

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NO DIABETES MELITO

Beatriz G. Santos Seligman, Nadine Clausell

O diabetes melito está associado a elevado risco cardiovascular, sendo sugerido que a expressão da doença aterosclerótica apresenta características próprias nessa situação, com evolução mais grave e acelerada da doença aterosclerótica. A disfunção endotelial é considerada condição "sine qua non" para o desenvolvimento da aterogênese, uma vez que ocorra dano ao endotélio vascular por um ou mais fatores de risco cardiovascular. Nesse sentido, o diabetes melito tipo 1 e tipo 2 e a síndrome de resistência à insulina têm sido associados à disfunção endotelial. Nesta revisão são abordados os modelos experimentais e clínicos que associam o diabetes e a hiperglicemia à disfunção endotelial, bem como o papel da insulina nesse processo. São revisados também aspectos distintos presentes na disfunção endotelial no diabetes tipo 1 e tipo 2, a relação entre insulina e endotélio, e os diferentes marcadores biológicos associados à disfunção endotelial.

Palavras-chave: endotélio, óxido nítrico, aterosclerose.

Rev Bras Hipertens 1999;3:288-95

Serviços de Medicina Interna e Cardiologia — Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Endereço para correspondência:

*Serviço de Cardiologia — Hospital de Clínicas de Porto Alegre —
Rua Ramiro Barcelos, 2350 — CEP 90035-0003 — Porto Alegre — RS*

Recebido para aprovação: 6/8/99. Aceito para publicação: 27/8/99.

INTRODUÇÃO

A disfunção endotelial ocorre precocemente na patogênese da aterosclerose, desempenhando papel-chave no surgimento das doenças vasculares e suas complicações⁽¹⁻³⁾. Fisiologicamente, o endotélio vascular cumpre papel regulador das diversas funções da vasculatura, onde a produção de diversas substâncias biológicas, como, por exemplo, o óxido nítrico, a prostaciclina e a bradicinina, contribui para, entre outras funções, manter o tônus vascular com predomínio de vasodilatação, controlar o fluxo sanguíneo e manter uma superfície endotelial não-aderente. Por outro lado, devido a sua localização estratégica como interface entre o sangue circulante e os tecidos, as células endoteliais respondem prontamente à presença de fatores que causem dano à superfície endotelial, sintetizando outro conjunto de moléculas, como, por exemplo, a endotelina-1, o tromboxane, o PAI-1 e o fator de von Willebrand, entre outros, modificando intensamente o equilíbrio fisiológico do endotélio.

Portanto, com a continuada agressão de fatores de risco cardiovascular, o endotélio perde progressivamente seu papel protetor fisiológico

e passa a ser fonte de elementos que participarão da progressão de doença aterosclerótica. Assim, dano ou ativação do endotélio modificam suas funções regulatórias e resultam em disfunção endotelial, com alteração na vasodilatação, redução das atividades antitrombóticas, alterações estruturais e consequente dano vascular⁽⁴⁾.

O diabetes melito está associado a aterosclerose acelerada e maior prevalência de doença cardiovascular⁽⁵⁾. Estudos populacionais demonstram que a incidência de cardiopatia isquêmica ajustada para a idade é quatro vezes maior em diabéticos para qualquer nível de colesterol, quando comparada a não-diabéticos⁽⁶⁾. Esses dados sugerem que a aterogênese seja expressa de forma diferente no diabetes melito, devido a características próprias da doença ou a um agregado de fatores de risco presentes⁽⁷⁾. Estudos experimentais em animais demonstram claramente que a vasodilatação endotélio-dependente está alterada em modelos animais de diabetes melito^(8, 9). Em humanos, esse comportamento também já foi estudado em indivíduos com diabetes melito tipo 1⁽¹⁰⁻¹²⁾ e tipo 2⁽¹³⁻¹⁵⁾. No contexto da presente revisão, as evidências que as-

sociam disfunção endotelial ao diabetes, à hiperglicemia e aos estados de resistência à insulina, e os mecanismos fisiopatológicos potencialmente envolvidos serão particularmente enfocados.

