

*Bernardo Léo Wajchenberg*

**RESUMO**

A principal etiologia para a mortalidade e grande morbidade dos diabéticos é a aterosclerose. A hipótese para a lesão inicial da aterosclerose é a disfunção endotelial, pelo reconhecimento de que o endotélio tem um papel fundamental na manutenção das características de fluidez do sangue, tônus vascular e sua permeabilidade, sendo o óxido nítrico derivado do endotélio (e-NO) o principal protetor contra a moléstia aterosclerótica por inibir as diversas vias envolvidas na aterogênese. A disfunção endotelial identificada como um marcador precoce de moléstia cardiovascular poderá prever coronariopatia no futuro, mesmo antes que alterações ateroscleróticas evidentes apareçam nas artérias. Assim, medidas da função endotelial poderiam identificar indivíduos com risco para moléstia cardiovascular, como determinar a vaso-dilatação endotélio-dependente pelo fluxo após isquemia induzida, que requer a produção de e-NO. Além disso, pode-se também avaliar a reatividade vascular da microcirculação bem como dosar os marcadores bioquímicos da função endotelial. Finalmente, pode-se fazer a mensuração da espessura da camada médio-intimal de grandes artérias, como as carótidas, um marcador indireto da função do endotélio. A disfunção endotelial tem sido documentada no diabetes (DM), em indivíduos com resistência à insulina ou com alto risco para desenvolver DM do tipo 2, nos quais a hiperglicemia está associada a um aumento do estresse oxidativo, levando a um incremento na formação de radicais oxigênio tais como o superóxido, que reage com o e-NO, levando à sua degradação. No DM do tipo 1 o estado diabético predispõe para a alteração endotelial mas não é suficiente para causá-lo, outros agentes tendo provavelmente um papel. No tipo 2 estão presentes os efeitos do envelhecimento, hipertensão arterial e outros fatores e, em contraste à disfunção no tipo 1, esta pode ser observada anos antes da manifestação da vasculopatia, associada com a resistência à insulina. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/5:514-519**)

**Descritores:** Diabetes do tipo 1; Diabetes do tipo 2; Disfunção endotelial; Aterosclerose; Óxido nítrico; Estresse oxidativo; Resistência à insulina

**ABSTRACT**

**Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus.**

The main cause for mortality and the great morbidity in diabetes (DM) is atherosclerosis. A hypothesis for the initial lesion of atherosclerosis is endothelial dysfunction by recognizing that the endothelium plays a fundamental role in the maintenance of blood fluidity, vessel wall tone and permeability, the endothelium-derived nitric oxide (e-NO) being the main protector against atherosclerotic disease by inhibiting key pathways involved in atherogenesis. Endothelial dysfunction identified as an early marker of cardiovascular disease (CVD) could predict coronary artery disease in the future before the development of evident atherosclerotic changes in the arteries. Thus, the evaluation of endothelial function would identify subjects at high risk for CVD, such as determining flow-mediated

*Serviço de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), São Paulo, SP.*

*Recebido em 29/01/02  
Revisado em 26/04/02  
Aceito em 27/05/02*

endothelium-dependent vasodilatation, following induced ischemia, which requires the production of e-NO. Furthermore, it could also be assessed the vascular reactivity of the microcirculation as well as the biochemical markers of endothelial activity. Finally, it could also be measured the thickness of intima-media of large arteries, such as the carotids, an indirect measurement of the endothelial function. Endothelial dysfunction has been documented in DM, in individuals with insulin resistance or at high risk for future development of type 2 DM. In the DM subjects the hyperglycemia is associated with increased oxidative stress leading to increased formation of oxygen radicals such as super-oxide, which reacts with NO, causing it to be degraded. Although the diabetic state in type 1 DM predisposes to endothelial dysfunction it is not sufficient to cause it, other agents are likely to play a role. In type 2, the effects of aging, hyperlipidemia, hypertension and other factors add to the complexity of the problem and in contrast to the type 1 DM dysfunction, it could be observed years before the manifestation of the disease, associated with insulin resistance. (Arq Bras Endocrinol Metab 2002;46/5:514-519)

**Keywords:** Type 2 diabetes; Type 1 diabetes; Endothelial dysfunction; Atherosclerosis; Nitric oxide; Oxidative stress; Insulin resistance

