortalecem essa associação derivam de estudos epidemiológicos que demonstram hiperinsulinemia como fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular.

Também na síndrome metabólica (36) e em estudos experimentais, demonstra-se que a insulina pode desenvolver ou acelerar o desenvolvimento da aterosclerose, agindo em várias vias bioquímicas que são aterogênicas (37,38).

Vários estudos prospectivos sugerem que a hiperinsulinemia, avaliada em seus níveis basais, seja um fator de risco importante para cardiopatia isquêmica (36), embora outros não tenham confirmado tais achados (39-41). Se o hiperinsulinismo é um fator de risco independente de outros, como redução do HDL colesterol, hipertensão, fumo e elevação dos triglicérides, ainda não está definido.

Assumindo-se que a insulina seja um fator predisponente direto para aterosclerose, o mecanismo pelo qual isto ocorre não está bem elucidado. São explicações possíveis:

1. Elevação dos níveis de insulina e seu papel no aumento de lípidos circulantes e na promoção de sua deposição (elevação dos triglicérides, redução do HDL colesterol, aumento da oxidação do LDL);
2. Efeito estimulador de proliferação das células musculares lisas e maior síntese de proteínas da matriz extracelular;
3. Alteração dos fatores de coagulação sanguínea;
4. Hiperinsulinemia levando a hipertensão;
5. Alteração nas respostas vasculares do endotélio e estimulação da liberação de Endotelina-1 (42,43).

Acredita-se que a hiperinsulinemia promova a aterogênese via estímulo da hiperplasia e hipertrofia das células musculares lisas e aumento da síntese das proteínas da matriz extracelular. Esta teoria é baseada em estudos com culturas de células, mas é questionada pelo fato da insulina ser um agonista leve para as ações de crescimento propostas, e de terem sido utilizadas concentrações supra-fisiológicas da insulina na maior parte dos estudos. Por outro lado, ações vasodilatadoras da insulina são bem reconhecidas, além de sua capacidade de aumentar os níveis do NO, claramente antiaterogênico. Talvez o balanço alterado entre as ações aterogênicas e antiaterogênicas seja o fator mais importante para um maior risco cardiovascular nos estados de resistência à insulina e no diabetes (14,44,45).

Alguns autores sugerem que a capacidade da insulina de promover vasodilatação está diminuída no diabetes e nos estados de resistência à insulina. Especula-se que isso ocorra por diminuição da produção endotelial de NO ou por inativação do endotélio, ou ainda por alterações diretamente relacionadas ao estado de resistência à insulina. Essa teoria pressupõe que, acompanhando o diabetes ou a

resistência à insulina, ao nível da vasculatura, haveria uma diminuição seletiva das ações antiaterogênicas da insulina. A relação entre a ação da insulina e a vasodilatação parece ser mediada pelo NO, que, nos estados de resistência à insulina, estaria defeituosa. Este defeito na vasodilatação insulino-mediada pode contribuir para uma maior resposta pressórica e menor captação da glicose. Ou seja, a insulina em concentrações fisiológicas e nos estados não diabéticos poderia ter ações antiaterogênicas, que seriam perdidas nos estados de resistência à insulina e no diabete (34,46). Uma vez que tais alterações estão relacionadas a uma menor liberação de NO, pode-se aceitar que o órgão alvo nos estados de resistência à insulina seja o endotélio vascular (44).

Baron e colaboradores (44,45,47) demonstraram que a insulina causa uma resposta alterada na vasodilatação endotélio-dependente, sem que efeito semelhante fosse encontrado na vasodilatação produzida por nitroprussiato, endotélio-independente. Com estes estudos, sugere-se que o endotélio seja um verdadeiro tecido alvo da ação da insulina, e não apenas o palco para seus efeitos. A partir daí, aceita-se que a modulação do NO seria alterada nos estados de resistência à insulina, com perda das ações vasodilatadoras e antiaterogênicas do endotélio. Aceitando-se tal proposta, fica mais fácil entender o risco cardiovascular associado a tais condições clínicas. Quando Steinberg e colaboradores compararam pacientes obesos e diabéticos (ambos com resistência à insulina verificada por clamp euglicêmico hiperinsulinêmico), houve uma diferença nítida na vasodilatação endotélio-dependente nos dois primeiros em relação a controles, não sendo notada qualquer diferença na vasodilatação endotélio-independente (45). A habilidade da insulina em aumentar o fluxo foi diretamente relacionada com a sensibilidade à insulina e de forma inversa com a pressão arterial (mesmo em faixa de normotensão) e com o índice de massa corporal. É importante mencionar que a resposta máxima à infusão de acetilcolina (endotélio-

dependente) neste trabalho, teve uma correlação positiva com os níveis de HDL colesterol, e negativa com o LDL-colesterol.

Os resultados deste estudo sugerem que a ação da insulina ao nível da célula endotelial seja de modulação da produção/liberação de NO, e que este efeito seja bloqueado na presença de obesidade ou diabetes melito. O fato de não haver aumento do fluxo sanguíneo dependente do endotélio na presença de grande captação da glicose (estimulada com níveis muito elevados de insulina) no grupo dos diabéticos e obesos sugere que o efeito da insulina na célula endotelial seja independente de seu efeito na captação de glicose, e que o endotélio nas situações de menor sensibilidade à insulina perca o efeito modulador na liberação de NO (45).

Hipercolesterolemia e disfunção endotelial

Morfologicamente, o endotélio se mantém intacto nos estágios iniciais da aterosclerose; funcionalmente, entretanto, ocorrem alterações pronunciadas.

Um modelo animal utilizado para avaliar dislipidemia e disfunção endotelial tem sido o de alimentar coelhos com dietas ricas em colesterol (0,3 a 2,5%), acarretando hipercolesterolemia e a formação de lesões ateroscleróticas experimentais. Esse modelo tem limitações pela diferente fisiologia e metabolismo dos lípides em roedores quando comparados com humanos, mas tem servido para demonstrar alteração nas respostas vasodilatadoras do endotélio quando exposto a hipercolesterolemia (30,48). Técnicas utilizando pletismografia no antebraço e cateterismo coronariano em humanos têm confirmado que a hipercolesterolemia é associada à alteração na resistência vascular (49,50).

De forma especial as partículas LDL-oxidadas (LDL-Ox) estão presentes nas lesões ateroscleróticas em humanos. Na artéria coronariana porcina, o LDL-Ox inibe a vasodilatação endotélio-dependente e a síntese de NO induzida por plaquetas, serotonina e trombina, e esta inibição é específica para o LDL-oxidado, não sendo induzida por concentrações comparáveis do LDL nativo (51,52).

Em humanos, uma das marcas registradas de alteração no tônus vasomotor associada a hipercolesterolemia é disfunção na vasodilatação endotélio-dependente. Estudos avaliando medidas de fluxo com doppler nas artérias braquiais e femorais de crianças e adultos com diferentes perfis lipídicos mostraram que crianças com hipercolesterolemia familiar apresentavam dano na vasodilatação endotélio-dependente, contra resposta preservada a nitroglicerina, que é endotélio independente (53). Além disso, foi encontrada uma correlação significativa entre a vasodilatação fluxo-mediada e endotélio-mediada e escores para fatores de risco coronarianos (31,54). Tais resultados confirmam a relação entre níveis de colesterol e disfunção endotelial (32,49).

Mesmo indivíduos hipercolesterolêmicos assintomáticos têm alteração na vasodilatação endotélio-dependente, precedendo alterações morfológicas, em estudos que analisaram a resposta à infusão de acetilcolina intra-arterial e diâmetro intra-arterial (33). Avaliando disfunção do endotélio, Baron e colaboradores (45) sugerem que houve correlação inversa entre os níveis de LDL colesterol e a indução de vasodilatação com infusão de metacolina (endotélio-dependente), sugerindo-se inclusive que esta relação seja contínua, mesmo em limites normais do colesterol.

Em relação à dislipidemia, sabe-se que o LDL colesterol altera *in vitro* a produção de NO, e especula-se que partículas menores e mais densas de LDL, mais comuns nos estados de resistência à insulina e mais suscetíveis de oxidação, poderiam revelar uma associação mais forte com disfunção endotelial (45).

Endotelina-1 e Fator de von Willebrand

A endotelina é um peptídeo isolado originalmente a partir de células endoteliais cultivadas, e apresenta três isoformas - Endotelina-1, Endotelina-2 e Endotelina-3 - as quais são expressas em vários tecidos e células, tanto em leitos vasculares como em outros tecidos. Destes, a Endotelina-1 (Et-1) é a única produzida pelas células endoteliais, bem como pelas células da musculatura lisa dos vasos, sendo o mais potente vasoconstritor endógeno identificado. A Et-1 não é estocada nos grânulos secretórios no interior das células endoteliais, e estímulos específicos (hipóxia, isquemia, estiramento) induzem a transcrição do seu RNA mensageiro, síntese e secreção em minutos. Da produção de Et-1 pelas células endoteliais, 75% se direciona para a margem da musculatura lisa das células, onde se liga a receptores específicos, causando vasoconstrição. Esta concentração provavelmente não contribui para os níveis de Et-1 no plasma. Assim, a ação da Et-1 pode ser vista mais como parácrina do que como endócrina. Entretanto, a determinação de seus níveis plasmáticos é útil, já que têm correlação com severidade de doenças (insuficiência cardíaca, por exemplo), ou podem ter valor prognóstico, como no infarto do miocárdio (35).

Evidências de disfunção endotelial no diabetes melito derivam também de estudos que avaliaram a presença de mediadores endoteliais da fibrinólise e coagulação. Tanto no diabetes melito tipo 1 quanto no 2, a atividade fibrinolítica está diminuída e a atividade do “Fator Inibidor do Plasminogênio” aumentada (35,55). Há inúmeros trabalhos mostrando vasodilatação endotélio-dependente alterada no diabetes, mas os resultados são discrepantes, possivelmente devido a fatores de confusão, como hipertensão e dislipidemia, ou diferenças entre os pacientes dos diversos trabalhos.

O fato de níveis elevados de Et-1 terem sido observados em presença de aterosclerose e infarto ou mesmo em pacientes com angina instável sugere que o peptídeo possa representar um marcador plasmático da disfunção endotelial associada a essas condições (56-63). Há indícios de que seus níveis tenham correlação com a severidade de lesões coronarianas e apresentação clínica da cardiopatia isquêmica (62-64).

A diminuição dos níveis circulantes de Endotelina-1 após a redução do peso em indivíduos obesos parece ter relação com a queda nos níveis de insulina, sugerindo que esta possa exercer um papel fisiológico na regulação da Et-1 (64). A associação entre insulina, níveis de Et-1 e pressão arterial ainda é controversa: a pressão arterial elevada seria predisponente para disfunção do endotélio (e níveis mais altos de Et-1) ou conseqüente à disfunção endotelial? A insulina parece ser um estímulo para a liberação da Et-1, mas a definição desta relação ainda não está clara (65,66). Ferri e colaboradores (67) encontraram níveis mais elevados de Et-1 em pacientes hipertensos com tolerância diminuída a glicose, havendo correlação direta com os níveis de insulina no jejum.

Trabalhos em animais e em humanos demonstraram que níveis de Et-1 estavam aumentados na presença de hipercolesterolemia, sem lesões ateroscleróticas evidentes (81). Além disso, a hipercolesterolemia *in vitro* aumentou a reatividade vascular à Endotelina-1. A liberação da Et-1 parece ter uma relação mais direta com os níveis de LDL-oxidado (82). Este aumento da Et-1, entretanto, não deve refletir uma produção aumentada local do peptídeo, já que a maior parte de sua produção vai se concentrar na célula, no lado abluminal. Assim, níveis elevados da Et-1 na realidade evidenciam o desequilíbrio dos fatores que levam a vasoconstrição do endotélio, que se tornam mais dominantes, em relação aos vasodilatadores, como o NO (83,84). Em situação de hipercolesterolemia experimental, houve resposta vasoconstritora aumentada na circulação coronariana em resposta à endotelina e

atenuação da atividade do NO endógeno, sugerindo que na hipercolesterolemia experimental haja alteração na reatividade vascular (85).

