

Níveis Glicêmicos Usados Para o Diagnóstico do Diabetes Mellitus Alteram a Função Endotelial? Estudo em Rim Isolado de Coelhos Normais

artigo original

Filipe de Souza Affonso
Solange Cailleaux
Leonardo F. Corrêa Pinto
Eduardo Tibiriçá
Marília de Brito Gomes

Disciplina de Diabetes e Metabologia (FSA,MBG), Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ; e Laboratório de Farmacologia Neuro-Cardiovascular (SC,LFCP,ET), Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica – Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

Recebido em 28/02/03
Revisado em 09/06/03
Aceito em 18/06/03

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos agudos de concentrações de glicose usadas para o diagnóstico do diabetes mellitus, na reatividade vascular (RV) de rim isolado de coelhos normais. **Metodologia:** Rins isolados de coelhos normais foram agudamente expostos (3hs) a concentrações normais (5,5mM) e elevadas (7, 7,8 e 11,1mM) de glicose. A RV foi avaliada com acetilcolina. **Resultado:** Houve redução significativa na vasodilatação dependente do endotélio no grupo com glicose 11,1mM em comparação ao controle (redução máxima na pressão de perfusão de 24±3 vs. 41±4%; p<0,05), mas não ocorreram diferenças significativas entre os grupos com glicose 7 e 7,8mM e o controle (reduções máximas na pressão de perfusão de 39±4 e 34±3, respectivamente, vs. 41±4%, p>0,05). **Conclusão:** Níveis de glicose utilizados para o diagnóstico pós-TOTG de DM são capazes de provocar alterações agudas na RV. Estes efeitos não foram observados com os valores diagnósticos de jejum. Especulamos que a glicemia pós-TOTG possa estar mais relacionada com a presença de disfunção endotelial do que os níveis diagnósticos de jejum e, por isto, se correlacione melhor com o risco cardiovascular. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:716-720)

Descritores: Endotélio; Hiperglicemia; Reatividade vascular; Circulação renal

ABSTRACT

Is Endothelial Function Altered by Glucose Levels Used in the Diagnosis of Diabetes Mellitus? Study in the Isolated Rabbit Kidney.

Objective: To assess the acute effects of glucose levels used in diagnosis of diabetes mellitus on vascular reactivity in the isolated rabbit kidney. **Methods:** Isolated rabbit kidneys were acutely exposed (3hs) to normal (5.5mM) and high (7, 7.8 and 11.1mM) glucose concentrations. Vascular reactivity was evaluated with acetylcholine. **Results:** Kidneys perfused with glucose 11.1mM (maximal reduction in the perfusion pressure of 24±3 vs. 41±4%; p<0.05), but not with 7 and 7.8mM (maximal reduction in the perfusion pressures of 39±4 e 34±3%, respectively, vs. 41±4%, p>0.05) showed significantly decreased endothelium-dependent relaxations compared to control. **Conclusions:** High glucose levels typically observed after an oral glucose challenge can acutely alter vascular reactivity. We speculated that post-OTG glucose levels are more strongly related to endothelial dysfunction and this is the reason why it is more correlated with cardiovascular disease. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/6:716-720)

Keywords: Endothelium; Hyperglycemia; Vascular reactivity; Renal circulation

ODIABETES MELLITUS (DM) é considerado atualmente um importante problema de saúde pública devido à sua crescente prevalência e complicações crônicas micro e macrovasculares, que geram elevados custos dire-

tos e indiretos, comprometendo a produtividade e qualidade de vida de seus portadores, e acarretando uma maior taxa de morbimortalidade. A prevalência do DM vem aumentando tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. No Brasil, os dados do estudo multicêntrico de DM mostraram uma prevalência de 7,6% na população de 30 a 69 anos, e estima-se que no ano 2.010 possam existir cerca de 11 milhões de diabéticos no país, representando um aumento de 100% em relação aos atuais cinco milhões de diabéticos (1).

A alta morbimortalidade dos portadores do DM está na dependência de suas complicações crônicas, que ocorrem em vários tecidos, envolvendo a micro e a macrovasculatura. De fato, o DM contribui para a maioria dos casos de doença renal terminal no mundo ocidental, sendo também a principal causa de cegueira adquirida e de amputações não traumáticas dos membros inferiores. Após a descoberta da insulina em 1921, a principal causa de morbidade e mortalidade nos diabéticos passou a ser a doença cardiovascular (2). Segundo o estudo de Framingham (3), mais de 50% da mortalidade dos diabéticos está relacionada à doença cardiovascular, e a incidência de doença cérebro-vascular e arterial coronária é duas a quatro vezes maior nos pacientes diabéticos do que na população geral. Agravando a situação, os diabéticos que desenvolvem doença cardiovascular apresentam pior prognóstico e maior mortalidade (4-7).