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL E DIABETES: MODELOS EXPERIMENTAIS

Hiperglicemia

Vários estudos demonstraram alteração na vasodilatação endotélio-dependente em diferentes leitos vasculares de animais diabéticos⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Com relação à hiperglicemia, estudos expõem artérias a concentrações elevadas de glicose causaram alterações semelhantes às encontradas experimentalmente em animais diabéticos, e não foram reproduzidos com exposição ao manitol, sugerindo indução primária da glicose e não da hiperosmolaridade na alteração da resposta à infusão de acetilcolina. Assim, a hiperglicemia por si pode representar fator de risco independente para disfunção endotelial^(19, 20).

Óxido nítrico e radicais livres

A disfunção endotelial observada em animais diabéticos pode ser decorrente de menor síntese e liberação de óxido nítrico, menor resposta da musculatura lisa aos fatores de relaxamento ou maior produção de fatores vasoconstritores e/ou inativação do óxido nítrico por radicais livres. O fato de a menor vasodilatação endotélio-dependente poder ser restaurada com inibidores da ciclo-oxigenase sugere que o mecanismo seja mediado por prostanoídes vasoconstritores liberados pelo endotélio que antagonizam a ação do óxido nítrico^(16, 19). Já a participação de radicais livres oxigenados na disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia tem sua base teórica na demonstração de que os sistemas de remoção de radicais oxigenados livres estão menos ativos no diabetes^(19, 21). Assim, a vasculatura dos pacientes com diabetes melito seria alvo para o ataque de radicais livres, seja por meio de redução do estado antioxidante celular ou de maior suscetibilidade do LDL-colesterol à oxidação. Vários investigadores relacionam a melhora da vasodilatação endotélio-dependente à ação de antioxidantes endógenos ou exógenos, ativando o sistema de remoção de radicais livres⁽²²⁻²⁵⁾. Em indivíduos com diabetes tipos 1 e 2, o uso de vitamina C foi associado à melhora na

vasodilatação endotélio-dependente^(14, 26). Já a suplementação oral de vitamina E em indivíduos com diabetes melito tipo 2 não melhorou a disfunção endotelial⁽²⁷⁾.

DISFUNÇÃO ENDOTELIAL: ESTUDOS CLÍNICOS

Os inúmeros estudos experimentais utilizando animais que demonstram comprometimento endotelial no estado diabético têm sido corroborados por estudos envolvendo portadores de diabetes. A vasodilatação induzida pela acetilcolina (endotélio-dependente) foi menor em artérias de corpos cavernosos de homens diabéticos quando comparada a indivíduos impotentes não-diabéticos⁽²⁸⁾. O mesmo achado foi demonstrado em artérias coronárias angiograficamente normais de indivíduos com diabetes⁽²⁹⁾. Além disso, em nosso laboratório, recentemente demonstramos que a expressão de fator de necrose tumoral- α , marcador inflamatório associado à ativação endotelial, estava aumentada em lesões ateroscleróticas de indivíduos com diabetes tipo 2 submetidos a amputação quando comparados a vasculopatas sem diabetes⁽³⁰⁾.

Indivíduos não-diabéticos com hiperglicemia provocada

Williams e colaboradores⁽³¹⁾ encontraram diminuição da vasodilatação endotélio-dependente em indivíduos normais em situação de hiperglicemia provocada, demonstrando menor disponibilidade do óxido nítrico na ausência de diabetes, mas com hiperglicemia aguda⁽³¹⁾. A mesma resposta foi evidenciada por Kawano e colaboradores⁽³²⁾ tanto em indivíduos normais como em diabéticos do tipo 2 e pacientes com baixa tolerância à glicose, corroborando a hipótese de que a hiperglicemia possa contribuir para a disfunção endotelial⁽³²⁾. Giugliano e colaboradores⁽³³⁾ em um experimento semelhante, demonstraram que as alterações eram reproduzidas pela administração de LNMMA e revertidas com a administração de L-arginina, implicando menor disponibilidade do óxido nítrico durante a hiperglicemia⁽³³⁾.

