

O Endotélio na Síndrome Metabólica

revisão

RESUMO

O endotélio é responsável pela manutenção da homeostase vascular. Em condições fisiológicas, mantém o tônus vascular, o fluxo sanguíneo laminar, a fluidez da membrana plasmática, o equilíbrio entre coagulação e fibrinólise, a inibição da proliferação e da migração celulares e o controle da resposta inflamatória. A disfunção endotelial é definida como uma alteração do relaxamento vascular por diminuição da biodisponibilidade de fatores de relaxamento derivados do endotélio, principalmente o óxido nítrico (NO). Estas respostas vasomotoras anormais ocorrem na presença de inúmeros fatores de risco para a aterosclerose. A síndrome metabólica é considerada um estado de inflamação crônica que se acompanha de disfunção endotelial e ocasiona aumento na incidência de eventos isquêmicos cardiovasculares e elevada mortalidade. Essa revisão abordará o processo fisiológico de regulação da função vascular pelo endotélio, os métodos disponíveis para avaliação *in vivo* da disfunção endotelial e as terapias capazes de melhorar a função vascular e conseqüentemente minimizar o risco cardiovascular dessa síndrome tão prevalente no nosso meio. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/2:291-303)

Descritores: Endotélio; Síndrome metabólica

ABSTRACT

The Endothelium in the Metabolic Syndrome.

The endothelium is responsible for the maintenance of vascular homeostasis. In physiological conditions it acts keeping vascular tonus, laminar blood flow, plasmatic membrane fluidity, the balance between coagulation and fibrinolysis and the inhibition of cellular proliferation, migration and the inflammatory response. Endothelial dysfunction is defined as an alteration of vascular relaxation induced by reduction of endothelium-derived relaxing factors (ERRFs), mainly nitric oxide. These abnormal vasomotor responses occur in the presence of various risk factors for atherosclerosis. The metabolic syndrome is considered a state of chronic inflammation accompanied of endothelial dysfunction causing an increased incidence of ischemic cardiovascular events and high mortality. This revision will encompass the physiological process of vascular function regulation, methods for *in vivo* assessment of endothelial dysfunction and therapies capable to improve vascular function and consequently minimize the cardiovascular risk due to metabolic syndrome. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/2:291-303)

Keywords: Endothelium; Metabolic syndrome

*Luciana Bahia
Luiz G. K. de Aguiar
Nivaldo Ribeiro Villela
Daniel Bottino
Eliete Bouskela*

*Disciplina de Endocrinologia e
Metabologia da Universidade
Estadual de Campinas –
UNICAMP, Campinas, SP.*

*Recebido em 10/12/05
Aceito em 17/01/06*

ATEROSCLEROSE TEM SIDO reconhecida como doença nos últimos 150 anos, mas a compreensão de como ocorre seu desenvolvimento tem evoluído dramaticamente. O entendimento atual da fisiopatologia da aterosclerose envolve vários fatores que integram de forma complexa, muito diferente da antiga visão de uma doença decorrente do depósito anormal de lipídeos na parede vascular. Dentre esses fatores, destacam-se de forma importante a inflamação e a disfunção endotelial. Independente do mecanismo que inicia a lesão, as alterações características da aterosclerose representam diferentes estágios de um processo inflamatório crônico nas artérias (1). Possíveis causas de disfunção endotelial, como hipercolesterolemia, tabagismo, estados de resistência insulínica, diabetes mellitus, hipertensão arterial, hiper-homocisteinemia, ou mesmo a combinação desses fatores, estão relacionadas à disfunção endotelial e a maior incidência de doença aterosclerótica.

O termo disfunção endotelial refere-se à alteração da vasodilatação dependente do endotélio e a desregulação das interações endotélio-células sanguíneas, que causam uma inflamação localizada e posteriormente lesões vasculares e trombose. A disfunção endotelial ocorre quando os efeitos vasoconstritores se superpõem aos efeitos vasodilatadores, geralmente como resultado de uma diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), com perda de sua ação vaso-protetora. Do ponto de vista prático, a disfunção endotelial é definida como uma alteração do relaxamento vascular dependente do endotélio. Estas respostas vasomotoras anormais ocorrem na presença de fatores de risco tradicionais para o aparecimento de doenças cardiovasculares (2).

Estudos prospectivos em humanos demonstraram claramente que a disfunção endotelial é um preditor independente de eventos cardiovasculares isquêmicos e de prognóstico a longo prazo (3).

FISIOLOGIA DO ENDOTÉLIO

O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo, com a sua força de cisalhamento (“*shear stress*”), atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que conduzem à produção de NO, pela enzima NO-sintase endotelial (eNOS). O período de vida esperado de uma célula endotelial em adultos é cerca de 30 anos. Após este período, as células tendem a morrer e são substituídas pelo crescimento de células

vizinhas. O endotélio regenerado parece não possuir a mesma habilidade para liberação dos fatores que inibem a contração, e sua resposta a estímulos torna-se diminuída.

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória.

Os primeiros autores que demonstraram de forma clara o papel do endotélio, através da relação entre a acetilcolina e a vasodilatação *in vivo*, foram Furchgott e Zawadzki (4). Observaram que, em algumas preparações isoladas de anéis de aorta torácica descendente de coelhos, a acetilcolina não produzia a vasodilatação esperada, ao contrário, produzia vasoconstrição (resposta paradoxal). Entretanto, isto ocorria devido à retirada involuntária do endotélio vascular durante a preparação do vaso. Com a preservação da integridade do vaso sanguíneo, pôde-se isolar o NO produzido pelo endotélio através do qual a acetilcolina promove aumento do diâmetro vascular (vasodilatação endotélio-dependente).

Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras (fator de hiperpolarização derivado do endotélio, prostaciclina, cininas) e também substâncias vasoconstritoras (angiotensina II e endotelina). Quando a função do endotélio é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência à vasodilatação.

O endotélio é capaz de produzir e liberar outras substâncias benéficas, além do NO, tais como fatores antioxidantes (enzima superóxido dismutase) e substâncias antiinflamatórias, tais como heparanas, prostaciclina e peptídeos natriuréticos. A liberação destas substâncias resulta na conservação do padrão de fluxo sanguíneo laminar em um saudável ciclo que impede a gênese e o desenvolvimento da aterosclerose.

A geração do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) evita a trombose local, mantendo sua superfície carregada negativamente e secretando heparanas e trombomodulinas. Além de ações anti-trombóticas, o endotélio mantém as células musculares lisas vasculares com baixo poder de proliferação, migração e apoptose, com o intuito da preservação da morfologia vascular normal.

É de fundamental importância que a fluidez da membrana plasmática endotelial seja mantida, pois permite o arranjo tridimensional adequado dos receptores de superfície, possibilitando ligações eficientes

com diversas moléculas circulantes para a correta sinalização intracelular.