**A**MOLÉSTIA VASCULAR ATEROESCLERÓTICA acelerada é a principal causa de mortalidade em pacientes com diabetes do tipo 2. O evento crítico inicial na gênese da aterosclerose poderia ser lesão endotelial com conseqüente fixação e agregação plaquetária no local lesionado. Evidências de que a disfunção endotelial ocorra no diabetes são indicadas pelo achado de valores elevados plasmáticos do fator de von Willebrand, comprometimento da liberação de prostaciclina e do ativador do plasminogênio e redução da atividade da lipase lipoprotéica. Ainda que diversos fatores de risco cardiovasculares convencionais predisponentes a lesão endotelial, tais como a hipertensão arterial e anormalidades do metabolismo lipídico e das lipoproteínas além do envelhecimento e o estado pós-menopausal, existam nestes pacientes, eles não explicam totalmente o acentuado aumento na mortalidade cardiovascular no diabético do tipo 2.

Por causa da localização anatômica estratégica das células endoteliais entre o sangue circulante e os tecidos, estas células têm a capacidade de percepção das alterações nas forças hemodinâmicas e mediadores produzidos localmente ou circulantes e de responder a estas alterações pela produção de um número de fatores biologicamente ativos. Os fatores derivados do endotélio podem modificar profundamente a função

plaquetária bem como o estado contrátil e proliferativo das células musculares lisas vasculares (VSMC: *vascular smooth muscles cells*). Estes fatores incluem o óxido nítrico (NO) e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), ambos vasodilatadores e potentes inibidores da função plaquetária e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF: *endothelium-derived hyperpolarizing factor*). Por outro lado, as células endoteliais podem também produzir vasoconstritores e promotores de crescimento (por estimular a proliferação da VSMC) tais como a angiotensina II, endotelina-1 (ET-1), tromboxane A<sub>2</sub> e prostaglandina A<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>). Existem evidências de que na moléstia vascular o papel protetor do endotélio está diminuído ao passo que a produção de mediadores vasoconstritores, pró-agregatórios e pró-mitogênicos está mantido ou acentuado (1).

O papel do NO derivado do endotélio (e-NO) mediando as propriedades anti-ateroescleróticas foi revelado por estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstrando que o NO (2):

1. Inibe a adesividade e migração de leucócitos, o primeiro indicador morfológico de aterosclerose;
2. Reduz a permeabilidade endotelial para macromoléculas e lipoproteínas, assim diminuindo o acúmulo subendotelial de LDL colesterol e subsequente formação de células espumosas;
3. Inibe a proliferação e migração das células musculares lisas vasculares;
4. Contribui para a vasodilatação dos vasos coronários durante demanda metabólica aumentada;
5. Inibe a adesividade e agregação plaquetária, a via final comum mediando as síndromes vasculares agudas.

Em resumo, o e-NO inibe todas as vias conhecidas envolvidas na aterogênese.

## MEDIDAS DA ATIVIDADE ENDOTELIAL

A avaliação *in vivo* da biodisponibilidade do NO está focalizada nos efeitos vasodilatadores do NO. Assim, pode-se medir a função endotelial da artéria braquial (macrocirculação), com um eco-Doppler ultrassom, de alta resolução, determinando as respostas vasodilatadas da artéria durante a hiperemia reativa (vasodilatação endotélio dependente) e após a administração de nitroglicerina sub-lingual (vasodilatador endotélio-independente). Assim, uma resposta alterada ao estímulo do NO endógeno (hiperemia) refletirá uma biodisponibilidade comprometida de NO, ao passo que uma resposta diminuída ao doador de NO (nitroglicerina) refletirá alterações estruturais do vaso ou sensibi-

lidade diminuída da célula muscular lisa. Embora o significado de alterações vasculares em uma artéria que se caracteriza pela ausência de comprometimento aterogênico seja questionável, as respostas alteradas às manobras indicadas têm sido correlacionadas com o comprometimento da vasodilatação endotélio-dependente em artérias coronárias nos diversos estudos.

Além disso, pode-se também avaliar a reatividade vascular da microcirculação da pele do antebraço por medidas de imagens de perfusão com laser Doppler antes e após a iontoforese de acetilcolina (vasodilatação endotélio dependente) e nitroprussiato (vasodilatação endotélio independente).