Em 1997, a Associação Americana de Diabetes (ADA) modificou seu critério diagnóstico de DM, propondo que o mesmo fosse definido por uma glicemia de jejum maior ou igual a 7 mM e não recomendando o uso do teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Isto vem sendo alvo de críticas, uma vez que esta mudança no critério diagnóstico não foi elaborada com base numa análise específica do risco de complicações cardiovasculares (8).

Como atualmente uma série de evidências indica que a fisiopatogenia da doença vascular do DM está associada à disfunção endotelial (9), no presente estudo objetivamos avaliar os efeitos agudos das diferentes concentrações de glicose, rotineiramente utilizadas para o diagnóstico de DM, na reatividade da microcirculação renal de coelhos não diabéticos.

METODOLOGIA

Procedimentos Gerais

Foram utilizados coelhos albinos *New Zealand* anestesiados com pentobarbital sódico (40mg/kg, IV), imobilizados com brometo de pancurônio (1mg/kg, IV) para permitir ventilação controlada

mecânica e anticoagulados com heparina (500UI/kg, IV). Após realização de laparotomia mediana, ambos os rins são isolados e as artérias e veias renais cateterizadas. A seguir o rim é instalado em placa de petri e a artéria renal perfundida com solução nutriente (Krebs-Henseleit) aerada com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) com fluxo constante (2ml/min) para posterior registro da pressão de perfusão. Após indução de pré-contracção da circulação renal com perfusão contínua de noradrenalina (10µM), são realizadas curvas dose-resposta para verificação do efeito vasodilatador da substância a ser testada: acetilcolina (vasodilatação dependente do endotélio). A linha de perfusão foi conectada a um transdutor de pressão (Modelo 7016, Ugo Basile, Comerio, Itália) e as modificações da pressão de perfusão foram registradas continuamente através de um sistema de pré-amplificação acoplado a um fisiógrafo (Gemini 7070, Ugo Basile, Comerio, Itália). A composição da solução de Krebs-Henseleit utilizada é a seguinte (em mM): 118 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO₄, 2,5 CaCl₂·6H₂O, 1,2 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 5,5 glicose e 0,25% albumina sérica bovina (pH 7,4).

Protocolos Experimentais

Vasodilatação dependente de endotélio - Efeitos da glicose.

A circulação renal de coelho foi perfundida com soluções com diferentes concentrações de glicose durante 3 horas. Foram realizados grupos com concentração fisiológica de glicose (5,5mM, grupo controle) e com as seguintes concentrações elevadas de glicose: 7mM (critério diagnóstico de jejum da ADA), 7,8mM (critério diagnóstico de jejum do *National Diabetes Data Group* - NDDG e da Organização Mundial da Saúde - OMS) e 11,1mM (critério diagnóstico do TOTG). Após a perfusão, foi induzida pré-contracção sub-máxima (80% da resposta máxima) da circulação renal através de infusão contínua de noradrenalina (10µM). A seguir foram administradas doses crescentes de acetilcolina (10⁻⁵ a 10⁻³ mol) na linha de perfusão renal, para a determinação das respostas vasodilatadoras dependentes de endotélio.

Drogas

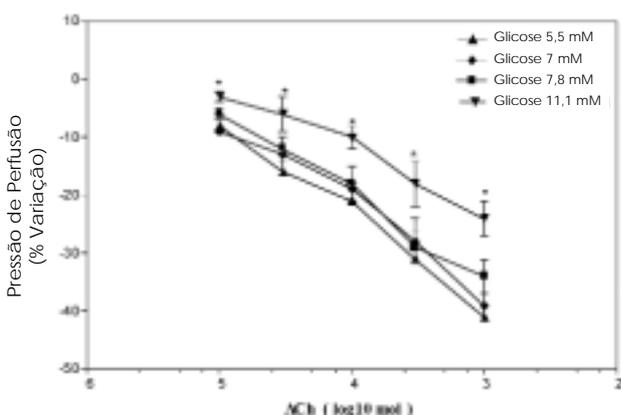
As seguintes drogas foram utilizadas: cloreto de acetilcolina, hidrocloreto de (±)-arterenol (noradrenalina), D-glicose e pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), brometo de pancurônio (Pancuron, Cristália, Brasil).