Durante um processo inflamatório, o endotélio é capaz de expressar as chamadas moléculas de adesão (seletinas e integrinas), que permitem a ativação, o rolamento e a adesão de leucócitos à sua superfície. A oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), por exemplo, ativa a proteína-quinase C e um fator de transcrição nuclear (NF- κ B) e conseqüentemente leva ao aumento da transcrição de vários genes (enzima de conversão da angiotensina II, moléculas de adesão e citocinas). Desta forma, a exacerbação desta resposta inflamatória e sua posterior cronicidade podem conduzir à disfunção endotelial, propiciando eventos pró-coagulantes, diferenciação das células musculares lisas vasculares e macrófagos, tendo como conseqüência o início da doença aterosclerótica (2).

SÍNDROME METABÓLICA E FUNÇÃO ENDOTELIAL

A Síndrome Metabólica (SM) tem sido definida pela presença de intolerância à glicose e/ou diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade abdominal. A presença de resistência à insulina é o denominador comum e antecede a instalação das alterações citadas. A presença da SM está significativamente associada a maior mortalidade cardiovascular, independente de alterações na tolerância à glicose (5). Evidências crescentes sugerem que a progressão da resistência insulínica (RI) para o DM2 é paralela à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose (6). A disfunção endotelial pode ser detectada precocemente no espectro da RI, antes mesmo do diagnóstico de qualquer grau de intolerância à glicose, como demonstrada na microcirculação de filhos e irmãos de pacientes com DM2 (7).

Diversos mecanismos inter-relacionados contribuem para a disfunção endotelial relacionada à RI. Alguns componentes da SM, tais como baixos níveis de HDL-colesterol, aumento nos níveis de LDL-pequena e densa, a hipertensão arterial e o aumento da oferta de ácidos graxos livres são fatores de risco independentes para aterosclerose e estão associados com função anormal do endotélio (8).

A insulina, em concentrações fisiológicas, atua como um vasodilatador e estimula a produção endotelial de NO. No endotélio, a ativação da via PI-3-quinase é capaz de regular a produção do NO insulino-dependente. A presença de RI, secundária a um defeito sistêmico na via PI-3-quinase, determina um defeito combinado no transporte de glicose e na

vasodilatação endotélio-dependente mediados pela insulina. A ativação da via da MAP-quinase atua como fator estimulador do crescimento celular. Na vasculatura, esta via medeia não somente o crescimento vascular, mas também a habilidade das células endoteliais, das células musculares lisas e monócitos em migrarem. Além disso, parece mediar a expressão de fatores pró-trombóticos e pró-fibróticos (9). Conseqüentemente, os efeitos resultantes dessa ativação são pró-aterogênicos. Questiona-se se esta via teria também suas ações atenuadas pela presença de RI. Estudos de biópsia de músculo glúteo com medidas da ativação da PI-3-quinase e MAP-quinase, antes e após infusão de insulina em controles magros, obesos sem DM2 e pacientes com DM2, não confirmam tal suposição (10). Esses dados demonstram, inclusive, que a RI e os defeitos associados à SM são dependentes de um defeito específico da via de sinalização da PI-3-quinase. É possível que a atenuação da ativação desta via esteja associada com o aumento da ativação da via da MAP-quinase nas células vasculares. A atenuação dos efeitos da insulina sob a via PI-3-quinase determina alteração na vasodilatação endotélio-dependente, enquanto a manutenção dessas ações sob a via da MAP-quinase tem função pró-aterogênica.

ESTRESSE OXIDATIVO

Os estados de RI estão associados com a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, processo denominado estresse oxidativo (EO). Existem, inclusive, evidências sugerindo que o EO exerça um papel na patogênese da RI (11). O papel do EO na disfunção endotelial tem sido objeto de intensas pesquisas nos últimos anos. As principais fontes formadoras de espécies reativas de oxigênio na vasculatura são os complexos enzimáticos: NADPH-oxidases e da eNOS desacoplada. Descrevem-se elevações na atividade da NADPH-oxidase pela exposição à angiotensina II e ao TNF- α em cultura de células musculares lisas vasculares (12).

A eNOS contém dois domínios funcionais distintos. Um N-terminal oxigenase, onde se ligam a tetra-hidrobiopterina e a L-arginina e o C-terminal redutase com sítios de ligação para NADPH e flavina, entre outros. Durante a síntese de NO, a eNOS recebe e estoca elétrons para transformar os co-substratos O₂ e L-arginina em NO e L-citrulina. Na ausência de substrato ou co-fatores, a eNOS ativada não catalisa a oxidação de L-arginina em NO. Apesar disso, a enzima ainda é capaz de receber e estocar elétrons em seu

domínio redutase, doando-os um a um ao seu substrato O₂. Conseqüentemente, em seu estado desacoplado, a eNOS gera superóxido ao invés de NO. A ausência do co-fator tetra-hidrobiopterina é o principal responsável pelo desacoplamento da eNOS. Animais com RI apresentam níveis reduzidos de tetra-hidrobiopterina na vasculatura e produção aumentada de superóxido com conseqüente disfunção endotelial. Além disso, a administração oral de tetra-hidrobiopterina se mostrou capaz de reverter estas condições (13).

Por vezes não há diminuição dos níveis de NO e sim aumento da biodegradação do NO, reduzindo sua biodisponibilidade. A presença de superóxido na árvore vascular determina uma reação rápida com o NO local, formando uma espécie reativa de nitrogênio denominada peroxinitrito. As moléculas de peroxinitrito causam dano direto ao DNA celular, além de induzir o desacoplamento da eNOS. Esta última ação determina uma produção adicional de superóxido e perpetuação do dano endotelial.

HIPERINSULINEMIA E HIPERGLICEMIA

A hiperinsulinemia que acompanha a RI é um fator de risco independente para doença arterial coronariana (14). Como visto anteriormente, a insulina, em condições fisiológicas, promove liberação de NO via PI-3-kinase e sua exposição crônica leva a um aumento na expressão da eNOS. No entanto, indivíduos com RI exibem respostas vasodilatadoras diminuídas tanto à infusão de insulina quanto à de agonistas colinérgicos, sugerindo um bloqueio desses efeitos fisiológicos.

A hiperinsulinemia estimula a produção de endotelina-1 (ET-1) pelas células endoteliais e isto pode, conseqüentemente, promover disfunção endotelial por se contrapor aos efeitos vasodilatadores do NO e por aumentar a produção de superóxido.