Marcadores bioquímicos da atividade endotelial, que são secretados pelo endotélio ou liberados da sua superfície em diversas patologias podem ser utilizados para medir a atividade endotelial, tais como a fator von Willebrand, trombomodulina, selectina-E, molécula de adesão intracelular (ICAM), molécula de adesão à célula vascular (VCAM), fator de crescimento endotelial vascular. A mais potente substância antiaterogênica produzida pelo endotélio, como já indicado, é o NO, que tem uma meia-vida muito curta na circulação e é instável, mas os seus metabólitos podem ser medidos na urina.

Finalmente, pode-se avaliar o espessamento da camada íntima-média de grandes artérias (carótida), embora não sendo um marcador direto da função endotelial, este espessamento é uma conseqüência física de uma disfunção endotelial antecedente sendo um bom indicador prognóstico de aterosclerose inicial na circulação cerebral e coronariana. Para esta medida geralmente se utiliza um ultrassom modo-B de alta resolução.

### **Disfunção endotelial no diabetes especialmente do tipo 2**

As investigações em pacientes diabéticos têm demonstrado resultados conflitantes. Assim, alguns investigadores demonstraram comprometimento da atividade do e-NO com resposta normal ao NO exógeno. Em oposição, outros observaram redução da resposta endotélio-dependente bem como da resposta vascular independente. Finalmente, outros estudos mostraram respostas normais aos dois testes. Um fator que poderia ter influenciado nas observações conflitantes poderia ser a presença ou não da microalbuminúria. Com efeito, tem sido sugerido que o desenvolvimento da microalbuminúria no paciente diabético se caracteriza por um progressivo grau de comprometimento endotelial (3). Além disso, pacientes com diabetes do tipo 2 com freqüência apresentam um largo espectro

de fatores de risco cardiovasculares, que por si só contribuem em graus variáveis para a disfunção endotelial. Apesar destas controvérsias, o conceito de disfunção endotelial como um mediador potencial para um risco aumentado de complicações cardiovasculares no diabetes, especialmente no estágio microalbuminúrico, está adquirindo progressivamente maior suporte. Portanto, a queda da atividade do e-NO pode ser determinada pela redução da síntese ou aumento da inativação do NO.

Caballero e cols. (4) mostraram que a reatividade vascular na microcirculação da pele e na artéria braquial estava alterada em indivíduos com tolerância alterada à glicose e naqueles normoglicêmicos com história familiar de diabetes do tipo 2 em comparação a controles normais pareados. Estes 2 grupos também tinham níveis circulantes elevados de endotelina -1 (ET-1), fator von Willebrand e moléculas de adesão celular (ICAM e VCAM), consistentes com ativação endotelial. Estes investigadores também demonstraram que as mulheres mostram melhor reatividade vascular do que os homens independente do estágio da homeostase glicêmica. A importância deste estudo bem como de outros investigadores (5), que avaliaram a função endotelial da artéria braquial de mulheres normoglicêmicas com história de diabetes gestacional, é a demonstração de anormalidades da função vascular presentes em indivíduos em risco para desenvolver diabetes do tipo 2 no estágio de tolerância normal à glicose.

Os mecanismos pelos quais o diabetes contribui para a disfunção endotelial não estão totalmente elucidados mas é provável que a hiperglicemia seja um insulto importante. Estudos experimentais em células endoteliais aórticas humanas mostraram que a síntese ou também a liberação do e-NO não está diminuída após exposição a elevadas concentrações de glicose (6). Entretanto, observou-se que a produção de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) foi maior do que a liberação do NO. A interação do ( $O_2^-$ ) com o NO é muito rápida e levaria à produção do potente oxidante, o peroxinitrito, que poderá contribuir para a disfunção endotelial. Portanto, a produção de NO basal e estimulada, avaliada pela medida do nitrito liberado, estavam significativamente aumentados nas células tratadas com altos níveis de glicose, de acordo com Cosentino e Lüscher (1,6). Segundo os mesmos investigadores, é altamente improvável que o comprometimento do relaxamento vascular possa ser explicado pela menor resposta do músculo liso vascular ao NO, com base em observações em artérias diabéticas.