Análise estatística

Os resultados foram representados como a média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo. A determinação das diferenças significativas entre os grupos foi realizada através de análise da variância (ANOVA). Quando uma diferença significativa era detectada pela ANOVA, o teste de Student-Newman-Keuls era utilizado para a localização das diferenças significativas. Diferenças com valor de $P < 0,05$ foram consideradas como significativas. Os cálculos estatísticos foram realizados através do programa assistido por computador *Graphpad Instat* (Graphpad Software, Universidade de Londres, Inglaterra).

RESULTADOS

A figura 1 ilustra os efeitos da perfusão das diferentes soluções contendo concentração elevada de glicose (7, 7,8 e 11,1mM) na vasodilatação dependente do endotélio. O relaxamento induzido pela acetilcolina foi significativamente menor no grupo perfundido com glicose 11,1mM em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$), atingindo uma redução máxima de $24 \pm 3\%$ na pressão de perfusão em contraste com a redução máxima de $41 \pm 4\%$ do grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo controle (5,5mM) e os grupos com glicose 7 e 7,8mM (reduções máximas na pressão de perfusão de $41 \pm 4\%$ versus 39 ± 4 e $34 \pm 3\%$, respectivamente, $p > 0,05$).



* $p < 0,05$ em relação ao controle.

Figura 1. Relaxamento induzido pela acetilcolina nos grupos controle (glicose 5,5mM, n= 6) e com glicose elevada (7, 7,8 e 11,1mM, n= 6). Cada ponto representa a média \pm EPM.

DISCUSSÃO

Está estabelecido que o endotélio possui ações críticas para homeostase corporal, sendo capaz de secretar vários mediadores químicos e de interagir com as células musculares lisas vasculares e com elementos presentes no sangue. Como principais funções endoteliais podemos citar: 1) controle do tônus vascular através da secreção de substâncias vasoativas; 2) regulação do crescimento das células musculares lisas vasculares; 3) participação na reação inflamatória e; 4) hemostasia (9,10). Conseqüentemente, os vários fatores implicados na patogenia de vasculopatias como fumo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, hiper-homocisteinemia e a própria hiperglicemia têm em comum a presença de perturbações na fisiologia endotelial. Nos diabéticos, em geral existe uma interação complexa de fatores que provocam disfunção do endotélio, tais como hiperglicemia, HAS, dislipidemia, hiperinsulinemia/resistência insulínica, sobretudo no DM2 (11,12). No DM1, o agente preponderante parece ser a hiperglicemia (11,12). Esta demonstrou ser um importante fator para as complicações microvasculares em pacientes com DM1 nos estudos DCCT (13) (*Diabetes Control and Complications Trial*) e Steno (14) e em DM2 conforme demonstrado pelo UKPDS (15) (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*), tendo também uma possível participação na patogênese das complicações macrovasculares (16,17).

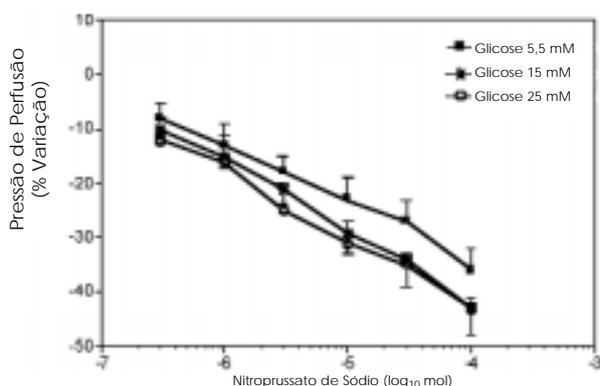
Vários métodos vêm sendo empregados em estudos experimentais para avaliação da presença de alterações da função endotelial, provocadas por concentrações elevadas de glicose. Entretanto, as concentrações de glicose utilizadas nos variados estudos têm sido muito altas em relação às encontradas rotineiramente na prática clínica (18-36). No nosso trabalho, encontramos a presença de disfunção endotelial aguda provocada por concentrações de glicose correspondentes ao valor diagnóstico pós TOTG. Desconhecemos, até o presente momento, estudos que tenham analisado especificamente os diferentes níveis glicêmicos usados para o diagnóstico do DM com relação à presença da disfunção endotelial.