Níveis elevados de insulina têm sido relacionados como causa de disfunção endotelial em voluntários saudáveis (15), embora em diabéticos o tratamento com este hormônio melhore a vasodilatação endotélio-dependente (16). Estudos da função endotelial em indivíduos com SM normotolerantes, intolerantes ou diabéticos demonstram a presença de disfunção endotelial que se agrava à medida que piora a tolerância à glicose (17). Nesse caso, a resistência insulínica com hiperinsulinemia e aumento de ácidos graxos livres seria o provável mecanismo inicial de disfunção endotelial e, com o desenvolvimento posterior da hiperglicemia, haveria piora do dano endotelial.

No Laboratório de Pesquisas em Microcirculação da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, estudamos um grupo de indivíduos com SM e intolerância à glicose e observamos uma diminuição da resposta vasodilatadora endotélio-dependente quando comparados com um grupo de indivíduos com SM normotolerantes (18).

ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

As elevações dos ácidos graxos livres (AGL) estão associadas com estados de RI, incluindo a SM, a obesidade e o DM2, e têm implicações na patogênese da RI. Os AGL alteram a captação de glicose no músculo esquelético, um efeito que pode ser mediado através da inibição do IRS associado à atividade do PI-3-quinase.

Ao nível vascular, observa-se diminuição na vasodilatação endotélio-dependente após infusão de uma emulsão lipídica com aumentos transitórios nos AGL circulantes em voluntários saudáveis (19). Há evidências de que os AGL reduzem a biodisponibilidade do NO por inibição da atividade da eNOS e estimulação da produção de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase (20).

ENDOTELINA

A endotelina 1 (ET-1) é um importante peptídeo vasoconstritor secretado pelas células endoteliais em resposta à insulina e outros agonistas. Níveis elevados de ET-1 são observados em indivíduos com RI e naqueles com aterosclerose (21), sugerindo um possível mecanismo patogênético. A ET-1 mostrou-se capaz de inibir a sinalização de insulina via PI-3-quinase (21). A inibição crônica da ET-1 melhorou a vasodilatação endotélio-dependente em ratos hiperinsulinêmicos, mas não teve nenhum efeito em animais controles (22). Por outro lado, a ET-1 também causa dano à função endotelial por induzir a atividade da NADPH-oxidase.

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

A atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) está aumentada nos estados de RI, hipertensão arterial e no curso da aterosclerose. Os componentes do SRA estão expressos no tecido adiposo e no endotélio vascular, sugerindo que este atue tanto de maneira endócrina

quanto parácrina, contribuindo para a disfunção endotelial. A infusão de angiotensina II induz a RI em animais, causando dano à sinalização de insulina por interferir com a interação entre o IRS-1 e a PI-3-quinase (23). Ao mesmo tempo, o bloqueio farmacológico do SRA é capaz de melhorar a sensibilidade insulínica (24).

O SRA influencia a função vascular de diversas maneiras. No endotélio, a enzima de conversão de angiotensina quebra angiotensina I, produz angiotensina II e catalisa a degradação de bradicinina, um vasodilatador gerador de NO. Além disso, a angiotensina II também estimula a produção de ET-1 e superóxido, via NADPH-oxidase vascular. Os componentes do SRA exercem seus efeitos no endotélio através de inúmeros mecanismos, e por isso a inibição desse sistema traz benefícios nos estados de RI melhorando a função endotelial e a sensibilidade insulínica.

ADIPOCINAS

A obesidade é fator de risco estabelecido para as doenças cardiovasculares (25). Essa relação ocorre pela associação de obesidade com outras co-morbidades (diabetes mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia etc.), porém nos últimos anos muitas evidências reforçam o papel das substâncias secretadas pelos adipócitos, denominadas adipocinas.

A leptina foi uma das primeiras adipocinas identificadas. Trata-se de um peptídeo liberado pelo tecido adiposo que regula o apetite, a massa corporal e a termogênese por suas ações ao nível do hipotálamo. Embora a deficiência de leptina, dada por uma mutação no gene da leptina, seja a causa de uma forma rara de obesidade, a maioria dos obesos humanos tem elevações nos níveis de leptina. Existe uma correlação inversa entre leptina e sensibilidade insulínica em indivíduos saudáveis, mesmo quando corrigida para o grau de adiposidade. Propõe-se que a RI em humanos está associada à resistência a leptina e que a hiperleptinemia pode ser um dos fatores patogênicos na SM (26). Os receptores de leptina também são expressos no endotélio. Este peptídeo exerce diversos efeitos neste sítio, incluindo ativação do sistema nervoso simpático, estimulação da angiogênese, aumento da agregação plaquetária e produção de superóxido (27). Em que extensão estes efeitos são inter-relacionados e envolvidos na patogênese da disfunção endotelial permanece para ser esclarecido. Em pacientes com doença coronariana estabelecida, os níveis de leptina foram preditores de eventos isquêmicos futuros (28), e em um

estudo caso-controle com indivíduos portadores de hipercolesterolemia a leptina foi fator de risco para eventos CV, mesmo após ajuste para todos os outros fatores de risco (29).

A resistina é produzida pelas células adiposas, mas também por vários outros tecidos/células, incluindo hipotálamo, pituitária, adrenais, pâncreas, tracto gastrointestinal, miócitos, baço e leucócitos. Recentemente demonstrou-se que os monócitos expressam o gen da resistina em grande quantidade, sugerindo uma relação importante entre o processo inflamatório e essa proteína (30). A resistina antagoniza as ações da insulina e pode causar diminuição da tolerância à glicose em animais geneticamente obesos ou com obesidade induzida pela alimentação, que expressam elevados níveis de resistina (31). Os estudos em humanos mostram evidências discrepantes em relação a essa associação. Recentemente, foi demonstrado que os níveis de resistina se correlacionaram com os marcadores inflamatórios de fase aguda e foram preditores de eventos cardiovasculares em diabéticos e não-diabéticos (32). Nosso grupo demonstrou que a resistina se correlacionou com os níveis de PCRt e com o fluxo sanguíneo de antebráço após acetilcolina (vasodilatação endotélio-dependente) em um grupo de 19 indivíduos com SM, porém sem relação com os índices de resistência insulínica (dados não publicados).

A adiponectina é uma proteína produzida exclusivamente pelo tecido adiposo que circula em grande quantidade e possui importantes efeitos no metabolismo, tais como efeitos anti-inflamatórios, anti-aterogênicos e sensibilizadores da insulina. Também tem sido implicada na regulação da homeostase energética, funcionando em combinação com a leptina. Por motivos ainda não esclarecidos, essa proteína está diminuída em indivíduos com diabetes mellitus, resistência insulínica e doença coronariana (33,34). A adiponectina parece proteger a parede vascular contra as alterações ateroscleróticas. A presença de receptores de adiponectina nas células endoteliais sugere um efeito direto dessa proteína sobre a vasculatura, através do aumento da fosforilação da eNOS, aumento da produção de NO e inibição do TNF- α , além dos efeitos benéficos indiretos (35). A hipoadiponectinemia está relacionada com disfunção endotelial em indivíduos com intolerância à glicose, diabéticos, obesos e hipertensos (36,37). Recentemente, foi demonstrado que altos níveis de adiponectina se associaram com menores índices de infarto de miocárdio em um estudo de 6 anos de acompanhamento entre homens sem doença cardiovascular, independente dos fatores de

risco tradicionais (38). Demonstramos que indivíduos com SM apresentavam menores níveis de adiponectina e de resposta vasodilatadora endotélio-dependente quando comparados com controles saudáveis, e que havia uma correlação entre os níveis de adiponectina e a variação da resistência vascular após acetilcolina, sugerindo um papel dessa adipocina na regulação da função vascular em indivíduos normais e com SM (dados não publicados).