Um dos determinantes mais significativos da biodisponibilidade do NO é, pois, a sua degradação após

reação com radicais livres derivados de oxigênio. Este mecanismo de inativação do NO é de particular relevância para os pacientes diabéticos, pois em modelos animais de diabetes, vasodilatação endotélio-dependente pode ser restaurada pelo tratamento com anti-oxidantes.

De um modo geral, o acentuado aumento do metabolismo da glicose, na hiperglicemia diabética, está associado a uma formação aumentada de radicais livres (espécies de oxigênio reativo, que por conter elétrons não-pareados são instáveis, mostrando intensa reatividade química, reagindo localmente aceitando ou doando elétrons a outras moléculas para alcançar um estado mais estável). Exemplos de radicais livres são o radical hidroxila (OH), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), metais de transição como o ferro e cobre e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Nestas condições, por haver um distúrbio no balanço entre a produção acentuada de radicais livres e as defesas [intracelulares (superóxido dismutases, peroxidases e catalases), na membrana celular (vitamina E, beta-caroteno e coenzima Q) e extracelulares (proteínas ligantes de metais, quando livres, como o ferro e o cromo, podem promover lesão de radical livre, acelerando a peroxidação lipídica e catalizando a formação de radicais hidroxila), além das formas extracelulares das peroxidases do glutathione e superóxido desmutases]] resultará no assim chamado estresse oxidativo que está relacionado ao desenvolvimento das complicações diabéticas (7).

Todos os radicais livres supramencionados podem causar comprometimento oxidativo a várias macromoléculas biológicas. A reação do superóxido com o NO é bastante deletéria, resultando na for-

mação de peroxinitrito, que é um oxidante volátil potente atacando muitos tipos de moléculas biológicas, resultando em iniciação da peroxidação lipídica (com acentuado efeito indesejável nas membranas celulares e a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade que é central a muitos dos processos de aterogênese), nitratação de aminoácidos aromáticos como a tirosina, lesão direta do DNA e oxidação de antioxidantes, tais como o ascorbato e vitamina E.

Muitas vias metabólicas associadas com a hiperglicemia, tais como a auto-oxidação da glicose, a glicosilação de proteínas e a ativação da via do poli-ol aumentam a produção de radicais livres. Em adição, os mecanismos de defesa para os radicais livres têm sido descritos como reduzidos no diabetes, em particular o glutathione, o superóxido desmutase e a catalase, assim se desenvolvendo o estresse oxidativo (figura 1). Um mecanismo potencial levando à disfunção endotelial no diabético é a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs: *advanced glycation end products*). Quando as proteínas plasmáticas e da membrana celular estão expostas a concentrações elevadas de glicose por períodos prolongados elas sofrem glicação não-enzimática podendo se depositar na camada sub-endotelial e induzir disfunção endotelial. Com efeito, AGEs podem diretamente inativar o e-NO e daí determinar impedimento da vasodilatação endotélio-dependente. Também se mostrou que podem aumentar a permeabilidade vascular e a sua captação por macrófagos subendoteliais resulta em ativação da resposta local inflamatória, também contribuindo para o estresse oxidativo.