Diabetes tipo 1 e endotélio vascular

Com relação a pacientes com diabetes melito tipo 1, os dados relativos à função endotelial são controversos. Há estudos demonstrando

vasodilatação endotélio-dependente diminuída ou normal em vasos de antebraço de pacientes com diabetes melito do tipo 1^(10-12, 34, 35). Johnstone e colaboradores⁽¹⁰⁾ encontraram diminuição da vasodilatação endotélio-dependente em indivíduos com diabetes tipo 1 quando comparados a controles normais, havendo correlação inversa entre os níveis de insulina e a vasodilatação endotélio-dependente. Não houve correlação com os níveis de glicose e glico-hemoglobina ou duração do diabetes, e a resposta à infusão de nitroprussiato de sódio e verapamil não diferiu entre diabéticos e controles, caracterizando a vasodilatação endotélio-independente como normal. Além disso, neste trabalho todos os pacientes haviam recebido inibidores da ciclo-oxigenase previamente, sugerindo que o mecanismo da disfunção endotelial neste caso não seja intermediado por prostanoídes⁽¹⁰⁾. Por outro lado, Halkin e colaboradores⁽³⁶⁾ não encontraram diferença na vasodilatação endotélio-dependente entre indivíduos normais e com diabetes tipo 1 usando o mesmo modelo⁽³⁶⁾. Já Clarkson e colaboradores⁽³⁷⁾ descrevem claro dano na reatividade vascular — tanto endotélio-dependente como independente, mas em menor grau — em uma série de pacientes com diabetes tipo 1, sendo a disfunção endotelial mais relacionada aos níveis de LDL-colesterol e com a duração do diabetes⁽³⁷⁾. É possível que a disparidade entre os resultados seja decorrente de fatores de confusão, como normo ou microalbuminúria, diferentes níveis de glicose durante o experimento, controle glicêmico dos indivíduos e mesmo sexo (o comprimento do antebraço pode ser um fator de confusão para a inativação da acetilcolina, e mulheres parecem apresentar maior proteção contra disfunção endotelial quando comparadas a homens)^(18, 38). Outro fator de confusão que deve ser levado em conta quando se avaliam respostas vasculares em indivíduos com diabetes melito tipo 1 é a presença de disfunção autonômica⁽³⁹⁾.

O óxido nítrico é formado a partir da L-arginina por meio da NO-sintetase e a vasodilatação endotélio-dependente pode ser restaurada em vasos de animais diabéticos com a administração de L-arginina. Huvers e colaboradores⁽⁴⁰⁾ avaliaram a disfunção endotelial em pacientes com diabetes tipo 1 com e sem complicações microvasculares e microalbuminúria, comparando com controles normais⁽⁴⁰⁾. Avaliaram a vasodilatação endotélio-dependente basal e es-

timulada com a L-arginina em indivíduos com diabetes tipo 1 com e sem microalbuminúria e/ou retinopatia. Além disso, avaliaram a inter-relação entre vasodilatação endotélio-dependente e fatores circulantes derivados do endotélio relacionados a hemostasia e fibrinólise: inibidor da ativação do plasminogênio (PAI-1), fator ativador do plasminogênio, fator de von Willebrand, atividade do fator tecidual e níveis de endotelina-1. As respostas adrenérgicas do antebraço e a vasodilatação endotélio-dependente não estavam alteradas em diabéticos tipo 1 com ou sem complicações microvasculares, durante condições normoglicêmicas ou seminormoglicêmicas, compatível com disponibilidade adequada do óxido nítrico. Entretanto, a vasodilatação endotélio-dependente estava diminuída apenas nos diabéticos durante estimulações repetidas com acetilcolina e infusão concomitante de L-arginina. Mais estudos são necessários para aferir se essa disfunção endotelial é baseada em exaustão ou dessensibilização ao óxido nítrico derivado do endotélio, nos pacientes com diabetes melito tipo 1. A atividade do fator tecidual estava aumentada e do PAI-1, reduzida nos diabéticos em relação aos controles. Mais ainda, houve correlação entre PAI-1 e os níveis de excreção urinária de albumina, e a redução do PAI-1 era mais pronunciada nos diabéticos com retinopatia. A presença ou ausência de complicações microvasculares não afetou as respostas endotélio-dependentes e independentes. Neste trabalho, de todos os marcadores de disfunção endotelial aferidos, a elevação da atividade do fator tecidual foi considerada o mais consistente⁽⁴⁰⁾.