INFLAMAÇÃO E ENDOTÉLIO

O início e a progressão do processo aterosclerótico são regulados por mecanismos inflamatórios, e a resistência insulínica interfere na cascata inflamatória. A SM está relacionada ao aumento na circulação sanguínea de marcadores inflamatórios, caracterizando um estado de inflamação crônica subclínica acompanhado de elevados níveis plasmáticos de proteína C-reativa (39).

A etapa inicial da aterosclerose é o recrutamento de monócitos e células T para a parede do vaso. A adesão é iniciada com o rolamento dos leucócitos no endotélio e subsequente ligação à superfície endotelial. Essa migração só é possível pela expressão de moléculas de adesão leucocitárias pelas células endoteliais. As moléculas de adesão são proteínas de superfície celular que são expressas em pequenas quantidades pelas células endoteliais e sua expressão está muito aumentada na presença de citocinas inflamatórias. A molécula de adesão denominada VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) pode ser induzida também por outras macromoléculas inflamatórias, como lipopolissacarídeos de bactérias Gram negativas e fosfolipídeos oxidados, que são gerados durante a oxidação de lipoproteínas. Esta atividade explica o aumento da adesividade das células endoteliais expostas à LDL oxidada. A molécula de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) é induzida na parede do vaso por meio de uma via dependente das citocinas. Sua expressão também pode ocorrer por estresse hemodinâmico. Ocorre aumento na expressão de moléculas de adesão em resposta a variações no *shear stress*, fazendo supor que alterações no fluxo sanguíneo, como por exemplo na hipertensão arterial, possam aumentar a expressão dessas moléculas. Assim, monócitos e linfócitos expressam moléculas de adesão em resposta à expressão endotelial, são ativados, sofrem rolamento seguido de adesão, transmigram para a camada íntima arterial perpetuando a resposta inflamatória. Os macrófagos expressam receptores (*scavengers*) para lipoproteínas modificadas, englobando partículas minimamente oxidadas

de LDL, formando as células espumosas. As moléculas de LDL oxidadas estimulam a produção de moléculas pró-inflamatórias pelas células endoteliais, incluindo moléculas de adesão leucocitárias e fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), e inibem a produção do NO. Os linfócitos T elaboram citocinas inflamatórias, como o γ -interferon e o fator de necrose tumoral beta (TNF- β), que estimulam os macrófagos, as células endoteliais e as células musculares lisas. Persistindo o processo inflamatório, há entrada de mais leucócitos na íntima, ativação de linfócitos T, formação de maior número de células espumosas, maior ativação e aderência plaquetárias. Esse intenso processo inflamatório dá origem a uma densa matriz extracelular que é uma lesão característica da aterosclerose avançada. O processo inflamatório responsável pelo surgimento e manutenção da aterosclerose, também pode ser o responsável pela ruptura da placa aterosclerótica, precipitando complicações trombóticas agudas. Os macrófagos ativados produzem enzimas proteolíticas capazes de degradar o colágeno, responsável pela resistência da capa fibrosa que protege a placa de ateroma, tornando-a fina, fraca e susceptível à ruptura (40).

O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e interleucina-6. A expressão de TNF- α está aumentada em indivíduos com RI no tecido adiposo e no músculo (41), e esses níveis circulantes aumentados podem contribuir para a RI e a disfunção endotelial. O TNF- α causa dano à via de sinalização de insulina por estimular a fosforilação da serina na proteína IRS, o que então inibe a atividade do receptor de insulina. O TNF- α também pode inibir a captação de glicose através de um aumento na expressão da forma induzida da óxido nítrico-sintase (iNOS) no músculo. Ao nível vascular, o TNF- α reduz a biodisponibilidade do NO em cultura de células endoteliais e impede a vasodilatação endotélio-dependente. Os possíveis mecanismos sugeridos incluem a redução mediada pelo TNF- α na meia vida do mRNA da NOS endotelial (eNOS) e o aumento na produção de superóxido pelo NADPH oxidase vascular. O TNF- α pode também contribuir para a apoptose da célula endotelial.

O SISTEMA PPAR

Essa superfamília de receptores nucleares tem sido muito estudada nos últimos anos pelo número crescente de evidências demonstrando importante papel na diferenciação dos adipócitos, metabolismos glicídicos

co e lipídico, além do controle vascular. São conhecidos três tipos de PPAR: alfa, gama e beta (teta).

Os PPAR γ são os reguladores-chave da diferenciação dos adipócitos, com estímulo para aumento na expressão de vários genes. A ativação desses receptores leva à diminuição da secreção do TNF- α e da leptina, ao mesmo tempo que aumenta a secreção de adiponectina (42). Conseqüentemente, há aumento da ingesta alimentar e maior substrato para adipogênese, porém ocorre bloqueio do efeito inibitório na cascata de sinalização da insulina e na liberação de ácidos graxos livres, melhorando as ações celulares da insulina (43).

A ativação dos PPAR γ é capaz de inibir a expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), das moléculas de adesão leucocitária (VCAM-1 e selectina-E) e da matrix-metaloproteinase-9 dos macrófagos (MMP-9), moléculas importantes na gênese da inflamação vascular e do processo aterosclerótico. Além disso, observam-se efeitos diretos sobre a parede vascular, tais como bloqueio de canais de cálcio, aumento do fator natriurético atrial, diminuição da secreção de endotelina 1 e do ligante do CD40 (43).

O ENDOTÉLIO COMO ALVO TERAPÊUTICO

Os efeitos benéficos de agonistas do PPAR γ na função endotelial já foram demonstrados em estudos clínicos em portadores de doença coronariana e diabéticos tipo 2 (44,45). No Laboratório de Pesquisas em Microcirculação (LPM), foi demonstrado que o uso de um agonista dos PPAR γ — rosiglitazona — foi capaz de melhorar a vasodilatação endotélio-dependente em um grupo de 18 indivíduos com síndrome metabólica sem diabetes, além de melhorar o perfil metabólico, inflamatório e aumentar consideravelmente os níveis de adiponectina (46). Esses dados sugerem um controle complexo desses receptores no processo aterosclerótico, porém até a presente data apenas um estudo clínico demonstrou que o uso de agonistas dos PPAR γ (pioglitazona) foi capaz de diminuir eventos cardiovasculares em nível de prevenção secundária (47).