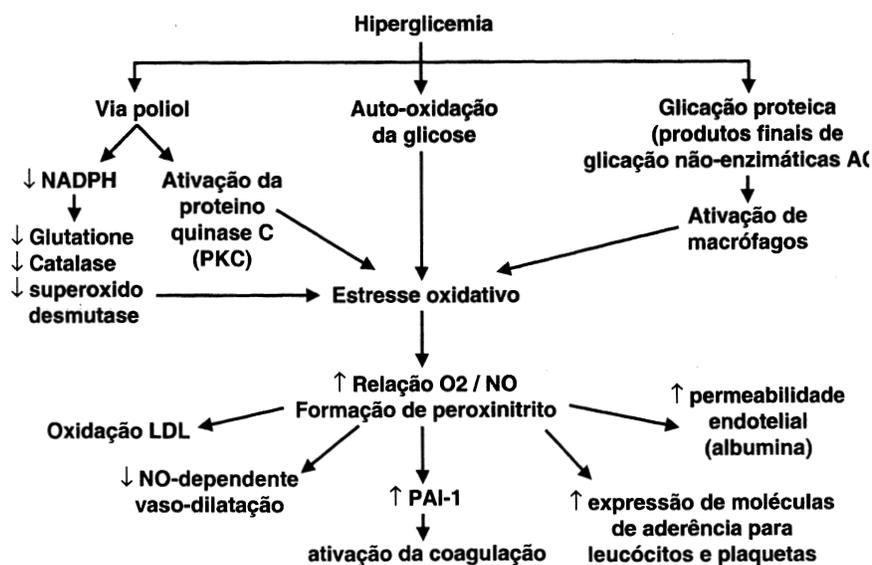


Figura 1: Estresse oxidativo e a diabetes

A ativação da via poliol induz a produção de diacil-glicerol pela síntese, de novo, a partir dos produtos intermediários glicolíticos. O diacil-glicerol pode ativar a cinase protéica C (PKC: *protein kinase C*) que está associada com um aumento na formação de radicais de oxigênio.

### Disfunção endotelial no diabetes do tipo 1

É consenso que a ocorrência da disfunção endotelial no diabetes do tipo 1 indica um elevado risco para micro- e macroangiopatia e ainda que o estado diabético predispõe para a alteração endotelial, entretanto não é suficiente para causá-la. Provavelmente, outros agentes (genes, ambiente) têm um papel em determinar aqueles pacientes que vão desenvolver disfunção endotelial e angiopatia severa (8).

### Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2

O papel da disfunção endotelial no diabetes do tipo 2 é mais complicado do que para o tipo 1. Os efeitos do envelhecimento, hiperlipemia, hipertensão arterial e outros fatores se somam para a complexidade do problema. Em contraste aos pacientes com diabetes do tipo 1, a disfunção endotelial pode ser detectada antes de se observar elevação dos níveis glicêmicos, como foi indicado previamente, e mesmo muitos anos antes de qualquer evidência de microangiopatia (8). Considerando que uma alteração fisiopatológica importante do diabetes do tipo 2 é a resistência à insulina, numerosos estudos foram realizados para definir a possível contribuição da resistência à insulina para a disfunção endotelial.

### RESISTÊNCIA À INSULINA, ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

Hiperinsulinemia compensatória, ou resistência à insulina, tem sido identificada como um defeito inicial no desenvolvimento do diabetes do tipo 2, particularmente na presença de obesidade, sedentarismo ou dietas ricas em gordura. Tem sido proposto que a hiperinsulinemia seria um fator de risco independente de aterosclerose. Com efeito, a insulina de per si é um peptídeo com atividade intensamente aterogênica, estimulando a produção de lipídios, proliferação da célula muscular lisa e síntese de colágeno e a produção de vários fatores de crescimento. Em contraste a estas propriedades aterogênicas, mostrou-se que a insulina estimula a produção de NO. Esta liberação insulino-mediada de NO induz vasodilatação e aumenta a captação celular de glicose e o seu metabolismo (9). Conseqüentemente, foi proposto que a redução da disponi-

bilidade do NO, resultando em comprometimento da utilização da glicose nos músculos, poderia determinar a resistência à insulina e os fenótipos associados da síndrome da resistência à insulina. Em consonância com este conceito, se demonstrou uma relação entre a função endotelial e a sensibilidade à insulina em controles normais (10). Também se verificou que mulheres normoglicêmicas, obesas e não obesas, com tendência a apresentar no futuro o diabetes do tipo 2, ou seja, com a história de diabetes gestacional, como já mencionamos (5), exibiram uma vasodilatação endotélio-dependente comprometida da artéria braquial durante a hiperemia reativa e após a administração de nitroglicerina (endotélio-independente) apenas nas obesas. Portanto, poder-se-ia sugerir que o comprometimento da vasodilatação micro- e macrovascular endotélio-dependente estaria intimamente relacionada com a capacidade da insulina em estimular a captação da glicose no tecido muscular esquelético e na regulação da pressão arterial. O defeito comum, captação da glicose mediada pela insulina e a produção de NO também mediada pela insulina, envolveria a via PI3 K (fosfoinositol 3- cinase), como já foi descrito. Com efeito, existem evidências de que o estresse oxidativo, avaliado pela medida plasmática da 8-epi-Prostaglandina 2 $\alpha$ , índice da peroxidação dos lipídios no homem, poderia preceder a disfunção endotelial e subsequente desenvolvimento da resistência à insulina do diabetes do tipo 2 (11). Finalmente, outros componentes da síndrome de resistência à insulina, prevalentes no diabetes do tipo 2, reduzem a atividade do e-NO: hipertensão arterial, LDL pequeno e denso e oxidado e hipertrigliceridemia (12).