O Fator de von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína sintetizada principalmente pelas células endoteliais, e representa um fator essencial na hemostasia dependente do endotélio vascular. Estudos *in vivo* e *in vitro* identificaram que seus níveis aumentavam na presença de dano ao endotélio vascular, sugerindo que possa representar um marcador da disfunção endotelial. Entretanto, tais aumentos são considerados inespecíficos quanto à origem da lesão no endotélio, já que suas concentrações plasmáticas elevam-se em diferentes situações que afetam o endotélio vascular, como o lupus eritematoso sistêmico, fumo, dislipidemia, diabetes melito, hipertensão arterial, doença cerebrovascular, ativação da coagulação e liberação de citocinas (68-73).

Nos pacientes com DM 2 há correlação entre a excreção urinária de albumina, doença cardiovascular e disfunção endotelial, estimada por concentrações do Fator de von Willebrand. Sugere-se ainda que níveis mais elevados de albuminúria estariam relacionados a novos eventos cardiovasculares somente na presença de níveis aumentados de FvW (74), servindo a disfunção endotelial como um elo entre microalbuminúria e eventos cardiovasculares.

Em pacientes com diabetes melito tipo 1 acompanhados prospectivamente por Stehouwer e colaboradores, níveis do FvW mais elevados foram detectados cerca de três anos antes do surgimento da microalbuminúria (75). Entretanto, um estudo semelhante, com dez anos de observação em pacientes com diabetes melito tipo 1 mostrou que os níveis de FvW apresentavam tendência (sem significância) a ser mais elevados nos pacientes que posteriormente desenvolveriam microalbuminúria, quando comparados a controles. Considerou-se que não havia coincidência entre o surgimento

de microalbuminúria e a disfunção endotelial quando avaliada pelos níveis de FvW (76).

No DM 2, têm sido relatados níveis mais elevados de ET-1 e FvW, piorando especificamente quando retinopatia está presente (77). A correlação entre os níveis de FvW e microalbuminúria nos diabéticos tipo 2 é ainda controversa, não tendo sido encontrada em uma série relatada por Knobl e colaboradores, em 1993 (78). Já em outra série de pacientes com diabetes tipo 2, o risco cardiovascular posterior teve correlação com a microalbuminúria e níveis iniciais elevados de FvW, sendo magnificado se havia elevação concomitante do LDL-colesterol (74). Talvez no DM 2 a microalbuminúria possa representar na realidade um marcador biológico de outro elemento (dislipidemia) que leva a um maior risco agregado (79). Por outro lado, o seguimento após 10 anos de uma coorte de pacientes com DM 2 revelou que os fatores de risco para a mortalidade cardiovascular eram a idade, a glicohemoglobina e o nível de Fator de von Willebrand (80), quando avaliados por regressão logística.

Dislipidemia, diabete melito, insulina e aterogênese

Anormalidades nos lípides parecem ser parte integral da síndrome de resistência à insulina, com ou sem diabete melito. Indivíduos com adiposidade central têm HDL reduzido e níveis mais elevados de VLDL-colesterol e triglicérides, quando comparados com controles normais ou obesos com distribuição periférica da gordura. Além disso, apresentam aumento na proporção de partículas menores e mais densas do LDL-colesterol. Hiperglicemia mais severa tende a acentuar estas anormalidades. Várias observações sugerem que pacientes com diabetes tipo 2 têm maior aterogênese do que indivíduos não diabéticos com anormalidades semelhantes nos lípides (86,87). Especula-se que isso possa ser atribuído à diferença nas partículas do LDL colesterol.

Tais pacientes apresentam concentrações mais elevadas do LDL3 (menor e mais denso) associado a níveis maiores de triglicérides e apoB, e menores do HDL colesterol. Estas modificações nas partículas têm sido atribuídas à formação de produtos de glicação avançada, agregação e oxidação associadas ao diabetes (86-88).

A redução do colesterol com vastatinas mostrou melhora da função endotelial coronariana em pacientes com cardiopatia isquêmica (89-91). Além disso, esta intervenção se associou a redução de mortalidade (92,93) não evidenciada com outras reduções nos lípidos, de mesma magnitude, sugerindo que de fato o órgão alvo para intervenção seja o endotélio vascular.

Estudos epidemiológicos, pós-morte e angiográficos sugerem de forma clara uma relação causal entre os níveis de colesterol e a gênese da aterosclerose e cardiopatia isquêmica. Estudos experimentais mostram que este processo envolve disfunção endotelial já na fase inicial da aterogênese, e mostram que ocorre tanto no diabetes como na hipercolesterolemia. Evidências sugerem que a insulina seja a mediadora das alterações na vasodilatação endotélio-dependente. Este poderia ser o evento aterogênico inicial nas situações de resistência à insulina (47).

Em suma, a Et-1 e o FvW são marcadores não-invasivos de disfunção do endotélio vascular. No entanto, não há estudos avaliando ou comparando estes marcadores em populações de risco similar (pacientes hipercolesterolêmicos e indivíduos com DM 2 associado à dislipidemia) sem que potenciais fatores de confusão, como fumo, micro ou macroalbuminúria e hipertensão estejam envolvidos. O presente estudo visa investigar a função endotelial nestes grupos de indivíduos, o que, além de proporcionar maior conhecimento sobre a evolução da doença aterosclerótica, pode eventualmente indicar que tais ferramentas sejam úteis para acompanhamento e monitorização da disfunção endotelial associada ao DM 2 e à dislipidemia.

HIPÓTESE

O grau de disfunção endotelial identificado nos pacientes diabéticos tipo 2 portadores de dislipidemia é maior do que nos dislipidêmicos não diabéticos, caracterizando-se por concentrações mais elevadas de Fator de von Willebrand e Endotelina-1. Ambos os grupos apresentam níveis superiores aos de controles normais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Comparar o grau de disfunção endotelial entre pacientes diabéticos tipo 2 com dislipidemia e pacientes com dislipidemia não diabéticos, ambos comparados a controles normais.

Objetivos específicos

1. Determinar o grau de disfunção endotelial, avaliada através dos níveis plasmáticos do FvW, em pacientes com diabete melito tipo 2 portadores de dislipidemia e em pacientes dislipidêmicos não diabéticos, comparando com controles normais.
2. Determinar o grau de disfunção endotelial, avaliada através dos níveis plasmáticos de Et-1, em pacientes com diabete melito tipo 2 portadores de dislipidemia e em pacientes dislipidêmicos sem diabete, comparando com controles normais.

PACIENTES E MÉTODOS

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo transversal controlado, em que os fatores avaliados são o DM 2 e a dislipidemia, sendo o desfecho a disfunção endotelial, representada por maiores concentrações do Fator de von Willebrand e da Endotelina-1.

PACIENTES

Seleção da amostra

A população em estudo constou de três grupos de pacientes:

1. Pacientes com diabete melito tipo 2 portadores de dislipidemia
2. Pacientes com dislipidemia, não diabéticos
3. Indivíduos saudáveis.

Os grupos foram encaminhados dos ambulatórios de Medicina Interna, Cardiologia e Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Eram incluídos os indivíduos que, após serem esclarecidos acerca da descrição geral da pesquisa, seus objetivos, exames a ser realizados e eventual necessidade de visitas mais frequentes ao hospital, aceitassem fazer parte do estudo, assinando Consentimento Informado (anexo 1). Foram também incluídos indivíduos identificados através de anúncio em jornal de circulação estadual e noticiário local na televisão, solicitando voluntários para estudo na área de diabete e colesterol, que preenchessem as condições descritas.

Critérios de inclusão na amostra

1. Pacientes com diabetes melito tipo 2, com idade entre 40 e 65 anos, índice de massa corporal menor ou igual a 32, não fumantes, normotensos, portadores de dislipidemia, sem uso de fármacos hipolipemiantes ou bloqueadores da enzima de conversão da angiotensina. Os critérios para o diagnóstico de diabetes melito tipo 2 foram fundamentados nas recomendações da OMS (94) ou em teste de tolerância à glicose diagnóstico (94). Foram incluídos os diabéticos que apresentassem colesterol total maior ou igual a 200 mg/dl, LDL colesterol maior ou igual a 160 mg/dl ou HDL colesterol inferior a 35 mg/dl e/ou triglicérides superiores a 150 mg/dl (95).
2. Pacientes dislipidêmicos, definidos como portadores de colesterol total superior a 200mg/dl e LDL-colesterol superior a 160 mg/dl ou HDL inferior a 35 mg, com ou sem triglicérides superiores a 150 mg/dl, idade entre 40 e 65 anos, normotensos, não fumantes, índice de massa corporal igual ou inferior a 32, tendo realizado teste de tolerância oral à glicose normal, sem uso de fármacos hipolipemiantes ou bloqueadores da enzima de conversão da angiotensina .
3. Controles normais: indivíduos sadios, normotensos, não fumantes, sem dislipidemia, com índice de massa corporal inferior a 32, com teste de tolerância oral à glicose normal.

Critérios de exclusão da amostra

Foram excluídos pacientes com perda de função renal (creatinina superior a 1.5 mg/dl), história de retinopatia diabética, evento vascular nos últimos seis meses (angina, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, obstrução arterial aguda), insuficiência cardíaca ou qualquer outra doença associada. Foram também excluídos pacientes que apresentassem microalbuminúria, em amostra casual de urina estéril, definida como razão albumina/creatinina (g/g) superior a 17 (96).

MÉTODOS

Coleta de dados e exame clínico

Após a inclusão, os pacientes responderam a um questionário (anexo 2) que avaliou idade, fármacos em uso, história familiar de diabetes melito e tempo de evolução da doença. A pressão arterial foi verificada em esfigmomanômetro de mercúrio com o paciente sentado, após 15 minutos de repouso, sendo excluídos aqueles que apresentassem níveis superiores a 140 mmHg de PA sistólica e 90 mmHg de PA diastólica após três verificações separadas com intervalos de 5 minutos. Foram realizadas aferições do peso e altura em balança antropométrica (Filizola), sem sapatos e com roupas leves. O IMC foi calculado pela equação $IMC = \text{Peso(Kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$.

Os pacientes também responderam a dois questionários: Questionário Rose (OMS) para a avaliação de sintomas cardiovasculares (97) e questionário

padronizado para aferir sintomas de neuropatia (anexos 3 e 4). Foram avaliados pulsos centrais e periféricos (tibiais posteriores e pediosos), sensibilidade vibratória (diapasão de 128 ciclos/s) em membros superiores e inferiores e presença ou ausência de cianose, ceratose plantar e palidez na elevação dos membros inferiores, sempre pelos mesmos examinadores.

Vasculopatia periférica foi definida pela diminuição dos pulsos periféricos e/ou claudicação intermitente no Questionário Rose, e cardiopatia isquêmica pela história de dor anginosa ou infarto no passado, no mesmo questionário. Neuropatia periférica foi definida pela redução da sensibilidade vibratória, testada em terceiro dígito das mãos e junto ao maléolo externo com diapasão de 128 ciclos, e/ou ausência de reflexos aquileu e patelar.

Avaliação laboratorial

A avaliação laboratorial foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, segundo as técnicas de rotina. Foram medidos no soro ou plasma:

- glicose de jejum (método glicose-oxidase)
- creatinina (método de Jaffé)
- colesterol total e frações (método enzimático colorimétrico, soro congelado e estocado, dosagem em tempo único para toda a amostra). VLDL e LDL calculados pela fórmula de Friedwald (1972). Quando os triglicérides

apresentaram níveis maiores ou iguais a 400 mg/dl, não foi calculado o LDL.