Vários estudos observacionais demonstraram que a hiperglicemia é um fator de risco independente para a doença cardiovascular, incluindo a doença arterial coronariana (DAC), o acidente vascular encefálico isquêmico (AVE) e a doença vascular periférica (37,38). Ambas as glicemias de jejum e após uma sobrecarga oral com glicose contribuem para a glicemia média, a qual pode ser avaliada pela determinação dos níveis de hemoglobina glicada. Entretanto, ainda não são totalmente conhecidas as contribuições relativas

destas diferentes glicemias para o risco cardiovascular. Apesar da ausência de uma análise específica do risco de complicações cardiovasculares, em 1997 a ADA modificou seu critério para o diagnóstico de DM, não recomendando o uso do TOTG. Já o estudo DECODE (*Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*) mostrou que a glicemia de jejum isoladamente, ao contrário da glicemia pós TOTG, não identifica os indivíduos com maior risco de morte associada com a hiperglicemia (8).

Diante destas controvérsias, além da realização de estudos epidemiológicos que possam esclarecer as importâncias relativas das glicemias de jejum e pós TOTG no risco vascular, é importante avaliar se existem diferenças no grau de anormalidades biológicas causadas por estes diferentes níveis de glicemia. No nosso estudo, encontramos a presença de disfunção endotelial aguda causada por níveis de glicemia diagnósticos de DM pós TOTG, mas não com os níveis diagnósticos de jejum. Desta forma, um indivíduo que apresente diagnóstico apenas pelo TOTG (níveis de jejum normais) já pode estar desenvolvendo alterações fisiopatogênicas endoteliais que levem à doença vascular. Entretanto, não pudemos avaliar os efeitos crônicos de níveis diagnósticos de jejum na reatividade vascular e suas implicações fisiopatológicas.

Em trabalhos anteriores, avaliamos a vasodilatação independente de endotélio através do uso de nitroprussiato de sódio (SNP) como vasodilatador. Realizamos curvas dose-resposta com SNP 10^{-7} a 10^{-5} mol. O mesmo sistema foi perfundido com soluções contendo glicose 5,5mM (controle), 15 e 25mM. Conforme a figura 2, não houve diferenças significativas neste tipo de vasodilatação entre os grupos, mostrando que concentrações elevadas de glicose não afetaram a vasodilatação independente de endotélio.



Não houve diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 2. Relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio nos grupos controle (glicose 5,5mM, n= 6) e com glicose elevada (15 e 25mM, n= 6). Cada ponto representa a média±EPM.

Concluimos que níveis de glicose correspondentes aos utilizados para o diagnóstico de DM pós TOTG são capazes de provocar alterações agudas significativas na reatividade vascular da circulação renal de coelhos não diabéticos. Estes efeitos não foram observados com os valores diagnósticos de jejum. Especulamos que a glicemia pós TOTG possa estar mais relacionada com a presença de disfunção endotelial do que os níveis diagnósticos de jejum e, por isto, se correlacione melhor com o risco cardiovascular.

AGRADECIMENTOS

Ao colega de trabalho Rodrigo Cavalheiro da Silva pela sua boa vontade e presteza sempre presentes nos momentos árduos da prática laboratorial.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de hipertensão arterial e diabetes mellitus, 2002.**
2. Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Khan CR. Epidemiologic approach to etiology of type 1 diabetes and its complications. **N Engl J Med** 1987;317:1390-8.
3. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham study. **JAMA** 1979;241:2035-8.
4. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, and the MILIS STUDY GROUP. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. **J Am Coll Cardiol** 1989;14:49-57.
5. Singer DE, Moulton AW, Nathan DM. Diabetic myocardial infarction: interaction of diabetes with other pre-infarction risk factors. **Diabetes** 1989;38:350-7.
6. Smith JW, Marcus FI, Serokman R. Prognosis of patients with diabetes mellitus after acute myocardial infarction. **Am J Cardiol** 1984;54:718-21.
7. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-year cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). **Diabetes Care** 1993;16:434-44.
8. DECODE Study Group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and ADA diagnostic criteria. **Lancet** 1999;354:617-21.
9. Carvalho MH, Scivoletto R, Nigro D, Fortes ZB. Funções fisiológicas do endotélio vascular. **Rev Soc Cardiol Est SP** 1996;6:121-8.
10. Nunes GL, Sousa AG, Sousa JE. Papel do endotélio na regulação da proliferação vascular implicações na reestenose pós-angioplastia coronária. **Rev Soc Cardiol Est SP** 1996;6:190-6.
11. Escandon JC, Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocr Rev** 2001;22:36-52.