No UKPDS, o grupo que utilizou a metformina apresentou menos eventos cardiovasculares, apesar do controle metabólico semelhante quando comparado com as outras modalidades de tratamento. A partir daí cresceu o interesse sobre os efeitos vasculares da metformina. Além dos conhecidos efeitos benéficos sobre o metabolismo glicídico, lipídico, parâmetros

hemostáticos e pressão arterial, recentemente foi demonstrado que a metformina possui efeitos vasculares diretos através da ativação da enzima AMP-quinase (AMPK) ao nível das células endoteliais, promovendo oxidação de ácidos graxos e diminuindo a lipotoxicidade presente nos estados de insulino-resistência (48). Estudamos, no LPM, o uso da metformina em 31 filhos de diabéticos tipo 2 e portadores de SM, e demonstramos melhora da função endotelial independente da melhora no perfil glicídico, lipídico e do IMC, sugerindo um efeito benéfico direto da metformina sobre as células endoteliais (49).

As estatinas são capazes de diminuir a morbiletalidade cardiovascular por diversos mecanismos, além da diminuição dos níveis de LDL colesterol. Observa-se melhora da função endotelial pelo aumento da biodisponibilidade do NO (aumento da atividade da eNOS), efeitos anti-inflamatórios (diminuição da expressão das moléculas de adesão e MCP-1) e antioxidantes (50,51). Esse efeito já é observado com o uso a curto prazo dessas substâncias, independente da diminuição do colesterol plasmático, sugerindo que o uso seja precoce em indivíduos com síndromes coronarianas agudas, mesmo naqueles com colesterol normal (52).

Como o mecanismo de lesão das células endoteliais se dá pelo estresse oxidativo, o uso de substâncias antioxidantes desperta grande interesse científico. As estatinas, os agonistas PPAR γ e a metformina possuem efeitos anti-oxidantes. O uso agudo da vitamina C diretamente na artéria é capaz de melhorar a vasodilatação endotélio-dependente (53), porém não existem resultados semelhantes com o uso oral e a longo prazo em humanos. A vitamina E é capaz de proteger as moléculas de LDL colesterol do processo de oxidação em humanos (54), porém estudos a longo prazo não comprovaram seus efeitos sobre a função endotelial. O uso de óleo de peixe foi capaz de melhorar a função endotelial agudamente em indivíduos com hipercolesterolemia (55).

Os efeitos benéficos dos inibidores da enzima de conversão da angiotensina e dos bloqueadores dos receptores da angiotensina II certamente vão além dos efeitos sobre a pressão arterial. Os inibidores da enzima de conversão de angiotensina melhoram a função endotelial através da diminuição da angiotensina II e conseqüentemente da diminuição da geração de radicais livres a partir da NAPH-oxidase, aumento da bradicinina e do NO (56). Os bloqueadores dos receptores ATI também são capazes de diminuir a produção de íons superóxido ao nível do endotélio e da musculatura lisa vascular, conseqüentemente aumentando a

biodisponibilidade do NO e limitando a oxidação das moléculas de LDL (57).

A terapia de reposição estrogênica demonstrou ser capaz de melhorar a função endotelial agudamente (58), porém os estudos de prevenção primária e secundária de doenças cardiovasculares falharam em demonstrar proteção para os eventos isquêmicos nas mulheres que faziam reposição hormonal. O papel da medroxiprogesterona, progestágeno mais comumente utilizado em associação com estrogênios, deve ser levado em consideração, pois os dados da literatura são divergentes quanto a atenuação dos efeitos benéficos dos estrógenos quando combinados à medroxiprogesterona (59,60).

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO ENDOTELIAL *IN VIVO*

A funcionalidade do endotélio pode ser avaliada através dos chamados testes de função. A resposta vasodilatadora endotélio-dependente pode ser estudada na circulação coronariana ou periférica (membros). A angiografia coronariana observa as alterações no diâmetro vascular em resposta à infusão intra-arterial de fármacos vasodilatadores (ex. bradicinina, metacolina, acetilcolina). A avaliação da liberação basal de NO pode ser avaliada com a utilização de inibidores da NO-sintase, tais como análogos da L-arginina e o NG-monometil-L-arginina (L-NMMA). Em coronárias saudáveis, a acetilcolina (ACh) induz à vasodilatação endotélio-dependente, e em pacientes com fatores de risco ou com doença aterosclerótica estabelecida, essa resposta está diminuída, abolida ou, paradoxalmente, pode ocorrer vasoconstrição. Esse método é invasivo, custoso e apresenta os riscos da cateterização coronariana. A função da microvasculatura coronariana também pode ser estudada por Doppler intracoronário, que mede o fluxo sanguíneo em resposta a estímulos farmacológicos e fisiológicos. Outros testes não-invasivos também são capazes de avaliar a função endotelial coronariana, tais como ecocardiograma com Doppler, tomografia com emissão de prótons e ressonância nuclear magnética. São exames com boa reprodutibilidade, porém caros e limitados a poucos laboratórios.

A avaliação da circulação periférica é mais acessível e também permite estudar curvas dose-respostas a agonistas e antagonistas. Para o estudo da resposta vasodilatadora endotélio-dependente na circulação periférica, são utilizados 2 métodos: a pletismografia de oclusão venosa e o doppler arterial. Existe uma correlação já estabelecida entre esses métodos e a angiografia coronariana (61).

A pletismografia de oclusão venosa já é utilizada há cerca de 100 anos para estudo das funções do sistema nervoso autônomo na regulação do fluxo sanguíneo dos membros (62). Após a descoberta das funções do endotélio, esse método passou a ser utilizado para avaliar a função endotelial indiretamente através da reatividade vascular. As alterações no fluxo sanguíneo e da resistência vascular do membro são medidas em resposta à injeção intra-arterial de agentes vasoativos dependentes ou independentes do endotélio. É um método invasivo, mas que possui mínimos riscos de injúria vascular e infecção, porém dificilmente aplicado em estudos de larga-escala.