- fibrinogênio (imunoturbidimetria)
- frutossamina (método colorimétrico)
- insulina (RIE-laboratório Cis, France, C variação intra-ensaio 5,9%, variação inter-ensaio 7,9%)
- peptídeo C (RIE-Laboratório DPC, coeficiente de variação intra-ensaio 7,2%; inter-ensaio 7,8%)
- glicohemoglobina (cromatografia de alta performance), realizada no Laboratório Weinmann, imediatamente após a coleta.

Foi realizada tipagem ABO para posterior aferição de interferência com o FvW (98).

A urina foi congelada para posterior análise, sendo verificados leucocitúria e nitritos e dosadas creatinina urinária (método de Jaffé cinético) e albuminúria (imunoturbidimetria, variação intra-ensaio 10,2% e inter-ensaio 11,8%).

Todos os pacientes que não se sabiam diabéticos realizaram teste oral de tolerância à glicose, com dosagem da glicemia em jejum e após 120 minutos, mantendo-se sentados, com repouso nos minutos que precederam a ingestão e ao longo do teste.

Dosagem do FvW

Os pacientes realizaram a coleta em jejum de 12 horas, após 30 minutos em repouso sentados, sem garroteamento, na veia antecubital. O sangue foi centrifugado e o plasma mantido congelado a -70°C , para análise em tempo único, sem que os examinadores identificassem as amostras em relação aos grupos avaliados. A dosagem do Fator de von Willebrand foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA), Laboratório Asserachrom-Diagnostica STAGO, FRANCE.

Dosagem da Endotelina-1

A coleta foi realizada em jejum de 12 horas após repouso com os pacientes sentados durante 30 minutos, sem garroteamento, na veia antecubital. O sangue foi centrifugado e mantido estocado a -70°C , para posterior análise única, sem que os examinadores identificassem as amostras em relação aos grupos avaliados.

Extração da Endotelina-1:

O plasma foi diluído (0,5ml de plasma + 0.75 ml de solvente) em um solvente de extração composto por acetona, água e ácido clorídrico, e posteriormente centrifugado em centrífuga refrigerada a 3°C . O sobrenadante foi decantado em tubo de polipropileno e procedida a extração, em centrífuga de evaporação - no Centro de Biotecnologia-UFRGS - por um período de 4 a 5 horas, a 37°C . Os ensaios foram realizados imediatamente pelo método imunoenzimático (ELISA - R&D Systems, USA - variação intra-ensaio 4,2%, variação inter-ensaio 5,1%).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas com distribuição normal foram descritas através da média aritmética, desvio padrão e intervalo (mínimo - máximo). As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram descritas pela mediana e intervalo (mínimo - máximo), e por gráficos de caixas. Os valores foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, sendo realizada posterior correção *post-hoc* pelo método de Bonferroni (99).

Os valores de p estão apresentados nas tabelas, bem como o teste utilizado em cada caso. Foram considerados significativos valores de p inferiores a 0,05.

Para controle das variáveis de confusão foi realizada regressão logística com análise bruta e multivariada, sendo expressas as categorias de referência (representadas pelas medianas) e as razões de chance nas tabelas, com seus intervalos de confiança (100,101). O banco de dados foi elaborado no programa Epi-info 6.0 e a análise estatística foi realizada no programa SPSS for Windows.

ASPECTOS BIOÉTICOS

Todos os participantes do projeto foram entrevistados individualmente e esclarecidos acerca da justificativa, objetivos e procedimentos envolvidos na pesquisa. Foram incluídos aqueles que aceitaram participar do trabalho, assinando consentimento informado, sendo garantidos sigilo e confidencialidade dos dados obtidos.

consentimento informado, sendo garantidos sigilo e confidencialidade dos dados obtidos.

Os pacientes foram informados em entrevista individual sobre os resultados de seus exames e avaliação metabólica, sendo orientados e encaminhados para tratamento no HCPA ou serviço médico em que já mantivessem acompanhamento prévio.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

RESULTADOS

Características clínicas da população estudada

Foram arrolados 99 indivíduos que preencheram os critérios clínicos de inclusão. Destes, 13 apresentaram diminuição da tolerância à glicose no TTG oral, e 11 tinham classificação não representativa nas dosagens dos lípidos, como hipertrigliceridemia isolada, colesterol LDL ou colesterol total limitofes, sendo excluídos da análise para que os grupos ficassem claramente representados. Assim, a população efetivamente pesquisada foi de 75 pacientes.

A tabela I descreve as características clínicas dos grupos. Observa-se que os grupos diferiram com relação à idade, índice de massa corporal e pressão arterial sistólica (Tabela I).

Frequência das complicações crônicas na amostra

A figura 1 apresenta as distribuições de vasculopatia, cardiopatia isquêmica e neuropatia nos grupos. Dos 75 indivíduos, 10 apresentavam vasculopatia (13,5%), sendo 8 no grupo dos diabéticos e 2 nos dislipidêmicos. Esta diferença foi significativa. Em relação à presença de cardiopatia isquêmica, também havia 10 indivíduos com critérios positivos (6 diabéticos, 3 dislipidêmicos e 1 controle), mas não houve diferença significativa entre os três grupos. Neuropatia periférica teve distribuição exclusiva no grupo dos diabéticos, acometendo 7 dos 35 indivíduos, com significância estatística quando comparado com os dislipidêmicos e controles. Em

relação à história familiar de diabetes melito também houve maior frequência no grupo dos pacientes diabéticos em relação aos controles ($p < 0,05$), e não quando comparados aos dislipidêmicos (dados não apresentados).

Características laboratoriais da população estudada

A excreção urinária de albumina, avaliada em amostra casual de urina estéril, não apresentou diferença entre os 3 grupos, mesmo quando corrigida para a excreção urinária de creatinina. Não houve diferença na frequência de grupo sanguíneo O⁺ entre diabéticos, dislipidêmicos e controles.

Houve diferença na glicemia dos diabéticos em relação aos demais grupos, bem como insulina e glicohemoglobina. O peptídeo C dos pacientes diabéticos e dos dislipidêmicos foi diferente dos controles, bem como o fibrinogênio (Tabela II).

Os grupos diferiram em relação ao perfil lipídico (Tabela III). Observa-se que o colesterol total foi comparável entre os pacientes com diabetes melito tipo 2 dislipidêmicos e os dislipidêmicos não diabéticos, e diferente, como seria esperado pelo delineamento, em relação aos controles. Não houve diferença entre os grupos nos níveis do HDL-colesterol. A diferença maior está na expressão da dislipidemia, que, nos pacientes com DM 2, ocorre predominantemente às custas do VLDL-colesterol, enquanto nos dislipidêmicos às custas do LDL-colesterol.

Tabela I. Características clínicas da amostra.

	Grupo 1 Diabéticos com dislipidemia n=35	Grupo 2 Dislipidêmicos n=21	Grupo 3 Controles n=19	p[§]
Idade (anos)	56 ± 5** (45-65)	52 ± 7* (41-65)	45 ± 4 (40-58)	0,01
Sexo (F/M)	17/18	5/16	6/13	NS
IMC (Kg/m ²)	28,4 ± 3,6* (23-32)	27,2 ± 3,2* (21-31)	24,2 ± 2,2 (21-29)	0,01
PAS (mmHg)	130,7 ± 11,2* (100-140)	121,8 ± 11,2 (100-140)	122,5 ± 9,3 (104-140)	0,04
PAD (mmHg)	76,9 ± 7,5 (54-90)	74,9 ± 6,8 (60-86)	72,5 ± 7,1 (60-82)	NS

Os valores são mostrados como média ± desvio padrão, com valores mínimo e máximo entre parênteses. Os asteriscos * situam as diferenças na correção *post-hoc*.

Sexo: F=feminino; M=masculino

NS: não significativo ($p \geq 0,05$)

PAD : Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

IMC: Índice de massa corporal

§ Teste: ANOVA

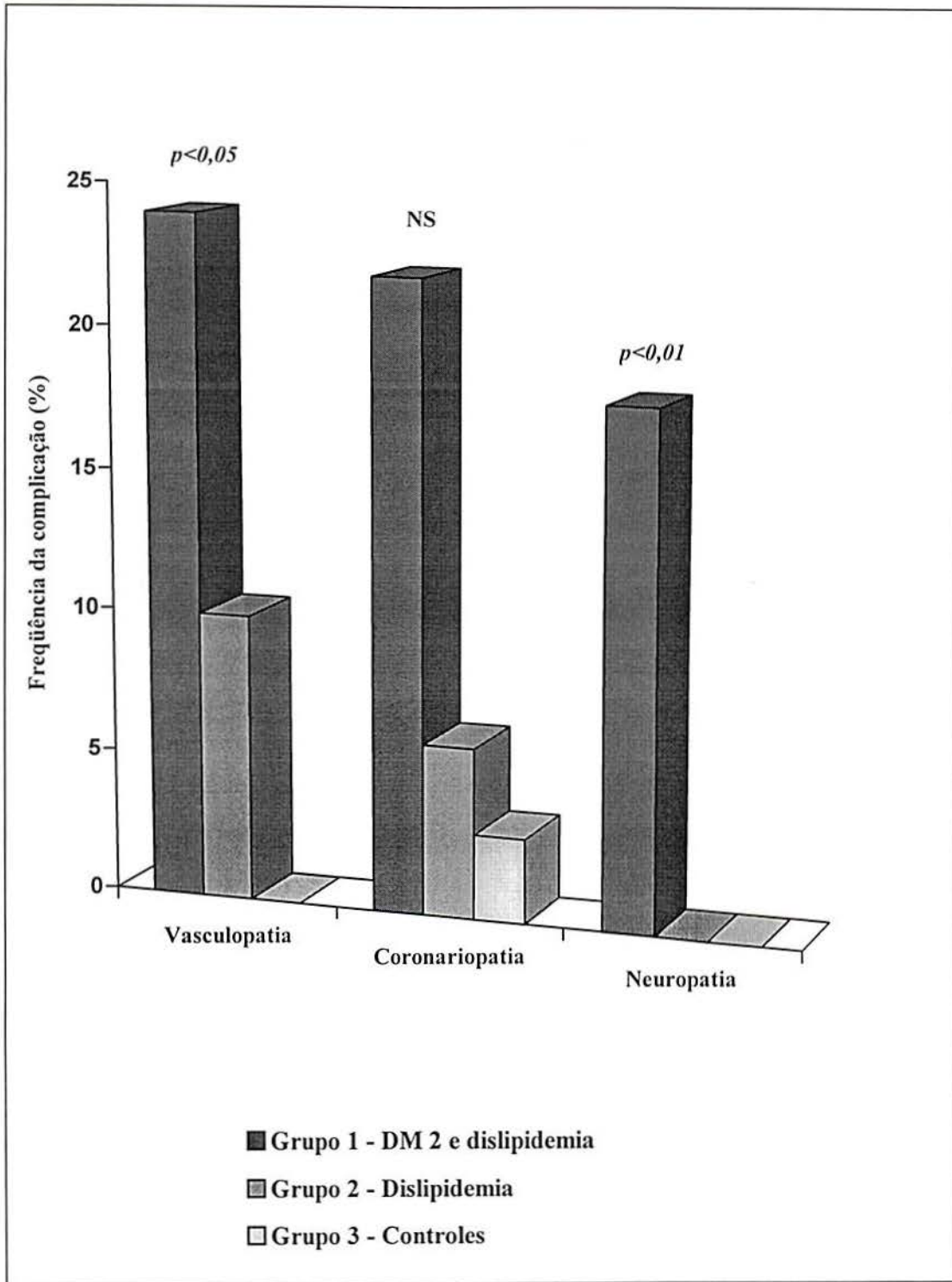


Figura 1. Frequência das complicações crônicas - vasculopatia, cardiopatia isquêmica e neuropatia periférica - nos grupos estudados. O gráfico mostra a porcentagem de indivíduos acometidos em cada grupo. NS = não significativo ($p > 0,05$). Teste: Kruskal-Wallis.

Tabela II. Características laboratoriais da amostra.