Diabetes tipo 2, hiperinsulinismo e endotélio vascular

No diabetes tipo 2, a diminuição da vasodilatação endotélio-dependente tem sido demonstrada de forma mais consistente⁽⁴¹⁾. McVeigh e colaboradores⁽¹⁵⁾ avaliaram, de forma invasiva, a vasodilatação endotélio-dependente e independente em indivíduos não fumantes com diabetes tipo 2, comparando com controles normais, encontrando evidências de disfunção tanto na vasodilatação endotélio-dependente como independente no grupo dos diabéticos⁽¹⁵⁾. Entretanto, a capacidade da musculatura lisa de responder a estímulos pode estar diminuída nesses pacientes, que são mais velhos e portadores de doenças concomitantes, como hipertensão e

dislipidemia. Williams e colaboradores,⁽¹³⁾ estudando diretamente fluxos vasculares, demonstraram diminuição da vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com diabetes melito tipo 2, comparados a controles normais pareados, sem que o bloqueio da ciclo-oxigenase pudesse afetar essas respostas⁽¹³⁾. Enderle e colaboradores⁽⁴²⁾ avaliaram vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com diabetes melito tipo 1 de longa duração sem complicações crônicas, comparando com pacientes diabéticos do tipo 2 e controles normais, verificando disfunção endotelial apenas no grupo de indivíduos com diabetes tipo 2⁽⁴²⁾. Estudos invasivos, realizados antes desse, já haviam demonstrado diminuição da vasodilatação endotélio-dependente em pacientes com diabetes tipo 2^(10, 13, 15). Os mecanismos afetando o endotélio podem ser diferentes nos indivíduos com diabetes tipo 1 e 2. Enquanto anormalidades na síntese e liberação de óxido nítrico parecem ser os mecanismos mais prováveis da disfunção endotelial nos indivíduos com diabetes tipo 1, os dados a respeito do tipo 2 sugerem que haja predominantemente maior inativação do óxido nítrico. Ou, ainda, respostas anormais da vasculatura ao óxido nítrico, bloqueando a vasodilatação⁽¹³⁾.

A disfunção endotelial pode ser avaliada pela determinação de marcadores biológicos, como o fator de von Willebrand, a endotelina-1, o PAI-1 e a expressão de moléculas de adesão nos diferentes estados pró-aterogênicos. Níveis elevados da endotelina-1 e do fator de von Willebrand já foram verificados nos pacientes com diabetes tipo 2⁽⁴³⁾. Além disso, nos pacientes com diabetes tipo 2, o fator de von Willebrand tem valor preditivo para a mortalidade macrovascular⁽⁴⁴⁾.

Makimattila e colaboradores⁽⁴⁵⁾ avaliaram a vasodilatação endotélio-dependente e independente em obesos com diabetes tipo 2, procurando verificar quais determinantes poderiam ser mais importantes para a disfunção endotelial nesse grupo de indivíduos⁽⁴⁵⁾. Confirmaram redução da resposta vasodilatadora à infusão de acetilcolina nos diabéticos em relação aos controles. A concentração de antioxidantes era comparável nos dois grupos. No grupo dos diabéticos tipo 2, o tamanho das partículas LDL foi o principal determinante da função endotelial⁽⁴⁵⁾. Nesse sentido, um trabalho realizado em nosso laboratório comparou marcadores de disfunção endotelial em três grupos de indivíduos, todos

normotensos, normoalbuminúricos e não-fumantes: diabéticos tipo 2 e dislipidêmicos sem uso de insulina, dislipidêmicos não-diabéticos sem uso de hipolipemiantes e controles normais. Os pacientes com diabetes tipo 2 com dislipidemia apresentaram níveis mais elevados de endotelina-1 e fator de von Willebrand em relação aos demais grupos, mesmo com a correção para idade, índice de massa corporal e peptídeo C, sugerindo risco maior para o endotélio quando da associação de duas situações de risco, como diabetes tipo 2 e dislipidemia⁽⁴⁶⁾.