No Laboratório de Pesquisas em Microcirculação, realizamos estudos com pletismografia de oclusão venosa com protocolos invasivo e não-invasivo. No protocolo invasivo, os pacientes são estudados após jejum noturno e acomodados em uma sala com ambiente climatizado com temperatura controlada em 20 ± 1 °C, e permanecem em repouso mínimo de 30 min antes do início do procedimento. Uma agulha 27G é inserida na artéria braquial do braço não-dominante para a infusão de drogas sob anestesia local. A medida não invasiva da pressão arterial é aferida durante todo o estudo no braço contralateral. A mudança do volume do membro superior é medida por um sensor, disposto ao redor da parte mais larga do antebraço e conectado ao pletismógrafo. A variação de volume do antebraço tem uma relação linear com a variação do fluxo sanguíneo. Durante a análise de fluxo é feito o bloqueio do retorno venoso por um manguito inflado na porção superior do braço a 40 mmHg, utilizando-se um insuflador rápido, e outro manguito insuflado no punho 40mmHg acima da pressão arterial sistólica 1 min antes do início das medidas para isolamento da circulação da mão, pois esta microcirculação possui muitos *shunts* arteriovenosos, tornando desproporcional o fluxo sanguíneo em relação ao volume do antebraço. As medidas são realizadas em condições de repouso e após infusão contínua de 7,5, 15 e 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ de acetilcolina a cada 5 min e nitroprussiato de sódio nas doses de 2, 4 e 8 $\mu\text{g}/\text{min}$, com intervalo de 30 minutos entre as duas drogas. O fluxo sanguíneo do antebraço é medido durante os últimos 2 min da infusão de cada dose. São analisadas 4 curvas a cada tempo do estudo. Essas curvas sofrem tratamento matemático que resulta em medidas de fluxo sanguíneo em $\text{ml}/\text{min}/100\text{ml}$ de tecido, e a média de 4 medidas é utilizada na análise (figura 1). A resistência vascular é calculada dividindo o valor da pressão arterial média pelo fluxo sanguíneo a cada momento. São geradas curvas dose-resposta de

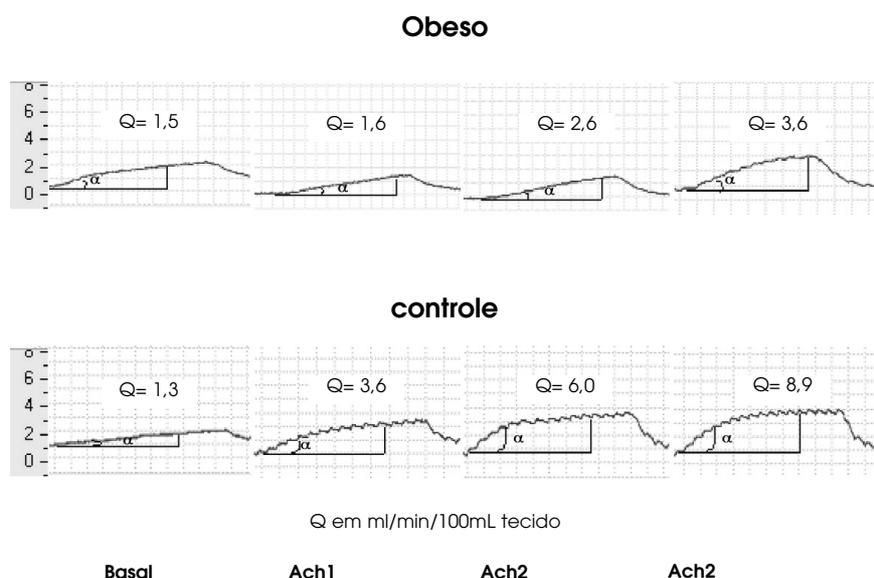


Figura 1. Fluxo sanguíneo de antebraço (Q) após infusão de acetilcolina em indivíduo obeso (menor incremento do fluxo) e magro controle (maior incremento do fluxo). A inclinação das curvas de variação de volume do antebraço é proporcional às variações do fluxo sanguíneo.

incremento de fluxo sanguíneo e decréscimo de resistência vascular (figura 2).

Para o protocolo não-invasivo, utilizamos oclusão arterial do membro por 5 minutos para avaliação da vasodilatação dependente do endotélio (*shear stress*) e a administração de nitroglicerina sublingual para avaliação da vasodilatação endotélio-independente.

Outra técnica útil na avaliação da função endotelial é o estudo da variação do calibre da veia dorsal da mão através de um transdutor após a infusão de substâncias vasoativas. Apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos por ser minimamente invasivo, com alta sensibilidade e reprodutibilidade (63).

O Doppler da artéria braquial tem sido utilizado de maneira crescente por ser menos invasivo, seguro, rápido e poder ser realizado em maior número de pacientes. A oclusão do fluxo sanguíneo durante 5 minutos e posterior liberação resulta em hiperemia reativa por aumento do *shear stress*. Mede-se o diâmetro da artéria braquial, no estado de repouso e após a dilatação fluxo-mediada (figuras 3 e 4). O mecanismo de vasodilatação não é exclusivamente dependente da produção de NO, havendo a participação de outras substâncias (prostanóides, fator hiperpolarizante do endotélio), com mecanismos ainda pouco conhecidos. O diâmetro do vaso interfere nas respostas (maior diâmetro basal, menor dilatação) e as

medidas são extremamente dependentes do examinador e do aparelho utilizado. Um bom treinamento do observador para realização da técnica (usualmente meses) é necessário para evitar erros e artefatos, com isso assegurando a qualidade e reprodutibilidade das medidas (64).

Realizamos um estudo comparativo entre a resposta vasodilatadora mediada por fluxo e após nitroglicerina sublingual através da pletismografia de oclusão venosa e doppler de artéria braquial em 12 indivíduos diabéticos tipo 2 e 11 indivíduos controles. Observamos que ambos os métodos identificaram diminuição da vasodilatação dependente do endotélio nos diabéticos quando comparados com os controles, porém sem correlação entre os resultados, inerentes às diferenças nas técnicas utilizadas (65).

A medida do endurecimento arterial, incluindo a velocidade da onda de pulso e a distensibilidade arterial, também tem sido investigada como método não-invasivo (66). O endurecimento da parede arterial é dependente de fatores dinâmicos, como a liberação de NO, mas também das características estruturais fixas da parede do vaso (fibrose e calcificação). A relação precisa entre função endotelial e endurecimento arterial necessita de mais estudos.