	Grupo 1 Diabéticos com dislipidemia n=35	Grupo 2 Dislipidêmicos n=21	Grupo 3 Controles n=19	p[§]
Glicose em jejum (mg/dL)*	150 (104 - 206)	88 (69 - 118)	83 (60 - 112)	<0,0001
HbA_{1C} (%) *	7,0 (3,0 - 15,8)	4,3 (2,6 - 6,6)	4,0 (3,0 - 4,6)	<0,0001
Creatinina (mg/dL)†	0,86 ± 0,15	0,80 ± 0,11	0,80 ± 0,14	NS
Fibrinogênio (mg/dL)*	334 (102 - 538)	300 (179 - 482)	270 (123 - 403)	0,05
Insulina (UI/ml)*	14,4 (4,9 - 51,1)	7,6 (2,0 - 19,7)	7,0 (1,0 - 19,8)	0,001
Peptídeo C (ng/ml)*	2,6 (0,6 - 6,5)	2,1 (0,8 - 5,0)	1,7 (0,8 - 3,7)	0,02
EUA (g/g) *	4,8 (3,7 - 16)	4,6 (3,8 - 11,2)	4,2 (3,5 - 16,9)	NS

* Mediana, com intervalo (mínimo - máximo) entre parênteses. Teste Kruskal-Wallis

† Média ± desvio padrão, com intervalo entre parênteses. § Teste: ANOVA

NS: não significativo ($p \geq 0,05$)

HbA_{1C}: Glicohemoglobina

EUA : Excreção urinária de albumina

Tabela III. Descrição do perfil lipídico dos grupos

	Grupo 1 Diabéticos com dislipidemia	Grupo 2 Dislipidêmicos	Grupo 3 Controles	p
Colesterol total (mg/dl)*	225 § (154-335)	247 § (200-457)	167 (127-199)	<0,0001**
HDL colesterol (mg/dl)*	44 (28-60)	47 (24-59)	48 (36-109)	NS **
LDL colesterol (mg/dl)†	150±46 § (123-239) #	200±43 §§ (161-357)	98±30 (18-130)	<0,0001‡
Triglicérides (mg/dl)*	179 §§ (133-533)	128 § (40-260)	75 (35-146)	<0,0001**

* Valores são mostrados como mediana com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

† Valores mostrados como média ± desvio padrão, com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

** Teste: Kruskal-Wallis

‡ Teste: ANOVA.

NS: não significativo ($p \geq 0,05$).

§ Indica a diferença entre os grupos na correção *post hoc*

n= 34 pacientes

Marcadores não-invasivos de disfunção endotelial na amostra

Fator de von Willebrand

A dosagem do Fator de von Willebrand foi realizada sob mascaramento, com amostras em duplicata e triplicata, com o mesmo pipetador, em tempo único. O controle interno do ensaio mostrou uma variação máxima entre as duplicatas de 20%.

No grupo dos pacientes diabéticos, os níveis do FvW apresentaram uma mediana de 185,9%, nos dislipidêmicos de 168,2% e nos controles de 129,6%. A diferença foi significativa apenas entre os pacientes com DM2 em relação aos controles ($p=0,02$).

A figura 2 mostra os valores do FvW nos três grupos avaliados.

Endotelina-1

A dosagem da endotelina-1 foi realizada sob mascaramento, com amostras em duplicata e triplicata, com o mesmo pipetador, em tempo único. O controle interno do ensaio mostrou uma variação máxima entre as duplicatas de 15%.

Diferentemente do encontrado com o FvW, os valores apresentaram uma diferença mais pronunciada entre os grupos: a mediana nos pacientes diabéticos foi de 1,61 pg/ml, enquanto nos dislipidêmicos foi de 0,91pg/ml e nos controles 0,68pg/ml ($p=0,00008$).

A figura 3 mostra os valores da Et-1 nos três grupos avaliados.

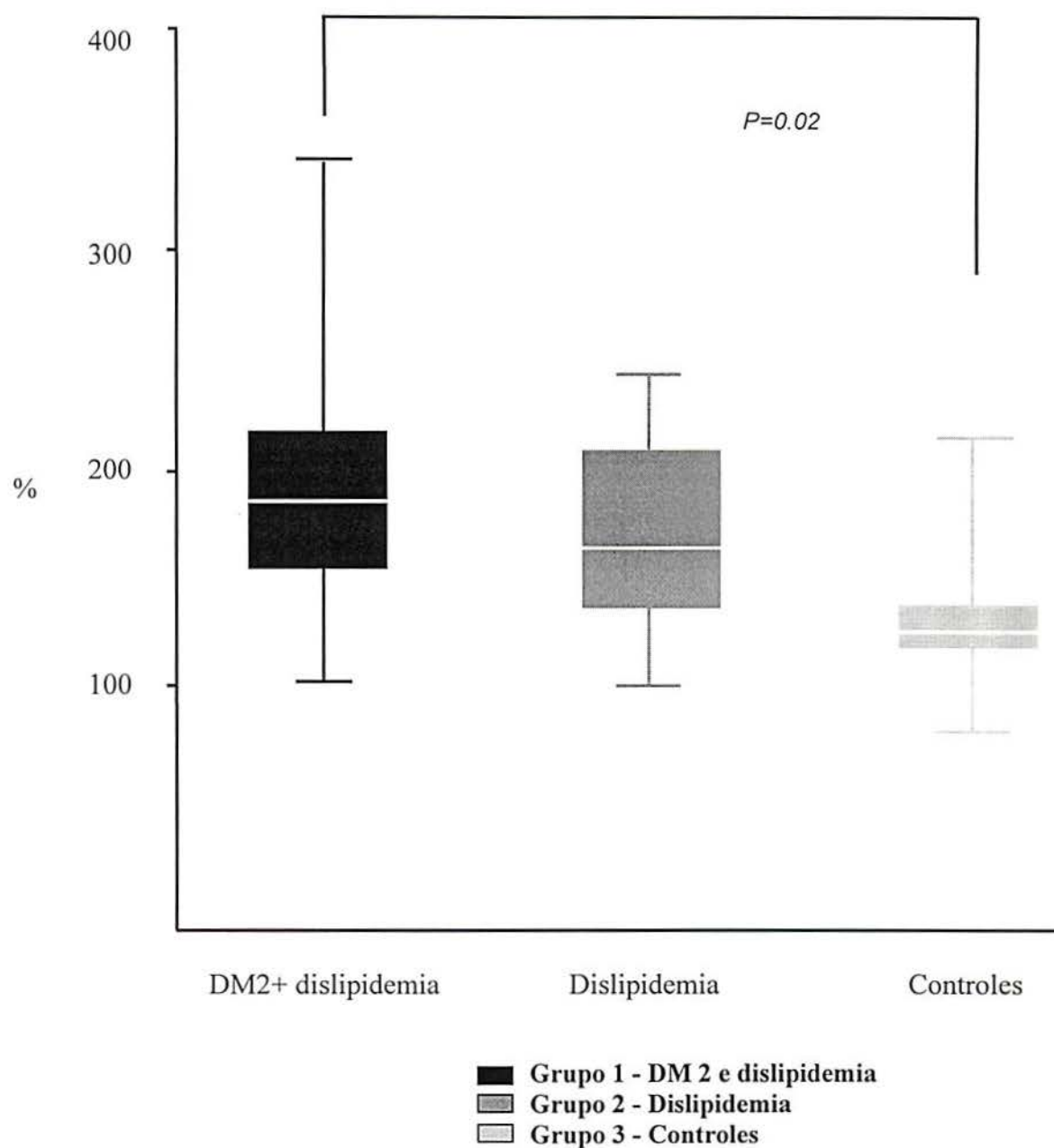


Figura 2. Níveis de Fator de von Willebrand (%) nos três grupos. Os valores são expressos como mediana e quartis 25% e 75%. O valor de p é indicado (teste Kruskal-Wallis), com correção *post-hoc* indicada por linha contínua.

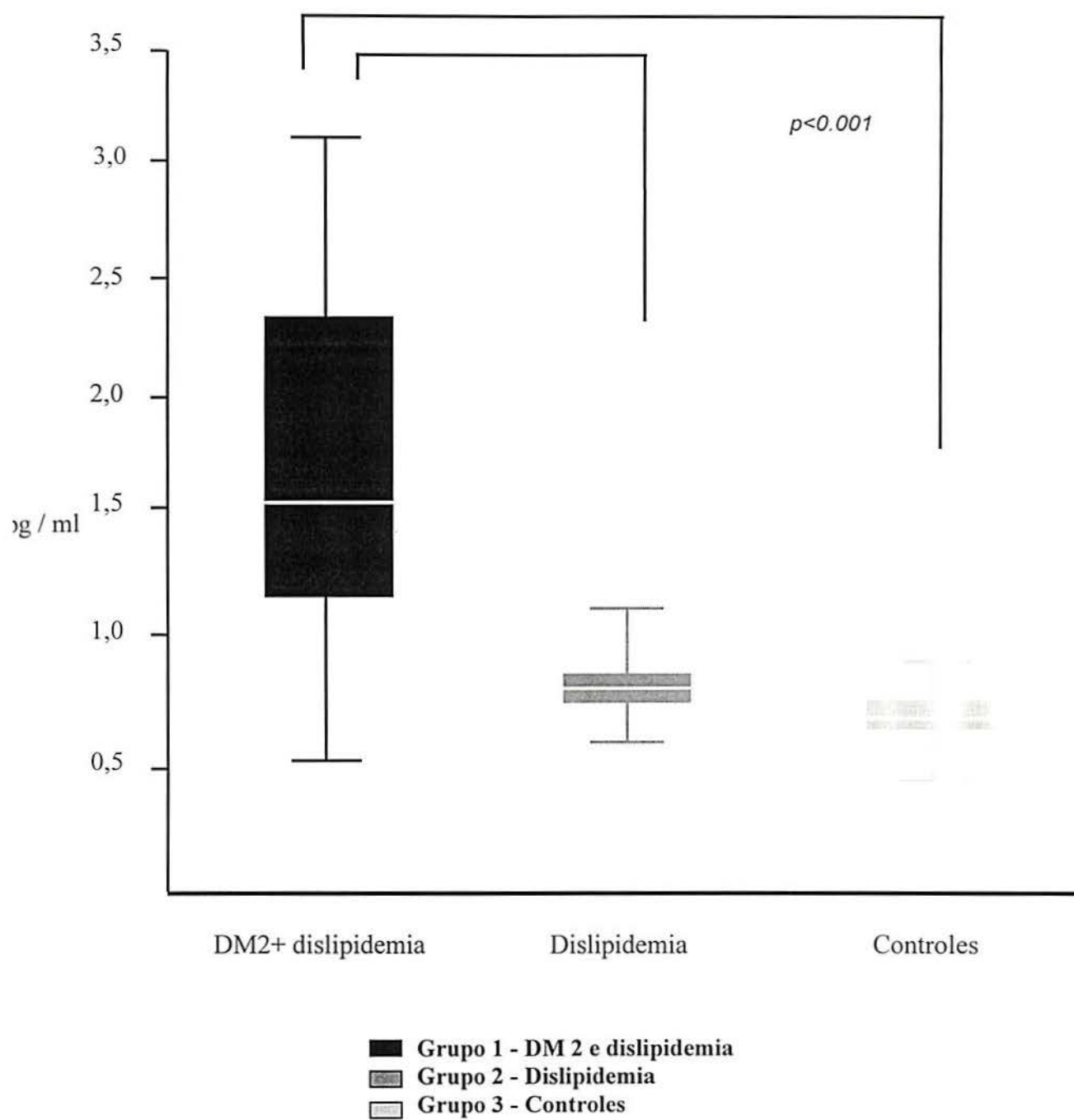


Figura 3. Níveis de Endotelina-1 (pg/ml) nos três grupos. Os valores são expressos como mediana e quartis 25% e 75%. O valor de p é indicado (teste Kruskal-Wallis) e a correção *post-hoc* indicada por linha contínua.