INSULINA E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

A insulina estimula a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, tendo, portanto, efeito vasodilatador. Há evidências de que esse efeito vasodilatador é relacionado à habilidade das células do músculo em captar glicose e a regulação da pressão arterial⁽⁴⁷⁾. Baron⁽⁴⁸⁾ demonstrou em indivíduos magros, obesos e diabéticos tipo 2 que o aumento de fluxo nos membros correlaciona-se diretamente com a captação de glicose, e que esse efeito era completamente bloqueado com a inibição do óxido nítrico. Demonstrou ainda que obesos sem diabetes tipo 2 tinham disfunção endotelial semelhante aos indivíduos com diabetes tipo 2, sugerindo que, nesse tipo de diabetes, a obesidade e não a hiperglicemia em si contribui para maior disfunção endotelial⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. É possível que o distúrbio comum da resistência à captação da glicose e a menor produção de óxido nítrico ocorram porque essas duas ações da insulina são mediadas pela mesma via metabólica. Assim, um defeito comum nesse processo metabólico poderia resultar em resistência à insulina no músculo e disfunção endotelial⁽⁴⁷⁾. Além disso, é possível que muitos componentes associados à síndrome da resistência à insulina reduzam a atividade do óxido nítrico endotelial. A hipertensão, o LDL oxidado, a hipertrigliceridemia e o HDL baixo têm sido independentemente relacionados à disfunção endotelial⁽⁴⁷⁾.

A insulina, além de seus efeitos vasodilatadores (bloqueados ou reduzidos nos quadros insulino-resistentes), tem efeitos sobre a musculatura lisa dos vasos que são potencialmente pró-aterogênicos, como a produção de PAI-1 e os estímulos para migração e crescimento celular^(47, 50-52). A insulina estimula maior produção de endotelina-1, com seus potentes efeitos vaso-

constritores, e níveis elevados desse peptídeo também têm sido demonstrados em indivíduos com diabetes tipo 2 e outros estados insulino-resistentes^(53, 54). Além disso, a correlação negativa entre os níveis de endotelina-1 circulantes e a captação total de glicose sugere que esse peptídeo possa, em nível tecidual, exercer efeitos negativos na sensibilidade dos tecidos à insulina⁽⁵³⁾.

Portanto, uma vez que os estados de resistência à insulina estão associados à redução da resposta vasodilatadora associada a esse hormônio, e esse efeito é dependente do óxido nítrico, a melhora da sensibilidade à insulina poderia determinar melhora na disfunção endotelial. Com essa hipótese, Tack e colaboradores⁽⁵⁵⁾ administraram troglitazona a pacientes obesos em um ensaio clínico duplo-cego. Ao final de oito semanas, mediram, por meio de pletismografia, as respostas à infusão intra-arterial de acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Avaliaram ainda a sensibilidade à insulina e as respostas vasoconstritoras do óxido nítrico ao L-NMMA durante hiperinsulinemia, além de monitorização da pressão arterial de 24 horas. Os obesos eram insulino-resistentes em relação aos controles. Houve melhora da resistência à insulina com troglitazona, mas a vasodilatação levemente comprometida no grupo dos obesos não melhorou com a troglitazona. Nesse experimento, ao contrário dos trabalhos de Baron e colaboradores⁽⁴⁹⁾, não houve diferença na vasodilatação endotélio-dependente e endotélio-independente nos obesos em re-

lação aos controles magros, e a melhora da sensibilidade à insulina não se associou a aumento da vasodilatação com a infusão de acetilcolina. Com esses dados, os autores não favorecem a associação entre função endotelial e resistência à insulina⁽⁵⁵⁾, embora esta tenha sido uma intervenção de curto prazo, em um número pequeno de indivíduos. É possível que um "terceiro fator", ainda a ser definido, possa ser a via comum entre a resistência à insulina e a disfunção endotelial⁽⁵⁶⁾.

CONCLUSÕES

O estado diabético confere risco maior para doença cardiovascular. Examinando-se mais especificamente a disfunção endotelial como elemento inicial e essencial ao desenvolvimento da doença aterosclerótica, entende-se que a interação dos diversos distúrbios metabólicos presentes no diabetes melito contribui de forma intensa para o dano progressivo ao endotélio. Dentre esses fatores destaca-se a insulina e os distúrbios relacionados ao óxido nítrico. Considerando a disfunção endotelial como um evento precoce, o diagnóstico desse distúrbio poderia servir para definir estratégias agressivas de modulação dos diversos fatores metabólicos envolvidos. Nesse sentido, o estudo de marcadores biológicos presentes no plasma que indiquem a presença de dano endotelial torna-se uma alternativa futura para monitorizar intervenções precoces na progressão da doença aterosclerótica.