Vários fatores influenciam as respostas vasodilatadoras e devem ser considerados antes e durante os exames, tais como temperatura ambiente, jejum ou

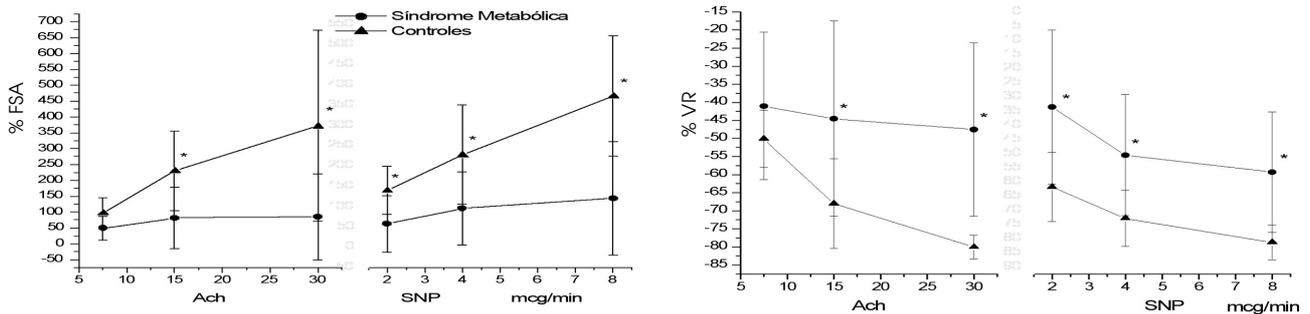


Figura 2. Curvas dose-resposta de incremento de fluxo sanguíneo de antebraço (ml/min/100ml tecido) (A) e decréscimo da resistência vascular (mmHg por ml/min/100ml tecido) (B). (* $p < 0,05$)

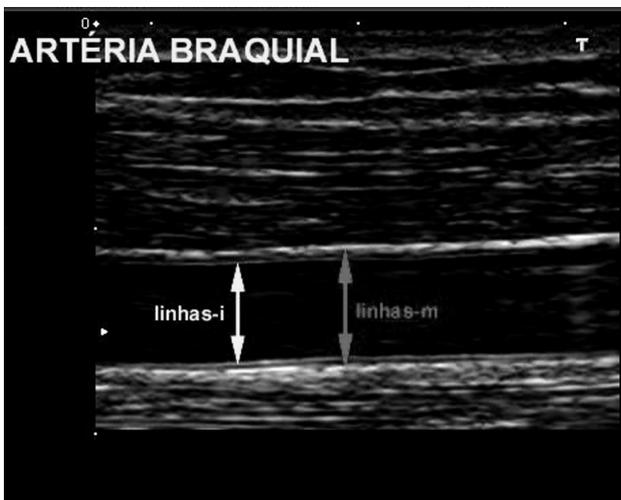


Figura 3. Imagem ultrassonográfica da artéria braquial. Linha s-i= diâmetro íntima-íntima e Linha s-m= diâmetro média-adventícia.

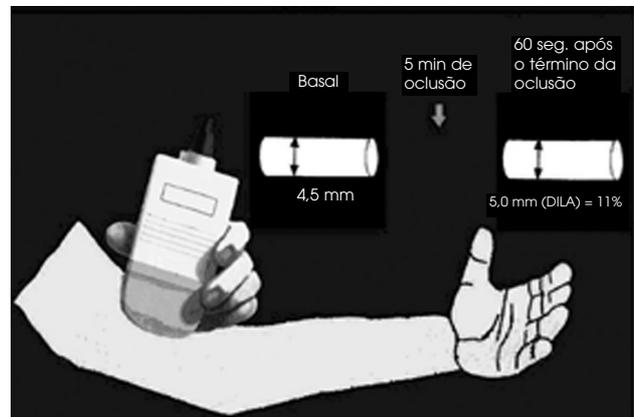


Figura 4. Dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DILA).

estado pós-prandial, uso prévio de medicamentos, estímulo simpático, exercícios, fase menstrual, caféina e fumo.

Os métodos disponíveis na atualidade para o estudo da função endotelial são úteis para avaliar os fatores de risco, mecanismos da doença CV e potenciais efeitos de intervenções. No entanto, devem ser conhecidas as limitações de cada técnica na escolha para estudos futuros.

CONCLUSÃO

As células endoteliais são os primeiros componentes do sistema vascular expostos aos fatores de risco que podem levar à injúria vascular e à doença. A presença de

disfunção endotelial parece ser o primeiro passo na progressão da aterosclerose. O estudo da função endotelial em indivíduos com síndrome metabólica é útil para avaliar os efeitos dos fatores de risco e das intervenções terapêuticas. Inúmeras substâncias têm demonstrado efeitos benéficos agudos sobre a função endotelial, porém apenas algumas classes de medicamentos demonstraram efeito cárdio-protetor a longo prazo. Na atualidade, os métodos disponíveis para estudo da vasodilatação endotélio-dependente apresentam limitações que devem ser do conhecimento de todos os médicos que se propõem a estudar a doença cardiovascular aterosclerótica. É provável que, no futuro, testes de avaliação da função endotelial façam parte obrigatória da rotina clínica inicial e após tratamentos em indivíduos com fatores de risco cardiovascular.

REFERÊNCIAS

1. Ross R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. **N Eng J Med** 1999;340:115-26.
2. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: from vascular biology to clinical applications. **Am J Cardiol** 2002;90(10C):40L-8.
3. Schachinger V, Zeiher AM. Prognostic implications of endothelial dysfunction: does it mean anything? **Coron Artery Dis** 2001;12:435-43.
4. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** 1980;288:373-6.
5. Lakka HM, Laaksonen DE, Laaka TA. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA** 2002;288:2706-16.
6. Hsueh WA, Christopher JL, Quiñones MJ. Insulin resistance and the endothelium. **Am J Med** 2004;117:109-17.
7. Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. **Circulation** 2000;101:1780-4.
8. Fagan TC, Deedwania PC. The cardiovascular dysmetabolic syndrome. **Am J Med** 1998;105(suppl):77S-82S.
9. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest** 2000;106:165-9.
10. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr P, et al. Insulin resistance differentially affects the PI3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. **J Clin Invest** 2000;105:311-20.
11. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relationship? **Diabetologia** 1996;39:357-63.
12. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. **Circ Res** 2000;86:494-501.
13. Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Maegawa H, Kojima H, et al. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. **Circ Res** 2000;87:566-73.
14. Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. **N Engl J Med** 1996;334:952-7.
15. Arcaro G, Cretti A, Balzano S, Lechi A, Muggeo M, Bonora E. Insulin causes endothelial dysfunction in humans: sites and mechanisms. **Circulation** 2002;105:576-82.
16. Yehkavaara S, Makimattila S, Schlenzka A, Vakkilainen J, Westerbacka J, Yki-Jarvinen H. Insulin therapy improves endothelial function in type 2 diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2000;20:545-50.
17. Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. **Diabetes** 1999;48:1856-62.
18. Aguiar LGK, Bahia L, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. High fasting plasma glucose is associated with impairment of endothelial function in insulin-resistant non-diabetic Brazilian subjects. **Diabetologia** 2004;47(suppl 1):A441.
19. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. **J Clin Invest** 1999;103:253-9.
20. Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, et al. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. **J Clin Invest** 1997;100:1230-9.
21. Piatti P, Monti LD, Galli L, Fragasso G, Valsecchi G, Conti M. Relationship between endothelin-1 concentration and metabolic alterations typical of the insulin resistance syndrome. **Metabolism** 2000;49:748-52.
22. Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Effects of chronic endothelin blockade in hyperinsulinemic hypertensive rats. **Am J Physiol** 1995;269:H2017-21.
23. Folli F, Saad MJ, Velloso L, Hansen H, Carandente O, Feener EP. Crosstalk between insulin and angiotensin II signalling systems. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** 1999;107:133-9.
24. Katovich MJ, Pachori A. Effects of inhibition of the renin-angiotensin system in the cardiovascular actions of insulin. **Diabetes Obes Metab** 2000;2:3-4.
25. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Bautista L, Franzosi MG, Commerford P, et al. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case-control study. **Lancet** 2005;366:1640-9.
26. Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, de Courten M. Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. **Ann NY Acad Sci** 1999;892:25-44.
27. Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science** 1998;281:1683-6.
28. Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Johnson BD, Somers VK. Plasma leptin and prognosis in patients with established coronary atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol** 2004;44:1819-24.
29. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). **Circulation** 2001;104:3052-6.
30. Adeghate E. An update on the biology and physiology of resistin. **Cell Mol Life Sci** 2004;61:2485-96.
31. Yang RZ, Huang Q, Xu A, McLenithan JC, Eisen JA, Shuldiner AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in humans and mouse. **Biochem Biophys Res Commun** 2003;310:927-35.
32. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. **Circulation** 2005;111:932-9.
33. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:1930-5.