Ajuste para as variáveis de confusão entre os grupos

Uma vez que os grupos apresentaram diferenças entre algumas características clínicas e laboratoriais, foi realizado controle para as variáveis de confusão, através de regressão logística múltipla, tanto para a Endotelina-1 como para o Fator de von Willebrand (tabelas IV e V). As tabelas mostram a equação de regressão, com o coeficiente B das variáveis na equação, o grau de significância p , a razão de chances e o intervalo de confiança para as variáveis significativas no modelo.

Para categorização das variáveis idade, pressão arterial sistólica, índice de massa corporal e insulina, a categoria de referência para entrada no modelo de regressão utilizada foi a final. Já para os grupos, a categoria foi inicial, categorizando-se doença de base em três grupos, do mais expresso (diabete associado a dislipidemia) ao menos (controles normais). Observa-se que a idade, índice de massa corporal, insulina e fibrinogênio não foram determinantes da diferença entre os níveis de Et-1 e FvW entre os grupos. Deve-se mencionar que o fibrinogênio alcançou um grau de significância de 0,08 na equação de regressão para o FvW.

Tabela IV. Fator de von Willebrand ajustado para as variáveis clínicas e laboratoriais entre os três grupos

Variável	B	RC (IC95%)	<i>p</i>
DM2 + dislipidemia	2,011	7,47 (1,38 – 40,53)	0,0197
Dislipidemia	1,993	7,34 (1,31 – 41,16)	0,023

Variáveis incluídas no modelo: Idade, IMC, PAS, Insulina e Fibrinogênio.*

A categoria de referência para doença básica foi a primeira (DM2+ dislipidemia), comparado com a segunda(dislipidemia) e controles.

Os valores são expressos como razão de chances (RC), com intervalo de confiança de 95% (CI 95%) entre parêntese.

IMC = índice de massa corporal.

B = índice beta , da equação de regressão

Valores de $p < 0,05$ são descritos.

* $p = 0,08$

Tabela V. Endotelina-1 ajustada para as variáveis clínicas e laboratoriais entre os três grupos

Variável	B	RC (IC95%)	<i>p</i>
DM2 + dislipidemia	3,80	44,7 (5,56 – 353,42)	0,0003
Dislipidemia	1,1	3,0 (0,53 – 17,01)	0,21

Variáveis incluídas no modelo: Idade, IMC, PAS, Insulina e Fibrinogênio.

A categoria de referência para doença básica foi a primeira (DM2+ dislipidemia), comparado com a segunda(dislipidemia) e controles.

Os valores são expressos como razão de chances (RC), com intervalo de confiança de 95% (CI 95%) entre parêntese.

IMC = índice de massa corporal.

B = índice beta , da equação de regressão

Valores de $p < 0,05$ são descritos.

DISCUSSÃO

Nesse estudo demonstramos que pacientes com DM 2 e dislipidemia apresentam maior grau de disfunção endotelial, avaliada de forma não-invasiva pela aferição dos níveis da Endotelina-1, comparados com pacientes dislipidêmicos não diabéticos e controles normais. Estes dados sugerem que algum fator específico do meio diabético (que a Et-1 pode representar) possa contribuir para um maior grau de disfunção endotelial. Por outro lado, não encontramos diferença significativa nos níveis destes marcadores (tanto a Et-1 como o FvW) entre pacientes dislipidêmicos e controles normais, diferente do que presumíamos. A disfunção endotelial, quando avaliada através do FvW, foi maior no grupo dos pacientes com DM 2 dislipidêmicos apenas quando comparados com os controles normais. Não encontramos diferenças nos níveis do FvW entre dislipidêmicos e pacientes diabéticos com dislipidemia.

Características clínicas da amostra e possíveis vieses

Deve-se levar em consideração fatores de nossa amostra que possam haver influenciado os resultados encontrados. Poderíamos lembrar potenciais vícios associados à seleção da amostra, utilização de questionários, classificação de cardiopatia isquêmica, vasculopatia e presença de neuropatia em alguns dos diabéticos. Por outro lado, tivemos o cuidado de seguir um questionário objetivo já validado em estudos anteriores para a classificação de doença vascular e coronariana. Em nosso trabalho, o diagnóstico de coronariopatia pelo questionário Rose poderia ser

questionado, mas trabalhos avaliando concentrações da Endotelina-1 em pacientes dislipidêmicos e diabéticos têm sido realizados até mesmo sem avaliar a presença ou ausência de coronariopatia (25), ou utilizando, como nós, apenas questionário (108,115) e, eventualmente, eletrocardiograma em repouso (26,83,106,116). Entretanto, uma estratificação mais precisa da doença isquêmica seria desejável.

Igualmente o exame clínico foi realizado de forma padronizada sempre pelos mesmos examinadores, com um questionário sistematizado para avaliar a presença de neuropatia.

Os nossos pacientes com diabetes tipo 2 eram mais velhos e apresentavam índice de massa corporal mais elevado em relação aos demais grupos, o que poderia determinar por si só maior disfunção endotelial. Entretanto, na análise multivariada, a idade e o índice de massa corporal não determinaram risco para elevação do FvW e da ET-1. Talvez a idade mais elevada possa se associar a maior resistência à insulina e dano ao endotélio, mas o exato papel da idade neste contexto ainda é controverso (117-119). Os pacientes diabéticos apresentaram também níveis de pressão arterial sistólica maiores do que dislipidêmicos e controles. Essa diferença foi significativa do ponto de vista estatístico, mas não parece ter relevância clínica, uma vez que ser normotenso era critério de inclusão - os hipertensos eram excluídos. Por outro lado, estudos experimentais mostram que a vasodilatação endotélio-dependente pode ser modulada pelos níveis de pressão arterial sistólica (87), mas há controvérsias (120).

Reaven e colaboradores (87) demonstraram que há uma correlação negativa entre o diâmetro da partícula LDL e os níveis pressóricos em uma população normotensa. Assim, um maior grau de disfunção endotelial poderia estar associado a essa diferença pressórica e influências na conformação dos lípidos, com maior potencial de oxidação e aterogênese, e não ao diabetes em si.

O uso de terapia de reposição hormonal também poderia ser um fator a alterar os resultados (121). Entretanto, de acordo com os questionários, dos 99 pacientes apenas 3 estavam em uso de estrógenos, uma paciente em cada grupo (dados não apresentados). O próprio delineamento garante a exclusão de outros fármacos que poderiam estar confundindo os resultados, como insulina, bloqueadores da enzima de conversão da angiotensina ou hipolipemiantes.

A presença de cardiopatia isquêmica poderia ser um fator de confusão para os resultados. Em nosso estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na sua frequência entre os três grupos, ainda que maior nos diabéticos. É esperado que indivíduos já com doença aterosclerótica estabelecida apresentem níveis mais elevados de Et-1 (35,56,112,122). Encontramos apenas um estudo transversal, comparando os níveis de Endotelina-1 entre diabéticos tipo 2 com doença macrovascular, cardiopatas isquêmicos sem diabetes e controles normais, que não encontrou diferença entre os três grupos, mas parece ser o único até o momento (123). Talvez esse achado discrepante possa se dever a características daquele trabalho, como não realização de teste de tolerância à glicose nos isquêmicos sem diabetes, por exemplo, e um número pequeno de pacientes no grupo controle. Além disso, chama a atenção o fato dos níveis da Endotelina-1 nos controles apresentarem uma média superior à dos isquêmicos e dos diabéticos.

Um possível viés para nossos resultados decorre também da maior prevalência de vasculopatia no grupo dos diabéticos. Isto poderia determinar um aumento nos marcadores de disfunção endotelial atribuível ao diabetes, embora não haja maiores dados sobre vasculopatia isoladamente elevando os níveis destes marcadores de disfunção endotelial, e até um estudo mostrando que a sua presença não altera o ritmo da secreção de Endotelina-1 (113).

Endotelina-1 e Fator de von Willebrand

Ao escolhermos dois marcadores não-invasivos para aferir o grau de disfunção endotelial entre os três grupos distintos de pacientes, desejamos observar se o comportamento da Et-1 e do FvW move-se em uma direção idêntica, e se há características que os diferencie. Embora nosso trabalho não investigue os aspectos relacionados ao mecanismo de ação dos marcadores envolvidos no dano endotelial, algumas considerações podem ser levantadas justificando talvez nossos achados. Em nossos dados, houve uma expressão bem mais clara da diferença entre os grupos com a Et-1 do que com o FvW. Considerando que ambos refletem disfunção endotelial, cabe especular a que fatores poderia ser atribuída esta diferença. Talvez o FvW reflita mais os aspectos do endotélio relacionados à trombogênese, e a Endotelina-1, por sua potente ação vasoconstritora, represente predominantemente diferenças relacionadas ao tônus vascular (35,102). Ou, encontramos maior expressão da Et-1 por haver, de fato, um efeito mais claro da modulação que a insulina representa no endotélio, e que nossos pacientes com DM 2 refletiriam de forma mais clara? Neste sentido, foi demonstrado experimentalmente que a insulina estimula a produção e secreção de Endotelina-1 pelas células endoteliais (104).

Em nosso trabalho, os pacientes portadores de diabetes melito tipo 2 e dislipidemia apresentaram níveis mais elevados de Endotelina-1, tanto quando comparados a pacientes com dislipidemia sem diabetes como quando comparados com indivíduos controle. Esse achado tem paralelo com a demonstração de alteração na vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com DM 2, avaliada pela resposta à infusão de acetilcolina (26,105). Ferri e colaboradores mostraram que indivíduos com DM 2 normotensos tinham níveis mais elevados de Et-1 durante clamp euglicêmico hiperinsulinêmico. Com isso, sugerem que a Endotelina-1 possa exercer efeitos

negativos na sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo. Assim, tanto o aumento na secreção de insulina como a liberação de Endotelina-1 associada àquela poderiam ser agentes que favorecessem o desenvolvimento da vasculopatia diabética (106).

Em 1990, Takahashi e colaboradores já haviam descrito níveis de Et-1 mais elevados em pacientes diabéticos quando comparados a controles normais (58). Da mesma forma, Morise e colaboradores mediram os níveis de Endotelina-1 e Fator de von Willebrand em diabéticos tipo 2 comparando com controles normais. Consideraram que havia uma correlação positiva entre os níveis do FvW e Et-1, sugerindo que reflitam o dano endotelial no diabetes melito (77).

Insulina, triglicérides e fibrinogênio

Níveis aumentados de Endotelina-1 têm sido relatados em vários estados de resistência à insulina, como a obesidade, a hipertensão, o diabetes gestacional, além do diabetes tipo 2, permitindo a especulação de que talvez esse peptídeo seja na realidade um fator contribuinte para a síndrome de resistência à insulina. Em estudos com clamp, observou-se que o captopril reduzia os níveis da endotelina quando comparado com placebo, e melhorava a sensibilidade à insulina (104,106).

Nossos achados poderiam ser explicados por uma maior modulação da insulina para a Et-1, já que encontramos significância apenas para os seus níveis, e não para os do FvW, quando comparamos os pacientes diabéticos com os dislipidêmicos. Além disso, na análise multivariada para controle da diferença dos níveis de Et-1 entre os grupos, encontramos significância para o peptídeo C (refletindo a atividade secretória de insulina pelas células beta do pâncreas)(107) e os

triglicérides ($p=0,03$) que, associados à insulina, são indutores da liberação de Endotelina-1(108) .Já para o FvW, a análise demonstrou apenas uma tendência para o fibrinogênio ($p=0,06$). Um estudo de Piatti e colaboradores (108) sugere que triglicérides e insulina elevados sejam indutores diretos da liberação de Endotelina-1, e poderiam inclusive ter papel na patogênese da hipertensão e doença cardiovascular na síndrome metabólica. Um dado importante a ser mencionado é o fato da dislipidemia do diabetes ser mais frequentemente caracterizada por elevações dos triglicérides totais e VLDL, além de HDL baixo. Os triglicérides têm associação com o controle metabólico (correlacionam-se com a glicohemoglobina), e têm sido considerados um fator de risco independente para doença vascular no diabetes tipo 2 (105). Além disso, os triglicérides elevados têm sido associados a um menor tamanho das partículas LDL nos diabéticos tipo 2, mais aterogênicas (105). Talvez essa possa ser uma explicação concomitante para um maior nível de Et-1, e merece ser melhor averiguada em estudos futuros.