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND DIABETES MELLITUS

Beatriz G. Santos Seligman, Nadine Clausell

Diabetes mellitus is associated with increased cardiovascular risk and it appears that progression and severity of atherosclerosis in diabetes is also increased. Endothelial dysfunction is an early event in atherosclerosis and is triggered once one or more risk factors are present. Thus, diabetes mellitus type 1 and 2 and the insulin resistance syndrome have been intensely associated with the development of endothelial dysfunction. In this manuscript, experimental and clinical studies addressing these issues as well the role of hyperglycemia and insulin in the development of endothelial dysfunction are reviewed. Also, distinct features of type 1 and 2 diabetes mellitus related to the vascular endothelium are addressed as well as the different biological markers used to study endothelial function.

Key words: endothelium, nitric oxide, atherosclerosis.

Rev Bras Hipertens 1999;3:288-95

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
2. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986;315:1046-51.
3. Sorensen KE, Celermajer DS, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to lipoprotein(a) level. *J Clin Invest* 1994;93:50-5.
4. De Meyer G, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Progr Cardiovasc Dis* 1997;39:325-42.
5. Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diab Rev* 1997;5:294-315.
6. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44.
7. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997;350:9-13.
8. Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1986;132:75-8.
9. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-8.
10. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-6.
11. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthesis in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992;90:2548-54.
12. Elliot TG, Cockerft JR, Groop PH, Viberti GC, Ritter JM. Inhibition of nitric oxide synthesis in the human forearm vasculature of insulin-dependent diabetic patients: blunted vasoconstriction in patients with microalbuminuria. *Clin Sci* 1993;85:687-93.
13. Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:567-74.

14. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996;97:22-8.
15. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:771-6.
16. Tesfamarian B, Jakubowski JA, Cohen RA. Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium-derived $\text{PGH}_2/\text{TxA}_2$. *Am J Physiol* 1989;257:3272-7.
17. Lash JM, Bohlen HG. Structural and functional origins of suppressed acetylcholine vasodilation in diabetic rat intestinal arterioles. *Circ Res* 1991;69:1259-68.
18. Cosentino F, Lüscher TF. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:S54-S61.
19. Tesfamarian B, Brown ML, Deykin ML, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990;85:929-32.
20. Tesfamarian B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein-kinase C. *J Clin Invest* 1991;87:1643-8.
21. Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: the role of oxidative glucosylation in diabetes. *Biochem J* 1987;245:234-50.
22. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K, Kanno M. Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991;261(4Pt2):H1086-H1094.
23. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. *Am J Physiol* 1994;266:H1153-H1161.
24. Tesfamarian B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992;263(2Pt2):H321-H326.
25. Pieper GM, Dembny W, Siebeneich W. Long-term treatment in vivo with NOX-101, a scavenger of nitric oxide, prevents diabetes-induced endothelial dysfunction. *Diabetologia* 1998;41:1220-6.
26. Timimi FK, Ting HH, Haley EA, Roddy M, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:552-7.
27. Gazis A, White DJ, Page SR, Cockerott JR. Effect of oral vitamin E (alpha-tocopherol) supplementation on vascular endothelial function in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999;16:304-11.
28. Saenz de Tejada I, Goldstein I, Azadzoi K, Krane RJ, Cohen RA. Impaired neurogenic and endothelium-mediated relaxation of penile smooth muscle from diabetic men with impotence. *N Engl J Med* 1989;320:1025-30.
29. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptekar E, Attali J. Impairment of coronary vascular reserve and Ach-induced coronary vasodilation in diabetic patients and angiographically normal coronary arteries and normal ventricular systolic function. *Diabetes* 1993;42:1017-25.
30. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased expression of tumor necrosis factor-alpha in diabetic macrovasculopathy. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:145-51.
31. Williams SB, Goldfine AB, Timini FK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998;97:1695-701.
32. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, et al. Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:146-54.
33. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reverted by L-arginine. *Circulation* 1997;95:1783-90.
34. Smits P, Kapma J, Jacobs M, Lutterman J, Tien T. Endothelium-dependent vascular relaxation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 1993;42:148-53.
35. McNally PG, Watt PAC, Rimmer T, Burden AC, Hearnshaw JR, Thurston H. Impaired contraction and endothelium-dependent relaxation in isolated resistance vessels from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Sci* 1994;87:31-6.
36. Halkin A, Benjamin N, Doktor HS, Todd SD,