34. Dunajska K, Milewicz A, Jedrzejuk D, Szymczak J, Kuliczowski W, Salomon P, et al. Plasma adiponectin concentration in relation to severity of coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors in middle-aged men. **Endocrine** 2004;25:215-21.
35. Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89:2563-8.
36. Fernandez-Real JM, Castro A, Vazquez G, Casamitjana R, Lopez-Bermejo A, Penarroja G, et al. Adiponectin is associated with vascular function independent of insulin sensitivity. **Diabetes Care** 2004;27:739-45.
37. Shimabukuro M, Higa N, Asahi T, Oshiro Y, Takasu N, Tagawa T, et al. Hypoadiponectinemia is closely linked to endothelial dysfunction in man. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:3236-40.
38. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. **JAMA** 2005;291:1730-7.
39. Haffner SM. Insulin resistance, inflammation and the prediabetic state. **Am J Cardiol** 2003;92:18J-26J.
40. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation** 2002;105:1135-43.
41. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest** 1995;95:2409-15.
42. Maeda N, Takahashi M, Finahasi T, et al. PPAR gamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose derived protein. **Diabetes** 2001;50:2094-9.
43. Chinetti-Gbaughidi G, Fruchart JC, Staels B. Role of the PPAR family of nuclear receptors in the regulation of metabolic and cardiovascular homeostasis: new approaches to therapy. **Curr Opin Pharmacol** 2005;5:177-83.
44. Pistocho F, Passauer J, Fischer S, Fuecker K, Hanefeld M, Gross P. In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control. **Diabetes Care** 2004;27:484-90.
45. Sidhu JS, Cowan D, Kaski JC. Effects of rosiglitazone on endothelial function in men with coronary artery disease without diabetes mellitus. **Am J Cardiol** 2004;94:151-6.
46. Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. Rosiglitazone improves endothelial dysfunction in insulin-resistant nondiabetic Brazilian subjects. **Diabetes** 2004;53(suppl 2):A482.
47. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial. **Lancet** 2005;366:1279-89.
48. Zou M-H, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo - role of mitochondrial reactive nitrogen species. **J Biol Chem** 2004;279:43940-51.
49. Aguiar LGK, Bahia L, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. Metformin improves vascular reactivity at brachial artery in first-degree relatives of diabetes mellitus subjects with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. **Diabetes** 2005;54(suppl 1):A150.
50. Mehta JL. Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease? **Endothelium** 2003;10:3-4.
51. Wassman S, Nickenig G. Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction-modulation by statins. **Endothelium** 2003;10:23-33.
52. Tsai TT, Nallamothu BK, Mukherjee D, Rubenfire M, Fang J, Chan P, et al. Effect of statin use in patients with acute coronary syndromes and serum low-density lipoprotein \leq 80mg/dl. **Am J Cardiol** 2005;96:1491-3.
53. Ting HH, Timimi FK, Haley EA, Roddy M, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in forearm resistance vessels of humans with hypercholesterolemia. **Circulation** 1997;95:2617-22.
54. Jialal I, Fuller CJ, Huet BA. The effect of alpha-tocopherol supplementation on LDL oxidation: a dose-response study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 1995;15:1513-9.
55. Chin JP, Dart AM. Therapeutic restoration of endothelial function in hypercholesterolemic subjects: effects of fish oils. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 1994;21:749-55.
56. Neutel JM. Effect of the renin-angiotensin system on the vessel wall: using ACE inhibition to improve endothelial function. **J Hum Hypertens** 2004;18:599-606.
57. Koh KK, Ahn JY, Han SH, Kim DS, Jin DK, Kim HS, et al. Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blocker in hypertensive patients. **J Am Coll Cardiol** 2003;42:905-10.
58. Reis SE, Gloth ST, Blumenthal RS, Resar JR, Zacur HA, Gerstenblith G, et al. Ethinyl-estradiol acutely attenuated abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women. **Circulation** 1994;89:2545-51.
59. Oishi A, Ohmichi M, Takahashi K, Takahashi T, Mori-Abe A, Kawagoe J, et al. Medroxyprogesterone acetate attenuates estrogen-induced nitric oxide production in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2004;324:193-8.
60. Clarkson TB, Appt SE. MPA and postmenopausal coronary artery atherosclerosis revisited. **Steroids** 2003;68:941-51.
61. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulation. **J Am Coll Cardiol** 1995;26:1235-41.
62. Brodie TG, Russel AE. On the determination of the rate of blood flow through an organ. **J Physiol** 1905;32:47-9.
63. Moreno H Jr, Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, et al. Endothelial dysfunction in human hand veins is rapidly reversible after smoking cessation. **Am J Physiol** 1998;275:H1040-5.
64. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. A report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. **J Am Coll Cardiol** 2002;39:257-65.

65. Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Regattieri N, Montenegro C, Bottino D, et al. Non-invasive assessment of endothelial function in type 2 diabetics and controls: comparison of two different methods. **Diabetes** 2005;55(suppl 1):A508.
66. Oliver JJ, Webb DJ. Noninvasive assessment of arterial stiffness and risk of atherosclerotic events. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 2003; 23:554-566.

Endereço para correspondência:

Luciana Bahia
Av. Visconde de Albuquerque 1400-501
22450-000 Rio de Janeiro, RJ
E-mail: lucianabahia@uol.com.br