Quanto ao fibrinogênio, vários estudos têm demonstrado que é um fator de risco independente para doença cardiovascular, tendendo a agir de forma sinérgica com a hipercolesterolemia e hipertensão (109). Há uma associação entre o fibrinogênio, a glicohemoglobina e a excreção urinária de albumina em pacientes com DM 2 (110), sugerindo que seja de fato um marcador de risco cardiovascular no diabetes. A relação entre disfunção endotelial e fibrinogênio elevado nos diabéticos ainda necessita ser melhor esclarecida .

Lípides e disfunção endotelial

Não encontramos diferença nos níveis de Endotelina-1 e Fator de von Willebrand entre pacientes dislipidêmicos e controles, ao contrário dos achados nos

pacientes com DM 2. Nosso grupo de dislipidêmicos era claramente representado - todos tinham que apresentar colesterol total superior a 200 mg/dl acompanhado por HDL diminuído ou LDL superior a 160 mg/dl. Assim, a ausência de diferença não pode ser atribuída a diluição da dislipidemia dentro do grupo. Os estudos invasivos demonstram de forma clara a relação entre hipercolesterolemia e disfunção endotelial (49), inclusive sugerindo uma relação inversa entre os níveis de LDLcolesterol e vasodilatação endotélio-dependente (45). Já estudos com marcadores não-invasivos são poucos.

Arendt e colaboradores (84), encontraram níveis mais elevados de Endotelina-1 em 43 pacientes com dislipidemia, com e sem coronariopatia, quando comparados com 29 controles normais. Embora os níveis mais elevados fossem encontrados nos dislipidêmicos cardiopatas, ainda assim houve diferença entre dislipidêmicos sem cardiopatia e controles normais. Também Mangiafico e colaboradores encontraram em um grupo menor de pacientes - 8 em cada grupo - níveis mais elevados de Endotelina-1 associada a hipercolesterolemia quando comparada a controles normais (83,111). Nesse último trabalho, à semelhança de nossos pacientes, a diferença principal foi nos níveis do LDL-colesterol, já que o HDL era idêntico nos dois grupos.

Apesar de alteração na vasodilatação dependente do endotélio estar já definida na presença de hipercolesterolemia (32,48,102,112), há poucos trabalhos avaliando marcadores não-invasivos. Desta forma, acreditamos que o comportamento da Endotelina-1 e do Fator de von Willebrand ainda precise ser melhor estudado nas diferentes situações de risco. Tarquini e colaboradores dosaram a Et-1 ao longo do tempo em 72 indivíduos (113), e realizaram análise multifatorial avaliando diferentes fatores de risco para a elevação circadiana de seus níveis, como diabete melito, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, idade, fumo e vasculopatia. Encontraram uma média ajustada para o ritmo de liberação do peptídeo mais elevada no diabete e na doença vascular, e uma maior amplitude de variação circadiana apenas no

primeiro. Não foram significativas as variações circadianas da endotelina para os demais fatores de risco, inclusive elevação do colesterol total e LDL-colesterol. Já Haaz (81) encontrou níveis mais elevados da Endotelina-1 em pacientes com hipercolesterolemia em relação a controles. Além disso, encontrou correlação positiva entre a apoproteína B e a endotelina apenas nos fumantes. Não houve correlação entre a endotelina e os triglicérides, a idade ou o sexo. Com relação a Endotelina-1 e lípidos, Ferri e colaboradores (67) encontraram níveis mais elevados em pacientes hipertensos com hiperlipidemia, mas associada a baixa tolerância à glicose. Nestes pacientes, encontraram inclusive uma correlação direta entre os níveis da insulina em jejum e a Endotelina-1.

Em relação a intervenções, pode-se mencionar também a melhora da vasodilatação endotélio-dependente em diabéticos tipo 2 após a administração de vitamina C (114). Este é um trabalho que avaliou de forma invasiva a resposta do endotélio à metacolina, e mostrou melhora com a infusão aguda de vitamina C apenas nos diabéticos, sem mudança nos controles. Sugerem com isso que a reatividade vascular alterada do diabetes tenha uma relação com a ação de radicais oxidantes e possa ser revertida.

Limitações do estudo

Além do que já citamos acerca de uma melhor caracterização de coronariopatia, uma limitação de nosso trabalho foi não ter avaliado nos pacientes a razão cintura-quadril. Seria uma aferição simples que teria acrescentado informações importantes acerca das anormalidades metabólicas que estamos estudando. Da mesma

forma, avaliamos o insulinismo pela concentração basal de insulina e do peptídeo-C, o que não permite maiores conclusões sobre o nível absoluto da secreção de insulina nestes pacientes (124,125), embora níveis elevados de insulina no jejum tenham apresentado, em estudos populacionais, uma correlação com risco cardiovascular (40,41,125).

Considerações metodológicas e outros estudos

Ao se avaliar disfunção endotelial, devemos ter em mente que o padrão-ouro para sua aferição é a verificação da vasodilatação endotélio-dependente (pós-infusão de acetilcolina ou hiperemia reativa), comparada com as respostas à infusão de nitrato, endotélio-independente, inicialmente realizados em estudos experimentais *in vitro* e com animais (35,102). Estes estudos são realizados via de regra com pletismografia e instilação de fármacos intra-arteriais ou compressão de vasos e administração de nitrato sublingual, aferindo diâmetros intra-arteriais através de doppler de alta resolução (103). Assim, são caros e têm difícil aplicabilidade clínica.

É interessante mencionar um trabalho que demonstrou alteração na vasodilatação, tanto em resposta à infusão de acetilcolina como de glicerilnitrato em diabéticos. McVeigh e colaboradores (105) compararam pacientes com DM 2 e controles sadios na resposta da vasculatura do antebraço à infusão de acetilcolina e posterior bloqueio com N-monometil-L-arginina (L-NMMA), bem como à infusão de glicerilnitrato (endotélio-independente). Encontraram alteração nas repostas vasodilatadoras dos diabéticos, tanto dependentes do endotélio quanto convencionais, quando comparados com indivíduos normais.

Já Enderle e colaboradores, mais recentemente, (103) avaliaram a função endotelial através da comparação entre os fluxos, por doppler de alta resolução, aferindo a vasodilatação independente e dependente do endotélio. Foram estudados diabéticos tipo 1 sem complicações, diabéticos tipo 2 com complicações crônicas e controles saudáveis. Foi encontrada disfunção endotelial apenas nos diabéticos tipo 2.

Nossos dados estão em consonância com estudos invasivos e não-invasivos que demonstram disfunção endotelial no diabetes tipo 2. Acreditamos que a metodologia que empregamos presta-se a responder a várias indagações sobre o comportamento do endotélio frente aos fatores de risco, seja em estudos intervencionais ou observacionais, sem a necessidade de técnicas mais caras e requintadas ou de métodos invasivos, com maior risco para os pacientes e controles.

Em conclusão, os dados apresentados evidenciam que pacientes diabéticos tipo 2, sem uso de insulina, não fumantes, sem microalbuminúria, têm maior grau de disfunção endotelial, representada pela elevação dos níveis de Et-1 no plasma, quando comparados a pacientes hipercolesterolêmicos e a controles normais. Essa diferença se mantém mesmo quando controlada para a idade e índice de massa corporal. Em nossa amostra, os níveis de peptídeo C e dos triglicérides determinam maior risco para a diferença na secreção de Endotelina-1, mas não do Fator de von Willebrand. Ao contrário de nossa hipótese, não encontramos diferença significativa nos níveis de Endotelina-1 e Fator de von Willebrand entre dislipidêmicos e controles normais. Como marcador não invasivo de disfunção endotelial, o FvW apresentou diferença significativa apenas entre os pacientes com DM 2 e dislipidemia em relação aos controles. Especula-se que a Endotelina-1 possa refletir mais os efeitos da insulina ou de algum fator específico do diabetes tipo 2 sobre a função endotelial.

CONCLUSÕES

1. Pacientes dislipidêmicos portadores de diabetes melito tipo 2 apresentam maior grau de disfunção endotelial quando comparados a pacientes com dislipidemia não-diabéticos e a controles saudáveis.
2. O grau de disfunção endotelial, avaliado através dos níveis plasmáticos do Fator de von Willebrand, é maior em pacientes dislipidêmicos com diabetes melito tipo 2 apenas quando comparados a controles saudáveis. Não encontramos diferença entre diabéticos tipo 2 com dislipidemia e dislipidêmicos não-diabéticos.
3. O grau de disfunção endotelial, avaliado através dos níveis plasmáticos de Endotelina 1, é maior em pacientes dislipidêmicos com diabetes melito tipo 2 tanto quando comparados a indivíduos com dislipidemia não-diabéticos como quando comparados a controles saudáveis. Não houve diferença entre dislipidêmicos não-diabéticos e controles normais.

ESTUDOS FUTUROS

A análise dos resultados obtidos permite abordar algumas questões que mereceriam estudos futuros:

1. Visando melhor aferir a importância dos marcadores de disfunção endotelial nos pacientes com diabetes melito tipo 2 com dislipidemia e nos pacientes dislipidêmicos, seria desejável um estudo longitudinal, controlado, avaliando a presença de desfechos clínicos e correlacionando-os temporalmente com os níveis de Et-1 e FvW;
2. Para avaliar de forma mais adequada as relações entre a insulina e os marcadores não-invasivos de disfunção endotelial, seriam desejáveis estudos com clamp euglicêmico hiperinsulinêmico nos três grupos;
3. Estudos com intervenção medicamentosa e acompanhamento a longo prazo poderiam ser realizados correlacionando desfechos clínicos e anormalidades metabólicas com os níveis da Et-1 e FvW longitudinalmente. Ou ainda, avaliando outros elementos envolvidos na patogênese da doença aterosclerótica - moléculas de adesão, por exemplo - e averiguando sua interação com a insulina, os lípidos, a disfunção endotelial e os desfechos clínicos;
4. Da população inicialmente delimitada, criou-se um subgrupo de indivíduos, que não foi avaliado no presente estudo: aqueles com tolerância diminuída à glicose. Consideramos mandatório avaliar o comportamento dos marcadores não-invasivos de disfunção endotelial neste grupo, tanto em corte transversal quanto em acompanhamento no tempo, uma vez que tais indivíduos podem representar uma condição potencialmente precoce no espectro do diabetes melito tipo 2 e da vasculopatia diabética.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Prezado Sr/a.:

Estamos conduzindo um estudo que procura pesquisar alterações precoces no sistema vascular (veias e artérias) de pacientes com diabete e pacientes com colesterol alto. Gostaríamos de contar com a sua participação que constará da coleta de sangue venoso - 10 ml de sangue- uma ou duas vezes quando da sua vinda para consulta no ambulatório. Com esta amostra de sangue faremos dosagens que permitirão identificar alterações que talvez no futuro devam receber tratamento especial para reduzir as chances das complicações cardiovasculares dos pacientes diabéticos e com colesterol alto. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr/a.

O Sr/a. é livre para escolher participar ou não deste estudo, e a sua recusa não implicará em nenhum prejuízo do seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição ou ao seu médico se assim o desejar. Todos os resultados obtidos serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa sendo resguardada sua total confidencialidade.

Se estiver de acordo em participar deste estudo, por favor assine na linha abaixo.