- Viberti GC, Riter JM. Vascular responsiveness and cation exchange in insulin-dependent diabetes. *Clin Sci* 1991;81:223-32.
37. Clarkson P, Celermajer DS, Donalckd AE, Sampson M, Sorensen KE, Adams M, et al. Impaired vascular reactivity in insulin-dependent diabetes mellitus is related to disease duration and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:573-9.
38. Chowienczyk PJ, Watts GF, Brett SE, Ritter JM. Sex differences in endothelial function in normal and hypercholesterolemic subjects. *Lancet* 1994;344:305-6.
39. Makkimatila S, Mantysaari M, Groop P, Summanen P, Virkamäki A, Schlendza A, et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1997;95:618-25.
40. Huvers FC, De Leeuw PW, Houben AJ, De Haan CH, Hamulyak K, Schouten H, et al. Endothelium-dependent vasodilation, plasma markers of endothelial function, and adrenergic vasoconstrictor responses in type 1 diabetes under near-normoglycemic conditions. *Diabetes* 1999;48:1300-7.
41. Hsue WA, Law RE. Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am J Med* 1998;105:4S-14S.
42. Enderle MD, Benda N, Schmuelling RM, Haring HU, Pfohl M. Preserved endothelial function in IDDM patients, but not in NIDDM patients, compared with healthy subjects. *Diabetes Care* 1998;21:271-7.
43. Morise T, Takeuchi Y, Kawano M, Koni I, Takeida R. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1995;18:87-9.
44. Standl E, Balletshoffer B, Dahl B, Weichenhain B, Stiegler H, Hörmann A, et al. Predictors of 10-year macrovascular and overall mortality in patients with NIDDM: the Munich General Practitioner Project. *Diabetologia* 1996;39:1540-5.
45. Makimattila S, Liu M, Vakkilainen J, Schlenzka A, Lahdenpera S, Syvanne M, et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in type 2 diabetes. Relation to LDL size, oxidized LDL, and antioxidants. *Diabetes Care* 1999;22:973-81.
46. Seligman BGS, Biolo A, Oliveira J, Niederauer C, Araujo M, Foppa M, et al. Endothelial dysfunction in diabetes, dyslipidemia and normal controls: a controlled non-invasive evaluation. *Diabetes* 1998;47:A53 [resumo].
47. Hsueh WA, Quiñones MJ, Creager MA. Endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Rev* 1997;5:343-52.
48. Baron AD. Insulin and the vasculature: old actors, new roles. *J Invest Med* 1996;44:406-12.
49. Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man: a novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest* 1990;85:1844-52.
50. Juhan-Vague I, Alessi MC. PAI-1, obesity, insulin resistance and risk of cardiovascular events. *Thromb Haemost* 1997;78:656-60.
51. Hsueh WA, Law RE. Insulin signaling in the arterial wall. *Am J Cardiol* 1999;84:21J-24J.
52. Baron AD. Vascular reactivity. *Am J Cardiol* 1999;84:25J-27J.
53. Ferri C, Carlomagno A, Coassin S, Roberta B, Cassone Faldeta MR, Laurenti O, et al. Circulating endothelin-1 levels increase during euglycemic hyperinsulinemic clamp in lean NIDDM men. *Diabetes Care* 1995;18:226-33.
54. Ferri C, Pittoni V, Piccoli A, Laurenti O, Cassone MR, Bellini C, et al. Insulin stimulates endothelin-1 secretion from human endothelial cells and modulates its circulating actions in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:829-35.
55. Tack CJJ, Ong MKE, Lutterman JA, Smits P. Insulin-induced vasodilation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone. *Diabetologia* 1998;41:569-76.
56. Cleland SJ, Petrie JR, Ueda S, Elliot HL, Connel JM. Insulin as a vascular hormone: implications for the pathophysiology of cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998;25:175-84.