12. Hsueh WA, Quinones MJ, Creager MA. Endothelium in insulin resistance and diabetes. **Diabetes Rev** 1997;5:343-52.
13. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1993;329:977-86.
14. Feldt-Rasmussen B, Mathiesen ER, Jensen T, et al. Effect of improved metabolic control on loss of kidney function in type I (insulin-dependent) diabetic patients: an update of the Steno studies. **Diabetologia** 1991;34:164-70.
15. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) 33. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and the risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet** 1998;352:837.
16. Wilson PW, Cupples LA, Kannel WB. Is hyperglycemia associated with cardiovascular disease? The Framingham study. **Am Heart J** 1991;121:586-90.
17. Hanefeld M, Fischer S, Julius U, et al. Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: The Diabetes intervention study, 11 year follow-up. **Diabetologia** 1996;39:15777-83.
18. Lash JM, Bohlen HG. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. **Circ Res** 1991;69:1259-68.
19. Taylor PD, Oon BB, Thomas CR, Poston L. Prevention by insulin treatment of endothelial dysfunction but not enhanced noradrenaline-induced contractility in mesenteric resistance arteries from streptozotocin - induced diabetic rats. **Br J Pharmacol** 1994;111:35-41.
20. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers endothelium dependent relaxation in diabetic rat aorta. **Am J Physiol** 1991;261(H):1086-94.
21. Tesfamariam B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium-derived $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$. **Am J Physiol** 1989;257(H):1327-33.
22. Oyama Y, Kawaski H, Hamori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. **Eur J Pharmacol** 1986;131:74-8.
23. Abiru T, Watanabe Y, Kamara K, Miyata N, Kasuya Y. Decrease in endothelium-dependent relaxation and levels of cyclic nucleotides in aorta from rabbits with alloxan induced diabetes. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol** 1990;68:13-25.
24. Pieper GM, Siebeneich W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. **J Cardiovasc Pharmacol** 1998;32:101-5.
25. Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium - derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. **J Clin Invest** 1990;85:929-32.
26. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. **J Clin Invest** 1991;87:1643-8.
27. Bohlen HG, Lash JM. Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF - mediated vasodilation of normal rats arterioles. **Am J Physiol** 1993;265(H):219-25.
28. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. **Am J Physiol** 1992;263(H):321-6.
29. Dorigo P, Fraccarollo D, Santostasi G, Maragno I. Impairment of endothelium-dependent but not of endothelium-independent dilation in guinea-pig aorta rings incubated in the presence of elevated glucose. **Br J Pharmacol** 1997;121(5):972-6.
30. Davies MG, Hagen PO. Alterations in venous endothelial cell and smooth muscle cell relaxation induced by high glucose concentrations can be prevented by aminoguanidine. **J Surg Res** 1996;63:474-9.
31. Hattori Y, Hattori S, Sato N, Kasai K. High-glucose-induced nuclear factor kappa B activation in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res** 2000;46:188-97.
32. Manduteanu I, Voinea M, Serban G, Simionescu M. High glucose induces enhanced monocyte adhesion to valvular endothelial cells via a mechanism involving ICAM-1, VCAM-1 and CD18. **Endothelium** 1999;6:315-24.
33. Taki H, Kashiwagi A, Tanaka Y, Horiike K. Expression of intercellular adhesion molecules 1 (ICAM-1) via an osmotic effect in human umbilical vein endothelial cells exposed to high glucose medium. **Life Sci** 1996;58:1713-21.
34. Salameh A, Zinn M, Dhein S. High D-glucose induces alterations of endothelial cell structure in a cell-culture model. **J Cardiovasc Pharmacol** 1997;30:182-90.
35. Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, et al. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. **Diabetes** 1996;45(S3):84-6.
36. Khatami M. Kinetics of myo-inositol transport in corneal endothelial cells: diverse effects of sugars and implications in corneal deuterogenesis. **Membr Biochem** 1990;9:91-106.
37. Donahue RP, Abbott RD, Reed DM, Yano K. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry. Honolulu Heart Program. **Diabetes** 1987;36:689-92.
38. Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: a meta-regression analysis of published data from 20 studies of 95783 individuals followed for 12.4 years. **Diabetes Care** 1999;22:233-40.

Endereço para correspondência:

Filipe de Souza Affonso
Serviço de Diabetes
Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Av. 28 de Setembro, 77
20551-030 Rio de Janeiro, RJ
Fax: (021) 2587-6324 / 2284-2788
e.mail: souzaaffonso@aol.com