Paciente ou responsável

Dra. Beatriz S. Seligman

Dra. Nadine Clausell

ANEXO 2**QUESTIONÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO****1. Dados pessoais**

Nome: _____

Idade: _____

Registro: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Grupo sanguíneo: _____

Sexo: () F () M

2. Dados clínicos

Peso: _____ Altura _____ IMC: _____

Pressão arterial: _____

DM? S () N ()

Fármacos: _____

Tempo de Evolução do DM: _____

História familiar de DM? _____

Retinopatia S () N ()

Outras Patologias: _____

ACO ou TRH? _____

Controle do Diabetes: _____

Sedentarismo S () N ()

3. Dados laboratoriais

Uréia: _____

Creatinina: _____

Glicose: _____

Glicohemoglobina: _____

Albuminúria: _____

Frutosamina: _____

Colesterol total: _____

HDL: _____

Triglicérides: _____

LDL: _____

TTG glicose 0': _____

120': _____

Insulina: _____

Peptídeo C: _____

4. Endotélio:

Fator de von Willebrand: _____

Endotelina: _____

Fibrinogênio: _____

Data: _____

ANEXO 3

ANAMNESE CARDIOVASCULAR- G. A. ROSE

SEÇÃO A: DOR TORÁCICA AOS ESFORÇOS

1. Você já apresentou alguma dor ou desconforto no peito?

Sim	
Não	

Se "Não", vá para a Seção C.

2. Você tem dor ao subir lomba ou caminhar ligeiro?

Sim	
Não	*
Não caminha ligeiro ou sobe lombas	

3. Você tem dor ou desconforto quando caminha normal sem inclinação?

Sim	
Não	

4. O que você faz se apresenta a dor ao caminhar?

Para ou reduz a marcha ou usa nitrato	
Segue andando	*

5. Se você fica parado, o que ocorre com a dor?

Alivia	
Não alivia	*

6. Em quanto tempo?

10 minutos ou menos	
mais que 10 minutos	*

7. Pode me mostrar o local da dor?

Esterno (superior ou meso)	
Esterno inferior	
Hemitórax anterior esquerdo	
Membro superior E	
Outra	
Anotar todas as áreas mencionadas	

8. Sente a dor em algum outro local?

Sim	
Não	

SEÇÃO B: POSSÍVEL INFARTO

9. Você já apresentou dor no peito com duração de meia hora ou mais?

Sim _____

Não _____

SEÇÃO C: CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE

Se uma resposta for marcada com * não são necessárias questões adicionais

10. Você tem dor em alguma das pernas que surge ao caminhar?

Sim _____

Não * _____

11. Esta dor alguma vez surgiu em repouso ou sentado?

Sim * _____

Não _____

12. Em que parte da perna você a sente?

Inclui panturrilhas _____

Não inclui panturrilhas * _____

Se não mencionar panturrilhas, inquirir : Algum outro local?

13. Você tem a dor ao subir lombo ou andar depressa?

Sim _____

Não * _____

Nunca anda depressa ou sobe lombo _____

14. Você tem a dor andando normalmente sem inclinação?

Sim _____

Não _____

15. A dor às vezes desaparece se você continua andando?

Sim * _____

Não _____

16. O que você faz se a dor surge ao caminhar?

Para ou diminui o ritmo _____

Segue andando * _____

17. O que acontece com a dor se você para?

Alivia _____

Não alivia * _____

18. Em quanto tempo?

10 minutos ou menos _____

Mais que 10 minutos _____

ANEXO 4

Questionário para avaliação de neuropatia diabética

Avaliação de sintomas

1. Avaliação de fraqueza muscular:

O(a) sr.(sra.)

	SIM	NÃO
a) Tem dificuldade de abrir botões ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b) Deixa cair objetos no chão com frequência ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c) Tem dificuldade de levantar peso ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d) Tem dificuldade de subir escada ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e) Tem instabilidade ao caminhar ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Avaliação de sensibilidade:

Pense nas suas 2 pernas, pés, braços ou mãos e responda se você apresenta dor ou desconforto como: dormência, queimação ou formigamento em repouso, nos últimos 6 meses.

SIM () NÃO () Se sim, responda as seguintes perguntas:

2.1. Caracterize a dor ou desconforto:

Cansaço	<input type="checkbox"/>	Cãimbra	<input type="checkbox"/>
Queimação	<input type="checkbox"/>	Formigamento	<input type="checkbox"/>
Dolorimento	<input type="checkbox"/>	Dormência	<input type="checkbox"/>
Outros	<input type="checkbox"/>	Não sei	<input type="checkbox"/>

2.2. Local onde mais sente a dor ou desconforto:

Pés ou solas dos pés	<input type="checkbox"/>	Mãos	<input type="checkbox"/>
Pernas	<input type="checkbox"/>	Braços	<input type="checkbox"/>
Calcanhares	<input type="checkbox"/>	Outros	<input type="checkbox"/>

Especificar:

2.3. Estes sintomas acordam você à noite ?

SIM () NÃO () NÃO SEI ()

2.4. Quando pioram estes sintomas ?

DIA () NOITE () DIA E NOITE () NÃO SEI ()

2.5. Há quanto tempo ? _____ dias _____ meses _____ anos

2.6. Frequência de apresentação? (todos os dias, 3 vezes por semana, 1 vez por mês)

Avaliação de sinais e exame físico

1. Exame geral

PESO: _____ kg ALTURA: _____ cm

PA: _____ / _____ mmHg FC: _____ bpm

2. Pulsos e Reflexos:

	Direito	Esquerdo
Pedioso		
Tibial		

Escores:	
ausente	1
fraco	2
moderado	3
normal	4

3. Exame dermatológico dos pés:

Cor: normal () cianótico () hiperemia () palidez na elevação ()

Temperatura: normal () fria () quente ()

Lesões: ceratoses () alterações ulcerosas () infecção ()

4. Exame neurológico:

	Direito	Esquerdo
Reflexos profundos		
Aquileu		
Patelar		
Sensibilidade vibratória		
Hálux		
Index		

Escore	
Normal	1
Aumentado	2
Diminuído	3
Ausente	4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993; 16:434-444.
2. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannell WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; 23:105-111.
3. Panzram G. Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1987; 30:123-131.
4. Koskinen P, Manttari M, Manninen V, Huttunen JK, Heinonen OP, Frick MH. Coronary heart disease incidence in NIDDM patients in the Helsinki Heart Study. *Diabetes Care* 1992; 15:820-825.
5. Kuusisto J, Mykkanen L, Pyorala K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 1994; 43:960-967.
6. Lyons TJ. Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993; 71:26B-31B.
7. Andersen JL, Rasmussen LM, Ledete T. Diabetic macroangiopathy and atherosclerosis. *Diabetes* 1996; 45(supl3):S91-S94.

8. Christensen T, Neubauer B. Increased arterial wall stiffness and thickness in medium-sized arteries in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Acta Radiol* 1988; 29:299-302.
9. Colwell JA. Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; 42:8-11.
10. Bierman EL. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:647-656.
11. Colwell JA. Intensive insulin therapy in type II diabetes - Rationale and collaborative clinical trial results. *Diabetes* 1996; 45(suppl3):S87-S90.
12. Semenkovich CF, Heinecke JW. Perspectives in diabetes. The mystery of diabetes and atherosclerosis. Time for a new plot. *Diabetes* 1997; 46:334
13. American Diabetes Association Undiagnosed diabetes or impaired glucose tolerance and cardiovascular risk (editorial). *Diabetes Care* 1997; 20:127-128.
14. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-986.
15. American Diabetes Association Consensus Statement. Consensus Statment: detection and management of lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 1993; 16:106-112.
16. Bach R, Jung F, Kohsie KI. Factors affecting the restenosis rate after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Thromb Hemostas* 1994; 74(suppl1):S55-S77.

17. Carroza JP, Kuntz RE, Fishman RF, Baim DS. Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1993; 118:3444-3449.
18. Rabbani LE, Edelman ER, Ganz P, Selwyn AP, Loscalzo J, Bitti JA. Relation of restenosis after excimer laser angioplasty to fasting insulin levels. *Am J Cardiol* 1994; 73:323-327.
19. Aronson D, Bloomgarden Z, Rayfield EJ. Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:528-535.
20. Pieper GM, Gross GJ. Oxygen free radicals abolish endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1988; 255:H825-H833.
21. Lash JM, Bohlen HG. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. *Cir Res* 1991; 69:1258-1268.
22. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87:432-438.
23. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993; 88:2510-2516.
24. Elliot TG, Cockcroft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients. Blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci* 1993; 85:687-693.

25. Mc Veigh G, Brennan GM, Hohnston GD. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992; 35:771-776.
26. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:567-574.
27. Mäkimattila S, Mänysaari M, Groop PH, Summanen P, Virkamäki A, Schlenzka A, et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1997; 95:618-625.
28. Zeither AM. Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenesis link to myocardial ischaemia or epiphenomenon? *Lancet* 1996; 348:S10-S12.
29. Libby P. Atheroma: more than much. *Lancet* 1996; 348:S4-S6.
30. Shimokawa H, Vanhoutte PM. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and in atherosclerosis. *Circ Res* 1989; 64:900-914.31. 31. Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE. Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1468-1474.
32. Henry PD, Cabello O, Chen CH. Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Current Opin Lipidol* 1995; 6:190-195.

33. Arcaro G, Zener BM, Travia D. Non-invasive detection of early endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 1995; 114:247-254.
34. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997; 350(suppl1):S9-S13.
35. De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997; 39:325-342.
36. Reaven GM. Banting Lecture 1988: role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37:1595-1607.
37. Sussman KE. Hyperinsulinemia, the insulin-resistance syndrome, and the pathogenesis of atherosclerosis. In: Dranzin B, Eckel R, editors. *Diabetes and Atherosclerosis. Molecular Basis and Clinical Aspects*. New York, Amsterdam, London, Tokyo 1997.
38. Modan M, Or J, Darasic A. Hiperinsulinemia, sex and risk of atherosclerotic cardiovascular disease. *Circulation* 1991; 84:1165-1175.
39. Yokoyama I, Ohtake T, Momomura S, Yokenura K, Nishikawa J, Sasaki Y, et al. Hyperglycemia rather than insulin resistance is related to reduced coronary flow reserve in NIDDM. *Diabetes* 1998; 47:119-124.
40. Salonen JT, Lakka TA, Lakka H, Valkonen V, Everson SA, Kaplan GA. Hyperinsulinemia is associated with the incidence of hypertension and dyslipidemia in middle-aged men. *Diabetes* 1998; 47:270-275.

41. Bonora E, Willeit J, Kiechl S, Oberhollenzer F, Egger G, Bonadonna R, et al. U-shaped and J-shaped relationships between serum insulin and coronary heart disease in the general population. *Diabetes Care* 1998; 21:221-223.
42. Ledet T, Wissler RW. Reaction of the muscular and fibroelastic artery wall in diabetes. In: Dranzin B, Eckel RH, editors. *Diabetes and Atherosclerosis* 1991
43. Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, Laurenti O, Cassone MR, Bellini C, et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating levels *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metabolism* 1995; 80:829-835.
44. Baron AD. The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium-derived nitric oxide. *Diabetes* 1996; 45(suppl1):S105-S109.
45. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. *J Clin Invest* 1996; 97:2601-2610.
46. Jiang ZY, Lin YW, Clermont AC, Igarashi M, King GL. Direct demonstration of selective insulin resistance on PI 3-kinase pathway in vascular tissues in obese Zucker (fa/fa) rats. *Diabetes* 1997; 46(suppl):S210
47. Baron AD. Insulin and the vasculature - old actors, new roles. *J Invest Med* 1996; 44:406-412.
48. Noll G, Lüscher TF. Influence of lipoproteins on endothelial function. *Thrombosis Res* 1994; 74(suppl1):S45-S54.

49. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86:228-234.
50. Zeither AM, Drexler H, Wollslager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. *Circulation* 1991; 83:391-401.
51. Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Lüscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries: role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1991; 83:2012-2020.
52. Tanner FC, Tsachudi MR, Lüscher TF. Endothelium, lipoproteins and atherosclerotic vascular disease. *Vasc Med Rev* 1991; 2:161-176.
53. Sorensen KE, Celermajer DS, Georgakopoulos D, Hatcher G, Betteridge DJ, Deanfield JE. Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to lipoprotein-a level. *J Clin Invest* 1994; 93:50-55.
54. Vita J., Treasure CB, Nabel EG, McLenachen JM, Fish RD, Yeung AC, et al. Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1990; 81:491-497.
55. Bensoussan D, Levy-Toledano S, Passa P. Platelet hyperaggregation and increased plasma level of von Willebrand factor in diabetic patients with retinopathy. *Diabetologia* 1975; 11:307-312.

56. Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sondberg SM, Burnett Jr JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325:997-1001.
57. Myauchi T, Yanagisawa M, Tomizawa T. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; 2:53-54.
58. Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC, Ohalloran DJ, Bloom SR. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990; 33:306-310.
59. Schernathaner G, Schwartz C, Kuzmits R, Muller MM, Klemen U, Freyler H. Increased angiotensin-converting enzyme activities in diabetes mellitus: Analysis of diabetes type, state of metabolic control and occurrence of diabetic vascular disease. *J Clin Pathol* 1984; 37:307-312.
60. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
61. Remuzzi G, Benigni A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *The Lancet* 1993; 342:589-593.
62. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995; 333:357-363.
63. Yanagisawa M. The endothelin system: a new target for therapeutic intervention. *Circulation* 1994; 89:1320-1322.
64. Schimieder RE, Schobel HP. Is endothelial dysfunction reversible? *Am J Cardiol* 1995; 76:117-121.

65. Salomone AO, Elliot PM, Calvino R, Holt D, Kaski JC. Plasma immunoreactive endothelin concentration correlates with severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris and normal ventricular function. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28:14-19.
66. Wolpert HA, Steen SN, Istfan NW. Insulin modulates circulating endothelin-1 levels in humans. *Metabolism* 1993; 42:1027-1030.
67. Ferri C, Bellini C, Desideri G, Baldoncini R, De Sisti L, Santucci A. Elevated plasma endothelin-1 levels as an additional risk factor in non-obese essential hypertensive patients with metabolic abnormalities. *Diabetologia* 1997; 40:100-102.
68. Jensen T, Bjerre-Knudsen J, Feldt-Rasmussen B, Deckert T. Features of endothelial dysfunction in early diabetic nephropathy. *Lancet* 1989; 1:461-463.
69. Stehouwer CDA, Stroes ESG, Hackeng WHL, Mulder PGH, den Ottolander GJH. von Willebrand factor and development of diabetic nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1991; 40:971-976.
70. Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. von Willebrand Factor in plasma: a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J* 1991; 66:351-355.
71. Stehouwer CDA, Donker AJM. Urinary albumin excretion and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus: is endothelial dysfunction the missing link? *J Nephrol* 1993; 6:72-92.
72. Pedrinelli R, Giampietro O, Carnassi F. Microalbuminuria and endothelial dysfunction in essential hypertension. *Lancet* 1994; 344:14-18.

73. Conlan MG, Folsom AR, Finch A. Associations of Factor VIII and von Willebrand Factor with age, race, sex and risk factors for atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thromb Haemost* 1993; 70:380-385.
74. Stehouwer CDA, Nauta JJP, Zeldenrust GC. Urinary albumin excretion, cardiovascular disease and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340:319-323.
75. Stehouwer CDA, Fischer HRA, van Kuijk WR. Endothelial dysfunction precedes development of microalbuminuria in IDDM. *Diabetes* 1995; 44:351-358.
76. Myrup B, Mathiesen ER, Ronn B, Deckert T. Endothelial function and serum lipids in the course of developing microalbuminuria in IDDM. *Diabetes Res* 1994; 26:33-39.
77. Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeda R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand Factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1995; 81:87-89.
78. Knobl P, Schernthaner G, Schnack C, Pietschmann P, Griesmacher A, Prager R, et al. Thrombogenic factors are related to urinary albumin excretion rate in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1993; 36:1045-1050.
79. Turner RC, Millns H, Holman RR. Coronary heart disease and risk factors in NIDDM - experience from the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetologia* 1997; 40:S121-S122.

80. Standl E, Schnell O, Balleshofer B, Schleicher E, Muhr D, Ziegler AG, et al. Influence of diabetes mellitus on the heart and macrovascular mortality. *Diabetologia* 1997; 40:S125-S126.
81. Haak T, Marz W, Jungmann E, Hausser S, Siekmeier R, Gross W, et al. Elevated endothelin levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Clin Invest* 1994; 72:580-584.
82. Anderson TJ, Meredith IT, Charbonneau F, Yeung AC, Frei B, Ganz P. Endothelium-dependent coronary vasomotion relates to the susceptibility of LDL to oxidation in humans. *Circulation* 1996; 93:1647-1650.
83. Mangiafico RA, Malatino LS, Santonocito MS, Spada RS, Polizzi G, Tamburino G. Raised plasma endothelin-1 concentrations in patients with primary hypercholesterolemia without evidence of atherosclerosis. *Internation Angiol* 1996; 15:240-244.
84. Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Schmoeckel M, Suhler K, Richter WO. Increased endothelin plasma concentrations in patients with coronary artery disease or hyperlipoproteinemia without coronary events. *Res Exp Med (Berl)* 1993; 193:225-230.
85. Mathew V, Cannan CR, Miller VM, Barber DA, Hasdai D, Schwartz RS, et al. Enhanced endothelin-mediated coronary vasoconstriction and attenuated basal nitric oxide activity in experimental hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 96:1930-1936.
86. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendation: detection and management of lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 1996; S1-S12.

87. Reaven GM, Chen YDI, Jeppesen J, Maheux P, Krauss RM. Insulin resistance and hyperinsulinemia in individuals with small, dense, low density lipoprotein particles. *J Clin Invest* 1993; 92:141-146.
88. Poston L. Endothelial control of vascular tone in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1997; 40:S113-S114.
89. Treasure CB, Klein L, Weintraub WS, Talley D. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995; 332:481-487.
90. Anderson TJ, Meredith IT, Yeung AC, Frei B, Selwyn AP, Ganz P. The effect of cholesterol-lowering and antioxidant therapy on endothelium-dependent coronary vasomotion. *N Engl J Med* 1995; 332:488-493.
91. Egashira K, Hirooka Y, Kai H, Sugimashi M, Suzuki S. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 1994; 89:2519-2524.
92. Levine GN, Keaney JF, Vita JA. Cholesterol reduction in cardiovascular disease - clinical benefits and possible mechanisms. *N Engl J Med* 1995; 332:512-521.
93. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389.
94. World Health Organization. Diabetes mellitus: report of a WHO study group. 1985; Geneva: WHO. Technical Report Series 727

95. National Cholesterol Education Program Expert Panel (NCEP). National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on detection, evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol (Adult Treatment Panel II). JAMA 1993; 209:3015-3023.
96. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR, Paggi A, Tatsch M, Azevedo M. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. Diabetes Care 1997, 20:516-519.
97. Rose GA, Blackburn H, Gillum RF, Prineas RJ. Annex 6: London School of Hygiene Cardiovascular Questionnaire. In: Rose GA, editor. Cardiovascular Survey Methods. Geneva: 1982
98. Sweeney JD, Hoernig LA. Intraplatelet von Willebrand Factor and ABO blood group. Thrombosis Research 1992; 68:393-398.
99. Daniel WW. Procedures that utilize data from three or more independent samples. In: Daniel W.W. Applied nonparametric statistics. Boston: Houghton Mifflin Company, 1978:211
100. Zar JH. Multivariate analysis. In: J.H.Zar, editor. Biostatistical analysis. 3rd ed. 1996.
101. Rothman K. Chapter 14 - Multivariate analysis. In: Kenneth Rothman, editor. Modern Epidemiology. Boston: Little, Brown and Company, 1986:289-294.
102. Tanner FC, Boulanger CM, Lüscher TF. Endothelium-derived nitric oxide, endothelin, and platelet vessel wall interaction: alterations in hypercholesterolemia and atherosclerosis. Semin Thromb Hemost 1993; 19:167-175.

103. Enderle M, Benda N, Schmuelling R, Haering HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 1998; 21:271-286.
104. Desideri G, Ferri C, Bellini C, De Mattia G, Santucci A. Effects of ACE inhibition on spontaneous and insulin-stimulated endothelin-1 secretion: in vitro and in vivo studies. *Diabetes* 1997; 46:81-86.
105. Lahdenperä S, Syväne M, Kahri J, Taskinen MR. Regulation of low-density lipoprotein particle size distribution in NIDDM and coronary disease: importance of serum triglycerides. *Diabetologia* 1996; 39:453-461.
106. Ferri C, Carlomagno A, Coassin S, Baldoncini R, Faldetta MRF, Laurenti O, et al. Circulating endothelin-1 levels increase during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM men. *Diabetes Care* 1995; 18:226-233.
107. Halban PA, Shoelson SE. Insulin biosynthesis and chemistry. In: Kahn CR, Weir GC, editors. *Joslin's diabetes mellitus*. 13rd.ed. 1994:29-55.
108. Piatti P, Monti LD, Conti M, Baruffaldi L, Galli L, Phan CV, et al. Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans. *Diabetes* 1996; 45:316-321.
109. Ernst E, Resch KL. Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature. *Ann Intern Med* 1993; 118:956-963.
110. Bruno G, Cavallo-Perin P, Bargerò G, Borra M, D'Errico N, Pagano G. Association of fibrinogen with glycemic control and albumin excretion rate in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1996; 125:653-657.

111. Mangiafico RM, Malatino LS, Santonocito M, Spada RS, Polizzi G, Tamburino G. Raised plasma endothelin-1 concentrations in patients with primary hypercholesterolemia without evidence of atherosclerosis. *International Angiology* 1996; 15:240-244.
112. Lerman A, Holmes DR, Bell MR, Garrant KN, Nishimura RA, Burnett JC. Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans. *Circulation* 1995; 92:2426-2431.
113. Tarquini B, Perfetto F, Tarquini R, Cornelissen G, Halberg F. Endothelin-1's chronome indicates diabetic and vascular disease chronorisk. *Peptides* 1997; 18:119-132.
114. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996; 97:22-28.
115. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992; 90:1248-1253.
116. Haak T, Marz W, Jungmann E, Hausser S, Siekmeier R, Gross W, et al. Elevated endothelin levels in patients with hyperlipoproteinemia. *Clin Invest* 1994; 72:580-584.
117. Ferrannini E, Vichi S, Beck-Nielsen H, Laakso M, Paolisso G, Smith U, et al. Insulin action and age. *Diabetes* 1996; 45:947-953.

118. Luscher TF, Dohi Y, Tanner FC, Boulanger C. Endothelium-dependent control of vascular tone: effects of age, hypertension and lipids. *Basic Res Cardiol* 1991; 86:143-158.
119. Dohi Y, Kojima M, Sato K, Luscher TF. Age-related changes in vascular smooth muscle and endothelium. *Drugs Aging* 1995; 7:278-291.
120. Watts GF, O'Brien S, Silvester W, Millar JA. Impaired endothelium-dependent and independent dilatation of forearm resistance arteries in men with diet-treated non-insulin-dependent diabetes: role of dyslipidaemia. *Clin Sci* 1996; 91:567-573.
121. Gebara OC, Mittleman MA, Sutherland P, Lipinska I, Matheney T, Xu P, et al. Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham offspring study. *Circulation* 1995; 91:1952-1958.
122. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18:38-43.
123. Gunever N, Aytemir K, Aksoyek S, Gedik O. Plasma endothelin-1 levels in non-insulin dependent diabetes mellitus with macrovascular disease. *Coron Artery Dis* 1997; 8:253-258.
124. Reaven GM. The fourth Musketeer - from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 1995; 38:3-13.
125. American Diabetes Association Consensus Development Conference Report. Consensus development conference on insulin resistance. *Diabetes Care* 1998; 21:310-321.