A primeira evidência direta de que um defeito da síntese endotelial de NO está associado com resistência à insulina foi obtida em camundongos com "knockout" do gene codificando a síntese endotelial do NO (13).

### CONCLUSÃO

A disfunção endotelial foi demonstrada no diabetes dos tipos 1 e 2. No primeiro, esta alteração é relacionada com a vasculopatia e é provavelmente consequência das alterações metabólicas hiperglicemia-dependentes que também explicam a microangiopatia desta condição. No diabetes do tipo 2, a disfunção endotelial é observada nas fases iniciais da moléstia, mesmo antes do aparecimento da hiperglicemia, tendo um papel fundamental na etiopatogenia do comprometimento macrovascular do diabetes e estaria associ-

ada com a resistência à insulina. Enquanto a disfunção do endotélio nas artérias de grande e médio calibre tem um papel central na aterogênese, a disfunção do endotélio vascular periférico, a nível arteriolar e capilar, tem um papel na patogênese de ambos, a resistência à insulina e as características associadas com a síndrome da resistência à insulina. Portanto, pode-se sugerir que a síndrome da resistência à insulina, em conjunto com os vários aspectos da aterogênese, como sendo as múltiplas conseqüências da disfunção endotelial nos diversos leitos vasculares, como inicialmente sugerido por Yudkin e cols. (14) (figura 2).

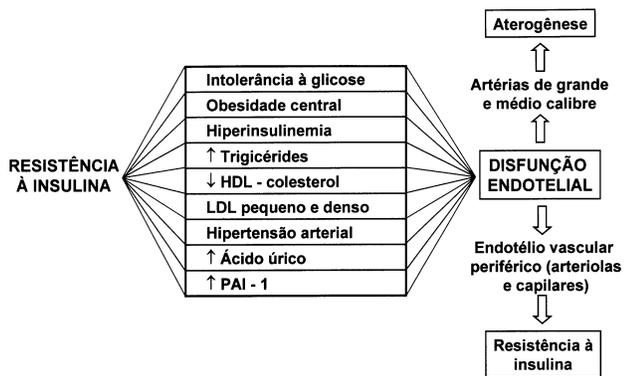


Figura 2: Síndrome da resistência à insulina e disfunção endotelial

## REFERÊNCIAS

1. Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;P:(Suppl 3) S54-S61.
2. Honing MLH, Morrison PJ, Stroes ESG, Rabelink TJ. Endothelial function in diabetes: a disturbed vascular balance. *Internat Diab Rev* 1999;8:6-10.
3. 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;83:687-93.

4. 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.
5. Anastasiou E, Lekakis JP, Alevisaki M, Papamichael CM, Megas J, Souvatzoglou A, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care* 1998;21:2111-5.
6. Cossentino F, Hishikawa K, Katusik ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:25-8.
7. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications of diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
8. Calles-Escandon J, Cippola M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. *Endocr Rev* 2001;22:36-52.
9. Young ME, Radda GK, Leighton B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J* 1997;322:223-8.
10. Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, Elliott HL, Connell JM. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. A physiological link with implications for pathogenesis of cardiovascular disease. *Circulation* 1997;93:1477-82.
11. Gopaul NK, Manraj MD, Hébé A, Lee Kwai Yan S, Johnston A, Carrier MJ, et al. Oxidative stress could precede endothelial dysfunction and insulin resistance in Indian Mauritians with impaired glucose metabolism. *Diabetologia* 2001;44:706-12.
12. Makimattila S, Liu M-L, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lodenpera S, Syvanne M, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 1999;22:973-81.
13. Duplain H, Sartori C, Egli M, Vollenweider P, Lepori M, Thorens B, et al. Insulin resistance in mice with congenital deficiency of the endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 1999;48(Suppl 1) Abstract.
14. Pinkney JH, Stehower CPA, Coppack SW, Yudkin JS. Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997;46(Suppl.2):S9-S13.

## Endereço para correspondência:

Bernardo Léo Wajchenberg  
Rua Itapeva, 490 - 5º andar  
01332-902 São Paulo, SP